

MLPA Основной протокол

Необходимые компоненты

Наименование	Кат. номер	Состав
SALSA® MLPA® смесь зондов	Описание смеси зондов см. в описании продукта	Синтетические олигонуклеотиды, очищенные бактериальные олигонуклеотиды, Tris-HCl, ЭДТА,



Для использования с:

- [SALSA® MLPA® набор реагентов](#) (Кат. No: EK1-FAM, EK1-CY5, EK5-FAM, EK5-CY5, EK20-FAM)
- [Data analysis software Coffalyser.Net™](#) (Cat. No: n.a.)

Для определенных приложений, может использоваться с:

Наименование	Кат. номер	Состав
SALSA® Binning/Reference Selection/Artificial Duplication DNA	SDXXX	Трис-HCl, ЭДТА, синтетическая/контрольная плазмидная ДНК, геномная ДНК женская, ДНК из клеточных линий

Хранение и сроки годности

Рекомендованные условия		
-------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------

Срок годности до истечения срока годности гарантирован, в том числе после вскрытия, при хранении в оригинальной упаковке в рекомендованных условиях. Точный срок годности указан на этикетках флаконов. Продукты не должны подвергаться более чем 25 циклам замораживания-оттаивания. Не используйте продукты, если упаковка была повреждена или вскрыта по прибытии. Храните продукты в оригинальной упаковке. Отходы должны утилизироваться в соответствии с национальными и местными правилами.

Безопасность компонентов

Ни один из ингредиентов не является продуктом жизнедеятельности человека, животных, патогенных бактерий или вирусов. Исходя из присутствующих концентраций, ни один из ингредиентов не является опасным в соответствии со стандартом информирования об опасности. [Паспорт безопасности \(SDS\) для этих продуктов не требуется](#): ни один из препаратов не содержит опасных веществ в концентрациях, требующих применения SDS (в соответствии с Регламентами (ЕС) № 1272/2008 [EU-GHS/CLP] и 1907/2006 [REACH] и поправками к ним). В случае разлива промойте водой и соблюдайте соответствующие процедуры на месте

Assay principle (MLPA)

SALSA® MLPA® это полуколичественный метод, основанный на амплификации до 60 зондов, каждый из которых обнаруживает определенную последовательность ДНК. Метод начинается с денатурации образца ДНК (см. рисунок 1 ниже). Затем добавляется смесь зондов MLPA, каждый из которых состоит из двух или трех олигонуклеотидов. Когда гибридизация всех олигонуклеотидов с образцом ДНК завершена, зонды, связанные с образцом ДНК, лигируются. Все лигированные зонды амплифицируются с использованием универсальной пары праймеров для ПЦР, один из которых имеет флуоресцентную метку. В результате получается набор ампликонов для ПЦР, уникальных для каждого зонда, каждый из которых имеет уникальную длину. Затем ампликоны разделяются по длине с помощью прибора для капиллярного электрофореза. Полученная электрофореграмма для конкретного образца анализируется с помощью Coffalyser.Net. Сравнивая электрофореграмму образца с электрофореграммой набора эталонных образцов, можно определить количество геномных мишеней, присутствующих в интересующем образце.

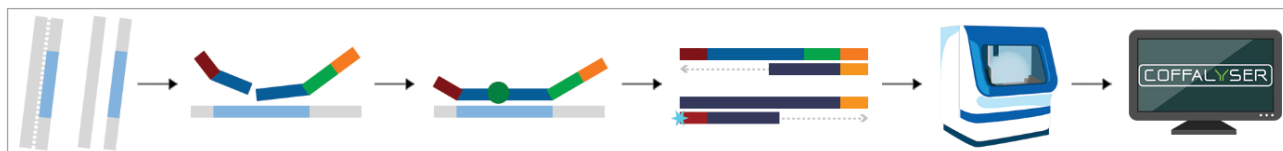


Рис 1. MLPA рабочий процесс

Требуемые материалы, но не поставляемые

- Ультраточистая вода
- TE_{0.1} (10 мМ Трис-HCl pH 8.0 + 0.1 мМ ЭДТА)
- Калиброванный термоджиклер с нагреваемой крышкой (99-105°C) и стандартное лабораторное оборудование
- 0.2 мл ПЦРпробирки/стрипы/планшеты
- Оборудование для капиллярного электрофореза который работает в условиях денатурации и оснащен программным обеспечением для анализа фрагментов; более подробную информацию смотрите в [Help Centre article](#)
- Высокоочищенный формамид
- Меченные размерные стандарты: Applied Biosystems GeneScan™ 500 LIZ®/ROX™; SCIEX CEQ™ DNA Size Standard kit - 600
- Полимеры: POP-1, POP-4 or POP-7 (Applied Biosystems); GenomeLab™ Linear Polyacrylamide denaturing gel (SCIEX); Spectrum Compact Polymer4 (Promega); Hitachi DS3000 Polymer4 (Hitachi)

Требования к образцам

50-250 нг человеческой ДНК (если не указано иное), выделенных из ткани, указанной в описании продукта. Образцы ДНК должны содержать 5-10 мМ Трис-HCl буфер, pH 8.0-8.5.

Рекомендуемые методы выделения:

- QIAGEN Autopure LS (автомат) и QIAamp DNA mini/midi/maxi kit (ручное)
- Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (ручное)
- Высаливание (ручное)

Меры предосторожностиОбщее

1. Не используйте наборы, если они повреждены или у него истек срок годности.
2. Только для профессионального использования. Анализ должен проводиться профессионалами, обученными молекулярным методам.
3. Требуется внутренняя валидация каждого анализа, особенно при его первом использовании или при изменении процедуры обработки образца, метода извлечения ДНК или используемых инструментов. Используйте не менее 16 различных образцов ДНК, взятых у здоровых людей. Проверка должна показать стандартное отклонение $\leq 0,10$ для каждого образца, если только в описании к смеси зондов не указано иное.
4. Лицо, ответственное за интерпретацию результатов, должно быть осведомлено о последних научных достижениях в области применения и о любых ограничениях метода MLPA, которые могут привести к неправильным результатам.
5. Для анализа данных следует использовать Coffalyser.Net. Использование другого программного обеспечения может привести к ложным результатам.
6. Всегда проверяйте показатели контроля качества перед интерпретацией результатов. Только результаты образцов с хорошими показателями качества могут быть надежно интерпретированы.
7. Очевидные гомозиготные делеции должны быть подтверждены визуальным исследованием электроферограммы, чтобы исключить ложные результаты, вызванные проблемами биннинга или слабыми сигналами.
8. Результаты MLPA предназначены для использования в сочетании с другими клиническими и диагностическими результатами, соответствующими профессиональным стандартам практики, включая подтверждение альтернативными методами, оценку

родителей, клинико-генетическую оценку и консультирование, при необходимости. Результаты анализов должны быть интерпретированы клиническим молекулярным генетиком или его эквивалентом.

Меры предосторожности в отношении качества образцов

9. Денатурация ДНК, вызванная недостаточной буферной способностью образца ДНК, может привести к ложным результатам. Если неизвестно, имеется ли достаточный объем буфера, добавьте Трис-HCl: 4 мкл образца ДНК + 1 мкл 50 мМ Трис-HCl pH 8.5.
10. Загрязняющие вещества, остающиеся после экстракции ДНК, включая соли, гепарин, ЭДТА (>1.5 мМ) и железо, могут повлиять на результаты анализа.
11. Соль в образцах ДНК может привести к плохой денатурации. Это может привести к явным удалениям даже нескольких зондов, распознающих соседние геномные мишени. Не используйте системы QIAGEN M6, M48 и M96; в них остается слишком много соли. For QIAGEN EZ1, используйте the [QIAGEN Supplementary Protocol](#) для MLPA.
12. Не концентрируйте ДНК с помощью выпаривания или ускоренного вакуумирования; это приводит к высокой концентрации ЭДТА и соли.

Меры предосторожности во время выполнения

13. Никогда не используйте более 5 мкл образца ДНК в реакции. Необходимое количество ДНК указано в описании смеси зондов.
14. Не смешивайте смеси зондов MLPA разных лотов.
15. Испарение, которое увеличивает концентрацию загрязняющих веществ и соли, может произойти во время ночной гибридизации или при дозировании лигатурной смеси. Для предотвращения/уменьшения испарения:
 - a. Используйте многоканальную пипетку, чтобы сократить время обработки;
 - b. Убедитесь, что крышка с подогревом работает правильно;
 - c. Увеличьте или уменьшите давление на нагреваемую крышку;
 - d. Попробуйте использовать разные реакционные трубки;
 - e. Нанесите небольшую каплю минерального масла поверх образца ДНК, чтобы покрыть поверхность жидкости.
16. Регулярно заменяйте капилляры и полимер. Полимер быстро портится при длительном воздействии температуры >25°C. Если размеры стандартных пиков постоянно низкие и широкие, возможно, капилляры или полимер испортились.
17. Формамид при нагревании может становиться кислым, что приводит к обесцвечиванию и фрагментации продуктов ПЦР. Используйте высококачественный формамид и храните его в аликвотах при температуре -20°C.
18. Объем продукта для ПЦР-анализа не должен превышать 10% от общего объема смеси для инъекций. При низких концентрациях увеличьте время инъекции и/или напряжение – не добавляйте больше продукта для ПЦР.
19. Если один или несколько пиков зашкаливают, могут быть получены ложные результаты. Риск появления зашкаливающих пиков повышается при использовании пробных смесей, содержащих относительно небольшое количество зондов. Чтобы

уменьшить сигнал, повторно запустите ПЦР-анализ с использованием:

- Более низкое напряжение впрыска, короткое время впрыска;
- Уменьшите кол-во продуктов ПЦР.

20. Загрязнение образцов ДНК кДНК или ПЦР-ампликонами отдельных экзонов может привести к усилению зондирующего сигнала. Анализ второго независимо собранного и изолированного образца ДНК может исключить эти артефакты загрязнения.

Меры предосторожности, связанные с конкретным применением

Смотрите описание продукта.

Тест процедура, часть I – MLPA реакция

Инструкции	Программа термоциклера
1. ДНК денатурация	
1.1 Промаркируйте 0.2 мл пробирки/стрипы/планшеты.	98°C, 5 мин
1.2 Добавьте 5 мкл ДНК образца или ТЕ (отрицательный контроль) в каждую пробирку.	
1.3 Поместите пробирки в термоциклер, нагревайте при 98°C в течении 5 минут, охладите до 25°C.	25°C пауза
2. Гибридизация	
2.1 Разморозьте MLPA буфер и MLPA смесь зондов, коротко вортиксите и центрифугируйте. Пипетируйте при комнатной температуре.	95°C, 1 min
2.2 Приготовьте ГИБРИДИЗАЦИОННЫЙ МАСТЕР МИКС Для одной реакции*: <ul style="list-style-type: none"> ● MLPA Буфер: 1.5 мкл ● MLPA смесь зондов: 1.5 мкл <p>Хорошо перемешайте вортиксированием или в каждую пробирку. Тщательное пипетирование необходимо на этом этапе! Перемешайте пипетированием.</p>	60°C пауза (16-20 h)
2.4 Поместите пробирки в термоциклер, инкубируйте при 95°C 1 минуту, и гибридизируйте при 60°C 16-20 часов.	
3. Лигирование	
3.1 Разморозьте Ligase Buffer A и Ligase Buffer B, коротко вортиксите и центрифугируйте. Пипетируйте при комнатной температуре. Согретьте Ligase-65 в руках 10 секунд. Не вортиксите, только коротко центрифугируйте.	54°C пауза
3.2 Подготовьте LIGASE-65 MASTER MIX** . Для одной реакции*: <ul style="list-style-type: none"> ● Ультрачистая вода: 25 мкл ○ Ligase Buffer A: 3 мкл ○ Ligase Buffer B: 3 мкл ● Ligase-65: 1 мкл, добавить последним. <p>Хорошо перемешайте, аккуратно пипетируя вверх и вниз, не взбалтывайте.</p>	54°C, 15 мин
3.3 Продолжите программу термоциклирования и охладите пробирки до 98°C.	98°C, 5 мин
3.4 При 98°C откройте пробирки в термоциклере , добавьте 32 µl LIGASE-65 MASTER MIX в каждую пробирку, перемешайте пипетированием, закройте пробирки, и продолжите инкубировать при 98°C, 15 минут.	20°C пауза
3.5 Нагрейте до 20°C и инкубируйте 5 минут для инактивации лигазы, затем охладите до 20°C.***	
4. ПЦР	
4.1 Разморозьте PCR Primer Mix, коротко вортиксите и центрифугируйте. Согретьте Полимеразу в руках 10 секунд, не вортиксите, коротко процетрифугируйте.	35 ПЦР циклов
4.2 Приготовьте POLYMERASE MASTER MIX . Для одной реакции*: <ul style="list-style-type: none"> ● Ультрачистая вода: 7.5 мкл ● PCR Primer Mix: 2 мкл ● Polymerase: 0.5 мкл <p>Хорошо перемешайте, пипетируя вверх и вниз, не взбалтывайте.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 95°C, 30 с ● 60°C, 30 с ● 72°C, 60 с
4.3 При 72°C, добавьте 10 мкл POLYMERASE MASTER MIX в каждую пробирку, тщательно перемешайте пипетированием, и продолжите ПЦР программу немедленно.	72°C, 20 мин
4.4 После ПЦР, во избежание загрязнения не открывайте пробирки в одном помещении и используйте другую микропипетку для обработки продуктов ПЦР.	15°C пауза
4.5 Store PCR products shielded from light at 4°C for up to 1 week, or between -25°C and -15°C for a longer time.	

* Чтобы свести к минимуму разброс проб, приготовьте достаточно большие объемы растворов для основной смеси: 5-10% от общего объема.

** Приготовленные заранее (не более чем за 1 час до употребления) мастер-смеси храните на льду или при температуре 4°C, а перед подачей в тубики разогрейте их до комнатной температуры.

***Когда пробирки будут доставлены в отдельную лабораторию для проведения ПЦР, предварительно нагрейте термоциклер для проведения ПЦР, например, установите температуру 95°C на 1 секунду, затем сделайте паузу в 20°C. Сократите время переноса до минимума (например, <5 мин), поместите пробирки в термоциклер и переходите к следующему этапу 4.1. Это сводит к минимуму образование неспецифических пиков.

Тест процедура, часть II – Разделение фрагментов

1. Настройки впрыска для обычно используемых устройств для капиллярного электрофореза, поддерживаемые в ПО Coffalyser.Net	
ПЦР меченный праймер: FAM	
ABI SeqStudio	Капилляры: 28 см Смесь впрыска: <ul style="list-style-type: none"> ПЦР продукт 0.8 мкл GS500 размерный стандарт 0.3 мкл (ROX/LIZ) HiDi формамид 12 мкл Закройте планшет септой для инъекций, инкубируйте при температуре 86°C в течение 3 минут, охлаждайте при температуре 4°C в течение 2 минут.
ABI Prism 3100 ABI 3130 (xL) ABI 3500 (xL) ABI 3730 (xL) ABI SeqStudio Flex RUO/Dx	Капилляры: 36 или 50 см Смесь для впрыска: <ul style="list-style-type: none"> PCR продукт 0.7 мкл 0.3 мкл(ROX) или 0.2 мкл (LIZ) GS500 Size Standard HiDi формамид 9 мкл Закройте планшет септой для инъекций, инкубируйте при температуре 86°C в течение 3 минут, охлаждайте при температуре 4°C в течение 2 минут
Hitachi DS3000*	
Promega Spectrum Compact*	
*Только 36 см капилляры.	
PCR primer label: Cy5	
SCIEX CEQ 2000 SCIEX CEQ 8000 SCIEX CEQ 8800 SCIEX GenomeLab GeXP	Капилляры: 33 см Injection mixture: <ul style="list-style-type: none"> PCR продукт 1 мкл SS600 размерный стандарт 0.5 мкл HiDi формамид / Beckman SLS 28.5 мкл Добавьте 1 каплю высокоочищенного минерального масла
2. Установки электрофореза	
Используйте настройки анализа фрагментов по умолчанию, соответствующие области применения, прибору, длине полимера и капилляра. Настройки прибора могут потребовать оптимизации, чтобы обеспечить попадание сигналов в оптимальный диапазон обнаружения и достаточную продолжительность цикла для обнаружения всех фрагментов. Оптимальные диапазоны сигналов (в RFU) и минимальные/максимальные значения сигналов для каждого прибора можно найти в Coffalyser.Net Reference Manual .	

Контроль качества и анализ данных

Последняя версия Coffalyser.Net™ (скачайте с сайта [MRC Holland](#)) следует использовать для контроля качества и анализа данных. Подробные инструкции см. в [Coffalyser.Net Reference Manual](#).

Смотрите также статьи в нашем справочном центре:

- [Объяснение количества и контроля денатурации фрагментов](#)
- [Информация о контроле без использования ДНК](#)

Для получения дополнительной помощи в устранении неполадок посетите страницы устранения неполадок на сайте [MRC Holland Help Centre](#).

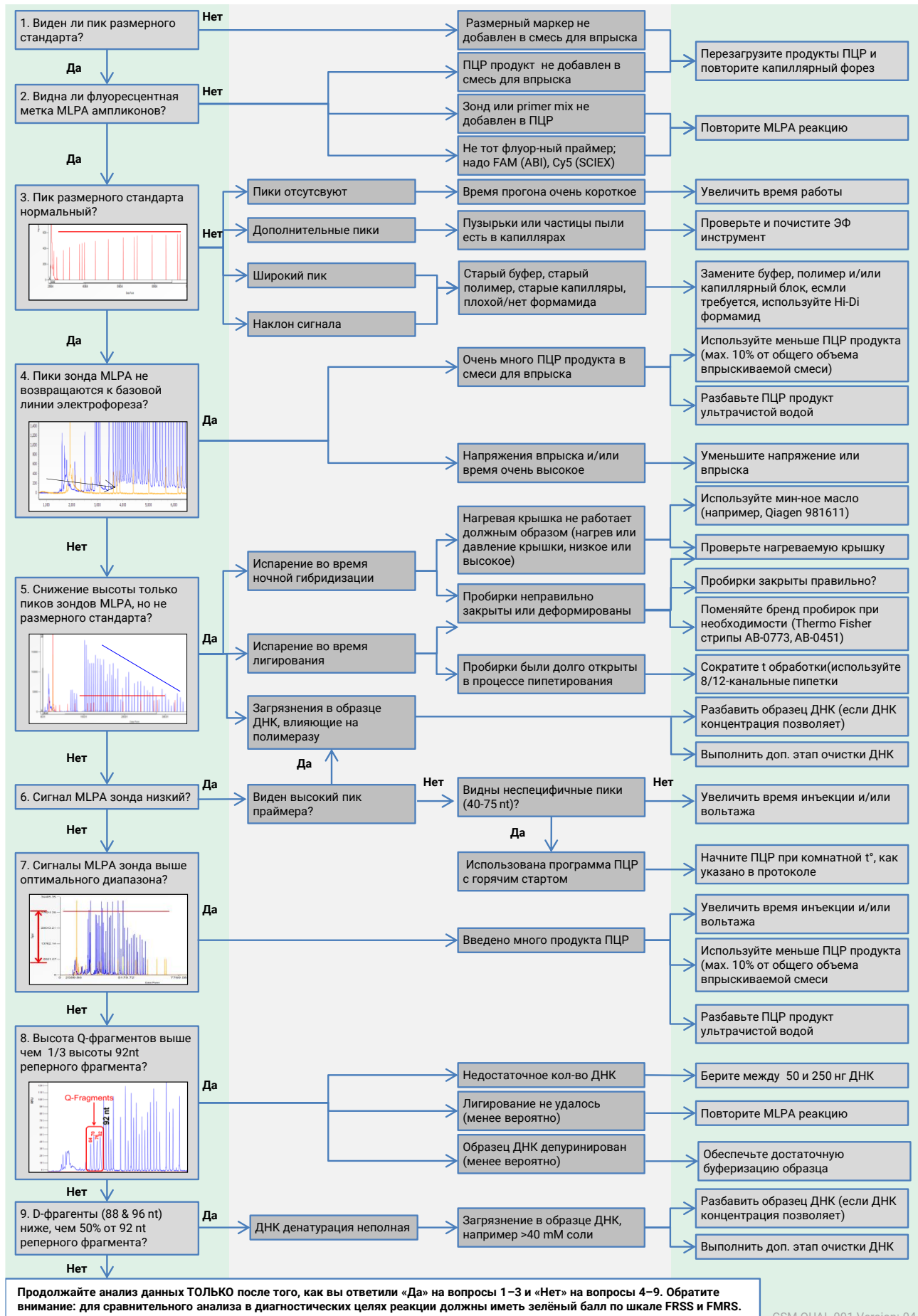
Интерпретация и подтверждение результатов и эксплуатационных характеристик.

Зависит от области применения; смотрите описание продукта probemix


Ограничения

1. В большинстве популяций и для большинства применений MLPA основной причиной генетических дефектов являются небольшие (точечные) мутации, большинство из которых не будут обнаружены с помощью MLPA.
2. MLPA не обнаружит большинство инверсий, сбалансированных транслокаций или изменений числа копий, которые лежат (частично) за пределами последовательности, обнаруженной зондом MLPA.
3. Аналитические характеристики могут быть снижены из-за примесей в образце ДНК, неполной денатурации ДНК (например, из-за загрязнения солью), использования недостаточного или слишком большого количества образца ДНК, недостаточных или неподходящих эталонных образцов, проблем с капиллярным электрофорезом, неправильной процедуры нормализации данных и других технических ошибок.
4. Незначительные различия в проведении экспериментов могут повлиять на характер пиков MLPA. В анализ включаются только те образцы, которые были а) включены в один и тот же эксперимент по MLPA и б) протестированы с использованием одной и той же партии probemix.
5. В некоторых случаях для правильной интерпретации результатов может потребоваться анализ родительских образцов.
6. Некоторые отклонения от числа копий могут быть вызваны соматическими изменениями, включая крупные делеции и дупликации целых хромосом.
7. Небольшие изменения (например, SNV, небольшие отступы) в последовательности, на которую нацелен зонд, могут привести к ложноположительным результатам, даже если они находятся на расстоянии >20 нт от места лигирования зонда. Изменения последовательности могут снизить сигнал зонда, препятствуя связыванию олигонуклеотидов зонда или дестабилизируя связывание олигонуклеотида зонда с ДНК образца. Отклонения, обнаруженные с помощью MLPA, должны быть подтверждены, а отклонения, связанные с одним зондом, всегда требуют подтверждения. Рекомендуется провести секвенирование целевой области.
8. ДНК, полученная в результате реакций амплификации всего генома, не подходит для MLPA из-за смещения амплификации.
9. Тесты MLPA позволяют получить среднее число копий целевых последовательностей в клетках, из которых был извлечен образец ДНК. В случае, если несколько зондов, нацеленных на соседние последовательности, имеют необычное значение, но не достигают обычных пороговых значений для делеции/дублирования, возможной причиной является мозаичность. Едва заметные изменения, подобные тем, которые наблюдаются в мозаичных случаях, можно распознать только тогда, когда зонды расположены в соответствии с расположением хромосом.
10. Не все изменения количества копий, обнаруженные MLPA, являются патогенными. MRC Holland не может предоставить информацию о том, приведет ли конкретное удаление или дублирование к заболеванию.

Схема устранения неполадок



Дополнительные деталиОн-лайн инструкция [How to perform an MLPA reaction](#).Schouten JP et al. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 30:e57.

Дополнительная информация	
www.mrcholland.com ; support.mrcholland.com	
	MRC Holland BV; Willem Schoutenstraat 1 1057 DL, Amsterdam, the Netherlands
Email	info@mrcholland.com (information & technical questions); order@mrcholland.com (orders)
Phone	+31 888 657 200

MRC Holland, SALSA, MLPA, digitalMLPA, Coffalyser.Net, Coffalyser digitalMLPA, и их логотипы являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками MRC Holland BV. Все остальные торговые марки и названия, представленные в данном документе, являются собственностью их соответствующих владельцев.



Внесены изменения в протокол
<p><i>Версия 010-RU1 – 21 Май 2025</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - ABI SeqStudio Flex переименован в ABI SeqStudio Flex RUO/Dx на стр 4. - Предыдущие версии документа доступны только на английском языке. <p><i>Версия 009 – 21 Май 2024</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Протокол получил новую структуру и новый дизайн. - Таблицы компонентов для анализа SALSA MLPA заменены ссылками на описания компонентов в продуктах. - Раздел на стандартных упаковочных этикетках удален. - Переписан раздел о принципе MLPA и улучшен рисунок рабочего процесса. Удален рисунок о расчетах. - Обновлен раздел "Необходимые, но не предоставленные материалы". - Изменена информация в разделе "Обработка и хранение образцов". Раздел сокращен и переименован в "Требования к образцам". Часть информации перенесена в раздел "Меры предосторожности и предупреждения". - Раздел "Выбор эталонных и других контрольных образцов" удален, поскольку эта информация также присутствует в описаниях продуктов. - Информация из главы 3, которую следует прочитать перед началом тестирования, перенесена в часть I процедуры тестирования. Информация из глав 5 и 6 (краткий протокол MLPA и протокол MLPA) объединена в части I процедуры тестирования в новом табличном формате. - Инструкция по извлечению пробирок из термоциклера после денатурации и установке их обратно после добавления основной смеси для гибридизации удалена. - Инструкция по установке пробирок в термоциклер перед добавлением основной смеси для полимеразы удалена, поскольку ранее не было инструкции по их извлечению. - В часть I процедуры тестирования добавлена дополнительная информация, дающая инструкции на случай, если пробирки будут доставлены в отдельную лабораторию для проведения ПЦР. - Информация из раздела 7.1. Примечания, которые следует прочитать, прежде чем переходить к мерам предосторожности и предупреждениям.. - Таблица диапазонов сигналов в приборах для капиллярного электрофореза в разделе 7.2 заменена ссылкой на соответствующую таблицу в Coffalyser. Справочное руководство по сети. - Информация в главе 8 (контроль качества и устранение неполадок) заменена ссылками на Coffalyser.Сетевое справочное руководство и статьи базы знаний о контрольных фрагментах и контроле без ДНК. - Глава 9 (Анализ данных) заменена инструкцией по загрузке Coffalyser.Net и ознакомлению с Coffalyser.Сетевое справочное руководство. - Информация в главе 10 (Интерпретация и подтверждение) либо перенесена в раздел "Меры предосторожности и предупреждения", "Ограничения", либо удалена, поскольку она специфична для определенных применений.