

# MLPA法 Q&A集

株式会社ファルコバイオシステムズ  
2021年2月発行  
第3版

# 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ピークパターンが確認できません。その原因と解決策は？
- Q2. サイズスタンダードが確認できません。その原因と解決策は？
- Q3. サイズスタンダードのピークの高さが均一ではありません。その原因と解決策は？  
【GeneScan 500ROX/LIZ 使用時】
- Q4. ピークがベースラインまで下がりません(MLPAシグナル間が盛り上がります)。その原因と解決策は？
- Q5. MLPAピークパターンのみスローピングしています。その原因と解決策は？
- Q6. MLPAピークパターンとサイズスタンダードがスローピングしています。その原因と解決策は？
- Q7. MLPAシグナル強度が高いです。その原因と解決策は？
- Q8. Qフラグメントが高いです。その原因と解決策は？
- Q9. Qフラグメントしか確認できません。その原因と解決策は？
- Q10. Dフラグメントが低いです。その原因と解決策は？
- Q11. プライマーピークが高いです。その原因と解決策は？
- Q12. プライマーダイマーピークが高いです。その原因と解決策は？
- Q13. MLPAプローブ間の非特異的ピークが現れます。その原因と解決策は？
- Q14. FRSSで  マークが表示され、他のスコアが表示されていません。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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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。



※日本語プロトコル([MLPA法の全般的なプロトコル-MDP-v007-JA-01.pdf](#))も  
ご参照ください。

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康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](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](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はありますか？

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  
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。  
下記のポイントをご確認ください。

- ・DNA抽出方法が同一である。  
推奨の抽出方法： 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)
- ・サンプルの抽出元 (血液、組織 等) や検査材料 (凍結組織、FFPE、細胞株 等) が同じである。
- ・サンプル毎の使用DNA濃度が同じである。
- ・MLPA解析の一連のステップをサンプル毎に別々で行わず、同一の実験で実施する。

■ 少量ボリュームでの実験系は組まない (MLPA<sup>®</sup> 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、泡立て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<sup>※1</sup>が起これ、解析データが不安定になり得るためです。

■ 電気泳動時<sup>※2</sup>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。

※1: DNA脱プリン化の防止方法

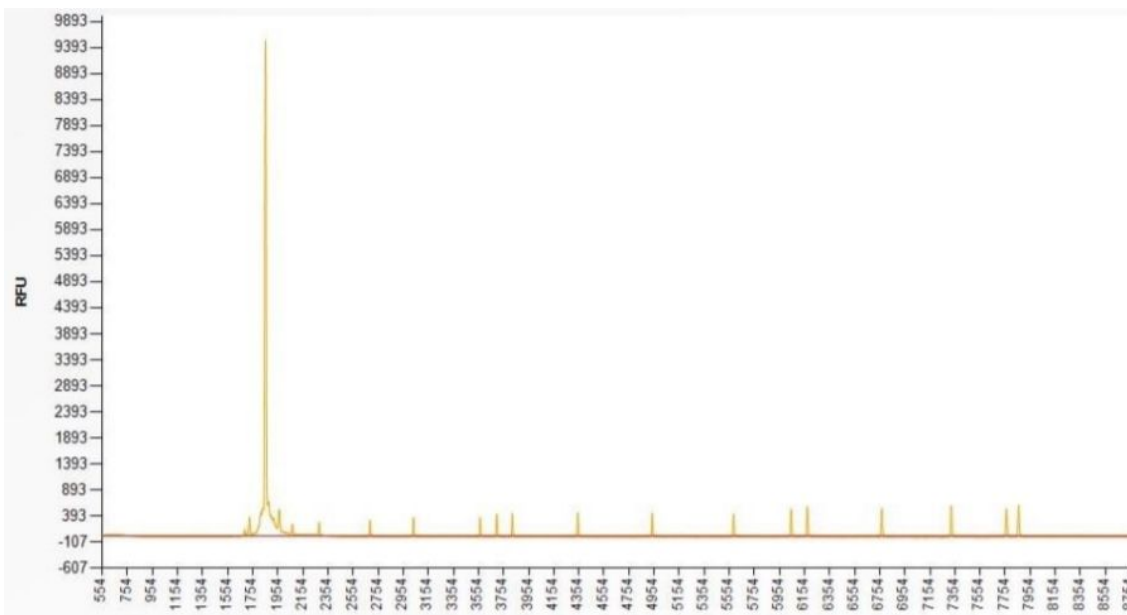
<https://support.mrcholland.com/kb/articles/how-do-i-prevent-sample-depurination>

※2: MLPA電気泳動の仕様(推奨環境):

[日本語プロトコル\(MLPA法の全般的なプロトコル-MDP-v007-JA-01.pdf\)](#)の  
8ページ「7.2. 電気泳動の仕様」をご参照ください。

### 3. 生データの評価・トラブルシューティング

Q1. MLPAピークパターンが確認できません。その原因と解決策は？



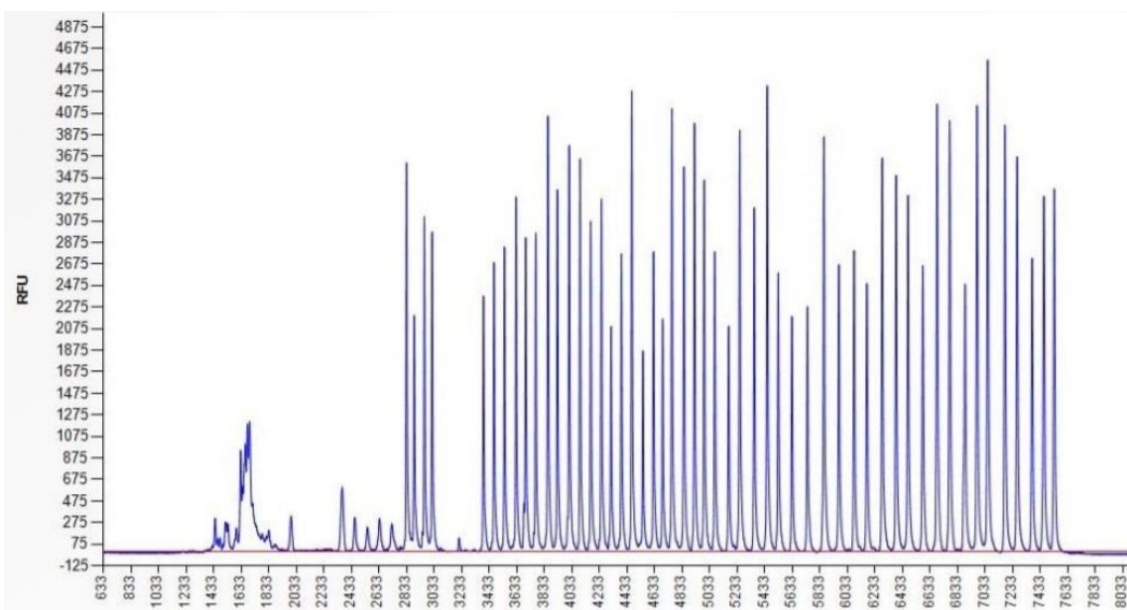
電気泳動図では、MLPAピークパターンが確認できず、サイズスタンダードのピークのみ現れています。

A1. ■原因: MLPA PCR産物が injection mixture に添加されていません。

□解決策: MLPA産物とサイズスタンダードを含む injection mixture を新たに準備し、再泳動します。

☆詳細は [MLPA電気泳動の仕様\(推奨環境\)](#) を参照ください。

Q2. サイズスタンダードが確認できません。その原因と解決策は？



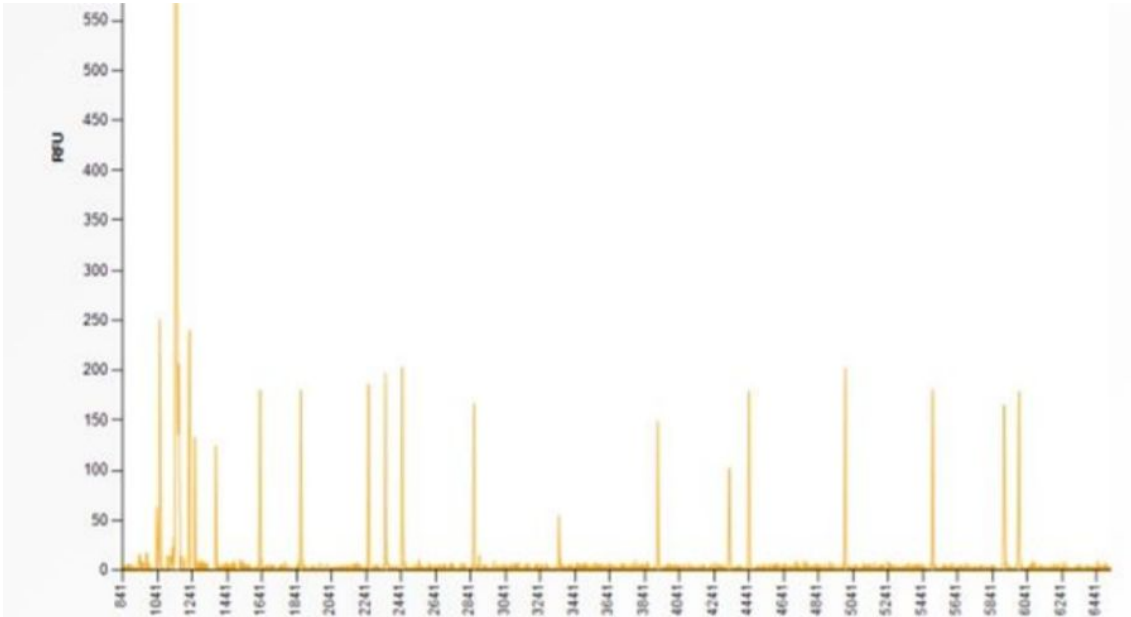
サイズスタンダードのピークが電気流動図のデータで現れていません。

A2. ■原因: サイズスタンダードがinjection mixtureに添加されていません。

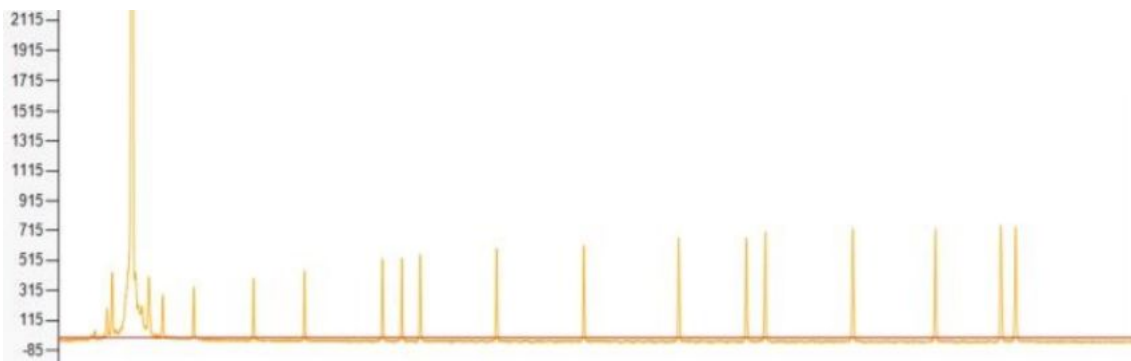
□解決策: MLPA産物とサイズスタンダードを含むinjection mixtureを新たに準備し、再泳動します。

☆詳細はMLPA電気泳動の仕様(推奨環境)を参照ください。

Q3. サイズスタンダードのピークの高さが均一ではありません。その原因と解決策は？  
【GeneScan 500ROX/LIZ 使用時】



GS500のサイズスタンダードのピークは、様々なシグナル強度を示します。



正常なGS500のパターンでは、すべてのサイズスタンダードピークの高さが同程度になっています。

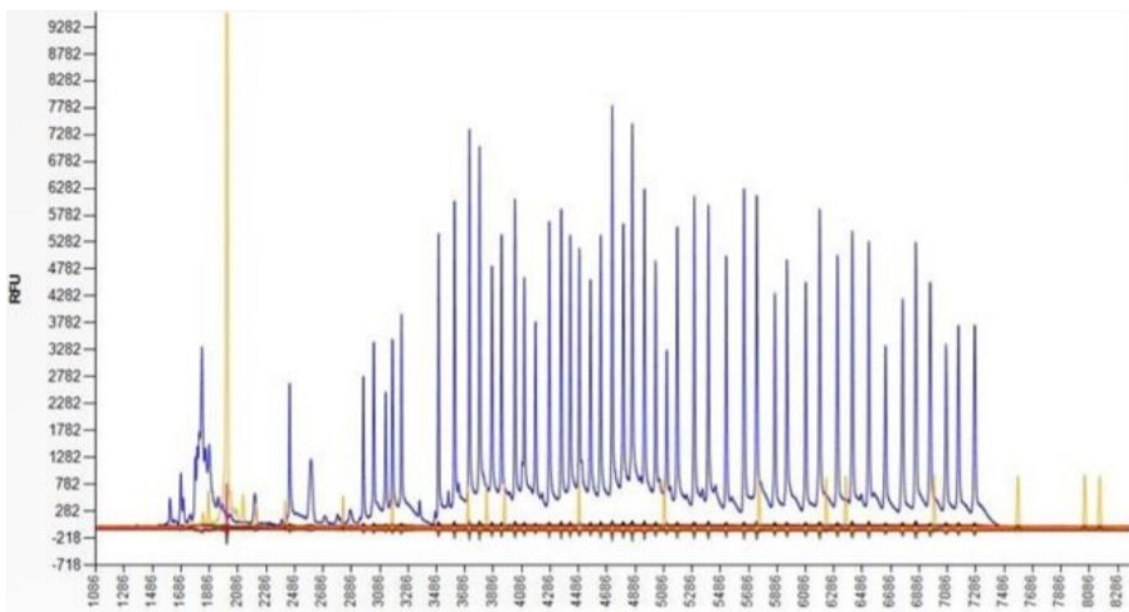
※この例は、GS500のサイズスタンダードを使用した場合に適応されます。

A3. ■原因: GS500(ABI)のサイズスタンダードを使用する場合、下図のように、サイズスタンダードのピークの高さは同程度になると予測されます。もしそれが当てはまらない場合は、フラグメント分離前の変性ステップがおそらく省かれています。

□解決策: injection mixtureの調整にはHiDiホルムアミドを使用します。フラグメント分離の前に、injection mixを86°Cで3分間インキュベートし、直ちに4°Cで2分間置きます。



Q4. ピークがベースラインまで下がりません(MLPAシグナル間が盛り上がります)。その原因と解決策は？



MLPAピーク間のシグナルがベースラインまで下がりません。

A4. ■原因①: injection mixture中のPCR産物量が多すぎます。

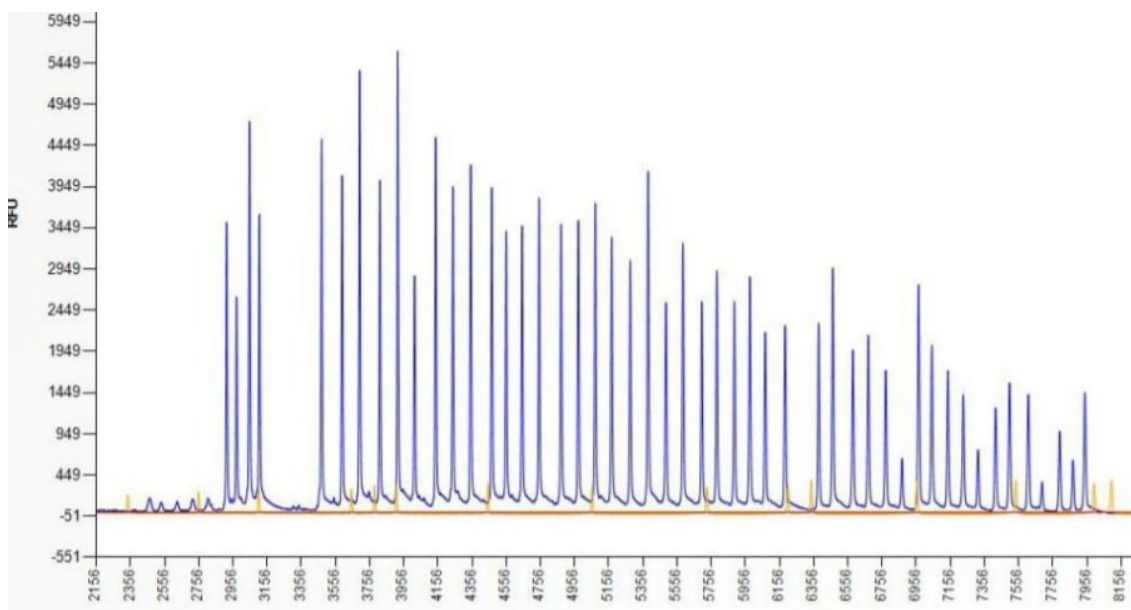
□解決策①: injection mixture中のPCR産物量を減らします。PCR産物量は、総量の10%未満に抑えます。PCR産物を超純水で希釈します。

■原因②: injection voltage や injection time の設定値が高すぎます。

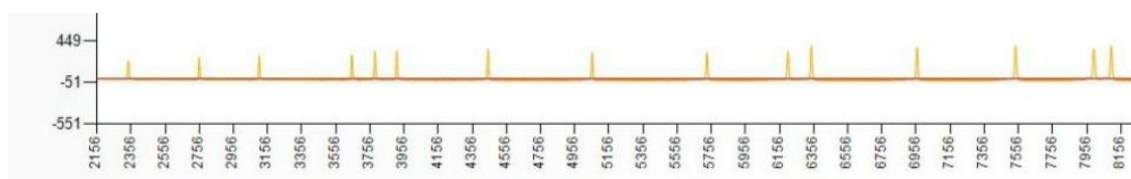
□解決策②: injection voltage と injection time の両方または一方の設定値を下げます。

☆詳細はMLPA電気泳動の仕様(推奨環境)を参照ください。

Q5. MLPAピークパターンのみスローピングしています。その原因と解決策は？



長いフラグメントになるにつれて、MLPAフラグメントのシグナル強度が減少します。



サイズスタンダードのフラグメントはスローピングしておらず、正常なシグナル強度を保っています。

A5. ■原因①: ハイブリダイゼーション反応中(オーバーナイト)の過剰な蒸発です。

オーバーナイトのハイブリダイゼーション時に8  $\mu$ lの水を入れたチューブを追加することで、ハイブリダイゼーション中の蒸発を確認します。翌日、少なくとも5  $\mu$ lはチューブに残っている必要があります。

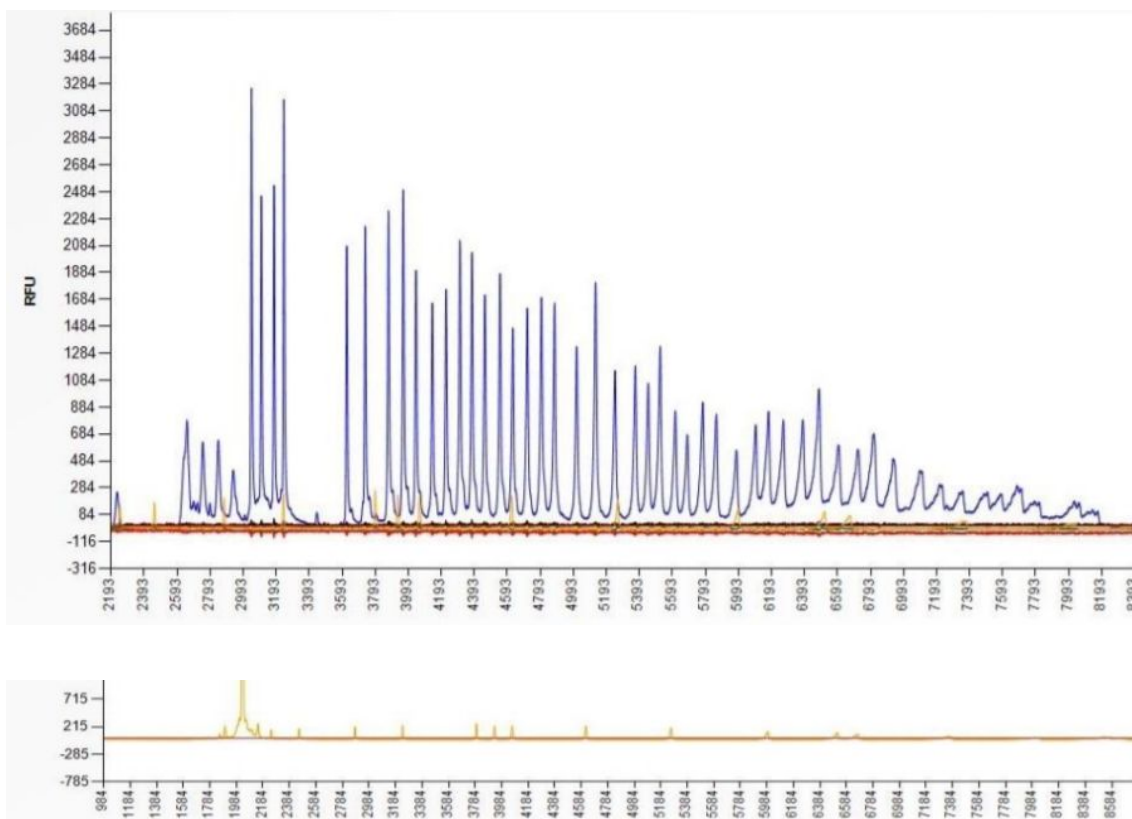
□解決策①: サーマルサイクラーの蓋を閉めたときに、チューブがきちんと閉まっているか、キャップが変形していないか注意します。それでも問題が解決しない場合は、ミネラルオイル(例: Vapor-Lock (Qiagen社))を使用するか、チューブのブランドを変更します。

■原因②: サンプルDNAに含まれる、ポリメラーゼ活性に影響を与える夾雑物です。

□解決策②: 1) 夾雑物を希釈するために、MLPA 1反応あたりのサンプル DNA 量を減らします。MLPA 1反応あたりの最適DNA量は50~100 ngです。  
2) 夾雑物を除去するための追加ステップとして、DNAを精製します。

☆詳細は[エタノール沈殿プロトコル](#)(MRC社サイトにjump)を参照ください。

Q6. MLPAピークパターンとサイズスタンダードがスローピングしています。その原因と解決策は？



MLPAピークパターンとサイズスタンダード共に、シグナルが減少しているのがわかります。フラグメントのシグナル強度は、長いフラグメントになるにつれて減少しています。

A6. ■原因①: injection voltage の設定値が高すぎます。injection voltageが高すぎる場合は、短いフラグメントほど優先的にinjectionされます。その結果、短いフラグメントの方が長いフラグメントよりもシグナル強度が高くなります。

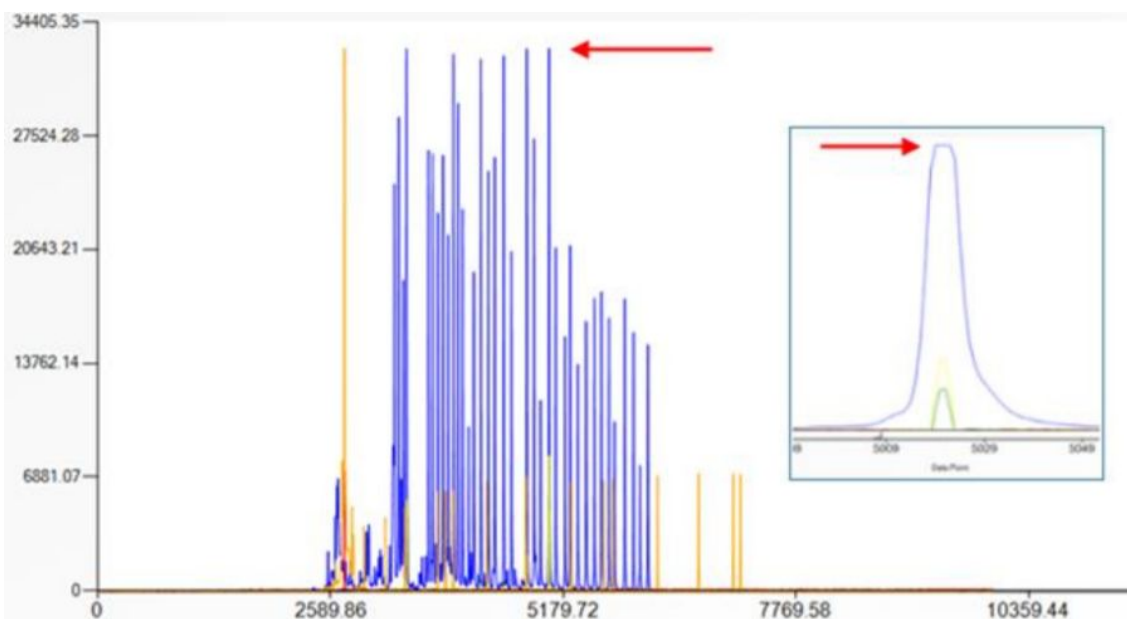
□解決策①: injectionの設定を変更します。

■原因②: ポリマーもしくは(および)キャピラリーが古すぎます。低品質のホルムアミドを使用しています。

□解決策②: ポリマーもしくは(および)キャピラリーを交換します。HiDiホルムアミドを使用します。

☆詳細はMLPA電気泳動の仕様(推奨環境)を参照ください。

Q7. MLPAシグナル強度が高いです。その原因と解決策は？



MLPAピークパターンのシグナル強度がキャピラリー電気泳動装置の検出限界に近い、または超えています。

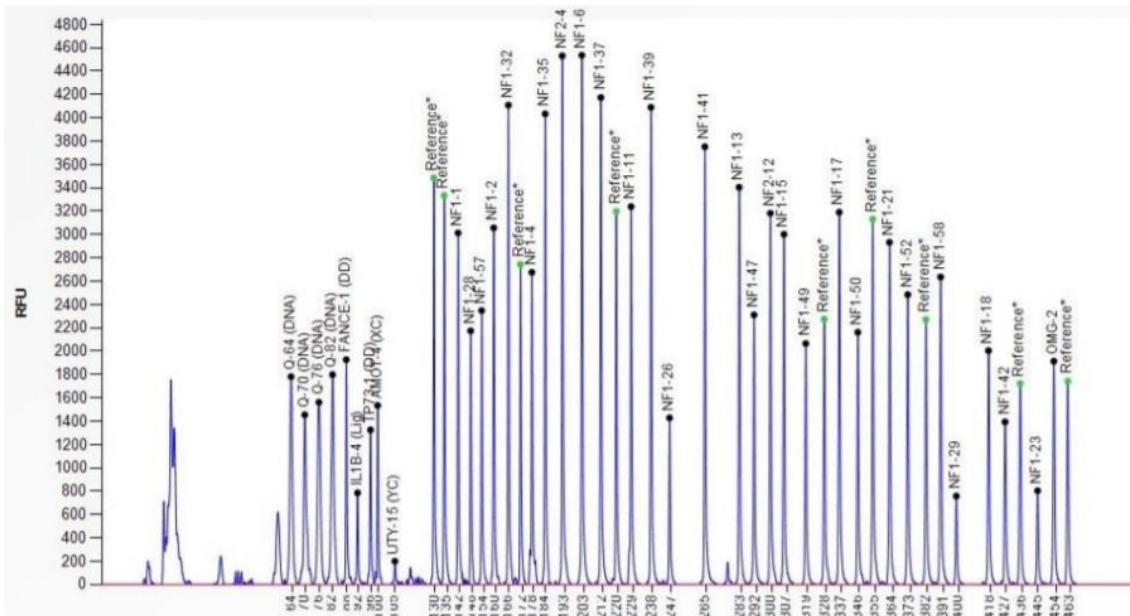
A7. ■原因:PCR産物の添加量が多すぎます。

□解決策:シグナル強度を減らすため、下記のパラメーターを調整します。

- ①injection mixture中のPCR産物濃度
- ②injection time
- ③injection voltage

☆詳細はMLPA電気泳動の仕様(推奨環境)を参照ください。

Q8. Qフラグメントが高いです。その原因と解決策は？



4つのQフラグメント(64 nt,70 nt,76 nt,82 nt)の中間値が、92 nt 基準フラグメントの1/3より高いです。

A8. ■原因①: MLPA反応に十分量のDNAが使用されていません。

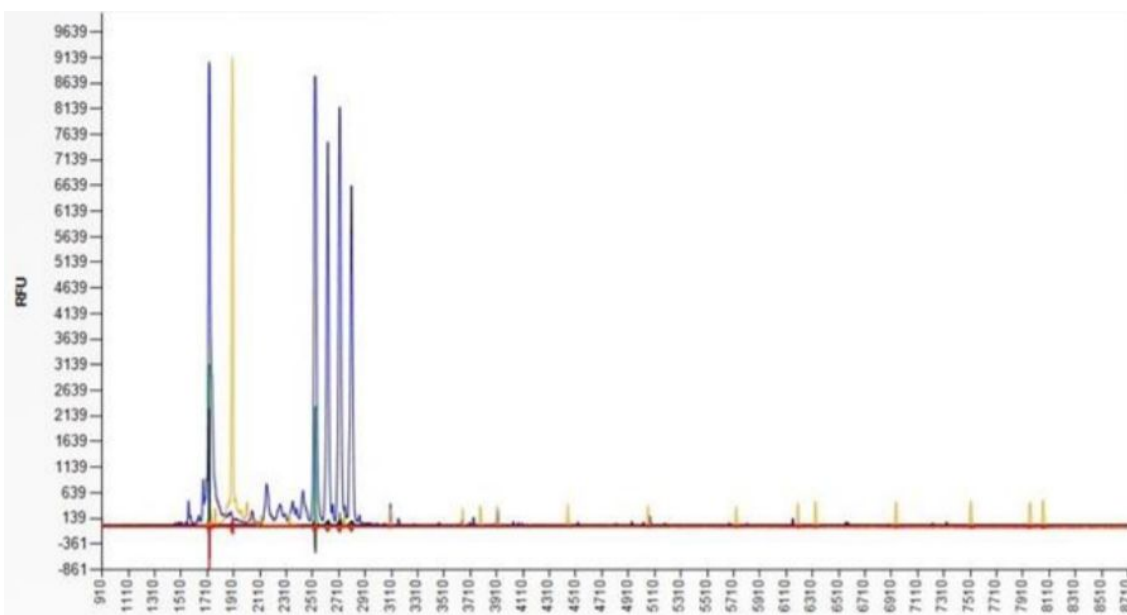
□解決策①: MLPA 1反応あたり、50～100 ngのDNAが添加されていることを確認します。

■原因②: ライゲーション反応が失敗しています。

□解決策②: DNAが脱プリン化を起こしています。脱プリン化を防止するために、DNAサンプルをTEに溶解して十分な緩衝能をもたせます。

- ・水に溶解したサンプルについては、Tris-HCl(pH8.5)を追加して終濃度5 mMのTris-HClにします。
- ・サンプルの溶媒が不明の場合は、4  $\mu$ lのDNAサンプルに1  $\mu$ lの50 mM Tris-HCl(pH8.5)を加えます。

Q9. Qフラグメントしか確認できません。その原因と解決策は？

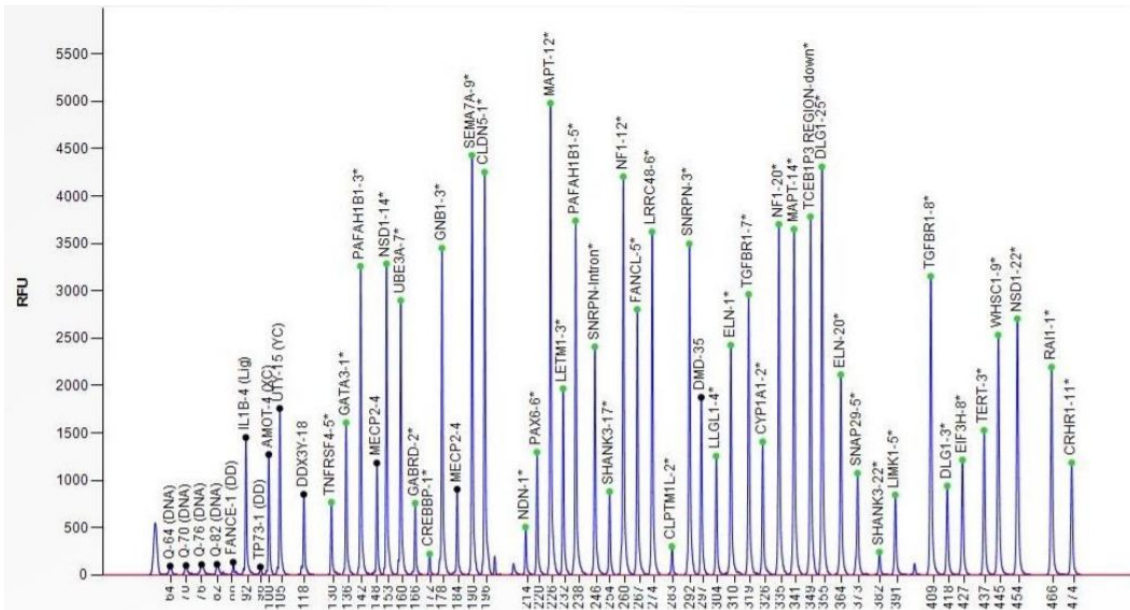


電気泳動図において、64 nt,70 nt,76 nt,82 nt の4つのQフラグメントのみが確認できます。DフラグメントやMLPAプローブシグナルは確認できません。

A9. ■原因: MLPA反応にDNAが添加されていません。

□解決策: MLPA 1反応あたり、50~100 ngのDNAが添加されていることを確認します。

Q10. Dフラグメントが低いです。その原因と解決策は？



88nt, 96ntのDフラグメントが、92nt基準フラグメントの50%よりも低くなっています。GCリッチな配列を標的とするプローブは、シグナルが減弱している可能性があります。

A10. ■原因: サンプルDNAに含まれる大量の夾雑物が、サンプルDNAの完全な変性を阻害しています。

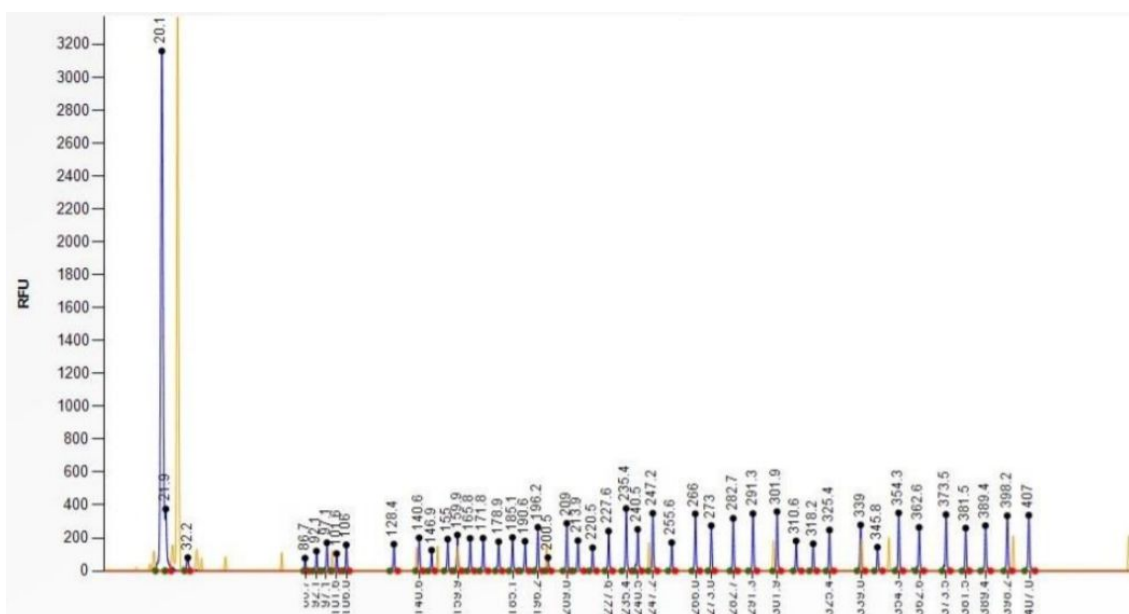
□解決策: ①夾雑物を希釈するために、MLPA 1反応あたりのサンプルDNA量を減らします。MLPA 1反応あたりの最適DNA量は50~100 ngです。

②夾雑物を除去するための追加ステップとして、DNAを精製します。簡易的なエタノール沈殿により、サンプルDNAに含まれる夾雑物は除去できます。

☆詳細は[エタノール沈殿のプロトコル](#)(MRC社サイトにjump)を参照ください。



Q11. プライマーピークが高いです。その原因と解決策は？



電気泳動図では、18～20 nt付近に高い非特異的ピークが確認できます。MLPAプローブおよびクオリティーフラグメントのピークシグナル強度は低いです。

A11. ■原因: プライマーピークが高い場合は、PCR失敗が考えられます。ポリメラーゼは、サンプルDNA中の夾雑物によって阻害される可能性があります。

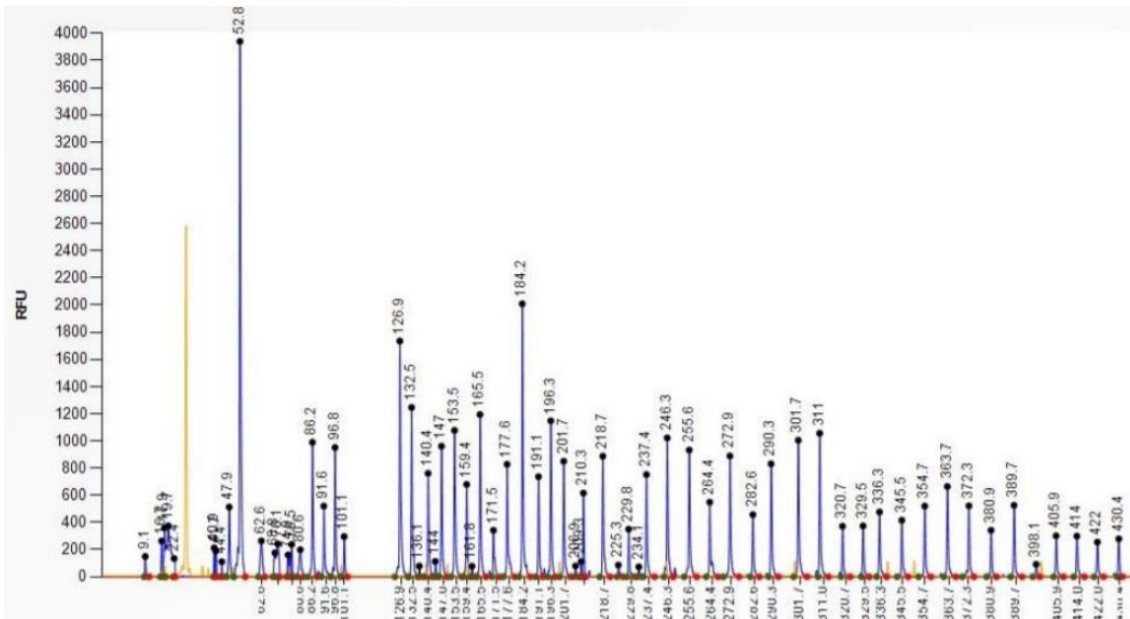
□解決策: ①夾雑物を希釈するために、MLPA 1反応あたりのサンプルDNA量を減らします。MLPA 1反応あたりの最適DNA量は50～100 ngです。

②夾雑物を除去するための追加ステップとして、DNAを精製します。簡易的なエタノール沈殿により、サンプルDNAに含まれる夾雑物は除去できます。

☆詳細は[エタノール沈殿のプロトコル](#)(MRC社サイトにjump)を参照ください。



Q12. プライマーダイマーピークが高いです。その原因と解決策は？

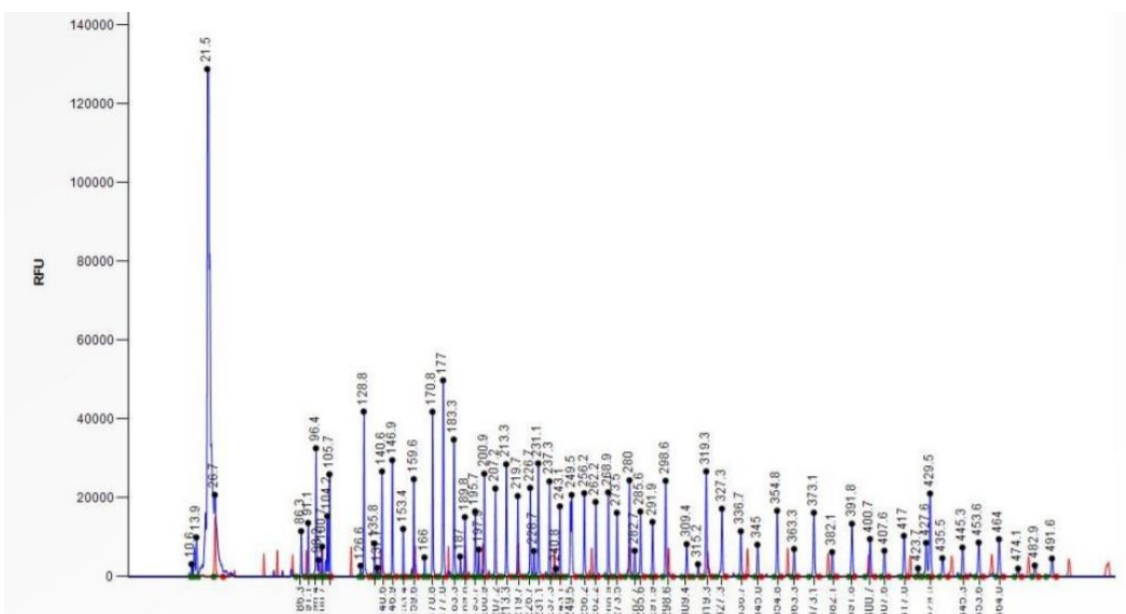


電気泳動図では、52 nt付近に高い非特異的ピークが確認できます。MLPAプローブおよびクオリティーフラグメントのピークシグナル強度が低いです。

A12. ■原因: プライマーダイマー(二量体)の形成は、一部のプライマー・MLPAプローブ間の非特異的な相互作用です。これにより消費されるプライマーは、MLPAピークパターンに取り込むことができません。その結果、MLPAピークパターンにバラつきが表れます。

□解決策: プライマー・MLPAプローブ間の非特異的な相互作用は、ホットスタートでPCR反応を開始すると起こり得ます。ホットスタートを行わず、代わりにポリマーゼマスターミックスをライゲーション産物に室温で添加し、サーマルサイクラーのプログラムを続けます。

Q13. MLPAプローブ間の非特異的ピークが現れます。その原因と解決策は？



電気泳動図では、21 nt付近に高い非特異的ピークが確認できます。MLPAプローブおよびクオリティフラグメントのピーク信号強度が低いです。

A13. ■原因: 非特異的ピークの形成は、MLPA反応時に室温でライゲーションマスターミックスを添加すると起こり得ます。

□解決策: ①ライゲーションマスターミックスを氷上で保存している場合は、MLPA反応前に室温まで温めます。

②サーマルサイクラーからチューブを取り出さないようにします。サーモブロックに反応チューブを置いた状態で、ライゲーションマスターミックスを反応液に添加します。



Q14.FRSSで✖マークが表示され、他のスコアが表示されていません。その原因と解決策は？  
 ※FRSS: Fragment Run Separation Score (キャピラリー電気泳動のクオリティーの指標となるスコア)

	sample name	sample type	bin simpl	FRSS	FMRS	probes	DNA	DD	X	Y	Pos
1	Female	reference	<input type="checkbox"/>	✖							D12
2	HGD	reference	<input type="checkbox"/>	✖							E12
3	Male	reference	<input type="checkbox"/>	✖							C12
4	NC	no DNA	<input type="checkbox"/>	✖							F12
5	OM42003	sample	<input type="checkbox"/>	✖							A12
6	OM42004	sample	<input type="checkbox"/>	✖							B12

各サンプルのスコアでFRSSのみに✖マークが表示されており、正しく評価がされていません。

A14. ■原因:「details」タブの実験条件が正しく選択されていない可能性があります。

- 解決策: 実験条件※の選択をご確認ください。
- ※下記チェック項目を参照

① experiment type: DNA/MLPA [default]

② CE device: ABI - 3130XL (set G5 LIZ)

nr.	act.	dye	channel type	channel content	analysis method
1	<input checked="" type="checkbox"/>	6-FAM	probes	P351-PKD1 - C1-1219 (C1)	block [default]
5	<input checked="" type="checkbox"/>	LIZ	size marker	G5500-250	

show advanced options

① experiment type

DNA/MLPA[default] (品番:POOO)       DNA/MS-MLPA (品番:MEOOO)

② CE device

シーケンサ機種     ABI ( 3100 ・ 3130(xl) ・ 3500(xl) ・ 3730(xl) )

※SeqStudioの場合は3500を選択してください。

Beckman/SCIEX ( CEQ-2000 ・ CEQ-8000 ・ CEQ-8800 ・ GeXP)

サイズスタンダードの蛍光標識(対応のFilter/Dyset)       ROX(D)  
 LIZ(G5)

③ Channel Content (MLPA プローブミックス)

品番:POOO / MEOOO  
Lot:AO-0000

④ Channel Content (サイズスタンダード)

GeneScan 500 ROX/LIZをご使用の場合は、「GS500-250」を選択ください。