MLPA®法の全般的なプロトコル

使用説明書

DNA 配列の検出と定量を目的とした、
MLPA(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)法の全般的なプロトコル

このプロトコルには、信頼性の高い MLPA 結果を得るために不可欠な情報が含まれています。全文を読み、適切な MLPA プローブミックスの製品説明書と併せて、ご参照ください。

SALSA MLPA® 試薬キットと Coffalyser.Net 解析ソフトは、特定の国々において、体外診断用医薬品（IVD）に登録されています（www.mrcholland.com 参照）。他のすべての国々では、本製品の使用は、研究目的（RUO）に限定されます。IVD 登録されたプローブミックスを診断目的で使用する際は、SALSA MLPA® 反応試薬キットおよび Coffalyser.Net 解析ソフトと併せてご使用ください。各国ごとのプローブミックスの IVD 登録状況は、適切なプローブミックス固有の製品説明書と www.mrcholland.com をご覧ください。

DNA のコピー数とメチル化度合を検出する方法(MS-MLPA 法)には、別のプロトコルがあります。このプロトコルは、www.mrcholland.com で閲覧できます。

製造元: MRC Holland B.V. Willem Schoutenstraat 1, 1057 DL Amsterdam, The Netherlands
Webサイト: www.mrcholland.com; 電話番号: +31 888 657 200
Eメール: info@mrcholland.com (インフォメーションおよび技術的な質問), order@mrcholland.com (注文)

目次

1. はじめに

コピー数多型 (CNVs) は、ヒト DNA の遺伝的変異の主な原因であり、多くの疾患に関与しています。Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®) は、一度のマルチプレックス PCR ベースの反応で最大 60 もの DNA 配列の相対コピー数を決定する、半定量的かつ非自動の実験手法です。

1.1. SALSA MLPA 法の構成試薬と保管条件

1.1.1. 反応試薬キットの品番

品番	説明	反応数	蛍光標識された **PCR** プライマー
EK1-FAM or EK1-Cy5	SALSA MLPA EK1 reagent kit	100	FAM or Cy5
EK5-FAM or EK5-Cy5	SALSA MLPA EK5 reagent kit	500	FAM or Cy5
EK20-FAM	SALSA MLPA EK20 reagent kit	2000	FAM

1.1.2.反応試薬キットの構成

試薬キット構成	容量 EK1	EK5	EK20	成分[1]
SALSA MLPA Buffer (黄色キャップ)	180 µl	5×180 µl	5×700 µl	KCl, Tris-HCl, EDTA, PEG-6000, DTT, オリゴヌクレオチド
SALSA Ligase-65 (緑色キャップ)	115 µl	5×115 µl	5×460 µl	グリセロール, EDTA, DTT, KCl, Tris-HCl, 非イオン性界面活性剤, Ligase-65 酵素 (バクテリア由来)
SALSA Ligase Buffer A (透明キャップ)	360 µl	5×360 µl	5×1420 µl	コエンザイム NAD (バクテリア由来)
SALSA Ligase Buffer B (白色キャップ)	360 µl	5×360 µl	5×1420 µl	Tris-HCl, $MgCl_2$, 非イオン性海面活性剤
SALSA PCR Primer Mix (茶色キャップ)	240 µl	5×240 µl	5×940 µl	(FAM または Cy5 で) 蛍光標識された合成オリゴヌクレオチド, dNTPs, Tris-HCl, KCl, EDTA, 非イオン性界面活性剤
SALSA Polymerase (オレンジ色キャップ)	65 µl	5×65 µl	5×240 µl	グリセロール, 非イオン性界面活性剤, EDTA, DTT, KCl, Tris-HCl, 複製酵素 (バクテリア由来)

1.1.3.アプリケーション別の MLPA プローブミックス

アプリケーション別の MLPA プローブミックス	取り扱い容量 (R=反応数)	成分
Probemix* (黒色キャップ)	40 µl (25R), 80 µl (50R), 160 µl (100R)	合成オリゴヌクレオチド, バクテリアから精製されたオリゴヌクレオチド, Tris-HCl, EDTA
Sample DNA# (SD) (青色キャップ)	30 µl or 100 µl	Tris-HCl, EDTA, 合成/コントロールプラスミド DNA, ヒト女性ゲノム DNA, 細胞株 DNA

* プローブミックスは、SALSA MLPA 反応試薬キットとの併用に限定して設計されています。
# SD バイアル（リファレンス(選抜)用, ビン設定用, 人工重複 DNA）は一部の MLPA プローブミックスに同梱されていますが、別途ご注文いただくことも可能です。

1.1.4. 保管・保存可能期間

構成試薬は全て、到着次第直ちに、また使用後は、−25℃～−15℃かつ遮光環境で元の梱包のまま、保管しなければなりません。推奨の条件下で保管している場合は、使用期限までの保存が保証され、開封後も期限は変わりません。正確な使用期限は、各バイアルのラベルを確認してください。製品の凍結融解は、25 回以上繰り返してはいけません。

1.1.5.包装表示

	製造元
LOT	ロット番号
	使用期限
Σ	反応数
IVD	体外診断用医薬品

	保管温度
	高温と直射日光を避けて下さい
REF	カタログ番号
i	使用前に説明書を読んで下さい
RUO	研究用

1.2. MLPA 法の原理

MLPA の原理は、最大 60 のプローブの増幅に基づいており、各々のプローブは長さ約 60nt の特異的な DNA 配列を検出します (図 1)[2]. MLPA 反応の結果、長さ 64～500nt のユニークな PCR アンプリコンのセットが得られ、キャピラリー電気泳動によって

[1] いずれの成分も、ヒト, 動物, 病原性細菌由来ではありません。存在する濃度に基づくと、いずれの成分も危険有害性周知基準によって規定される有害物質ではありません。**安全性データシート(SDS)は本製品には必要ありません**：いずれの調製液にも、SDS（EU 規則(EC)No.1272/2008【EU-GHS/CLP】,No.1907/2006【化学物質登録評価許可規則：REACH】および修正事項に記載の通り）の頒布が要求される濃度の危険物（EU 規則(EC)No.1272/2008【EU GHS/CLP】および修正事項に記載の通り）は含まれていません。もしこぼした場合は、水で洗浄して施設の適切な手順に従ってください。

分離されます。初めにサンプル DNA を変性した後、MLPA プローブの混合物をサンプルに添加します。一般的に、各 MLPA プローブを構成する 2 つのオリゴヌクレオチドは、隣り合う標的配列に直接ハイブリダイズし、ライゲーション結合により一本のプローブとなります (図 1).その後の PCR 反応の間に、ライゲーション結合プローブは全て、同じ PCR プライマーのペアを使用して同時に増幅され、結果としてユニークな PCR アンプリコンのセットが得られます。1 つの PCR プライマーが蛍光色素で標識されているため、キャピラリー電気泳動装置によるフラグメント分離を経て増幅産物が可視化されます。フラグメント分離により、サンプルごとの電気泳動図：サンプルの波形が得られます (図 2)。

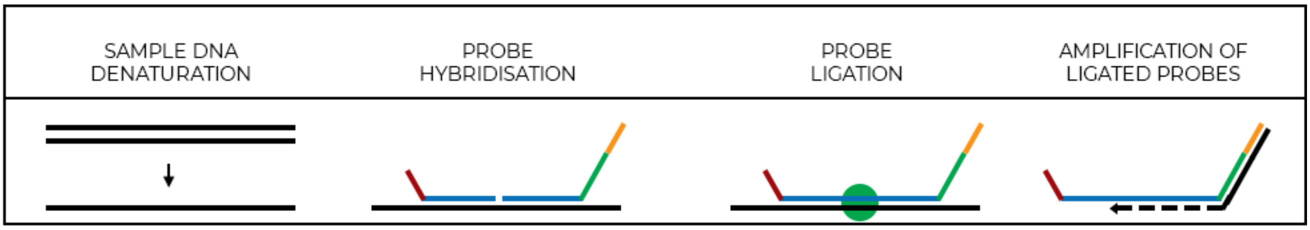


図 1. MLPA 反応

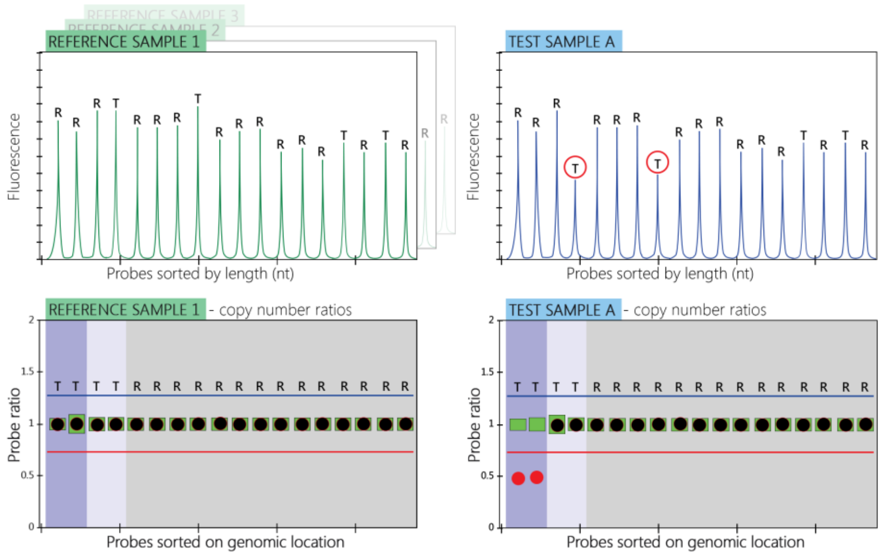
MLPA は相対的な実験手法です: DNA サンプルの MLPA ピークパターンの比較による、相対的な差のみを検出する事ができます。様々なリファレンス DNA サンプルにおけるプローブピークの高さの相対値と比較した、個々のプローブピークの高さの相対値が、サンプルにおける該当の標的配列の相対コピー数を反映しています。そのため、リファレンスサンプルを同じランに含める事が必須になります。1 ヶ所以上の標的配列が欠失している場合は、ピークの高さの相対的な減少により確認でき (図 2)、一方でピークの高さの相対値の増加は、コピー数増加を反映しています。

図 2. MLPA 解析データの結果比較

上: テストサンプル A の電気泳動図 (右) を、リファレンスサンプル集団の電気泳動図 (左) と比較しています。テストサンプル A の 2 つのプローブ (赤い丸の付いた箇所) に相対的な減少がみられます。

下:リファレンスサンプル集団 (左) で標準化し算出された、テストサンプル A (右) の probe ratio 値を Coffalyser.Net のソフト上で表示しています。染色体位置ごとにプローブを並べ替えると、テストサンプルにおいて probe ratio 値が 0.5 となりヘテロ接合性の欠失が認められる (赤い点の箇所) ことが明らかになります。

T: 目的領域に設計されたプローブ、R: リファレンスプローブ。



2. 実験セットアップの手順

2.1. 必要な材料(別途ご準備ください)

- 超純水
- $TE_{0.1}$ (10 mM Tris-HCl pH 8.0 + 0.1 mM EDTA)
- ヒートリッド (99-105°C) を備えたキャリブレーション済みのサーモサイクラー、および標準的な実験設備
- 0.2 ml PCR チューブ, ストリップ (連結キャップ) もしくはプレート
- フラグメント解析ソフトを搭載したキャピラリー電気泳動装置[3]
  - Applied Biosystems 製品: Standard Foundation Data Collection Software
  - SCIEX 製品: GeXP Software Package

[2] Schouten JP et al. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 30:e57.
[3] QIAGEN 社の QIAxcel, Agilent 社の Fragment Analyzer のような、変性状態を利用しないキャピラリー電気泳動装置は、MLPA で使用することはできません。

- 高品質なホルムアミド (例：Hi-Di ホルムアミド, Applied Biosystems 製品)
- 標識されたサイズスタンダード
  - Applied Biosystems 製品: GeneScan™ 500 LIZ®/ROX™ (推奨; 体外診断用医薬品(IVD)登録されたプローブミックスと併せて使用する場合は必須), GeneScan™ 600 LIZ®, GeneScan™ 500 TAMRA™
  - SCIEX 製品: CEQ™ DNA Size Standard Kit - 600
- ポリマー
  - Applied Biosystems 製品 (SeqStudioFlex を含む): POP-4 または POP-7 が推奨です。POP-6 は高分解能のため推奨されません。SeqStudio では POP-1 がカートリッジに組み込まれており、適しています。
  - SCIEX: GenomeLab™ Linear Polyacrylamide (LPA) 変性ゲル
  - Promega Spectrum Compact: Spectrum Compact Polymer4
- Coffalyser.Net 解析ソフト (www.mrcholland.com より無料ダウンロード可)

2.2. サンプルの処理と保管

- 各 MLPA 反応[4]で、総量 50～250 ng (プローブミックスの製品説明書に特に明記しない限り、推奨 50～100 ng)のヒト DNA を 5 µl[5]に溶解して使用してください。必要に応じ、DNA サンプルをエタノール沈殿で濃縮したり、グリコーゲン(Roche 社 型番 901393)をキャリアとして使用することも可能です。詳しい情報については、www.mrcholland.com をご覧ください。
- 初めの 98℃変性ステップ中の脱プリン化を防ぐため、DNA 調製液には 5～10 mM Tris buffer (pH8.0-8.5) が含まれなくてはなりません。例えば、**$TE_{0.1}$**(10 mM Tris-HCl pH 8.0 + 0.1 mM EDTA)にサンプル DNA を溶解／希釈します。十分な緩衝能があるか不明な場合は、Tris-HCl を加えてください (4 µl サンプル DNA + 1 µl 50 mM Tris-HCl pH 8.5)。
- DNA に残存した混入物（NaCl, KCl (40 mM 以上)やその他塩類, フェノール, エタノール, ヘパリン, EDTA (1.5 mM 以上), 鉄）は、MLPA の性能に影響する可能性があります。MLPA はモノプレックス PCR アッセイよりも不純物への感受性が高いです。蒸発や SpeedVac によって DNA を濃縮してはいけません；EDTA や塩の濃度が高くなり得ます。
- 抽出方法, 組織タイプ, DNA 濃度, 処理手順について、テストサンプル・リファレンスサンプルで極力同様になるようにしてください。
- 高濃度の混入物が残存しない抽出方法にしてください。多量の塩が残存してしまうため、QIAGEN M6,M48,M96 システムは使用しないでください。QIAGEN EZ1 については、*QIAGEN Supplementary Protocol: Purification of genomic DNA from whole blood, optimized for use in MRC-Holland MLPA® assays, using EZ1® DNA Blood Kits* を使用してください (www.mrcholland.com 参照)。MRC Holland 社が検証済みで推奨する抽出方法は以下の通りです：
  - QIAGEN Autopure LS (自動) と QIAamp DNA mini/midi/maxi kit (用手)
  - Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (用手)
  - 塩析法 (用手)
- ヘパリン血は、混入ヘパリンを除去する精製方法 (例：Nucleospin gDNA Clean-up XS) を経た場合に限り、使用できます。
- RNAse 処理は、サンプル組織において高発現している検査対象遺伝子を研究する場合にのみ必要不可欠となります。例：血液抽出サンプルにおける HBA, HBB 遺伝子; (ミトコンドリアの)リボソーム RNA 遺伝子 (全組織)
- 一部の場合においては、SALSA Sample Stabilising Solution (S4; カタログ No SMR04, SMR45) (研究用)を添加すると MLPA 反応の質が改善されるかもしれません。詳細は、www.mrcholland.com の製品説明書を参照ください。
- 全ゲノム増幅反応(WGA)で得られた DNA は増幅バイアスがかかっているため、MLPA での使用には適していません。
- サンプルは分注して－20℃で保管してください。微生物によるコンタミネーションにより、4℃で長期間保管したサンプルが劣化することがあります。

2.3. リファレンスサンプルおよびその他コントロールサンプルの選択

- リファレンスサンプルの選択。リファレンスサンプルは、ターゲットプローブおよびリファレンスプローブにより検出される配列が正常コピー数である健常人から得られた DNA サンプルです。リファレンスサンプルとテストサンプルは、抽出方法, サンプル由来, その他全ての面において可能な限り同様にする必要があります。全てのプローブミックスがあらゆる由来の DNA での使用に適しているわけではありませんので、ご了承ください (例：ホルマリン固定されたパラフィン包埋(FFPE)組織)。適切な DNA の由来について、プローブミックスの製品説明書を常に確認してください。
- リファレンスサンプル。各 MLPA 実験には、少なくとも 3 つのリファレンスサンプルを含める必要があります。21 サンプル以上を検査する場合は、テストサンプルが 7 つ加わるごとに、リファレンスサンプルをさらに 1 つ含めてください。変動を最小限に抑えるため、実験においてリファレンスサンプルをランダムに分散させて配置してください。MLPA の各ラン内での各プローブの再現性を評価するためには、**複数のリファレンスサンプルを測定**することが必要です。

[4] 吸光度(260 nm)の測定においては、例えば RNA のコンタミネーションにより、DNA 濃度が高く見積もられることがしばしばあります。DNA 量が十分であったか否かは、Q フラグメントに基づいて評価されます（項 8.1.で説明）。

[5]サンプル DNA は 1 反応あたり 5 µl 以上添加しないでください。DNA を 5 µl 以上添加すると、MLPA プローブと塩の濃度が低下します。これにより、ハイブリダイゼーションの反応速度や、MLPA プローブとサンプル DNA の結合安定性が低下します。

- 市販 DNA。サンプルの質が疑われる場合は、比較のため市販 DNA サンプルを 1 つ以上含めてください。MRC Holland 社では、Promega 社の男性 DNA(カタログ No. G1471)と女性 DNA(カタログ No. G1521)を推奨しています。市販 DNA は、サンプルの質を確認するためのコントロールとしての使用に限るべきであり、リファレンスサンプルとしては使用できません。
- DNA を含まないコントロール。MLPA の各ランに、DNA を含まないコントロール(no-DNA control)を含めることが推奨されます。TE, MLPA 試薬, 電気泳動関連試薬やキャピラリーのコンタミネーションの有無を確認するため、DNA 5 µl を $TE_{0.1}$ (10 mM Tris-HCl pH 8.0 + 0.1 mM EDTA)に置き換えてください。
- 陽性コントロールサンプル。陽性コントロールサンプルを入手可能な場合は、含めることが推奨されます。MRC Holland 社は陽性サンプルを提供しませんが、市販の陽性サンプルのリストは www.mrcholland.com から入手可能です。細胞株由来の DNA を使用する場合、細胞株が、染色体全領域のゲインやロスを含めた更なるコピー数変化を獲得している可能性もありますのでご留意ください。

3. 始める前にお読みください

- 解凍したバッファーとプローブミックスは常にボルテックスし、その後に短時間の遠心を行います。酵素試薬のチューブは全て、短時間の遠心を行う必要があります。MLPA buffer は−20℃では通常凍結していますが、塩濃度が高いために液体のままである可能性もあります。
- 酵素バイアル(Ligase-65 とポリメラーゼ)は、粘度を低下させるため、使用前に手で 10 秒温めてください。
- 酵素溶液は 50%グリセロールを含有し、−20℃では液体です。酵素を含むマスターミックスは、穏やかに上下にピペッティングしてよく混和する必要があります。混和が不完全であれば、信頼性の低い結果になり得ます。マスターミックスを準備する時は、酵素を常に最後に添加してください。酵素の不活化が起こり得るため、**酵素を含む溶液のボルテックスは厳禁です。**
- サンプル誤差を最小限に抑えるため、十分量(5~10%余分に)のマスターミックス溶液を準備ください。
- マスターミックス(Ligase-65 とポリメラーゼ)は、使用直前に室温(RT)で準備ください。使用する 1 時間以上前に準備した場合は、マスターミックスを氷上もしくは 4℃で保管ください。マスターミックスは、MLPA 反応液に添加する前に室温まで温める必要があります。非常に冷たいライゲースマスターミックスが添加された場合、no-DNA control の反応において非特異ピークが形成される可能性があります。
- 過度の蒸発を避けるため、マルチチャンネルピペットを使用してください。
- 実験室での MLPA 反応の実施方法に関する動画は、www.mrcholland.com からご覧いただけます。

4. 良好な MLPA 結果を得るための重要ポイント

- 全ての DNA サンプルに 5-10 mM Tris-HCl(pH 8-8.5)が含まれていることを確認します。(項 2.2)
- テストサンプルと同じタイプの組織から抽出し同様に処理したリファレンスサンプルを、毎回の MLPA 実験で少なくとも 3 つ含めます。(項 2.3)
- 試薬を正確にピペッティングすることが、信頼性の高い結果を得るためには不可欠です。ハイブリダイゼーションマスターミックス 3 µl の作成時に、これは特に重要となります。(項 6)
- Coffalyser.Net をデータ解析に使用します。(項 9)
- クオリティフラグメントを確認します。サンプル DNA の完全な変性が必須です。(項 8)
- キャピラリー電気泳動装置(CE device)の定期保守点検を実行し、キャピラリーやポリマーを製造元の推奨通りに取り替えます。 (項 7)

5. MLPA プロトコル – 簡易版

1. DNA 変性
    - DNA サンプル 5 µl の熱処理(98℃ 5 分)
2. プローブとサンプル DNA のハイブリダイゼーション
    - 室温まで冷却し、チューブを開く
    - ハイブリダイゼーションマスターミックス* 3 µl を加える
    - インキュベート(95℃ 1 分)後、ハイブリダイゼーション(60℃ 16 時間)
3. ハイブリダイズ結合プローブのライゲーション
    - サーモサイクラーの温度を 54℃に下げ、チューブを開く
    - Ligase-65 マスターミックス* 32 µl を加えた後、インキュベート(54℃ 15 分)
    - ライゲース酵素失活の熱処理(98℃ 5 分)
4. ライゲーション結合プローブの PCR 増幅
    - 室温まで冷却し、チューブを開く
    - 室温でポリメラーゼマスターミックス* 10 µl を加える
    - PCR 開始 ({95°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C 60 秒} x 35 サイクル後, 72°C 20 秒, 15°C pause)
5. キャピラリー電気泳動によるフラグメント分離
6. Coffalyser.Net による結果の解析

* マスターミックス：
- ハイブリダイゼーション: SALSA probemix 1.5 µl + MLPA buffer 1.5 µl（1 反応あたり）
- Ligase-65: Ligase buffer A 3 µl + Ligase buffer B 3 µl + 超純水 25 µl + Ligase-65 1 µl（1 反応あたり）
- ポリメラーゼ: 超純水 7.5 µl + PCR primer mix 2 µl + SALSA polymerase 0.5 µl（1 反応あたり）

6. MLPA プロトコル

6.1. MLPA 反応用のサーモサイクラープログラム

DNA 変性				
1.	98°C	*5 分*		
2.	25°C	*pause*		
ハイブリダイゼーション反応				
3.	95°C	*1 分*		
4.	60°C	*16 ～20 時間*		
ライゲーション反応				
5.	54°C	*pause*		
6.	54°C	*15 分*		
7.	98°C	*5 分*		
8.	20°C	*pause*		
PCR 反応				
9.	35 サイクル:	•	95°C	*30 秒*
		•	60°C	*30 秒*
		•	72°C	*60 秒*
10.	72°C	*20 分*		
11.	15°C	*pause*		

Note:プローブミックス固有の製品説明書に特に明記しない限り、このサーモサイクラープログラムに従ってください。

6.2. DNA 変性 (1 日目)

- 0.2 ml チューブの他, ストリップ（連結キャップ）または プレートをラベルします。
- 各チューブに DNA サンプル（50～250 ng；推奨は 50～100 ng）もしくは TE（no-DNA control の場合） 5 µl を加えます。
- サーモサイクラーにチューブをセットします; MLPA サーモサイクラープログラムのステップ 1～2 を開始します（項 6.1 参照）。
- サーモサイクラーが 25℃になっていることを確認してから、チューブを取り出します。

6.3. ハイブリダイゼーション反応 (1 日目)

- ハイブリダイゼーションマスターミックスを準備します。1 反応あたり、MLPA buffer (黄色キャップ) 1.5 µl + probemix (黒色キャップ) 1.5 µl を混合します。ピペッティングもしくはボルテックスにより、よく混和します。
- DNA 変性後、ハイブリダイゼーションマスターミックス 3 µl を各反応液に添加します。正確なピペッティングが重要です。穏やかに上下にピペッティングしてよく混和します。
- サーモサイクラープログラムをステップ 3～4 に進めます。

6.4. ライゲーション反応 (2 日目)

- Ligase-65 マスターミックスを準備します。1 反応あたり、超純水 25 µl + ligase buffer A (透明キャップ) 3 µl + ligase buffer B (白色キャップ) 3 µl を混合した後、Ligase-65 酵素 (緑色キャップ) 1 µl を添加します。穏やかに上下にピペッティングしてよく混和します。
- サーモサイクラープログラムをステップ 5 に進めます。
- サーモライクラーが 54°C で**サンプルがサーモサイクラーにセットされている状態**で、Ligase-65 マスターミックス 32 µl を　各 MLPA 反応液に添加します。穏やかに上下にピペッティングしてよく混和します。
- サーモサイクラープログラムをステップ 6～8 に進めます。

6.5. PCR 反応 (2 日目)

- ポリメラーゼマスターミックスを準備します。1 反応あたり、超純水 7.5 µl + SALSA PCR primer mix (茶色キャップ) 2 µl を混合した後、SALSA polymerase (オレンジ色キャップ) 0.5 µl を添加します。穏やかに上下にピペッティングしてよく混和します。
- **室温で、**ポリメラーゼマスターミックス 10 µl を各 MLPA 反応液に添加します。穏やかに上下にピペッティングしてよく混和します。**直ちに**チューブをサーモサイクラーにセットし、サーモサイクラープログラムをステップ 9～11 に進めます。

- PCR 反応後は、サーモサイクラーが置かれている部屋ではチューブを開かないでください。コンタミネーションを避けるため、MLPA 反応の実施時と MLPA-PCR 産物の取り扱い時でマイクロピペットを使い分けてください。
- PCR 産物は 4℃遮光環境下で 1 週間保存できます。より長期間になる場合は、－25℃ ～ －15℃で保管してください。

7. キャピラリー電気泳動によるフラグメント分離

7.1. 始める前にお読みください

- サイズスタンダード, 泳動条件, ポリマー, 蛍光色素および MLPA-PCR 産物量は、キャピラリー電気泳動装置のタイプによって決まります。貴施設のキャピラリー電気泳動装置において、アプリケーション, ポリマー, キャピラリー長に適用されるフラグメント解析の初期設定を使用してください。フラグメント分離を適切に実施するためには、装置設定の最適化が必要となるかもしれません。
- 製造元の推奨に従い、キャピラリーとポリマーを定期的に交換してください。ポリマーは、25℃以上の環境に長期間曝されると急速に劣化します。サイズスタンダードのピークが低くなり広がることが何度もある場合は、キャピラリーやポリマーが劣化しているかもしれません。
- 高品質なホルムアミドを使用し、分注して－20℃で保管してください。ホルムアミドは酸性度が高くなることがあり、熱処理の際に DNA 脱プリン化や断片化が起こる要因となり得ます。

7.2. 電気泳動の仕様

機器	プライマー色素	キャピラリー	注入混合液
SCIEX CEQ-2000 CEQ-8000 CEQ-8800 GeXP	Cy5	33 cm	PCR 産物 1 µl[a] CEQ サイズスタンダード – 600 0.5 µl[b] HiDi ホルムアミド もしくは Beckman SLS 28.5 µl 高品質なミネラルオイルを 1 滴加えます。
ABI-Prism 3100 (Avant) ABI-3130 (xL) ABI-3500[c] (xL) ABI-3730 (xL) ABI-SeqStudio Flex Hitachi DS3000 Promega Spectrum Compact	FAM	36, 50 cm	PCR 産物 0.7 µl[a] サイズスタンダード GS 500ROX 0.3µl もしくは 500LIZ 0.2µl HiDi ホルムアミド 9 µl インジェクションプレートを密封します。86℃で 3 分間熱処理し、4℃で 2 分間冷却します。[d]
ABI-SeqStudio	FAM	28 cm	PCR 産物 0.8 µl[a] サイズスタンダード GS 500ROX もしくは 500LIZ 0.3µl HiDi ホルムアミド 12 µl インジェクションプレートを密封します。86℃で 3 分間熱処理し、4℃で 2 分間冷却します。[d]

[a] 添加する PCR 産物の量が、注入混合液の総量の 10%を超えないようにします。
[b] 必要に応じて、サイズスタンダードの量を減らします。
[c] ABI-3500 ご使用の場合：run voltage を 15 kV に設定し、run time を十分確保します。
[d] キャピラリー電気泳動前に、注入混合液を短時間熱処理する事が推奨されます。

下表では、キャピラリー電気泳動装置の最適, 最小, 最大シグナル範囲についてまとめています。もしもシグナルがこれらの値から外れる場合は、誤った結果になることがあります。フラグメント解析設定の最適化が必要となるかもしれません。

機器	最適シグナル範囲（相対蛍光単位: RFU）	最小シグナル強度（相対蛍光単位: RFU）	最大シグナル強度（相対蛍光単位: RFU）
SCIEX CEQ もしくは GeXP	9,375 - 136,000	3000	170,000
ABI 310, 3100 & 3130 シリーズ	375 - 6,000	200	7,500
ABI 3500, 3730 シリーズ, SeqStudio, SeqStudio Flex; Hitachi DS3000, Promega Spectrum Compact	375 - 24,800	300	31,000

8. MLPA クオリティコントロール(品質管理)とトラブルシューティング

8.1. MLPA におけるクオリティコントロール(品質管理)フラグメント

Coffalyser.Net は、最低限の品質要件を満たしていることを保証するコントロールフラグメントのチェックを自動で実行してくれるため、MLPA データ解析には Coffalyser.Net を使用すべきです！MLPA プローブミックスには、MLPA 解析結果に影響するかもしれない問題の有無を知らせてくれるクオリティコントロールフラグメントが含まれます。クオリティコントロールフラグメントを含めた MLPA 反応のクオリティを、クオリティコントロールのフローチャート(項 8.4)を使用して評価します。品質要件を満たすデータのみが、MLPA 結果解釈に適しています。品質評価に役立てるための、E ラーニングモジュール【MLPA quality control fragments】と【MLPA troubleshooting wizard】をオンライン www.mrcholland.com で利用可能です。

下記の通り、ほぼ全ての SALSA MLPA probemix にコントロールフラグメント 9 つが含まれています：

名称	塩基長 (nt)	説明
基準フラグメント（Benchmark fragment）	92	他のクオリティコントロールフラグメントの比較対象となる基準です。
量評価フラグメント（Q-fragments）	64, 70, 76, 82	DNA 量が少な過ぎたりライゲーション失敗の場合、**高く**出ます。Q フラグメントシグナルの中間値が、92nt 基準フラグメントの 33%以上 → DNA 量が不十分もしくはライゲーション失敗。 図 3 を参照してください。
変性評価フラグメント（D-fragments）	88, 96	サンプル DNA の変性が不十分の場合、**低く**出ます。92nt 基準フラグメントの 50%以下 → DNA 変性が不十分。 図 4 を参照してください。
X, Y フラグメント	100, 105	サンプルの取り違い確認のためのコントロール。[6]

Q フラグメント

Q フラグメント 4 本(64,70,76,82 nt)は、十分量の DNA を加えたか、ライゲーションが成功したかの指標となります。Q フラグメントは PCR で増幅するため、DNA にハイブリダイズしたりライゲーション結合される必要はありません。より多くのサンプル DNA が反応するほど、Q フラグメントの高さが低くなります（図 3）。

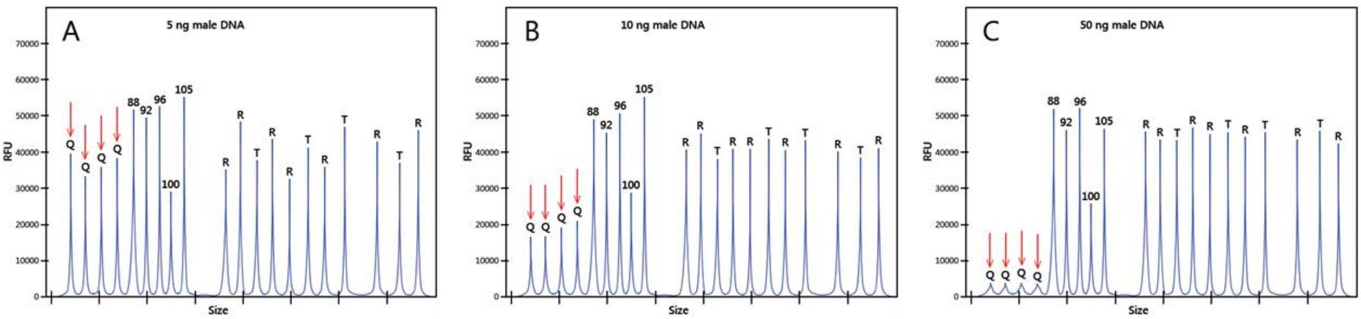


図 **3.** DNA 量が Q フラグメントに及ぼす影響。サンプル DNA の添加量が多くなるほど、Q フラグメントは低くなります。DNA を【A. 5 ng, B. 10 ng, C. 50 ng】添加した場合。サンプル A,B は DNA 不足です。

D フラグメント

D フラグメント 2 本(88,96 nt)は、非常に強い CpG アイランドに存在する配列を検出します。CpG アイランドは GC 含量が高く変性されにくい配列です。88,96nt D フラグメントが低い場合（92nt 基準フラグメントの 50%以下）は、サンプル DNA の変性が不十分であったことを示しています。変性が不十分な場合は、DNA サンプル中に 40 mM 以上の塩が存在しているかもしれません。サンプル DNA の変性が不完全な場合は、誤った結果になることがあります！

注: ABI の POP7 ポリマーを使用する場合、通常 80〜90nt に非特異フラグメントが出現するため、コントロールフラグメントに 重なるかもしれません！

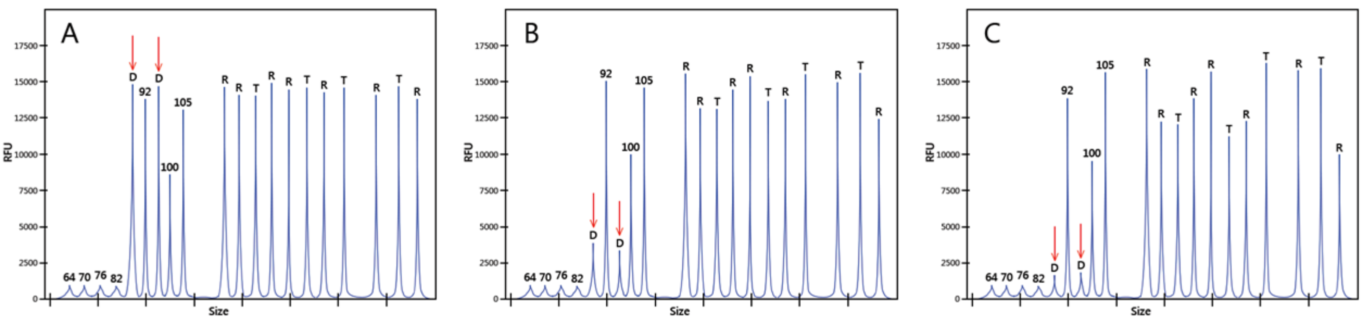


図 **4.** 不十分な DNA 変性が D フラグメントに及ぼす影響。D フラグメントは、サンプル DNA 変性が不完全な場合に低くなります（サンプルに塩を添加した例）。【**A.** TE, **B.** TE + 40 mM NaCl, **C.** TE + 100 mM NaCl】を組む DNA サンプルの MLPA 解析結果。サンプル **B, C** は変性が不十分です。

[6] この Y 特異的配列を欠いた男性、この Y 配列を X 染色体上に保有する女性の事例が知られています。

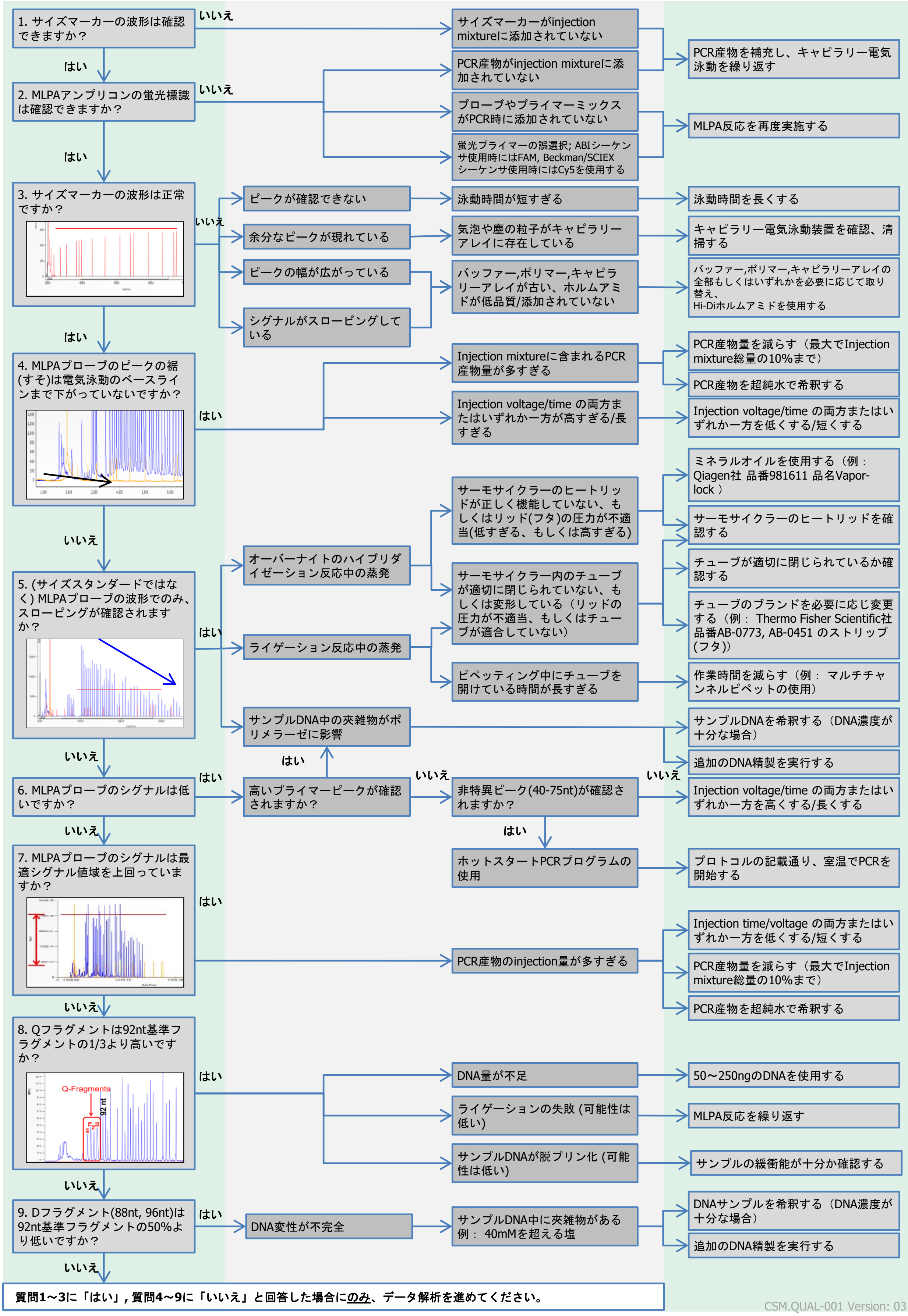
8.2. DNA を含まないコントロール(no-DNA control)

通常 no-DNA control では、Q フラグメント 4 本のみが確認できます。一部のプローブミックスにおいては、no-DNA control で 100nt より長鎖のピークが少数確認できるかもしれません。十分量のサンプル DNA が添加されている場合、これらの非特異ピークは、指数関数的に増幅した MLPA プローブのシグナルより相対的に低くなるため、MLPA 解析結果に影響しません。no-DNA control において、非特異ピークが Q フラグメント 4 本の高さの中間値の 50%より高くなり再現性がある場合は、MRC Holland 社にお知らせください。

8.3. 蒸発

蒸発は、（A）54℃ライゲーション反応のピペッティング中や（B）オーバーナイトのハイブリダイゼーション反応中に起きる可能性があり、塩濃度上昇の原因となります。これはサンプル DNA が強固な二次構造を形成する事につながり、一部プローブで標的配列への結合が妨げられる事があります。一般に、ストリップ(連結キャップ)よりプレートの方が蒸発しやすいです。蒸発が疑われる場合は、水 8 µl を 60℃オーバーナイトでインキュベートします；翌朝に水 5 µl 以上が残っている必要があります。蒸発を解消するためのアドバイスは、項 8.4 のステップ 5 を参照ください。ミネラルオイルを使用する場合は、液面を覆うのに十分な量のみを添加します。オイルを除去する必要はありません。プローブミックスとポリメラーゼマスターミックスを添加した後は、チューブを短時間遠心します。Ligase-65 マスターミックスを添加した後は、油層より下層を上下にピペッティングします。

8.4. クオリティコントロール(品質管理)フローチャート



9. データ解析

Coffalyser.Net ソフトウェアは、適切なロット別 Coffalyser シートと併せて MLPA データ解析に使用する必要があります。双方とも、最新バージョンを使用する必要があります。Coffalyser.Net リファレンスマニュアルでは、MLPA データ解析について順を追って説明しています。ソフトウェアとマニュアル共に、www.mrcholland.com.から無料ダウンロードできます。

キャピラリー電気泳動によって測定された、各プローブの蛍光強度の絶対値は多くの変数による影響を受け、直接使用することはできません。各プローブの蛍光強度はまず MLPA 反応内で内部標準化されなければなりません。この標準化では、全てのサンプルにおいて正常コピー数を保有すると想定されるリファレンスプローブを使用します。各サンプルの相対プローブシグナル値は、リファレンスサンプル集団の相対プローブシグナル値と比較されます。リファレンスサンプル集団では、全てのリファレンスプローブ・ターゲットプローブについて正常コピー数を保有する事が想定されます。この比較により、サンプルにおける標的配列の相対コピー数を決定できます。

Coffalyser.Net では MLPA プローブミックスごとに最良の解析方法が選択され、クオリティコントロールも数多く用意されています[7]。データ解析の実施手順については、Coffalyser.Net リファレンスマニュアルを参照してください。**IVD(体外診断薬)登録された MLPA アプリケーションについては、Coffalyser.Net の使用が必要となります！その他のソフトウェアを使用した場合は、不確定または誤った結果になる可能性があります！**

10. 解釈と確認

- MLPA で検出される異常は、可能な限り、確認用の MLPA プローブミックスや独立した手法で確認する必要があります。単一プローブで検出されたコピー数変化は、常に確認が必要となります。プローブ標的配列のシークエンシングにより、プローブシグナルが低くなる要因が変異/多型である事が示されるかもしれません。2 つのヘテロ接合性の配列が確認された場合は通常、サンプル DNA が 2 つの異なるアレルを保有することを示しています。シークエンシングで単一レアアレルが確認された場合、レアアレルが 2 コピー存在する可能性もあるため、1 アレルが欠失していることにはなりません。ホモ接合性の SNP が存在すると、ヘテロ接合性の欠失のような、部分的なシグナルの減弱につながることがあります。
- MLPA で検出される欠失や重複が全て病原性であるとは限りません。健常人で報告されている生殖細胞系列のコピー数変異は、http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home から確認できます。MRC Holland 社では、特定のエクソンの欠失や重複が疾患につながるか否かに関する情報を提供することはできません。
- 一部のコピー数変異は、染色体全領域の大規模欠失や重複を含めた体細胞変異によるものかもしれません。
- 明らかなホモ接合性の欠失の場合、シグナルが本当に出現していないのか確認するために電気泳動図を目視検証するべきです。プローブシグナルが出現していない場合、bin 設定の問題やシグナルの低さに原因があるかもしれません。
- リファレンスプローブや隣接領域プローブで検出されたコピー数変化は、解析環境との関連は無さそうです。リファレンスプローブの内容は、ご要望に応じて開示します。

11. 使用上の注意と警告

- 専門的用途に限ります。分析性能は、実験者の習熟度,手順書をどの程度遵守しているかに左右されます。アッセイは、分子生物学的手法に精通した専門スタッフが実行するべきです。結果解釈の担当者は、該当アプリケーション、および不正確な結果に繋がり得る MLPA 法の限界に関して、最新の科学的知識を得ている必要があります。
- 各 MLPA アプリケーションの内部バリデーションは、特に初めて MLPA 法を利用する場合、サンプルの取扱手順・DNA 抽出方法・使用機器を変更する場合に必須となります；少なくとも正常 DNA サンプル 16 個を含めてください。バリデーションにおいては、各プローブの標準偏差が 0.10 以下になる必要があります（関連プローブミックスの製品説明書に特に明記しない限り）。バリデーションに使用するサンプルは、日常で使用しているサンプルから選抜するべきです。

12. MLPA 法の限界

- 大部分の MLPA アプリケーションにおいて、遺伝子欠損の主たる要因は小規模変異(点変異)であり、それらの多くは MLPA プローブミックスでは検出できません。
- MLPA 法ではプローブの標的配列の範囲外に存在するあらゆる欠失・重複を検出できず、コピー数変化を伴わない逆位や転座も検出できません。
- 標的配列内やその近傍における塩基変化（例：SNP,点変異,小規模欠失・重複）をプローブが検出すると、結果が偽陽性になる可能性があります。[8]

[7] Coffalyser.Net は生データの解析（ベースライン補正，ピーク同定）から始まり、クオリティコントロール（例：DNA 使用量，DNA 変性度合，スロービング補正）も数多く用意されています。

[8] プローブを設計する場合、既知 SNP は可能な限り避けてください。ただし、新規 SNP は次々と発見されています。多型や高頻度の病的変異がプローブシグナルに影響する場合は、お知らせください。

- cDNA や個々のエクソンの PCR アンプリコンが DNA サンプルにコンタミネーションすると、プローブシグナルの増強につながる可能性があります[9]。別に分離・抽出した DNA サンプルを解析することで、これらの人為的なコンタミネーションを除外できます。
- サンプル DNA 変性が不十分な場合、隣り合うゲノム標的配列を認識する複数のプローブが明確に欠失していても、偽陽性の結果かもしれません！40mM 以上の塩化ナトリウムや塩化カリウムが存在する場合、非常に GC リッチな染色体領域は 98℃では変性されません。
- MLPA 解析では、DNA サンプルの抽出元となる細胞における、標的配列のコピー数の平均が分かります。隣り合う配列を標的にする複数のプローブの値が正常ではないが通常の欠失／重複の閾値に達しない場合、モザイクの可能性が考えられます。
- 実験を実施する上でのわずかな相違が、MLPA ピークパターンに影響するかもしれません。a)同じ MLPA 実験系に含まれ、b)同一ロットのプローブミックスで検査したサンプルのみを解析に含めてください。
- モザイク症例で認められるような微妙な変化は、染色体位置ごとにプローブを並び替えた場合にのみ分かるでしょう。
- 一部の症例では、正確な結果解釈のために親のサンプルの解析が必要となるかもしれません。
- MLPA 産物を泳動する時、キャピラリー電気泳動のプロトコルの最適化が必要となるかもしれません。1 つ以上のピークが検出範囲を超えている場合は、誤った結果になることがあります。例えば、1 つ以上のエクソンの重複は、ピークが検出範囲を超えている時は分かりにくくなり、偽陰性の結果となることがあります。ピークが検出範囲を超えるリスクは、使用するプローブミックスに含まれるプローブ数が比較的少ない時に、より高くなります。Coffalyser.Net ソフトウェアでは、検出範囲を超えたピークに警告が出ますが、その他のソフトウェアでは出ません。1 つ以上のピークが検出範囲を超えている場合は、次のいずれかを行って PCR 産物を再泳動してください：injection voltage ／ injection time の設定値を下げる、もしくは PCR 産物を希釈してサンプル量を減らす。

MLPA 法の全般的なプロトコル – 改訂履歴
Version-008-JA1 (2022 年 5 月 6 日)
- 項 2.1 および項 7.2 において、キャピラリー電気泳動装置に関する情報が、Coffalyser.Net ソフトウェアでの設定内容と一致するように更新されました。
Version-007 (2019 年 3 月 1 日改訂)
- プロトコルが再構成され、一部の章が書き換えられました。MLPA の実施方法に変更はありません。
- SALSA MLPA Buffer と SALSA Ligase-65 に含まれるβ-メルカプトエタノールが、DTT に置き換えられました。
- 検出範囲を超えたピークに関する MLPA 法の限界について、新たに書き加えられました。
Version-006 (2018 年 3 月 23 日改訂)
- 図 2 が新たに加わりました。
- 電気泳動の仕様表から、各シーケンサの初期設定と ABI-310 に関する文言が削除されました。
- 電気泳動の仕様表に、ABI-SeqStudio が加わりました。
- キャピラリー電気泳動装置のシグナル検出範囲に関する表が加わりました。
- クオリティコントロール(品質管理)フローチャートが加わりました。
- 良好な MLPA 結果を得るための重要ポイントが加わりました。
- プロトコルの情報が再編成され、書き換えられました。

[9] Varga RE et al. (2012). MLPA-based evidence for sequence gain: pitfalls in confirmation and necessity for exclusion of false positives. *Anal Biochem*. 421:799-801.