

Opći protokol MLPA

Potrebne komponente

Naziv	Kat. brojevi	Sastojci
SALSA® MLPA® probemix	pogledajte opis proizvoda probemix	sintetski oligonukleotidi, oligonukleotidi sintetizirani primjenom nepatogenog bakterijskog soja, Tris-HCl i EDTA


Upotrebljavati sa sljedećim:

- [SALSA® MLPA® Reagent Kit](#) (kat. br.: EK1-FAM, EK1-CY5, EK5-FAM, EK5-CY5, EK20-FAM)
- [Softver za analizu podataka Coffalyser.Net™](#) (kat. br.: n. d.)

Za određene primjene može se upotrebljavati sa sljedećim:

Naziv	Kat. brojevi	Sastojci
SALSA® Binning/Reference Selection/Artificial Duplication DNA	SDXXX	Tris-HCl, EDTA, sintetski/kontrolni plazmidni DNK, ljudski genomski DNK žene, DNK stanične linije

Skladištenje i rok trajanja komponenata

Preporučeni uvjeti		
--------------------	---	---

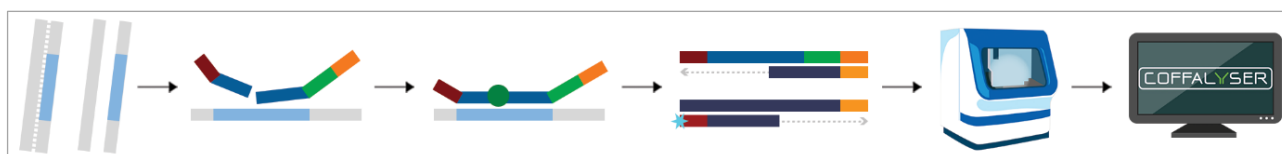
Zajamčen je rok trajanja do datuma isteka roka valjanosti, kao i nakon otvaranja ako se čuva u originalnom pakiranju u preporučenim uvjetima. Za točan datum isteka roka valjanosti pogledajte naljepnice na bočicama. Proizvodi ne smiju biti izloženi više od 25 ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja. Ne upotrebljavajte proizvode ako je pakiranje zaprimljeno oštećeno ili otvoreno. Proizvode ostavite u originalnim pakiranjima. Otpadni materijal mora se zbrinuti u skladu s nacionalnim i lokalnim propisima.

Sigurnost komponenata

Nijedan od sastojaka nije dobiven od ljudi, životinja, patogenih bakterija ili patogenih virusa. Na temelju prisutnih koncentracija, nijedan od sastojaka nije opasan kako je definirano Normom za obavještanje o opasnostima (Hazard Communication Standard). [Sigurnosno-tehnički list \(STL\) nije potreban](#) za ove proizvode: nijedan od pripravaka ne sadržava opasne tvari u koncentracijama koje zahtijevaju distribuciju STL-a (prema Uredbi (EZ) br. 1272/2008 [EU-GHS/CLP] i 1907/2006 [REACH] i izmjenama). U slučaju prolijevanja očistite vodom i slijedite odgovarajuće postupke na lokaciji.

Princip analize (MLPA)

SALSA® MLPA® polukvantitativna je tehnika temeljena na amplifikaciji do 60 proba, od kojih svaka detektira specifičnu sekvencu DNK-a. Tehnika započinje denaturacijom DNK-a uzorka (pogledajte Sliku 1 u nastavku). Zatim se dodaje smjesa proba MLPA, pri čemu svaka proba sadržava dva ili tri oligonukleotida. Kada je hibridizacija svih oligonukleotida s DNK-om uzorka završena, probe vezane za DNK uzorka se ligiraju. Sve ligirane probe su amplificirane primjenom univerzalnog para početnica PCR-a, od kojih je jedna početnica fluorescentno označena. To rezultira skupom amplicona PCR-a jedinstvenih za svaku probu, svakog s jedinstvenom duljinom. Ampliconi se zatim odvajaju po duljini na instrumentu za kapilarnu elektroforezu. Dobiveni elektroferogram specifičan za uzorak analizira se s pomoću softvera Coffalyser.Net. Usporedbom elektroferograma uzorka s onim skupa referentnih uzoraka može se odrediti broj genomskih ciljnih sekvenci prisutnih u uzorku od interesa.



Slika 1. Tijek rada MLPA

Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni

- Ultračista voda
- TE_{0,1} (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM EDTA)
- Kalibrirani termocikler s grijanim poklopcem (99 – 105 °C) i standardnom laboratorijskom opremom
- Epruvete/trake/pločice za PCR od 0,2 ml
- Instrument za kapilarnu elektroforezu koji radi u uvjetima denaturiranja i ima softver za analizu fragmenata; za više pojedinosti pogledajte [ovaj članak Centra za pomoć](#)
- Visokokvalitetni formamid
- Označeni standard veličine: Applied Biosystems GeneScan™ 500 LIZ®/ROX™; SCIEX CEQ™ DNA Size Standard kit – 600
- Polimer u gelu: POP-1, POP-4 ili POP-7 (Applied Biosystems); GenomeLab™ Linear Polyacrylamide denaturing gel (SCIEX); Spectrum Compact Polymer4 (Promega); Hitachi DS3000 Polymer4 (Hitachi)

Zahtjevi za uzorke

50 – 250 ng ljudskog DNK-a (osim ako nije drugačije navedeno) ekstrahirane iz tkiva navedenog u opisu proizvoda probemix. Uzorci DNK-a trebaju sadržavati 5 – 10 mM Tris-HCl pufera pH 8,0 – 8,5.

Preporučene metode ekstrakcije:

- QIAGEN Autopure LS (automated) i QIAamp DNA mini/midi/maxi kit (ručno)
- Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (ručno)
- isoljavanje (ručno)

Mjere opreza i upozorenjaOpće mjere opreza

1. Ne upotrebljavajte proizvod ako je oštećen ili mu je istekao rok trajanja.
2. Samo za stručnu uporabu. Analizu trebaju provoditi stručnjaci obučeni za molekularne tehnike.
3. Potrebna je interna validacija svake analize, posebice prilikom prve uporabe ili prilikom promjene postupka rukovanja uzorkom, metode ekstrakcije DNK-a ili instrumenata koji se upotrebljavaju. Upotrebljavajte ≥ 16 različitih uzoraka DNK-a zdravih osoba. Validacija bi trebala pokazati standardnu devijaciju $\leq 0,10$ za svaku probu, osim ako nije drugačije opisano u opisu proizvoda probemix.
4. Osoba odgovorna za tumačenje rezultata treba biti upoznata s najnovijim znanstvenim spoznajama o primjeni i svim ograničenjima tehnike MLPA koja bi mogla dovesti do netočnih rezultata.
5. Za analizu podataka potrebno je upotrebljavati softver Coffalyser.Net. Uporaba drugog softvera može dovesti do lažnih rezultata.
6. Uvijek provjerite rezultate kontrole kvalitete prije tumačenja rezultata. Samo rezultati uzoraka s dobrim ocjenama kvalitete mogu se pouzdano tumačiti.
7. Očigledne homozigotne delecije treba potvrditi vizualnim pregledom elektroferograma kako bi se isključili lažni rezultati uzrokovani problemima s grupiranjem (engl. binning) ili niskim signalima.
8. Rezultati tehnike MLPA namijenjeni su za uporabu u kombinaciji s drugim kliničkim i dijagnostičkim nalazima, u skladu sa stručnim standardima prakse, uključujući potvrdu alternativnim metodama, procjenu roditelja, kliničku genetsku procjenu i savjetovanje, kako je prikladno. Rezultate testova treba tumačiti klinički molekularni genetičar ili jednako kvalificirani stručnjak.

Mjere opreza za kvalitetu uzorka

9. Gubitak purinskih baza u uzorku DNK-a uzrokovan nedostatnim puferom kapacitetom uzorka DNK-a može rezultirati lažnim rezultatima. Ako nije poznato je li prisutna dostatna količina pufera, dodajte Tris-HCl: 4 μ l DNK-a uzorka + 1 μ l 50 mM Tris-HCl pH 8,5.
10. Kontaminanti koji ostaju nakon ekstrakcije DNK-a, uključujući soli, heparin, EDTA (> 1,5 mM) i željezo, mogu utjecati na učinkovitost analize.
11. Sol u uzorcima DNK-a može uzrokovati slabu denaturaciju. To može rezultirati prividnim delecijama, čak i kod nekoliko proba koje prepoznaju susjedne genomske ciljane sekvence. Ne upotrebljavajte sustave QIAGEN M6, M48 i M96; oni ostavljaju previše soli. Kod sustava QIAGEN EZ1 upotrebljavajte [Dopunski protokol tvrtke QIAGEN \(engl. QIAGEN Supplementary Protocol\)](#) za MLPA.
12. Ne koncentrirajte DNK isparavanjem ili instrumentom SpeedVac; to dovodi do visokih koncentracija EDTA i soli.

Mjere opreza tijekom izvođenja

13. Nikada ne upotrebljavajte više od 5 μ l otopine DNK-a po reakciji. Potrebna količina DNK-a navedena je u opisu proizvoda probemix.
14. Ne miješajte različite serije proizvoda probemix za MLPA.
15. Isparavanje koje povećava koncentracije kontaminanta i soli može se dogoditi tijekom hibridizacije preko noći ili prilikom pipetiranja glavne mješavine za ligaciju. Za sprječavanje/smanjenje isparavanja:
 - a. upotrebljavajte višekanalnu pipetu kako biste smanjili vrijeme rukovanja
 - b. provjerite radi li grijani poklopac ispravno
 - c. povećajte ili smanjite tlak zagrijanog poklopcu
 - d. pokušajte upotrebljavati različite reakcijske epruvete
 - e. stavite malu kap mineralnog ulja na uzorak DNK-a kako biste prekrili površinu tekućine.
16. Redovito mijenjajte kapilare i polimer. Polimer se brzo raspada nakon duljeg izlaganja temperaturi > 25 °C. Ako su vrhovi standarda veličine opetovano niski i široki, moguće je da je kvaliteta kapilara ili polimera smanjena.
17. Formamid može postati kiseo, što pri zagrijavanju uzrokuje gubitak purinskih baza i fragmentaciju produkata PCR-a. Upotrebljavajte visokokvalitetni formamid i čuvajte ga u alikvotima na temperaturi od –20 °C.
18. Volumen produkta PCR-a nikada ne smije biti > 10 % ukupne injekcijske smjese. Kada su vrhovi niski, povećajte vrijeme i/ili napon injektiranja – nemojte dodavati još produkta PCR-a.
19. Lažni rezultati mogu se dobiti ako je jedan ili više vrhova izvan skale. Rizik od vrhova izvan skale veći je kada se upotrebljavaju proizvodi probemix koji sadržavaju relativno mali broj proba. Za smanjenje signala ponovno izvedite analizu produkata PCR-a upotrebljavajući:
 - a. niži napon injektiranja / kraće vrijeme injektiranja
 - b. smanjenu količinu produkata PCR-a.
20. Kontaminacija uzoraka DNK-a s cDNK ili ampliconima PCR-a pojedinačnih egzona može dovesti do povećanog signala probe. Analiza drugog, nezavisno prikupljenog i izoliranog uzorka DNK-a može isključiti te artefakte kontaminacije.

Mjere opreza specifične za primjenu

Pogledajte opis proizvoda probemix.

Postupak testa, dio I. – reakcija MLPA

Upute	Program termociklera
1. Denaturacija DNK-a	
1.1 Označite epruvete/trake/pločice od 0,2 ml. 1.2 U svaku epruvetu dodajte 5 µl uzorka DNK-a ili TE (kontrola bez DNK-a). 1.3 Stavite epruvete u termocikler, zagrijavajte na 98 °C u trajanju od 5 minuta, ohladite na 25 °C.	98 °C tijekom 5 min Pauza na 25 °C
2. Hibridizacija	
2.1 Odmrznite MLPA Buffer i MLPA Probemix, promiješajte u vrtložnoj miješalici i kratko centrifugirajte. Pipetirajte kada dosegne sobnu temperaturu. 2.2 Pripremite GLAVNU MJEŠAVINU ZA HIBRIDIZACIJU . Za jednu reakciju*: ● MLPA Buffer: 1,5 µl ● MLPA probemix: 1,5 µl Dobro promiješajte u vrtložnoj miješalici ili pipetiranjem. 2.3 Dodajte 3 µl GLAVNE MJEŠAVINE ZA HIBRIDIZACIJU u svaku epruvetu. Precizno pipetiranje ključno je u ovom koraku! Promiješajte pipetiranjem. 2.4 Stavite epruvete u termocikler, inkubirajte na 95 °C u trajanju od 1 minute i hibridizirajte na 60 °C u trajanju od 16 – 20 sati.	95 °C tijekom 1 min Pauza na 60 °C (16 – 20 sati)
3. Ligacija	
3.1 Odmrznite Ligase Buffer A i Ligase Buffer B, promiješajte u vrtložnoj miješalici i kratko centrifugirajte. Pipetirajte kada dosegne sobnu temperaturu. Grijte Ligase-65 u rukama 10 sekundi. Ne miješajte u vrtložnoj miješalici, samo kratko centrifugirajte. 3.2 Pripremite glavnu mješavinu LIGASE-65** . Za jednu reakciju*: ● Ultračista voda: 25 µl ● Ligase Buffer A: 3 µl ● Ligase Buffer B: 3 µl ● Ligase-65: 1 µl, dodano posljednje. Dobro promiješajte laganim pipetiranjem gore-dolje, nemojte miješati u vrtložnoj miješalici. 3.3 Nastavite program termociklera i ohladite epruvete na 54 °C. 3.4 Na 54 °C otvorite epruvete u termocikleru , dodajte 32 µl GLAVNE MJEŠAVINE LIGASE-65 u svaku epruvetu, dobro promiješajte pipetiranjem, zatvorite epruvete i nastavite inkubirati na 54 °C tijekom 15 minuta. 3.5 Zagrijte na 98 °C i inkubirajte 5 minuta kako biste inaktivirali ligazu, ohladite na 20 °C.***	Pauza na 54 °C 54 °C tijekom 15 min 98 °C tijekom 5 min Pauza na 20 °C
4. PCR	
4.1 Odmrznite mješavinu PCR Primer Mix, promiješajte u vrtložnoj miješalici i kratko centrifugirajte. Grijte polimerazu u rukama 10 sekundi, ne miješajte u vrtložnoj miješalici, samo kratko centrifugirajte. 4.2 Pripremite GLAVNU MJEŠAVINU POLIMERAZE . Za jednu reakciju*: ● Ultračista voda: 7,5 µl ● PCR Primer Mix: 2 µl ● Polimeraza: 0,5 µl Dobro promiješajte pipetiranjem gore-dolje, nemojte miješati u vrtložnoj miješalici. 4.3 Na 20 °C dodajte 10 µl GLAVNE MJEŠAVINE POLIMERAZE u svaku epruvetu, dobro promiješajte pipetiranjem i odmah nastavite s programom PCR-a. 4.4 Nakon PCR-a, kako biste izbjegli kontaminaciju, nemojte otvarati epruvete u istoj prostoriji te upotrijebite drugu mikropipetu za rukovanje produktima PCR-a. 4.5 Produkte PCR-a čuvajte zaštićene od svjetlosti na 4 °C do 1 tjedan ili između –25 °C i –15 °C dulje vrijeme.	35 ciklusa PCR-a: ● 95 °C tijekom 30 s ● 60 °C tijekom 30 s ● 72 °C tijekom 60 s 72 °C tijekom 20 min Pauza na 15 °C

*Kako biste smanjili varijaciju uzorka, pripremite dovoljno velike volumene otopina glavne mješavine: višak volumena od 5 – 10 %.

**Kada se pripremaju unaprijed (ne više od 1 sat prije uporabe), glavne mješavine čuvajte na ledu ili na 4 °C te ih zagrijte na sobnu temperaturu prije dodavanja u epruvete.

***Kada se epruvete odnose u zaseban laboratorij za PCR, prethodno zagrijte termocikler za PCR, npr. postavite ga na 95 °C na 1 sekundu, a zatim paузirajte na 20 °C. Smanjite vrijeme prijenosa (npr. < 5 min), stavite epruvete u termocikler i nastavite s korakom 4.1. Time se smanjuje stvaranje nespecifičnih vrhova.

Postupak testa, dio II. – odvajanje fragmenata

1. Postavke injektiranja za često upotrebljavane uređaje za kapilarnu elektroforezu podržane u softveru Coffalyser.Net	
Oznaka početnice PCR-a: FAM	
ABI SeqStudio	Kapilare: 28 cm Injekcijska smjesa: <ul style="list-style-type: none"> • produkt PCR-a 0,8 µl • GS500 standard veličine 0,3 µl (ROX/LIZ) • HiDi formamid 12 µl Zatvorite injekcijsku pločicu, zagrijavajte na 86 °C u trajanju od 3 minute, hladite na 4 °C u trajanju od 2 minute.
ABI Prism 3100 ABI 3130 (xL) ABI 3500 (xL) ABI 3730 (xL) ABI SeqStudio Flex RUO/Dx	Kapilare: 36 ili 50 cm Injekcijska smjesa: <ul style="list-style-type: none"> • produkt PCR-a 0,7 µl • GS500 standard veličine 0,3 µl (ROX) ili 0,2 µl (LIZ) • HiDi formamid 9 µl Zatvorite injekcijsku pločicu, zagrijavajte na 86 °C u trajanju od 3 minute, hladite na 4 °C u trajanju od 2 minute.
Hitachi DS3000*	Zatvorite injekcijsku pločicu, zagrijavajte na 86 °C u trajanju od 3 minute, hladite na 4 °C u trajanju od 2 minute.
Promega Spectrum Compact*	*Samo kapilare od 36 cm.
Oznaka početnice PCR-a: Cy5	
SCIEX CEQ 2000 SCIEX CEQ 8000 SCIEX CEQ 8800 SCIEX GenomeLab GeXP	Kapilare: 33 cm Injekcijska smjesa: <ul style="list-style-type: none"> • produkt PCR-a 1 µl • SS600 standard veličine 0,5 µl • HiDi formamid / Beckman SLS 28,5 µl Dodajte 1 kap visokokvalitetnog mineralnog ulja.
2. Postavke elektroforeze	
Upotrebljavajte zadane postavke analize fragmenata prikladne za primjenu, instrument, polimer i duljinu kapilare. Optimizacija postavki instrumenta može biti potrebna kako bi se osiguralo da su signali unutar optimalnog raspona detekcije i da izvođenje traje dovoljno dugo za detekciju svih fragmenata. Optimalni rasponi signala (izraženi u RFU) i minimalni/maksimalni signali po instrumentu mogu se pronaći u Referentnom priručniku za Coffalyser.net .	

Kontrola kvalitete i analiza podataka

Za kontrolu kvalitete i analizu podataka treba se upotrebljavati najnovija inačica softvera Coffalyser.Net™ (može se preuzeti s [mrežnog mjesta tvrtke MRC Holland](#)). Za detaljne upute pogledajte [Referentni priručnik za Coffalyser.Net](#).

Pogledajte i sljedeće članke u našem Centru za pomoć:

- [Objašnjenje o kontrolnim fragmentima za količinu i denaturaciju](#)
- [Informacije o kontrolama bez DNK-a](#)

Za dodatnu pomoć u rješavanju problema posjetite stranice za rješavanje problema u [Centru za pomoć tvrtke MRC Holland](#).

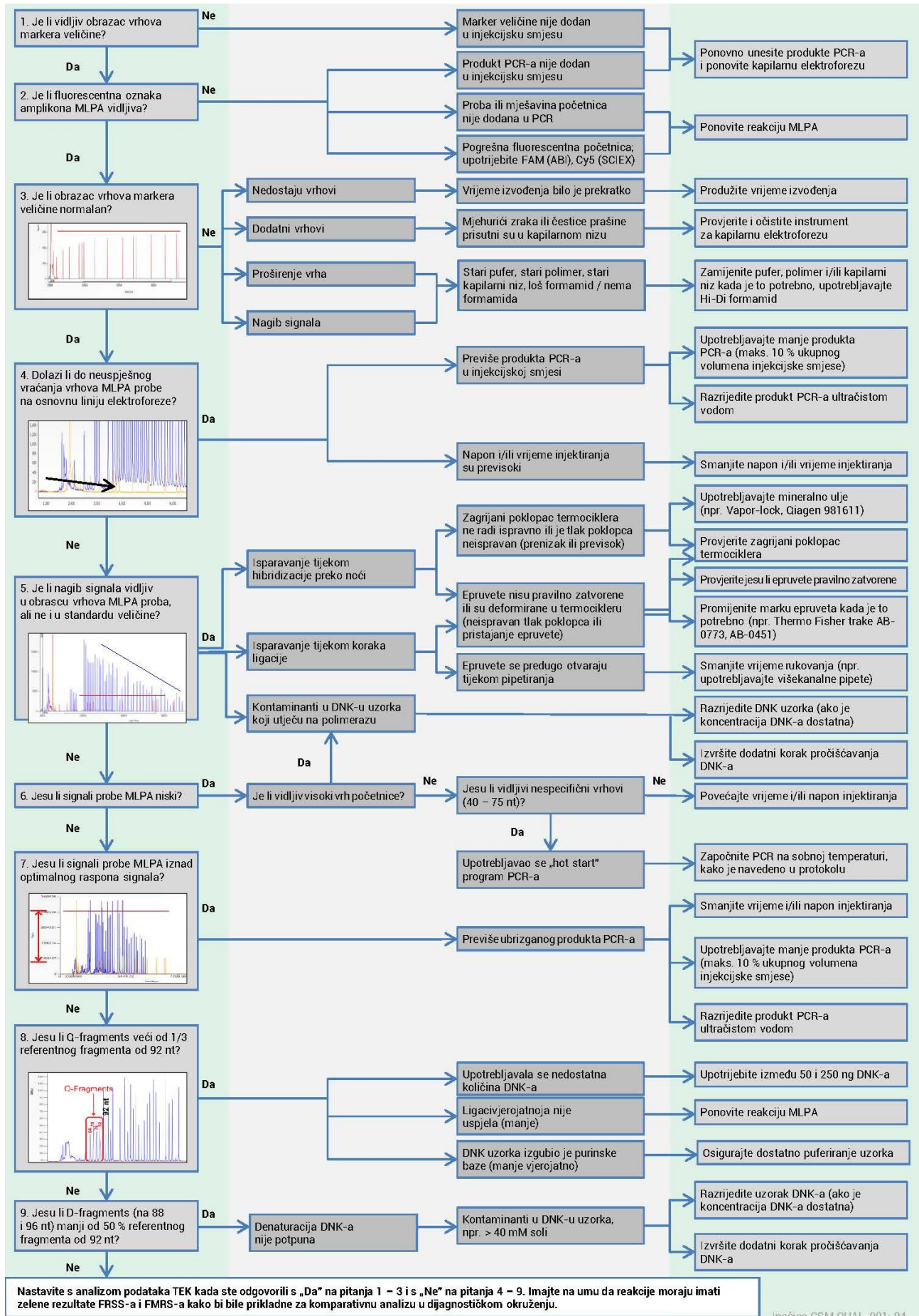
Tumačenje i potvrda rezultata i svojstva učinkovitosti

Ovisi o primjeni; pogledajte opis proizvoda probemix.

Ograničenja

1. U većini populacija i za većinu primjena tehnike MLPA glavni uzrok genetskih defekata male su (točkaste) mutacije, od kojih većinu MLPA neće detektirati.
2. MLPA neće detektirati većinu inverzija, uravnoteženih translokacija ili promjena u broju kopija koje se (djelomično) nalaze izvan sekvence koju je detektirala proba MLPA.
3. Analitička učinkovitost može biti ugrožena nečistoćama u uzorku DNK-a, nepotpunom denaturacijom DNK-a (npr. zbog kontaminacije solju), uporabom nedostatne ili prevelike količine DNK-a uzorka, nedostatnim ili neprikladnim referentnim uzorcima, problemima s kapilarnom elektroforezom ili lošim postupkom normalizacije podataka i drugim tehničkim pogreškama.
4. Manje razlike u izvođenju eksperimenta mogu utjecati na obrazac vrhova MLPA. U analizu uključite samo uzorke koji su a) uključeni u isti eksperiment MLPA i b) testirani s istom serijom proizvoda probemix.
5. U određenim slučajevima za ispravno tumačenje rezultata može biti potrebna analiza roditeljskih uzoraka.
6. Određene aberacije broja kopija mogu biti posljedica somatskih promjena, uključujući velike delecije i duplikacije cijelih kromosoma.
7. Male promjene (npr. varijante pojedinačnog nukleotida (engl. Single Nucleotide Variants, SNVs), mali indeli) u sekvenci koju cilja proba mogu uzrokovati lažno pozitivne rezultate, čak i kada su >20 nt od mjesta ligacije probe. Promjene u sekvenci mogu smanjiti signal probe sprječavanjem ligacije oligonukleotida probe ili destabilizacijom vezanja oligonukleotida probe na DNK uzorka. Odstupanja detektirana analizom MLPA trebaju se potvrditi, a odstupanja pojedinačnih proba uvijek zahtijevaju potvrdu. Preporučuje se sekvenciranje ciljane regije.
8. DNK iz reakcija amplifikacije cijelog genoma nije prikladan za MLPA zbog sustavnog odstupanja amplifikacije.
9. Testovi MLPA pružaju *prosječan* broj kopija ciljnih sekvenci u stanicama iz kojih je uzorak DNK-a ekstrahiran. U slučaju da nekoliko proba koje ciljaju susjedne sekvence imaju neuobičajenu vrijednost, ali ne dosežu uobičajene granične vrijednosti za deleciju/duplikaciju, mogući je uzrok mozaicizam. Suptilne promjene, poput onih uočenih u slučajevima mozaika, mogu se razlikovati samo kada su probe raspoređene prema kromosomskoj lokaciji.
10. Nisu sve promjene u broju kopija koje detektira MLPA patogene. Tvrtka MRC Holland ne može dati informacije o tome hoće li specifična delecija ili duplikacija rezultirati bolešću.


Dijagram tijeka za rješavanje problema



Više pojedinosti

Videozapis na mreži s uputama [Kako izvesti MLPA reakciju](#).

Schouten JP et al. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 30:e57.

Više informacija	
www.mrcholland.com ; support.mrcholland.com	
	MRC Holland BV; Willem Schoutenstraat 1 1057 DL, Amsterdam, Nizozemska
E-pošta	info@mrcholland.com (informacije i tehnička pitanja); order@mrcholland.com (narudžbe)
Telefon	+31 888 657 200

MRC Holland, SALSA, MLPA, digitalMLPA, Coffalyser.Net, Coffalyser digitalMLPA i njihovi logotipi zaštitni su znakovi ili registrirani zaštitni znakovi tvrtke MRC Holland BV. Sve ostale marke i nazivi koji su ovdje navedeni vlasništvo su njihovih vlasnika.



Implementirane promjene u protokolu
<p><i>Inačica 010-HR1 – 21. svibnja 2025.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - ABI SeqStudio Flex preimenovan u ABI SeqStudio Flex RUO/Dx na stranici 4. - Prethodne verzije dokumenta dostupne su samo na engleskom jeziku. <p><i>Inačica 009 – 21. svibnja 2024.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Protokol je dobio novu strukturu i novi dizajn. - Tablice u komponentama analize SALSA MLPA zamijenjene su referencama na opise komponenti. - Odjeljak o standardnim naljepnicama na pakiranju uklonjen je. - Odjeljak o principu metode MLPA preformuliran je, a slika tijekom rada je poboljšana. Slika s prikazom izračuna uklonjena je. - Ažuriran je odjeljak „Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni”. - Reorganizirane su informacije u odjeljku Obrada i skladištenje uzorka. Odjeljak je skraćen i preimenovan u „Zahtjevi za uzorke”. Neke su informacije premještene u odjeljak „Mjere opreza i upozorenja”. - Odjeljak „Odabir referentnih i ostalih kontrolnih uzoraka” uklonjen je jer su te informacije prisutne i u opisima proizvoda. - Informacije u poglavlju 3., „Napomene koje treba pročitati prije početka” premještene su u odjeljak „Postupak testa, dio I.” - Informacije iz poglavlja 5. i 6. („Protokol MLPA ukratko” i „Protokol MLPA”) objedinjene su u odjeljku „Postupak testa, dio I.” u novom tabličnom formatu. - Uklonjene su upute za uklanjanje epruveta iz termociklera nakon denaturacije i njihovo vraćanje nakon dodavanja glavne mješavine za hibridizaciju. - Upute za stavljanje epruveta u termocikler prije dodavanja glavne mješavine polimeraze uklonjene su jer nije bilo prethodnih uputa za njihovo uklanjanje. - Dodana je fusnota u odjeljak „Postupak testa, dio I.” s uputama za situaciju kada se epruvete odnose u zaseban laboratorij za PCR. - Informacije u odjeljku 7.1., „Napomene koje treba pročitati prije početka” premještene su u odjeljak „Mjere opreza i upozorenja”. - Tablica s rasponima signala u instrumentima za kapilarnu elektroforezu u odjeljku 7.2. zamijenjena je referencom na odgovarajuću tablicu u Referentnom priručniku za Coffalyser.Net. - Informacije u poglavlju 8. („Kontrola kvalitete i rješavanje problema”) zamijenjene su referencama na Referentni priručnik za Coffalyser.Net i članke iz baze znanja o kontrolnim fragmentima i kontrolama bez DNK-a. - Poglavlje 9. („Analiza podataka”) zamijenjeno je uputama za preuzimanje softvera Coffalyser.Net i čitanje Referentnog priručnika za Coffalyser.Net. - Informacije u poglavlju 10. („Tumačenje i potvrda”) premještene su u odjeljak „Mjere opreza i upozorenja”, u odjeljak „Ograničenja” ili su uklonjene jer su specifične za određene primjene.