

在SeqStudio基因分析仪上进行MLPA检测

在本应用说明中，我们展示了如下内容：

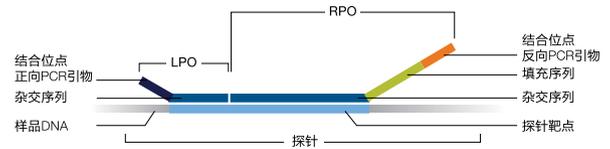
- 通过MRC-Holland开发的多重连接依赖性探针扩增(MLPA™)检测，新型Applied Biosystems™ SeqStudio™基因分析仪生成了高质量数据。
- SeqStudio基因分析仪可快速、高效地获取结果；每次可同时运行4份MLPA反应样品，并在45分钟内完成实验。
- 连接网络功能允许CE平台上的MLPA数据文件自动上传到个人或共享空间帐户；以Thermo Fisher Cloud为例，可在任何接入互联网访问的位置立即查看数据文件。
- SeqStudio基因分析仪具有较高的检测动态范围，可实现MLPA探针扩增子的精准片段大小及准确峰高。
- 生成的片段分析数据文件(.fsa)可以轻松导入Coffalyser.Net MLPA数据分析软件进行后续数据分析。

引言

多重连接依赖性探针扩增(MLPA)技术是广泛应用的分子生物学技术，可对人类遗传疾病研究中的多种DNA序列进行拷贝数检测[1]。该技术基于探针寡核苷酸的连接和PCR扩增，涵盖了多达50对可对目标基因座进行杂交的多重探针寡核苷酸。

每对寡核苷酸适用于特定长度的扩增产物；并且通过序列标记末端，所有连接的探针可以在PCR反应中用单个引物对扩增。正向PCR引物携带Applied Biosystems™6-FAM™荧光标记，可在自动毛细管电泳(CE)系统上按照探针的分子大小进行检测和定量(图1)。

1. 变性和杂交：左和右探针寡核苷酸(LPO和RPO)与其靶DNA结合



2. 连接：杂交探针寡核苷酸通过连接酶连接



3. 扩增：使用荧光PCR引物扩增连接的探针

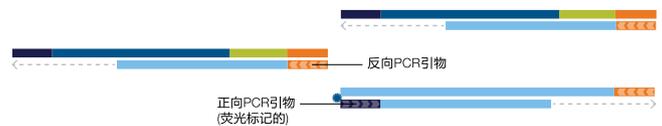


图1. MLPA技术示意图。

该方法已成功应用于外显子缺失和重复引起的疾病研究中，如杜氏肌营养不良症(DMD)和BRCA1/BRCA2基因分析。此外，MLPA技术的升级也可用于各种基因组序列的定量甲基化分析。

MRC-Holland开发了大量商业化的人类遗传疾病和癌症研究的MLPA检测产品。有关产品本身的详细信息、MLPA实验方案、以及推荐的MLPA数据分析软件Coffalyser.Net，参见mlpa.com网址。在本文中，我们将着重展示新型SeqStudio仪器作为MLPA应用检测的基因分析平台的可行性。

SeqStudio基因分析仪

新的SeqStudio基因分析仪依托30年经验积累的Applied Biosystems™毛细管电泳基因分析仪品牌。该基因分析仪通过对许多小型微生物基因组以及大型植物、哺乳动物和

人类基因组进行图谱绘制和测序，已经取得了重大的科学突破。我们的基因分析仪拥有两大标志性功能：Sanger测序和通过多色荧光标记和精确分子大小测定的DNA片段分析。SeqStudio基因分析仪外形紧凑，适合空间有限的实验室，且同时适用于8联管和标准96孔PCR板。该仪器易用功能的核心在于多功能卡夹，从而将4道毛细管、通用性聚合物、阳极缓冲液和流体硬件集成到一个简单的集成设备中(图2)。这一卡夹为用户获取数据提供了更高的灵活性和可控性。研究人员可以使用机载计算机通过触摸屏(eGUI)，或使用Plate Manager (在Thermo Fisher Cloud (thermofisher.com/cloud)中运行的独立软件)，或通过服务器或USB连接在单独的计算机上进行实验设置。SeqStudio基因分析仪与Thermo Fisher Cloud的增强连通功能可让研究人员随时随地分享数据，实时监控运行并分析数据。

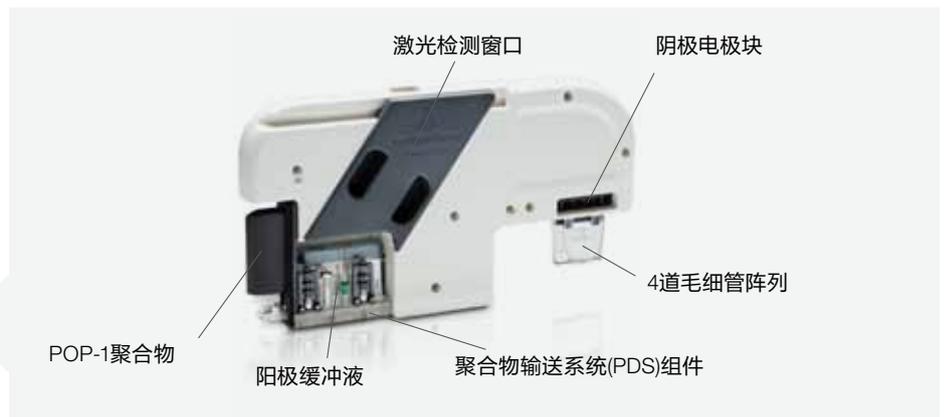


图2. SeqStudio基因分析仪和卡夹。

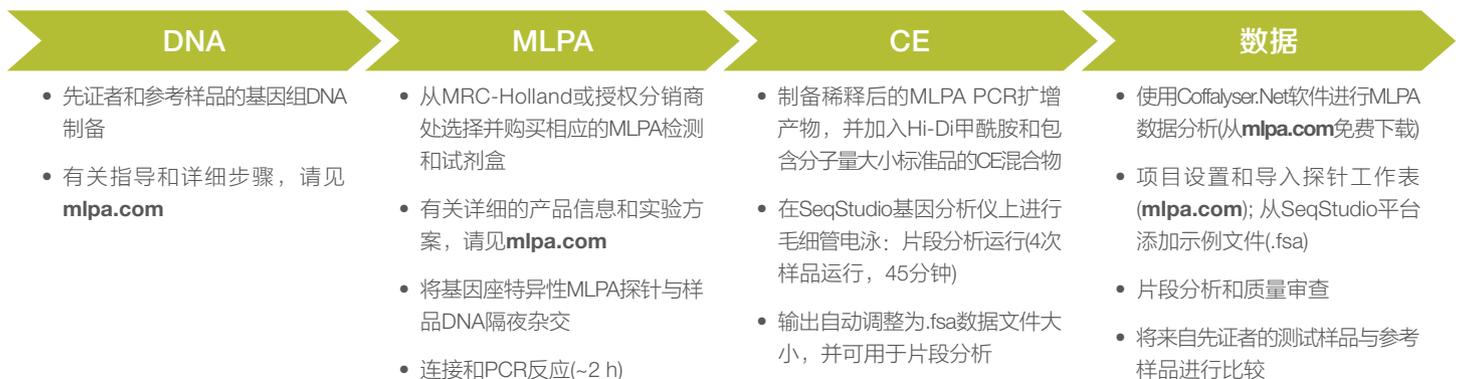


图3. MLPA工作流程概览 — 从DNA到数据结果。

材料与方法

1. 准备MLPA反应

根据制造商的说明书(mlpa.com)和标准的MLPA方案, 利用市售的SALSA™ MLPA™探针混合物和特定的DNA样品制备MLPA反应物。

2. 制备进行毛细管电泳的样品板

针对CE电泳反应(进样)的每份(共四份)样品, 将50 µL Applied Biosystems™ Hi-Di™甲酰胺与0.5 µL MRC550分子量大小标准品(MRC-Holland)进行组合。从该混合样品中, 取12 µL加样到96孔Applied Biosystems™ MicroAmp™板的4个孔(纵向亚组A-D或E-H取向)中, 并将1.5 µL 10倍稀释的MLPA样品分别添加至每个孔中。在TE缓冲液或分子生物学级纯水中稀释原MLPA PCR样品十分必要, 因为未稀释的样品会引起拔起峰。随后, 将孔板短暂离心除去所有气泡, 然后放入用于毛细管电泳的SeqStudio基因分析仪样品架中。

3. 根据CE反应设置SeqStudio分析仪

使用仪器上的eGUI或PC上的Plate Manager软件, 完成CE样品表和运行条件设置, 然后通过Thermo Fisher Cloud或U盘将样品表转移到仪器中。由于定制大小标准品MRC550是Applied Biosystems™ ROX™染料标记的, 以及MLPA样品是6-FAM染料标记的, 因此使用FragAnalysis运行模块, 并选择DS-30 (D)染料组进行数据分析。MLPA样品通常使用Applied Biosystems™ GeneScan™ 500 ROX分子量标准品(用于“D”染料组), 或使用LIZ™标记的GeneScan™ 500 LIZ™或600 LIZ™分子量标准品(用于“G5”染料组)进行电泳。使用具有恰当荧光标签的其他供应商的相应分子量标准品也同样可以选择, 但前提是MLPA峰值的最终尺寸值与分析模板的bin值设置相匹配(见下文)。

4. 使用Coffalyser.Net软件进行MLPA数据分析

完成CE运行后, SeqStudio基因分析仪会执行片段大小测定, 并生成可导出到云端或网络服务器的片段分析数据文件(.fsa), 或通过USB端口手动导出。然后将数据文件导入由Coffalyser.Net软件(可从mlpa.com免费下载)创建的MLPA数据分析项目。注意: 在本软件的仪器设置中, 选择“3500”作为替代。Coffalyser.Net的未来版本将具有SeqStudio基因分析仪的特定设置。

结果

使用MLPA检测大片段缺失

为了证明使用SeqStudio基因分析仪在MLPA分析中的可行性，我们使用了针对人血红蛋白 α (*HBA*)基因中已经得到良好表征的缺失基因的MLPA检测法。*HBA*基因中东南亚双重 α 球蛋白基因缺失(-SEA)包含带有19.4 kb缺失的 α -珠蛋白基因簇组成，其中包含完整的*HBA1*和*HBA2*基因，并且主要常见于东南亚地区[2]。使用SALSA™ MLPA™ probe-mix P140 HBA，通过MLPA分析来自杂合缺失载体(“样品”)和来自三个正常二倍体研究样品(其中一个标记为为

“对照”)中的DNA样品。图4A显示了对照和测试样品的电泳图中注释的MLPA峰。需要注意的是，与参考样品相比，缺失区域的探针信号减少了大约一半的峰值高度。在图4B中显示了具有相同probemix的比例图的定量分析。每个点表示测试和对照样品之间的探针比。其中，21个连续数据点在0.7标准比例以下(以红色显示)，表示并描绘了测试样本中的大量缺失。

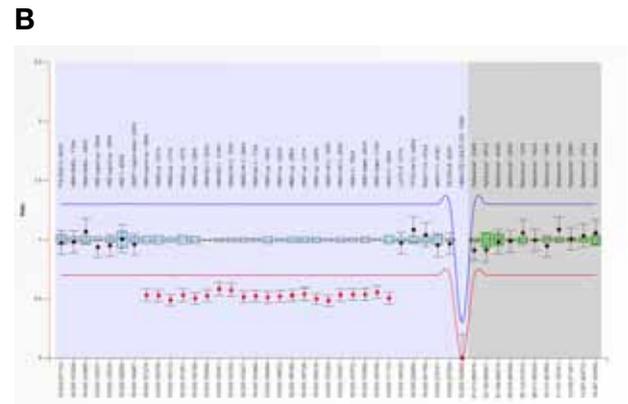
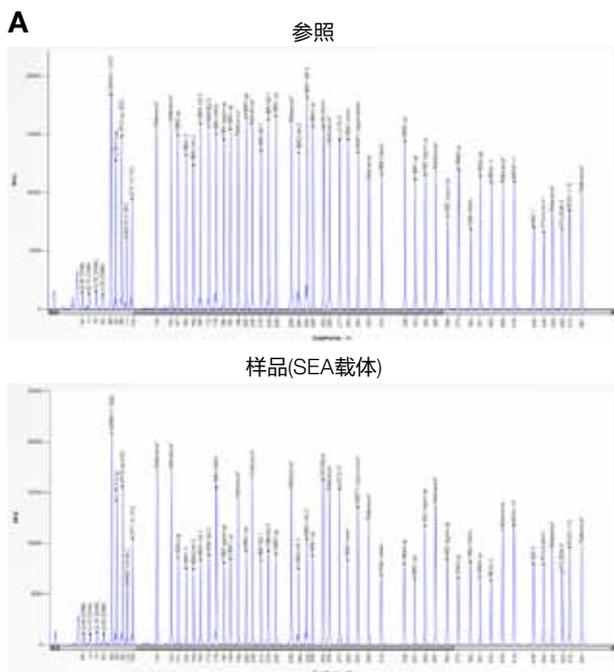


图4. 使用MLPA检测和分析一个已被鉴定的缺失。(A) 对照样品(顶部)和SEA载体(底部)的MLPA P140 HBA检测峰值谱图。请注意，后者谱图中检测HBA基因座的探针峰高度下降。x轴上的数字表示MLPA探针扩增子的核苷酸(nt)的相对大小；y轴表示相对荧光的峰值(RFU)。**(B)** Coffalyser.Net MLPA分析软件生

使用MLPA检测大片段重复

为了证明在人类基因组中可用于重复片段检测，我们分析了已知在DMD基因中携带外显子2-30的重复序列的先证者的DNA样品，并将其与正常参考DNA样品进行比较。本实验使用SALSA™ MLPA™ probemix P034 DMD-1。图5A显示了包含MLPA峰值分布的注释电泳图，图5B为显示靶向DMD基因中重复区域的探针比率的对应比率图。在蓝色阈值线上方表示重复区域，并且由探针比率从1增加到1.5来表示，对应拷贝数从2增加到3。

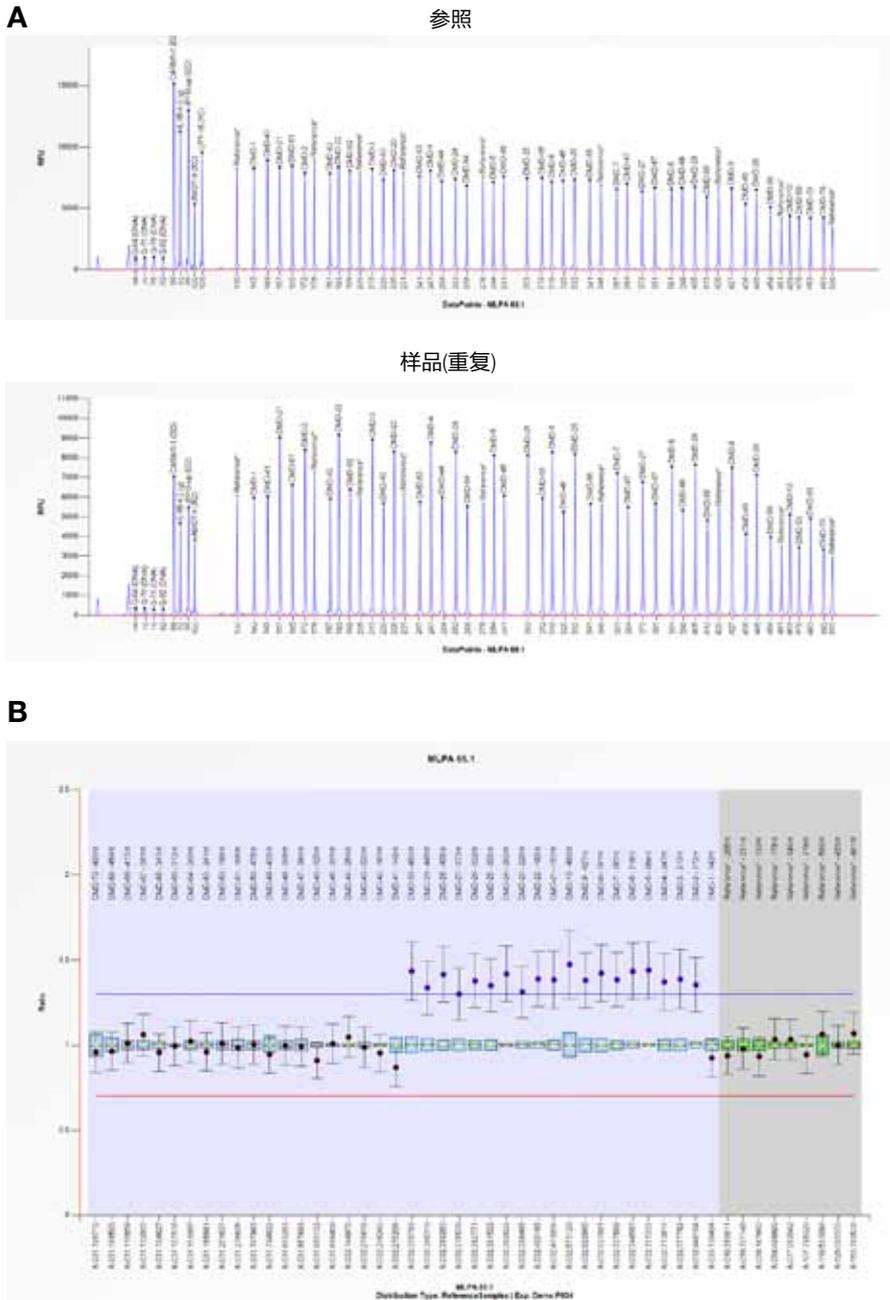


图5.检测DMD基因中的主要重复区域。(A) 携带重复(底部)和参考样品(顶部)的先证者的MLPA probemix P034 DMD的峰值图谱。(B) 重复携带基因的比例图，探针比例为~1.5表示拷贝数增加。

检测BRCA1基因缺失

BRCA1和BRCA2基因在遗传性乳腺癌和卵巢癌中经常发生突变。通常，当发生于基因的编码序列中时，缺失会导致蛋白质功能的破坏。SALSA™ MLPA™ probemix P002 BRCA1被临床研究人员广泛用于筛选人类BRCA1基因的缺失和/或重复(图6)。

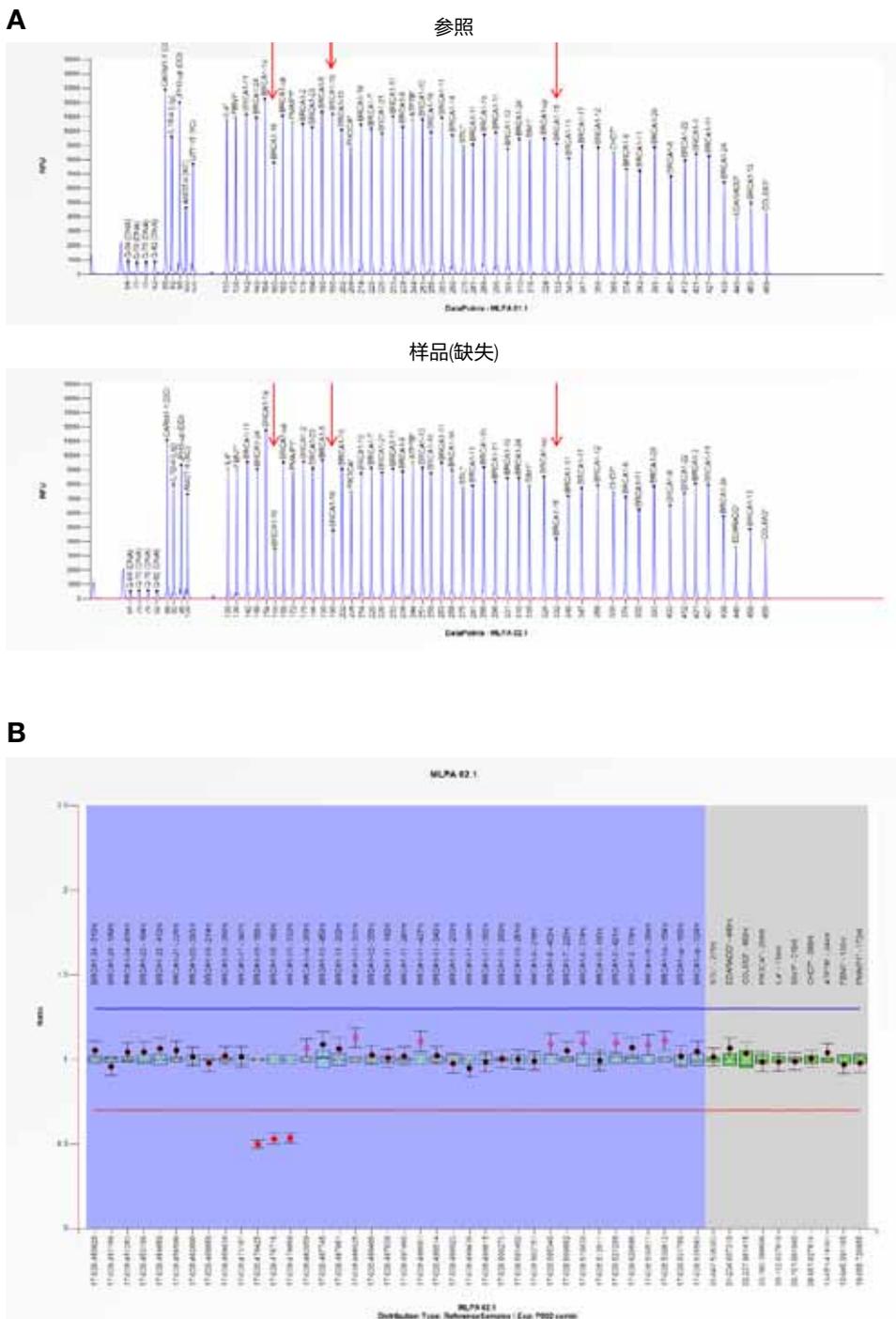


图6. MLPA检测BRCA1基因缺失。(A) 外显子15和16 (下部)具有杂合BRCA1缺失的Coriell DNA样品18949的MLPA probemix P002 BRCA1的峰值曲线, 以及参考样品(上部)的峰值曲线。(B) Coriell样品的比例图显示探针比为0.5, 表明含有杂合缺失。

结论

SeqStudio基因分析仪是Applied Biosystems™系列毛细管电泳仪家族新成员，具有Sanger测序和片段分析功能。

在此，我们已经证明该平台可从MLPA检测反应生成可靠数据。仪器生成的主要片段分析数据文件(.fsa)可轻松导入到MLPA专用的Coffalyser.Net软件中进行MLPA数据分析。SeqStudio基因分析仪是一种经济实惠、易于使用、维护需求少的仪器，对于正进行或计划使用MLPA的实验室，或者任何正在进行其他基因疾病研究的基因片段和测序分析的遗传分析实验室，都是不可多得的利器。

订购信息

产品	数量	货号
GeneScan 500 ROX大小标准染料	800次反应	401734
GeneScan 500 LIZ大小标准染料	800次反应	4322682
GeneScan 600 LIZ大小标准染料	800次反应	4366589
Hi-Di甲酰胺	25 mL	4311320
SeqStudio基因分析仪		A34274
GeneMapper软件5	1份许可证	4475073
SeqStudio卡夹	500次反应	A33671
SeqStudio入门试剂盒		A35000
SeqStudio SmartStart一天培训课程		A34684

有关MLPA产品及Coffalyser.Net软件的信息，请见mlpa.com

参考文献

1. Schouten JP et al. (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiples ligation-dependent amplification. *Nucleic Acids Res* 30(12):e57.
2. Nicholis RD et al. (1987) Recombination at the human alpha-globin gene cluster: sequence features and topological constraints. *Cell* 49(3):369-378.

更多有关SeqStudio基因分析仪的信息，请见 thermofisher.com/seqstudio



赛默飞
官方微信



赛默飞
Applied Biosystems
官方微信

免费服务电话：800 820 8982/400 820 8982
销售服务信箱：sales.china@thermofisher.com
技术咨询信箱：lifescience-cnts@thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC