



MLPA-NGS 试剂盒通用操作流程

使用手册版本号：V1.0

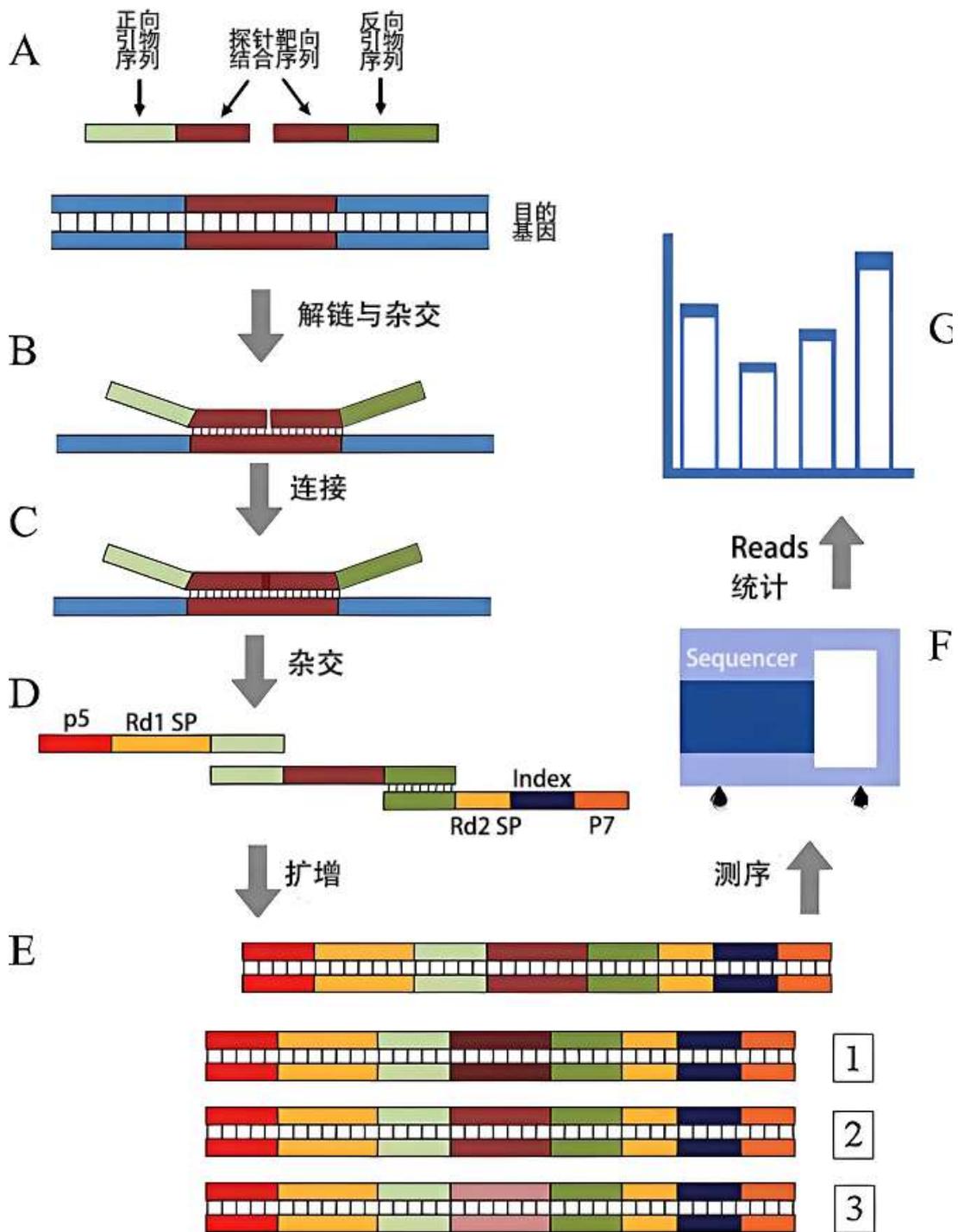
版本历史

使用手册版本	修订日期	修订内容摘要
A0	2025 年 1 月 1 日	首次发布

仅供科研使用

江阴检汇生物科技有限公司 版权所有

MLPA-NGS 技术的原理：



MLPA-NGS 是在 MLPA 基础上发展起来的。MLPA 是公认的拷贝数变异检测的金标准，一次可检测 60 个位点。

MLPA 与二代测序融合在一起构成 MLPA-NGS 技术，它以二代测序取代 MLPA 步骤中的毛细管电泳，对扩增产物以序列分析取代长度分析，因为片段的序列多样性远

高于长度多样性，所以 MLPA-NGS 比 MLPA 的检测通量大，一次可检测 2000 个位点。

MLPA 升级为 MLPA-NGS 技术后，性能不减，甚至更优。

探针连接后，使用带有不同 index 的二代测序接头序列进行 PCR，PCR 过程即为 NGS 建库过程，产物可混合测序，无需另外建库。因此，PCR 后可直接进行混合测序。

注意：

在试剂盒使用前，请自行准备 PCR 相关试剂如 Taq 酶，dNTP，Taq buffer 等。本试剂盒使用的是大连宝生物生产的 TaKaRa Taq™ Hot Start Version（货号 R007Q）。本公司专门为本试剂盒生产的 PCR Mix 正在测试中。

该流程需要两天时间。DNA 解链、DNA 与探针杂交的操作一般在第一天下午进行，杂交时运行 MLPA TouchDown 程序过夜。第二天进行杂交探针的连接、PCR 等操作。

1. DNA 解链

请准备 DNA 样本。DNA 浓度应在 10 - 100 ng/μL。取 DNA 样本 3uL，加入 PCR 管中，盖紧管盖，离心 15 秒，置于 PCR 仪中加热解链。

解链程序是：

98 度 5 分钟

25 度 hold

2. DNA 与探针杂交

在一个新的 PCR 管中，按样本数取 MLPA Buffer 与 Probe mix 等量混合成杂交 Mix。

MLPA Buffer 0.75uL ×n

Probe mix 0.75uL ×n

配制时一般需预备 10%以上损耗。

将样本从 PCR 仪中取出，各加入上述杂交 Mix 1.5 微升，盖紧管盖，离心 15 秒，放入 PCR 仪，运行 MLPA TouchDown 程序进行探针与模板的杂交。

MLPA TouchDown 程序：

95 度 1 分钟

65 度 1 小时

64 度 1 小时

63 度 1 小时

62 度 1 小时

61 度 1 小时

60 度 1 小时
59 度 1 小时
58 度 1 小时
57 度 1 小时
56 度 1 小时
55 度 1 小时
54 度 1 小时
54 度 hold

3. 杂交探针的连接

杂交时间一般为 14-20 小时。第二天，在新的 PCR 管子中准备连接 Mix，一般需预备 10%以上损耗。

纯净水 14uL xn
连接 buffer 2uL xn
连接酶 0.3uL xn

将连接 Mix 混合均匀，盖上 PCR 管盖，放入前述 PCR 仪器中，与正在杂交的样本一起孵育在 54 度 1 分钟以上，以预热连接 Mix。打开 PCR 仪的热盖，在 PCR 仪上进行操作（样本不取下来），将连接 Mix 取 16uL，依次加入并在 PCR 管内，与已有样本吹打混匀（吹打 5 次以上），盖上 PCR 管盖。每次更换 Tips。全部加完后，盖上 PCR 仪热盖，继续在 54 度孵育 20 分钟。

孵育完成后，立刻转入 DNA 解链程序，以尽量失活连接酶。从 PCR 仪中取出 PCR 管进行 PCR 操作。

4. PCR

试剂盒提供了 8 条正向引物和 12 条反向引物。正向引物（F）是森林绿色（ForestGreen），反向引物（R）是红色（Red）。两种引物可产生最多 96 个引物组合。

按 25 微升体系配制 PCR Mix:

模板(连接产物) 5 uL
纯净水 11 uL
Taq buffer 1 uL
dNTP 2 uL
引物 F 0.5 uL
引物 R 0.5 uL
GC buffer 5 uL
Taq 酶 0.2 uL

可先将除模板和引物外的其它试剂配好混匀，分别加入新的 PCR 管中，然后分别加入模板和引物。在加入引物时，每个 PCR 管使用不同的引物组合。加毕离心 15 秒，放入 PCR 仪中，运行 PCR 程序。

PCR 程序：

94 度 30 秒

60 度 30 秒

72 度 1 分钟

以上运行 35 个循环。

72 度 20 分钟

4 度 hold

5. 混样与送测

PCR 完成后，从各个 PCR 管中各取 10uL 产物，加入到 1.5 mL Eppendorf 管中混合均匀。填写测序单送公司，使用 Illumina 仪进行双端测序。在混合时，请保证不产生气溶胶污染。有条件者，可不开管盖寄送测序公司，请他们进行混合。

测序单的填写方式，可从本公司网站下载填写方法。

联系我们

生产企业：江阴检汇生物科技有限公司

生产地址：江苏省江阴市要塞路海澜财富中心东侧

客服电话：

邮 箱 ： jyjianhui@163.com

网 址 ： www.mlpangs.com