# MLPA - Yleinen Protokolla

**Tarvittavat komponentit**

| Nimi | Tuotenumero | Ainesosat |
|---|---|---|
| SALSA® MLPA® probemix | Katso Probemix-tuotekuvauksesta | synteettiset oligonukleotidit, oligonukleotidit, jotka on syntetisoitu käyttämällä ei-patogeenistä bakteerikantaa, Tris-HCl ja EDTA |

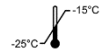
Tarkoitettu käytettäväksi seuraavien tuotteiden kanssa:

- SALSA® MLPA® -reagenssi kitti (Tuotenumero: EK1-FAM, EK1-CY5, EK5-FAM, EK5-CY5, EK20-FAM)
- Data-analysointiohjelmisto Coffalyser.Net™ (Tuotenumero: n.a.)

Tietyissä sovelluksissa voidaan käyttää:

| Nimi | Tuotenumero | Ainesosat |
|---|---|---|
| SALSA-binning®/Reference selection/Artificial duplicationDNA | SDXXX | Tris-HCl, EDTA, synteettinen/kontrollipla smidi-DNA, ihmisen genominen DNA, solulinjan DNA |

**Komponenttien säilytys ja säilyvyysaika**

| Suositellut olosuhteet |  | |
|---|---|---|



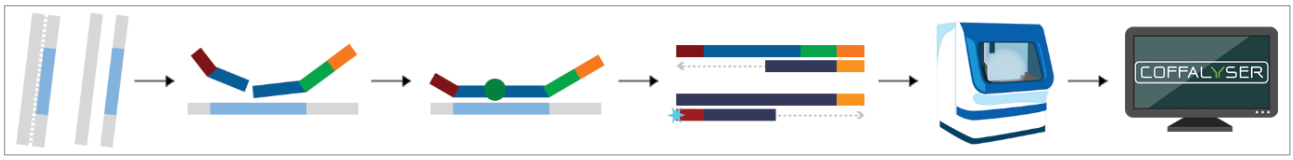
Säilyvyys taataan ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään asti, myös avaamisen jälkeen, mikäli komponentit säilytetään alkuperäispakkauksissaan ja valmistajan suositusten mukaisesti. Tarkka viimeinen käyttöpäivämäärä löytyy etiketeistä. Tuotteita ei saa altistaa enempää kuin 25 pakastus-sulatussyklille. Älä käytä tuotteita, jos pakkaus on vaurioitunut tai avattu saapuessa. Säilytä tuotteet alkuperäisissä pakkauksissaan. Jätteet tulee hävittää kansallisten ja paikallisten määräysten mukaisesti.

**Komponenttien turvallisuus**

Reagenssit eivät sisällä ihmis- tai eläinperäisiä aineita, eivätkä patogeenisiä bakteereja tai viruksia. Pitoisuuksien perusteella mikään ainesosista ei ole vaarallinen EU:n määritelmän mukaisesti. Näille tuotteille ei vaadita käyttöturvallisuus-tiedotetta (SDS), sillä mikään komponenteista ei sisällä vaarallisia aineita pitoisuuksina, jotka edellyttäisivät SDS:n toimittamista (asetusten (EC) N:o 1272/2008 [EU-GHS/CLP] ja 1907/2006 [REACH] sekä niiden muutosten mukaisesti). Jos roiskeita syntyy, ne voidaan puhdistaa vedellä ja noudattaa laboratorion tavanomaisia siivousohjeita.

**Menetelmän periaate (MLPA)**

SALSA® MLPA® on puolikvantitatiivinen menetelmä, jolla voidaan analysoida jopa 60 DNA-sekvenssiä samanaikaisesti. Mentelmä aloitetaan näyte DNA:n denaturoinnilla (ks. kuva 1 alla). Seuraavaksi näytteeseen lisätään MLPA-koetinseos, joka sisältää kaksi tai kolme oligonukleotidia per koetin. Kun kaikki koettimet ovat hybridisoituneet näytteen DNA:han, koettimet ligoidaan. Kaikki ligoidut koettimet monistetaan universaalilla PCR-alukeparilla, josta toinen on fluoresoivasti leimattu. Tuloksena on joukko PCR-amplikoneja, jotka ovat spesifejä kullekin koetinparille, ja joilla jokaisella on unikki pituus. Amplikonit erotellaan pituuden perusteella kapillaari-elektroforeesilaitteella. Tuloksena oleva näytekohtainen elektroferogrammi analysoidaan Coffalyser.Net ohjelmistolla, vertaamalla näytteen elektroferogrammia vertailunäytteiden joukkoon, jolloin voidaan määritellä tutkittujen genomisten kohteiden kopioluku.




**Kuva 1.** MLPA workflow

**Tarvittavat, mutta ei toimitetut materiaalit**

- Ultra-puhdas vesi
- $TE_{0.1}$ (10 mM Tris-HCl pH 8.0 + 0.1 mM EDTA)
- Kalibroitu PCR laite lämmitetyllä kannella (99-105 °C) ja perus laboratorio välineistö
- 0.2 ml:n PCR-putket/-liuskat/-levyt
- Kapillaarielektroforeesilaite, jossa denaturoivat ajo-olosuhteet ja fragmenttianalyysiohjelmisto; katso lisätietoja tästä artikkelista
- Korkealaatuinen formamidi
- Fluorensoivasti merkitty kokostandardi: Applied Biosystems GeneScan™ 500 LIZ/® ROX™; SCIEX CEQ™ DNA Size Standard - 600Geelipolymeeri: POP-1, POP-4 tai POP-7 (Applied Biosystems); GenomeLab™ Linear Polyacrylamide denaturing gel (SCIEX); Spectrum Compact Polymer4 (Promega); Hitachi DS3000 Polymer4 (Hitachi)

**Näytevaatimukset**

50-250 ng ihmisen DNA:ta (ellei toisin mainita) eristettynä menetelmällä, joka indikoitu tuotekuvauksessa ja joka soveltuu kyseiselle kudokselle. DNA-näytteiden tulee sisältää 5-10 mM Tris-HCl-puskuria, pH 8.0-8.5.
Suositellut eristysmenetelmät:

- QIAGEN Autopure LS (automatisoitu) ja QIAamp DNA mini/midi/maxi-kit (manuaalinen)
- Promega Wizard genominen DNA-kit (manuaalinen)
- Suolasaostusmenetelmä (manuaalinen)

**Varotoimet ja huomautukset**

Yleiset varotoimet

1. Älä käytä tuotetta, jos se on vaurioitunut tai vanhentunut.
2. Tuote on vain ammattikäyttöön. Menetelmä tulee suorittaa molekyylitekniikoihin koulutettujen ammattilaisten toimesta.
3. Jokainen testi tulee validoida erityisesti jos kyseessä on ensimmäinen käyttökerta tai jos näytteen käsittelymenetelmä, DNA-eristysmenetelmää tai laitteisto muuttuu. Käytä ≥16 erillistä terveiden yksilöiden DNA-näytettä. Hyväksyttävä hajonta on ≤0,10 jokaiselle koettimelle, ellei tuotekuvauksessa toisin mainita.
4. Tulosten tulkinnasta vastaavan henkilön tulee olla perehtynyt MLPA-menetelmän rajoitteisiin ja sovellusalueen tieteelliseen taustaan.
5. Tulosten analysointi tulee suorittaa Coffalyser.Net ohjelmistolla. Muiden ohjelmistojen käyttö voi johtaa virheellisiin tuloksiin.
6. Tarkista aina laadunvalvontatulokset ennen tulosten tulkintaa. Vain näytteiden tulokset, joilla on tarpeeksi korkeat laatupisteet, voidaan tulkita luotettavasti.
7. Näennäiset homotsygoottiset deleetiot tulee aina varmistaa elektroferogrammin visuaalisella tarkastelulla, jotta voidaan sulkea pois binning-ongelmista tai alhaisista signaaleista johtuvat virheelliset tulokset.
8. MLPA-tuloksia tulee tulkita yhdessä muiden kliinisten ja diagnostisten löydösten kanssa, ammatillisten käytäntöstandardien mukaisesti, mukaan lukien vahvistus vaihtoehtoisilla menetelmillä, vanhempien arviointi, kliininen geneettinen arviointi ja neuvonta tarpeen mukaan. Kliinisen molekyyligeneetikon tai vastaavan tulee tulkita testien tulokset.

Näytteen laatua koskevat varotoimet

9. DNA:n riittämättömästä puskurointikapasiteetista johtuva DNA:n depurinaatio voi johtaa virheellisiin tuloksiin. Jos ei tiedetä, onko puskuria riittävästi, lisää Tris-HCl:a: 4 µl näyte DNA:ta + 1 µl 50 mM Tris-HCl pH 8.5 puskuria.
10. DNA:n eristyksen jälkeen jäljelle jääneet epäpuhtaudet, mukaan lukien suolat, hepariini, EDTA (>1.5 mM) ja rauta, voivat vaikuttaa testin suorituskykyyn.
11. DNA-näytteissä oleva suola voi johtaa epätäydelliseen DNA:n denaturaatioon. Tämä voi johtaa näennäisiin deleetioihin, jopa useissa genomisesti vierekkäisissä koettimissa. Älä käytä QIAGEN M6-, M48- ja M96-järjestelmiä; Nämä jättävät liikaa suolaa näytteeseen. Käytä MLPA näytteille QIAGEN EZ1:lle QIAGEN-lisäprotokollaa.
12. Älä väkevöi DNA:ta haihduttamalla tai SpeedVacilla; tämä johtaa korkeisiin EDTA- ja suolapitoisuuksiin.

Varotoimet suorituksen aikana

13. Älä koskaan käytä enempää kuin 5 µl DNA-liuosta reaktiota kohden. Tarvittava DNA-määrä on määritelty tuotekuvauksessa.
14. Älä sekoita eri eriä MLPA-koetinseosta.
15. Haihtumista, joka lisää epäpuhtauksien ja suolan pitoisuuksia, voi tapahtua yön yli tapahtuvan hybridisaation aikana tai pipetoitaessa ligaatio master mixiä. Haihtumisen estämiseksi/vähentämiseksi:
    a. Käytä monikanavaista pipettiä käsittelyajan lyhentämiseksi;
    b. Varmista, että lämmitetty kansi toimii oikein;
    c. Lisää tai vähennä lämmitetyn kannen painetta;
    d. Yritä käyttää erilaisia reaktioputkia;
    e. Laita pieni tippa mineraaliöljyä DNA-näytteen päälle peittämään nesteen pinta.
16. Vaihda kapillaarit ja polymeeri säännöllisesti. Polymeeri heikkenee nopeasti pitkäaikaisen altistumisen jälkeen >25 °C:lle. Jos kokostandardipiikit ovat toistuvasti matalia ja leveitä, kapillaarit tai polymeeri ovat saattaneet heikentyä.
17. Formamidi voi muuttua happamaksi, mikä aiheuttaa PCR-tuotteiden poistumista ja pirstoutumista kuumennettaessa. Käytä korkealaatuista formamidia ja säilytä sitä määräissä -20 °C:ssa.
18. PCR-tuotteen tilavuus ei saa koskaan olla >10% injektioseoksen kokonaismäärästä. Jos signaalit ovat alhaiset, säädä injektioparametrejä (aikaa ja/tai jännitettä) – älä lisää PCR-tuotetta.
19. Vääriä tuloksia voidaan saada, jos yksi tai useampi piikki on mitta-asteikon ulkopuolella. Mitta-asteikon ulkopuolisten piikkien riski on suurempi, kun käytetään koetinsekoituksia, jotka sisältävät suhteellisen pienen määrän koettimia. Voit vähentää signaalia suorittamalla PCR-tuotteet uudelleen ajon:
    a. Pienemmällä injektiojännitteellä / lyhyemmällä injektioajalla;
    b. Pienemmällä määrällä PCR-tuotteita.
20. DNA-näytteiden kontaminaatio yksittäisten eksonien cDNA- tai PCR-amplikoneilla voi johtaa korkeampaan koettimen signaaliin. Analysoi tarvittaessa toinen itsenäisesti kerätty ja eristetty DNA-näyte, jotta voit sulkea pois kontaminaatioartefaktit.

Sovelluskohtaiset varotoimet

Katso tuotekuvaus.

**Testausmenettely, osa I – MLPA-reaktio**

| Ohjeet | PCR-ohjelma |
|---|---|
| 1. DNA:n denaturaatio | |
| 1.1 Merkitse 0,2 ml:n putket/liuskat/levyt.<br>1.2 Lisää 5 µl DNA näytettä tai TE:tä (no-DNA kontrolli) jokaiseen putkeen.<br>1.3 Aseta putket PCR laitteeseen, kuumenna 98 °C:ssa 5 minuuttia, jäähdytä 25 °C:seen. | 98 °C:ssa 5 minuuttia<br><br>25°C tauko |
| 2. Hybridisaatio | |
| 2.1 Sulata MLPA-puskuri ja MLPA-koetinsekoitus, vortexoi ja sentrifugi lyhyesti. Pipetoi huoneenlämmössä.<br>2.2 Valmista HYBRIDISATION MASTER MIX. Yhdelle reaktiolle*:<br>MLPA-puskuri: 1.5 µl<br>MLPA-koetinseos: 1.5 µl<br>Sekoita hyvin vorteksoimalla tai pipetoimalla.<br>2.3 Lisää 3 µl HYBRIDISATION MASTER MIX:ä jokaiseen putkeen. Tarkka pipetointi on välttämätöntä tässä vaiheessa! Sekoita pipetoimalla.<br>2.4 Aseta putket PCR laitteeseen, inkuboidaan 95 °C:ssa 1 minuutti ja hybridisoi 60 °C:ssa 16-20 tuntia. | 95 °C:ssa 1 minuutin ajan<br><br>60 °C tauko (16-20 h) |
| 3. Ligaatio | |
| 3.1 Sulata ligaasipuskuri A ja ligaasipuskuri B, vortexoi ja sentrifugoi lyhyesti. Pipetoi huoneenlämmössä. Lämmitä Ligase-65 käsissä 10 sekunnin ajan. Älä pyörrä, vaan sentrifugoi lyhyesti.<br>3.2 Valmista Ligase-65 Master Mix**. Yhdelle reaktiolle*:<br>Ultrapuhdas vesi: 25 µl<br>Ligaasipuskuri A: 3 µl<br>Ligaasipuskuri B: 3 µl<br>Ligaasi-65: 1 µl, lisätty viimeisenä.<br>Sekoita hyvin pipetoimalla varovasti ylös ja alas, älä vortexoi.<br>3.3 Jatka PCR ohjelmaa ja jäähdytä putket 54 °C:seen.<br>3.4 Avaa putket 54 °C:ssa PCR laitteessa ja lisää 32 µl LIGAASI-65 MASTER MIX:ä jokaiseen putkeen, sekoita hyvin pipetoimalla, sulje putket ja jatka inkubointia 54 °C:ssa 15 minuutin ajan.<br>3.5 Kuumenna 98 °C:seen ja inkuboi 5 minuuttia ligaasin inaktivoimiseksi, jäähdytä 20 °C:seen.*** | 54°C tauko<br><br>54 °C:ssa 15 minuuttia<br><br>98 °C:ssa 5 minuuttia<br><br>20 °C tauko |
| 4. PCR | |
| 4.1 Sulata PCR Primer Mix, vortexoi ja sentrifugoi lyhyesti. Lämmitä polymeraasia käsissä 10 sekunnin ajan, älä vortexoi, vaan sentrifugoi lyhyesti.<br>4.2 Valmista POLYMERASE MASTER MIX. Yhdelle reaktiolle*:<br>Ultrapuhdas vesi: 7,5 µl<br>PCR Primer Mix: 2 µl<br>Polymeraasi: 0,5 µl<br>Sekoita hyvin pipetoimalla ylös ja alas, älä vortexoi.<br>4.3 Lisää 20 °C:ssa 10 µl POLYMERASE MASTER MIX:ä jokaiseen putkeen, sekoita hyvin pipetoimalla ja jatka PCR-ohjelmaa välittömästi.<br>4.4 Älä avaa PCR putkia samassa tilassa ja käytä eri mikropipettiä PCR-tuotteiden käsittelyyn kontaminaation välttämiseksi.<br>4.5 Säilytä PCR-tuotteita valolta suojattuna 4 °C:ssa enintään 1 viikon ajan tai -25 °C ja -15 °C välillä pidempään. | 35 PCR-sykliä:<br>• 95 °C 30 sekuntia<br>• 60 °C 30 sekuntia<br>• 72 °C 60 sekuntia<br><br>72 °C:ssa 20 minuuttia<br><br>15°C tauko |

* Valmista riittävän suuri määrä kutakin master mixiä näytteen vaihtelun minimoimiseksi: pipetoi 5-10 % tilavuusylijäämä.
**Kun master mixit valmistetetaan etukäteen (enintään 1 tunti ennen käyttöä), säilytä ne jäällä tai 4 °C:ssa ja lämmitä ne huoneenlämpöisiksi ennen putkiin lisäämistä.
Kun putket viedään erilliseen laboratorioon PCR:ää varten, esilämmitä PCR laite, esimerkiksi asettamalla se 95 °C:seen 1 sekunniksi ja sen jälkeen 20 °C:n tauolle. Siirtoaika on minimoitava (esim. <5 min), asete putket PCR laitteeseen ja jatka vaiheesta 4.1. Tämä minimoi epäspesifisten piikkien muodostumisen.

**Testausmenettely, osa II – Fragmenttien erottaminen**

| **1. Yleisesti käytettyjen kapillaarielektroforeesilaitteiden injektioasetukset, joita Coffalyser.Net tukee** | |
|---|---|
| PCR alukkeen fluorensoiva markkeri : FAM | |
| ABI SeqStudio | Kapillaarit: 28 cm<br>Injektio seos:<br>• PCR-tuote 0,8 µl<br>• GS500 Size Standard 0,3 µl (ROX/LIZ)<br>• HiDi-formamidi 12 µl<br>Sulje injektiolevy, kuumenna 86 °C:ssa 3 minuuttia, jäähdytä 4 °C:ssa 2 minuuttia. |
| ABI Prisma 3100<br>ABI 3130 (xL)<br>ABI 3500 (xL)<br>ABI 3730 (xL)<br>ABI SeqStudio Flex RUO/Dx | Kapillaarit: 36 tai 50 cm<br>Injektio seos:<br>• PCR-tuote 0,7 µl<br>• GS500 Size Standard 0,3 µl (ROX) tai 0,2 µl (LIZ)<br>• HiDi-formamidi 9 µl<br>Sulje injektiolevy, kuumenna 86 °C:ssa 3 minuuttia, jäähdytä 4 °C:ssa 2 minuuttia.<br><br>*Vain 36 cm kapillaarit. |
| Hitachi DS3000* | |
| Promega Spectrum Compact* | |
| PCR-alukkeen fluornesoiva markkeri: Cy5 | |
| SCIEX CEQ 2000<br>SCIEX CEQ 8000<br>SCIEX CEQ 8800<br>SCIEX GenomeLab GeXP | Kapillaarit: 33 cm<br>Injektion seos:<br>• PCR-tuote 1 µl<br>• SS600 Size Standard 0,5 µl<br>• HiDi-formamidi / Beckman SLS 28,5 µl<br>Lisää 1 tippa korkealaatuista mineraaliöljyä. |
| **2. Elektroforeesin asetukset** | |
| Käytä sovelluksen, instrumentin, polymeerin ja kapillaarin pituuden mukaisia fragmenttianalyysin oletusasetuksia. Laitteen asetukset saattavat vaatia optimointia sen varmistamiseksi, että signaalit ovat optimaalisella tunnistusalueella ja että ajo on riittävän pitkä kaikkien fragmenttien havaitsemiseksi. Optimaaliset signaalialueet (RFU) ja minimi-/maksimisignaalit instrumenttia kohden löytyvät Coffalyser.Net viiteoppaasta. | |

**Laadunvalvonta ja datan analysointi**

Laadunvalvontaan ja datan analysointiin tulee käyttää Coffalyser.Net:n™ uusinta versiota (ladattavissa MRC Holland:in nettisivuilta). Katso tarkemmat ohjeet Coffalyser.Net viiteoppaasta.

Katso myös nämä artikkelit Help Centeristämme:
- Lisätietoja määrä- ja denaturaatiokontrollifragmenteista
- Lisätietoja no-DNA kontrolleista

Lisätietoja vianmäärityksestä saat Help Centeristämme vianmääritysivuilta.

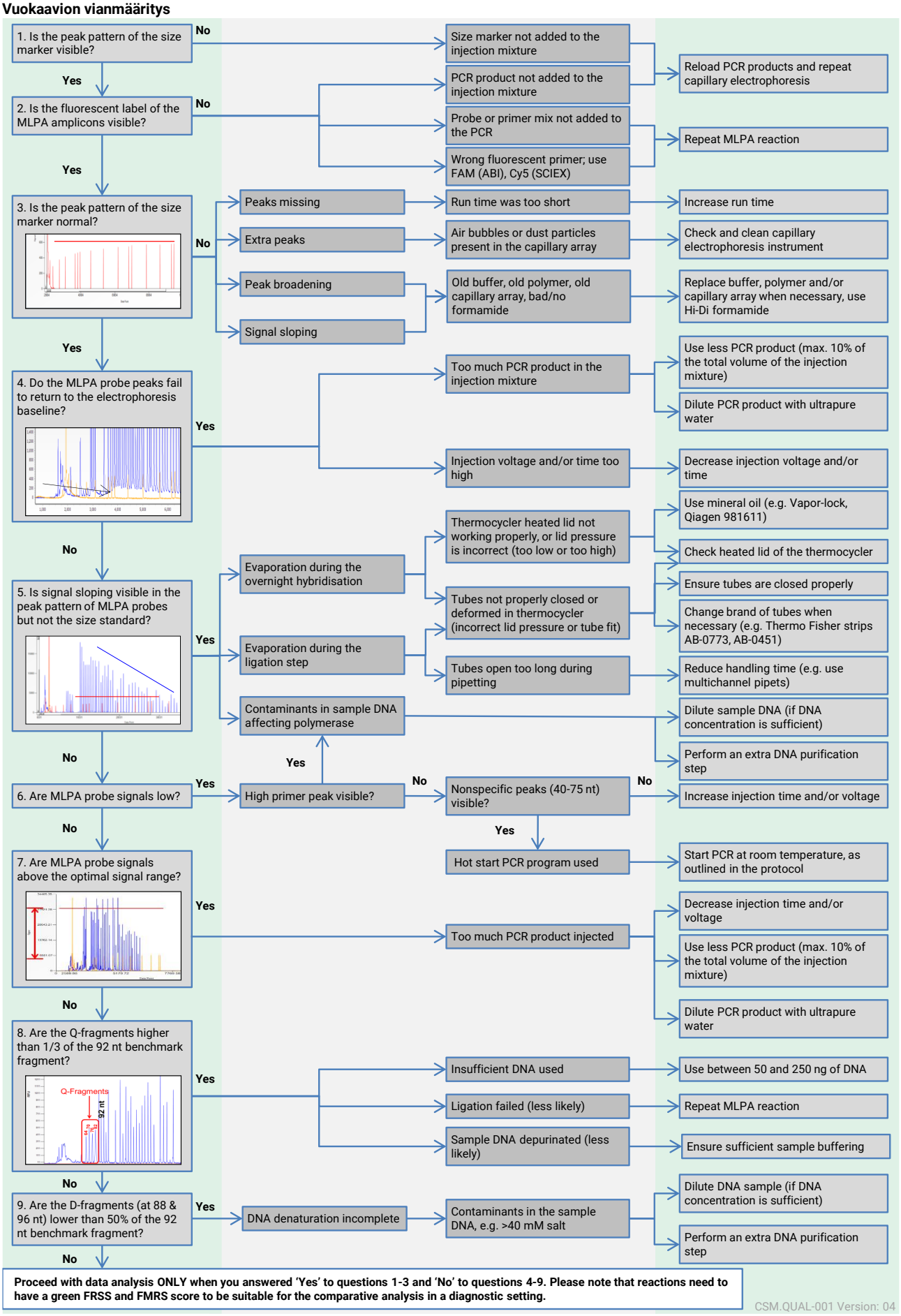
**Tulosten ja suorituskykyominaisuuksien tulkinta ja vahvistaminen**

Sovelluksesta riippuvainen; Katso ProbeMix-tuotekuvaus.

**Rajoitukset**

1. Useimmissa populaatioissa ja useimmissa MLPA-sovelluksissa geneettisten vikojen yleisimmät syy ovat pienet (piste)mutaatiot, joista suurinta osaa MLPA ei havaitse.
2. MLPA ei havaitse useimpia inversioita, tasapainoisia translokaatioita tai kopiomäärän muutoksia, jotka ovat (osittain) MLPA-koettimen detektoiman sekvenssin ulkopuolella.
3. Analyyttistä suorituskykyä voivat heikentää DNA-näytteen epäpuhtaudet, epätäydellinen DNA:n denaturointi (esim. suolakontaminaatio), DNA-näytteen riittämättön tai liian suuri määrä, riittämättömät tai sopimattomat vertailunäytteet, kapillaarielektroforeesiongelmat tai puutteellinen tietojen normalisointimenettely ja muut tekniset virheet.
4. Pienet erot kokeellisessa suorituksessa voivat vaikuttaa MLPA-elektrogrammiprofiiliin. Analyysiin tulee sisällyttää vain näytteet, jotka a) sisältyivät samaan MLPA-kokeeseen ja b) testattiin samalla koetinseoserällä.
5. Tietyissä tapauksissa vanhempien näytteiden analysointi voi olla tarpeen tulosten oikean tulkinnan kannalta.
6. Tietyt kopiomäärän poikkeavuudet voivat johtua somaattisista muutoksista, mukaan lukien kokonaisten kromosomien suuret deleetiot ja duplikaatiot.
7. Pienet muutokset (esim. SNV:t, pienet indel:it) koettimen detektoimassa sekvenssissä voivat aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia, jopa >20 emäksen päässä ligaatiokohdasta. Sekvenssimuutokset voivat heikentää koettimen signaalia estämällä koettimen oligonukleotidien ligaation tai heikentämällä koettimen oligonukleotidin sitoutumista näyte DNA:han. MLPA:n havaitsemat kopiomäärä muutokset tulee vahvistaa, ja yhden koettimen poikkeamat vaativat aina vahvistuksen. Kohdealueen sekvensointi on suositeltavaa.
8. Koko genomin amplifikaatioreaktiosta peräisin oleva DNA ei sovellu MLPA-menetelmään amplifikaatiovääristymän vuoksi.
9. MLPA-testit antavat *keskimääräisen* kopioluvun niissä soluissa, joista DNA-näyte on eristetty. Jos useilla vierekkäisiä sekvenssejä tunnistavilla koettimilla on poikkeava arvo, mutta ne eivät saavuta deleetion/duplikaation tavanomaisia kynnysarvoja, mosaiikkisuus on mahdollinen selitys. Hienovaraiset muutokset, kuten mosaiikkitapauksissa havaittavat,, voidaan erottaa vain silloin, kun koettimet on järjestetty kromosomisijainnin mukaan.
10. Kaikki MLPA:n havaitsemat kopiolukumuutokset eivät ole patogeenisiä. MRC Holland ei voi antaa tietoa siitä, johtaako tietty deleedio tai duplikaatio sairauteen.

## Vuokaavion vianmääritys



**Lisätietoja**
Online-ohjevideo *Kuinka suorittaa MLPA-reaktio*.

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

| **Lisätietoja**<br>**www.mrcholland.com; support.mrcholland.com** | |
|---|---|
| | MRC Holland BV; Willem Schoutenstraat 1<br>1057 DL, Amsterdam, Alankomaat |
| Sähköposti | info@mrcholland.com (lisätietoja ja tekniset kysymykset);<br>order@mrcholland.com (tilaukset) |
| Puhelin | +31 888 657 200 |

MRC Holland, SALSA, MLPA, digitalMLPA, Coffalyser.Net, Coffalyser digitalMLPA ja niiden logot ovat MRC Holland BV:n tavaramerkkejä tai rekisteröityjä tavaramerkkejä. Kaikki muut tässä mainitut tuotemerkit ja nimet ovat omistajiensa omaisuutta.

CE

| **Implemented changes in the protocol** |
|---|
| *Version 010 – 21 May 2025*<br>- ABI SeqStudio Flex renamed to ABI SeqStudio Flex RUO/Dx on page 4.<br>*Version 009 – 21 May 2024*<br>- Protocol received a new structure and a new design.<br>- Tables in SALSA MLPA assay components replaced with references to product descriptions of components.<br>- Section on standard packaging labels removed.<br>- Section on MLPA principle rewritten and figure of the workflow improved. Figure about calculations removed.<br>- Section Materials required but not provided updated.<br>- Information in section Sample treatment and storage reorganised. Section is made shorter and renamed to Sample requirements. Some information was moved to Precautions and warnings.<br>- Section Selecting reference & other control samples removed as this information is also present in product descriptions.<br>- Information in chapter 3 Notes to read before you start moved to Test procedure part I.<br>- Information in chapter 5 and 6 (MLPA protocol in brief and MLPA protocol) combined in Test procedure part I in a new table format.<br>- Instruction to remove tubes from thermocycler after denaturation and place them back after addition of Hybridisation master mix removed.<br>- Instruction to place tubes in the thermocycler before adding Polymerase master mix removed because there is no previous instruction to remove them.<br>- Foot note added to Test procedure part I, giving instructions for the situation when tubes are taken to a separate lab for the PCR.<br>- Information in section 7.1. Notes to read before you start moved to Precautions and warnings.<br>- Table about signal ranges in capillary electrophoresis instruments in section 7.2. replaced with a reference to the corresponding table in the Coffalyser.Net Reference Manual.<br>- Information in chapter 8 (quality control and troubleshooting) replaced with references to the Coffalyser.Net Reference Manual and to knowledge base articles about control fragments and no-DNA controls.<br>- Chapter 9 (Data analysis) replaced with the instruction to download Coffalyser.Net and to read the Coffalyser.Net Reference Manual.<br>- Information in chapter 10 (Interpretation and confirmation) either moved to Precautions and warnings, to Limitations or removed because it is specific for certain applications. |