

MLPA法 Q&A集

目次

1. MLPA法の導入

- Q1. 導入にあたり、何が必要になりますか？
- Q2. 実験にはどのようなサンプルが必要でしょうか？
- Q3. サンプルDNAはどれくらい用意すれば良いですか？
- Q4. キャピラリーシーケンサが自施設に無い場合でも実験はできますか？
- Q5. FFPE検体でも実験はできますか？

2. 実験のセットアップ

- Q1. 実験において重要なポイントはありますか？

3. 生データの評価・トラブルシューティング

- Q1. MLPAシグナルのみが長鎖プローブになるほど右肩下がりになっています。
その原因と解決策は？
- Q2. MLPAシグナルとサイズスタンダードが長鎖プローブになるほど右肩下がりに
なっています。その原因と解決策は？

1. MLPA法の導入

Q1. 導入にあたり、何が必要になりますか？

A1. MLPA解析には下記のものが必要となります。

■機器

- ・サーマルサイクラー（例: Veriti 96-Well Thermal Cycler）
- ・キャピラリーシーケンサ（例: ABI-3130xL, GeXP）

■試薬

- ・MLPA® kit試薬
- ・フラグメント解析関連試薬
（高品質なホルムアミド、サイズスタンダード、ポリマー）

■サンプル

- ・テストサンプル
- ・リファレンスサンプル
- ・No DNA control

■ソフト

- ・Coffalyser.Net

詳しくは、MLPA® General Protocolをご参照ください。

下記MRC-Holland社のWebサイトよりダウンロードしていただけます。



Q2. 実験にはどのようなサンプルが必要でしょうか？

A2. 実験を始めるにあたり、下記のサンプルが必要となります。

■テストサンプル

目的領域のコピー数変化を確認したいDNAサンプルです。同時再現性の確認のため、1 サンプルにつき2 チューブ用意(2重測定)していただくことが推奨されます。

■リファレンスサンプル

目的領域およびリファレンスプローブの設計領域が正常コピー数であるとされる健常人から得られたゲノムDNAです。

1 アッセイあたり少なくとも3種類必要となりますが、実験の失敗も考慮し、可能であれば、5種類用意していただくことをお奨めします。

■No DNA Control

DNAサンプルの代わりに、TE0.1 (10mM Tris-HCl pH8.0 + 0.1mM EDTA) を添加したwell(tube)です。TE buffer, MLPA試薬, 泳動関連試薬, キャピラリーのコンタミネーションの確認のため、実験系に含めることが推奨されます。

※その他、Positive control（陽性サンプル）のご利用も適宜ご検討ください。

Q3. サンプルDNAはどれくらい用意すれば良いですか？

A3. 1サンプルあたり50~250ng (濃度10~50 ng/ul)が製造元の推奨ですので、ご用意ください。

Q4. キャピラリーシーケンサが自施設に無い場合でも実験はできますか？

A4. フラグメント解析(キャピラリー電気泳動)のステップのみ外注していただければ、解析可能です。外注先につきましては、下記URLよりお問い合わせください。

http://www.falco-genetics.com/salsa/salsa_form.html

Q5. FFPE検体でも実験はできますか？

A5. 解析できます。尚、DNAの脱プリン化反応やホルマリン架橋、断片化によって、測定データが不安定となる可能性があります。

※FFPEサンプルの使用が適さないアプリケーションもございますので、詳細は各品番の個別資料をご参照ください。ご不明点は下記URLよりお問い合わせください。

http://www.falco-genetics.com/salsa/salsa_form.html

2. 実験のセットアップ

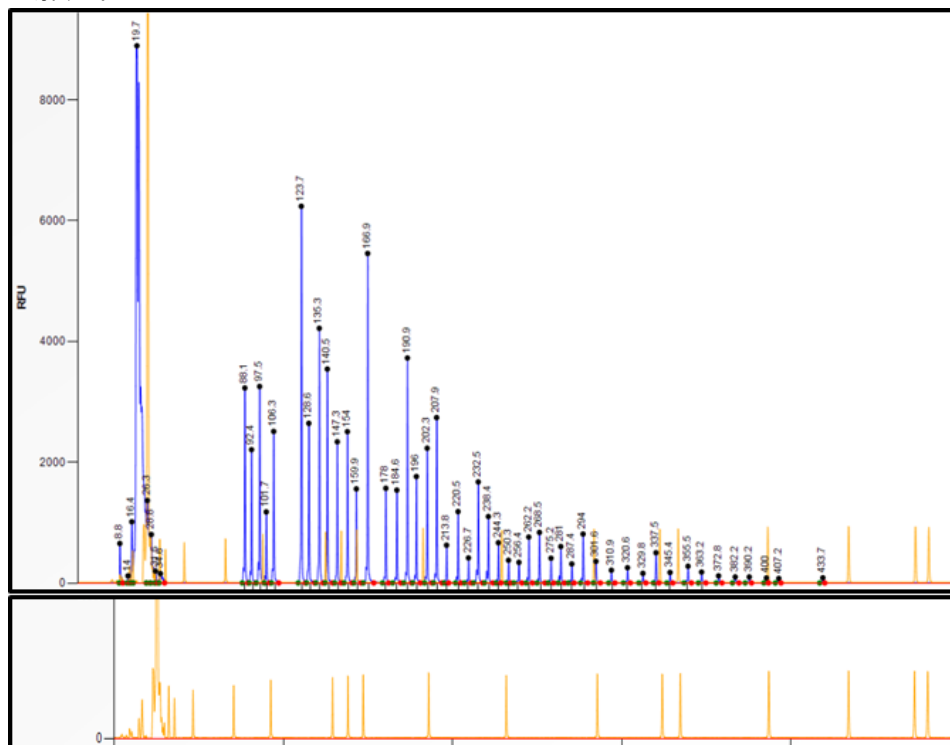
Q1. 実験において重要なポイントがありますか？

A1. 良好な実験結果を得るためのポイントは、以下の通りです。

- 少なくとも3種類のリファレンスサンプルを実験系に含める
解析データの標準化における信頼性を高めるためです。
- テストサンプルとリファレンスサンプルは、すべての工程において可能な限り条件を合わせる (DNA抽出方法, 抽出元, 濃度)
実験条件のわずかな違いが、ピークパターンに影響するためです。
- 少量ボリュームでの実験系は組まない (MLPA[®] General Protocolの規定量を遵守)
反応液蒸発により、反応失敗につながる可能性があるためです。
- 試薬はゆっくり且つしっかりミックスする (長時間のボルテックスは不可)
緩衝液と酵素が適切に混合されていなければ、信頼性の高い結果が得られない可能性があるためです。
- 酵素試薬およびそれを含む反応液は、ボルテックスしない
粘性があるため、泡立ないようにゆっくりピペティングしなければ、解析データに影響するためです。
- データ解析にはCoffalyser.Netを使用する
MLPAにおいて最も理想的な解析アルゴリズムで解析ができ、解析のクリティカルなエラーを検出できるためです。
- D-フラグメント(88, 96nt)*を確認する
サンプルが完全にDNA熱変性しているか確認をするためです。
*D-フラグメント：DNA熱変性のされにくいCpG islandに設計され、DNA熱変性の成否の指標となるフラグメント。
- サンプルDNAの溶出／希釈にTE0.1 (5~10mM Tris-HCl pH 8~8.5)を使用する
緩衝能をもたない純水等で希釈すると、DNA熱変性のステップで脱プリン化反応が起こり、解析データが不安定になり得るためです。
- 電気泳動時に古いキャピラリーやポリマーを使用しない
解析データが不安定になる可能性があるためです。

3. 生データの評価・トラブルシューティング

Q1. MLPAシグナルのみに長鎖プローブになるほど右肩下がりになっています。その原因と解決策は？



A1. ■原因①

ポリメラーゼ活性を阻害する夾雑物※1が混入しているためです。

※1: 夾雑物とは、鉄など金属イオン性の不純物（赤血球や磁気ビーズ由来）、エタノール、フェノール、トリゾール、ヘパリン、メラニン、EDTA(>1.5mM)等を指します。これらはDNA抽出時のbufferの持ち込みや、一部組織に由来します。サンプルが末梢血由来の場合、ヘパリン血から抽出したDNAではPCR阻害を受け、スローピング※2しやすくなるため、EDTA-2Na含採血管の使用が推奨されます。

※2: MLPA法ではテストサンプルとリファレンスサンプルのシグナル値（Peak Height）との比較において、相対コピー数の比（Ratio）を算出して結果とするため、スローピング現象が発生すると、テストサンプルの結果が偽陽性となることもあります（下図参照）。



□解決策①

- ・ DNA量を最適量（50～100ng）に設定し、夾雑物の影響を軽減させます。
- ・ DNA再精製（エタノール沈殿、精製キット使用）を実施し、夾雑物を除去します。
- ・ 末梢血サンプルの場合、EDTA-2Na含採血管を使用します。＊
※ヘパリン血から抽出したDNAはPCR阻害を受け、スローピング現象が発生しやすくなります。

■原因②

ハイブリダイゼーション中に、MLPA反応液が過剰に蒸発しているためです。

□解決策②

- ・ サーマルサイクラーのヒートリッド（加熱蓋）を点検し、正しく機能しているか確認します。ミネラルオイルを反応液に添加し、液面の蒸発を防ぎます。＊
※ハイブリダイゼーションの過程で8μLの水を入れたチューブを追加することで、一晚反応時に発生する蒸発量を測定できます（5μL残っていれば、結果に影響はありません）。
- ・ チューブが密閉されているか、確認します。
- ・ チューブが熱で変形している場合は、ブランドを変えます。

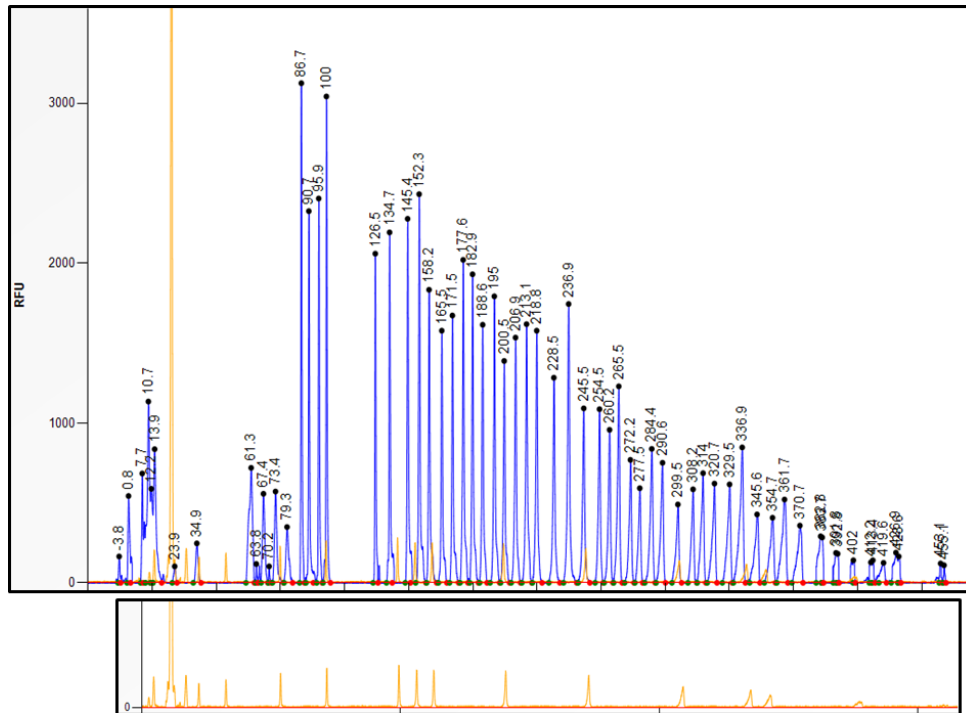
■原因③

ライゲーション中に、MLPA反応液が過剰に蒸発しているためです。

□解決策③

- ・ ライゲーションミックスのピペッティングにおいて、反応チューブを開く時間を短縮します。多検体処理時は、8連マルチピペットの使用を検討します。
- ・ チューブが密閉されているか確認します。
- ・ チューブが熱で変形している場合は、ブランドを変えます。

Q2. MLPAシグナルとサイズスタンダードが長鎖プローブになるほど右肩下がりになっています。その原因と解決策は？



A2. ■原因①

ポリマーやキャピラリーが古く、劣化しているためです。

□解決策①

ポリマーやキャピラリー等の消耗品を交換してください。

■原因②

低品質なホルムアミドを使用しているためです。

□解決策②

高品質なホルムアミドを使用してください。

(ex. Hi-Di Formamide, Applied Biosystems)

■原因③

Injection voltageが高すぎるためです。

□解決策③

キャピラリー電気泳動の設定、泳動環境を調整してください。