

Protocole général pour MLPA

Composants requis

Nom	Références	Ingrédients
SALSA® MLPA® probemix	voir la description du produit probemix	oligonucléotides synthétiques, oligonucléotides synthétisés à l'aide d'une souche bactérienne non pathogène, Tris-HCl et EDTA

À utiliser avec :

- [SALSA® MLPA® Reagent Kit](#) (Réf. : EK1-FAM, EK1-CY5, EK5-FAM, EK5-CY5, EK20-FAM)
- [Logiciel d'analyse des données Coffalyser.Net™](#) (Réf. : n.d.)

Pour certaines applications, il peut être utilisé avec :

Nom	Références	Ingrédients
SALSA® Binning/Reference Selection/Artificial Duplication DNA	SDXXX	Tris-HCl, EDTA, ADN plasmidique synthétique / de contrôle, ADN génomique humain de la femme, ADN de lignée cellulaire

Stockage et durée de conservation des composants

Conditions recommandées		
-------------------------	--	--

Une durée de conservation jusqu'à la date d'expiration est garantie, même après ouverture, lorsque le produit est conservé dans son emballage d'origine et dans les conditions recommandées. Pour connaître la date d'expiration exacte, consulter les étiquettes sur le flacon. Les produits ne doivent pas être exposés à plus de 25 cycles de gel-dégel. Ne pas utiliser les produits si l'emballage est endommagé ou ouvert lors de la réception. Laisser les produits dans leur contenant d'origine. Les déchets doivent être éliminés conformément aux réglementations nationales et locales.

Sécurité des composants

Aucun des ingrédients n'est dérivé de l'homme, d'animaux, de bactéries pathogènes ou de virus pathogènes. Sur la base des concentrations présentes, aucun des ingrédients n'est dangereux au sens de la norme sur la communication des renseignements à l'égard des matières dangereuses (Hazard Communication Standard). [Une fiche de données de sécurité \(FDS\) n'est pas requise](#) pour ces produits : aucune préparation ne contient de substances dangereuses à des concentrations nécessitant la distribution d'une FDS (conformément au Règlement (CE) 1272/2008 [UE-GHS/CLP] et le Règlement (CE) n° 1907/2006 [REACH] et à leurs modifications). En cas de déversement, nettoyer à l'eau et suivre les procédures appropriées sur le site.

Principe de l'essai (MLPA)

SALSA® MLPA® est une technique semi-quantitative basée sur l'amplification d'un maximum de 60 sondes, chacune détectant une séquence d'ADN spécifique. La technique commence par la dénaturation de l'échantillon d'ADN (voir la Figure 1 ci-après). Ensuite, un mélange de sondes MLPA est ajouté, chaque sonde étant constituée de deux ou trois oligonucléotides. Lorsque l'hybridation de tous les oligos avec l'ADN de l'échantillon est terminée, les sondes liées à l'ADN de l'échantillon sont ligaturées. Toutes les sondes ligaturées sont amplifiées à l'aide d'une paire d'amorces PCR universelle, dont l'une est marquée par fluorescence. Il en résulte un ensemble d'amplicons PCR propres à chaque sonde, chacun ayant une longueur unique. Les amplicons sont ensuite séparés en fonction de leur longueur sur un instrument d'électrophorèse capillaire. L'électrophérogramme spécifique à l'échantillon qui en résulte est analysé à l'aide de Coffalyser.Net. En comparant l'électrophérogramme d'un échantillon à celui d'un ensemble d'échantillons de référence, il est possible de déterminer le nombre de cibles génomiques présentes dans l'échantillon en question.

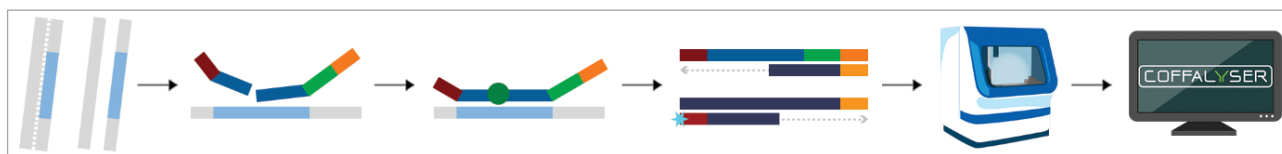


Figure 1. Flux de travail MLPA

Matériel nécessaire, mais non fourni

- Eau ultrapure
- TE_{0.1} (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0 + 0,1 mM d'EDTA)
- Thermocycleur calibré avec couvercle chauffant (99 à 105 °C) et équipement de laboratoire standard
- Tubes/bandes/plaques PCR de 0,2 ml
- Instrument d'électrophorèse capillaire fonctionnant dans des conditions de dénaturation et doté d'un logiciel d'analyse des fragments. Pour obtenir plus d'informations, consulter [cet article du Centre d'aide](#) (en anglais)
- Formamide de haute qualité
- Étalon de dimension étiqueté : Applied Biosystems GeneScan™ 500 LIZ®/ROX™ ; kit d'étalon de dimension ADN SCIEX CEQ™ - 600
- Polymère gélifié : POP-1, POP-4 ou POP-7 (Applied Biosystems) ; GenomeLab™ Linear Polyacrylamide denaturing gel (SCIEX) ; Spectrum Compact Polymer4 (Promega) ; Hitachi DS3000 Polymer4 (Hitachi)

Exigences en matière d'échantillons

50 à 250 ng d'ADN humain (sauf indication contraire) extrait du tissu indiqué dans la description du produit probemix. Les échantillons d'ADN doivent contenir 5 à 10 mM de tampon Tris-HCl de pH 8,0-8,5.

Méthodes d'extraction recommandées :

- QIAGEN Autopure LS (automatisé) et QIAamp DNA mini/midi/maxi kit (manuel) ;
- Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (manuel) ;
- Salage (manuel).

Précautions et mises en gardePrécautions générales

1. Ne pas utiliser le produit s'il est endommagé ou périmé.
2. Réserve à un usage professionnel. L'essai doit être effectué par des professionnels formés aux techniques moléculaires.
3. Une validation interne de chaque essai est nécessaire, en particulier lors de la première utilisation ou en cas de modification de la procédure de manipulation de l'échantillon, de la méthode d'extraction de l'ADN ou des instruments utilisés. Utiliser ≥ 16 échantillons d'ADN différents provenant d'individus sains. La validation doit montrer un écart-type ≤ 0,10 pour chaque sonde, sauf indication contraire dans la description du produit probemix.
4. La personne chargée de l'interprétation des résultats doit disposer des dernières connaissances scientifiques relatives à l'application et des limites de la technique MLPA susceptibles d'entraîner des résultats erronés.
5. L'utilisation de Coffalyser.Net est recommandée pour l'analyse des données. L'utilisation d'autres logiciels peut entraîner des résultats erronés.
6. Il faut toujours vérifier les résultats du contrôle qualité avant d'interpréter les résultats. Seuls les résultats des échantillons ayant un bon score de qualité peuvent être interprétés de manière fiable.
7. Les délétions homozygotes apparentes doivent être confirmées par un examen visuel de l'électrophérogramme afin d'exclure les résultats erronés dus à des problèmes de regroupement ou à des signaux faibles.
8. Les résultats de la MLPA sont destinés à être utilisés en conjonction avec d'autres résultats cliniques et diagnostiques, conformément aux normes de pratique professionnelle, y compris la confirmation par d'autres méthodes, l'évaluation parentale, l'évaluation génétique clinique et le conseil, le cas échéant. Les résultats des tests doivent être interprétés par un généticien moléculaire clinique ou équivalent.

Précautions relatives à la qualité des échantillons

9. La dépurination de l'ADN causée par une capacité tampon insuffisante de l'échantillon d'ADN peut entraîner des résultats erronés. Si l'on ne sait pas s'il y a suffisamment de tampon, ajouter du Tris-HCl : 4 µl d'échantillon d'ADN + 1 µl de 50 mM de Tris-HCl, pH 8,5.
10. Les contaminants restant après l'extraction de l'ADN, y compris les sels, l'héparine, l'EDTA (> 1,5 mM) et le fer, peuvent influencer les performances de l'essai.
11. La présence de sel dans les échantillons d'ADN peut entraîner une mauvaise dénaturation. Il peut en résulter des délétions apparentes, même si plusieurs sondes reconnaissent des cibles génomiques adjacentes. Ne pas utiliser les systèmes QIAGEN M6, M48 et M96, qui laissent trop de sel. Pour QIAGEN EZ1, il convient d'utiliser le [Protocole supplémentaire QIAGEN](#) pour MLPA.
12. Ne pas concentrer l'ADN par évaporation ou par SpeedVac, car cela entraîne des concentrations élevées d'EDTA et de sel.

Précautions à prendre lors de l'exécution

13. Ne jamais utiliser plus de 5 µl de solution d'ADN par réaction. La quantité d'ADN requise est spécifiée dans la description du produit probemix.
14. Ne pas mélanger différents lots de MLPA probemix.
15. L'évaporation qui augmente les concentrations de contaminants et de sel peut se produire pendant l'hybridation de nuit ou lors du pipetage du mélange maître de ligature. Pour prévenir/réduire l'évaporation :
 - a. Utiliser une pipette multicanal pour réduire le temps de manipulation.
 - b. S'assurer que le couvercle chauffant fonctionne correctement.
 - c. Augmenter ou diminuer la pression du couvercle chauffant.
 - d. Essayer d'utiliser des tubes de réaction différents.
 - e. Déposer une petite goutte d'huile minérale sur l'échantillon d'ADN pour couvrir la surface du liquide.
16. Remplacer régulièrement les capillaires et le polymère. Le polymère se détériore rapidement après une exposition prolongée à > 25 °C. Si les pics de l'étalon de dimension sont à plusieurs reprises faibles et larges, les capillaires ou le polymère peuvent s'être détériorés.
17. Le formamide peut devenir acide et provoquer la dépurination et la fragmentation des produits PCR lors du chauffage. Utiliser du formamide de haute qualité et le conserver dans des aliquotes à -20 °C.
18. Le volume du produit PCR ne doit jamais correspondre à > 10 % du mélange d'injection total. Lorsque les pics sont faibles, augmenter le temps d'injection et/ou la tension et ne pas ajouter plus de produit PCR.
19. Des résultats erronés peuvent être obtenus si un ou plusieurs pics sont hors échelle. Le risque de pics hors échelle est plus élevé lorsque l'on utilise des probemix contenant un nombre relativement faible de sondes. Pour réduire le signal, réexécuter les produits PCR en utilisant :
 - a. une tension d'injection plus faible / un temps d'injection plus court ;
 - b. une quantité réduite de produits PCR.
20. La contamination des échantillons d'ADN par de l'ADNc ou des amplicons PCR d'exons individuels peut entraîner une augmentation du signal de la sonde. L'analyse d'un deuxième échantillon d'ADN collecté et isolé de manière indépendante permet d'exclure ces artefacts de contamination.

Précautions spécifiques à l'application

Voir la description du produit probemix.

Procédure d'essai, partie I - Réaction MLPA

Instructions	Programme du thermocycleur
1. Dénaturation de l'ADN	
1.1 Étiqueter les tubes/bandes/plaques de 0,2 ml.	98 °C pendant 5 min
1.2 Ajouter 5 µl d'échantillon d'ADN ou de TE (contrôle sans ADN) à chaque tube.	
1.3 Placer les tubes dans le thermocycleur, chauffer à 98 °C pendant 5 minutes, refroidir à 25 °C.	25 °C pour la pause
2. Hybridation	
2.1 Décongeler le MLPA Buffer et le MLPA Probemix, mélanger au vortex et centrifuger brièvement. Pipeter à température ambiante.	95 °C pendant 1 min
2.2 Préparer le MELANGE MAITRE D'HYBRIDATION . Pour une réaction* : <ul style="list-style-type: none"> ● MLPA Buffer : 1,5 µl ● MLPA probemix : 1,5 µl Bien mélanger par vortexage ou pipetage.	60 °C pour la pause (16 à 20 h)
2.3 Ajouter 3 µl de MELANGE MAITRE D'HYBRIDATION à chaque tube. Un pipetage précis est essentiel à cette étape ! Mélanger par pipetage.	
2.4 Placer les tubes dans le thermocycleur, incubé à 95 °C pendant 1 minute et hybrider à 60 °C pendant 16 à 20 heures.	
3. Ligature	
3.1 Décongeler le Ligase Buffer A et le Ligase Buffer B, mélanger au vortex et centrifuger brièvement. Pipeter à température ambiante. Chauffer la Ligase-65 dans les mains pendant 10 secondes. Ne pas vortexer, mais centrifuger brièvement.	54 °C pour la pause
3.2 Préparer le MELANGE MAITRE DE LIGASE-65 ** . Pour une réaction* : <ul style="list-style-type: none"> ● Eau ultrapure : 25 µl ● Ligase Buffer A : 3 µl ● Ligase Buffer B : 3 µl ● Ligase-65 : 1 µl, ajout en dernier. Bien mélanger en pipettant doucement de haut en bas, ne pas vortexer.	54 °C pendant 15 min 98 °C pendant 5 min 20 °C pour la pause
3.3 Poursuivre le programme du thermocycleur et refroidir les tubes à 54 °C.	
3.4 À 54 °C, ouvrir les tubes dans le thermocycleur , ajouter 32 µl de MELANGE MAITRE DE LIGASE-65 dans chaque tube, bien mélanger en pipettant, fermer les tubes et continuer à incubé à 54 °C pendant 15 minutes.	
3.5 Chauffer à 98 °C et incubé pendant 5 minutes pour inactiver la ligase, refroidir à 20 °C.**	
4. PCR	
4.1 Décongeler le mélange de Primer PCR, mélanger au vortex et centrifuger brièvement. Chauffer la polymérase dans les mains pendant 10 secondes, ne pas vortexer, mais centrifuger brièvement.	35 cycles PCR :
4.2 Préparer le MELANGE MAITRE DE POLYMERASE . Pour une réaction* : <ul style="list-style-type: none"> ● Eau ultrapure : 7,5 µl ● Mélange de Primer PCR : 2 µl ● Polymérase : 0,5 µl Bien mélanger en pipettant de haut en bas, ne pas mélanger au vortex.	<ul style="list-style-type: none"> ● 95 °C pendant 30 s ● 60 °C pendant 30 s ● 72 °C pendant 60 s
4.3 À 20 °C, ajouter 10 µl de MELANGE MAITRE DE POLYMERASE dans chaque tube, bien mélanger en pipettant et poursuivre immédiatement le programme PCR.	72 °C pendant 20 min
4.4 Après la PCR, pour éviter toute contamination, ne pas ouvrir les tubes dans la même pièce et utiliser une micropipette différente pour manipuler les produits de la PCR.	15 °C pour la pause
4.5 Conserver les produits PCR à l'abri de la lumière à 4 °C jusqu'à 1 semaine, ou entre -25 °C et -15 °C pendant une période plus longue.	

* Pour minimiser la variation des échantillons, préparez des volumes suffisamment importants de solutions de mélange maître : 5 à 10 % d'excédent de volume.

** Lorsqu'ils sont préparés à l'avance (pas plus d'une heure avant l'utilisation), les mélanges maîtres doivent être conservés sur de la glace ou à 4 °C, et réchauffés à température ambiante avant d'être ajoutés aux tubes.

*** Lorsque les tubes sont transportés dans un autre laboratoire pour la PCR, préchauffer le thermocycleur pour la PCR, par exemple, à 95 °C pendant 1 seconde suivie d'une pause de 20 °C. Minimiser le temps de transfert (par exemple, < 5 min), placer les tubes dans le thermocycleur et continuer avec l'étape 4.1. Cela minimise la formation de pics non spécifiques.

Procédure d'essai, partie II - Séparation des fragments

1. Paramètres d'injection pour les appareils d'électrophorèse capillaire couramment utilisés et pris en charge par Coffalyser.Net	
Étiquette de l'amorce PCR : FAM	
ABI SeqStudio	Capillaires : 28 cm Mélange d'injection : <ul style="list-style-type: none"> • Produit PCR 0,8 µl • GS500 Size Standard 0,3 µl (ROX/LIZ) • HiDi formamide 12 µl Sceller la plaque d'injection, chauffer à 86 °C pendant 3 minutes, refroidir à 4 °C pendant 2 minutes.
ABI Prism 3100 ABI 3130 (xL) ABI 3500 (xL) ABI 3730 (xL) ABI SeqStudio Flex RUO/Dx	Capillaires : 36 ou 50 cm Mélange d'injection : <ul style="list-style-type: none"> • Produit PCR 0,7 µl • GS500 Size Standard 0,3 µl (ROX) ou 0,2 µl (LIZ) • HiDi formamide 9 µl Sceller la plaque d'injection, chauffer à 86 °C pendant 3 minutes, refroidir à 4 °C pendant 2 minutes.
Hitachi DS3000*	
Spectrum Compact* de Promega	* Seulement 36 cm de capillaires.
Étiquette de l'amorce PCR : Cy5	
SCIEX CEQ 2000 SCIEX CEQ 8000 SCIEX CEQ 8800 SCIEX GenomeLab GeXP	Capillaires : 33 cm Mélange d'injection : <ul style="list-style-type: none"> • Produit PCR 1 µl • SS600 Size Standard 0,5 µl • HiDi formamide / Beckman SLS 28,5 µl Ajouter 1 goutte d'huile minérale de haute qualité.
2. Réglages de l'électrophorèse	
Utiliser les paramètres d'analyse des fragments par défaut en fonction de l'application, de l'instrument, du polymère et de la longueur du capillaire. Il peut être nécessaire d'optimiser les réglages de l'instrument pour s'assurer que les signaux se situent dans la plage de détection optimale et que la durée de la série est suffisante pour détecter tous les fragments. Les plages de signaux optimales (en RFU) et les signaux minimaux/maximaux par instrument sont indiqués dans le Manuel de référence de Coffalyser.Net (en anglais).	

Contrôle qualité et analyse des données

Il est recommandé d'utiliser la dernière version de Coffalyser.Net™ (téléchargeable sur le [site Internet de MRC Holland](#)) pour le contrôle qualité et l'analyse des données. Pour des instructions détaillées, voir le [Manuel de référence de Coffalyser.Net](#).

Voir aussi ces articles dans notre Centre d'aide :

- [Explication des fragments de contrôle quantité et de dénaturation](#) (en anglais)
- [Informations sur les contrôles sans ADN](#) (en anglais)

Pour plus d'aide sur le dépannage, consultez les pages de dépannage du [Centre d'aide de MRC Holland](#) (en anglais).

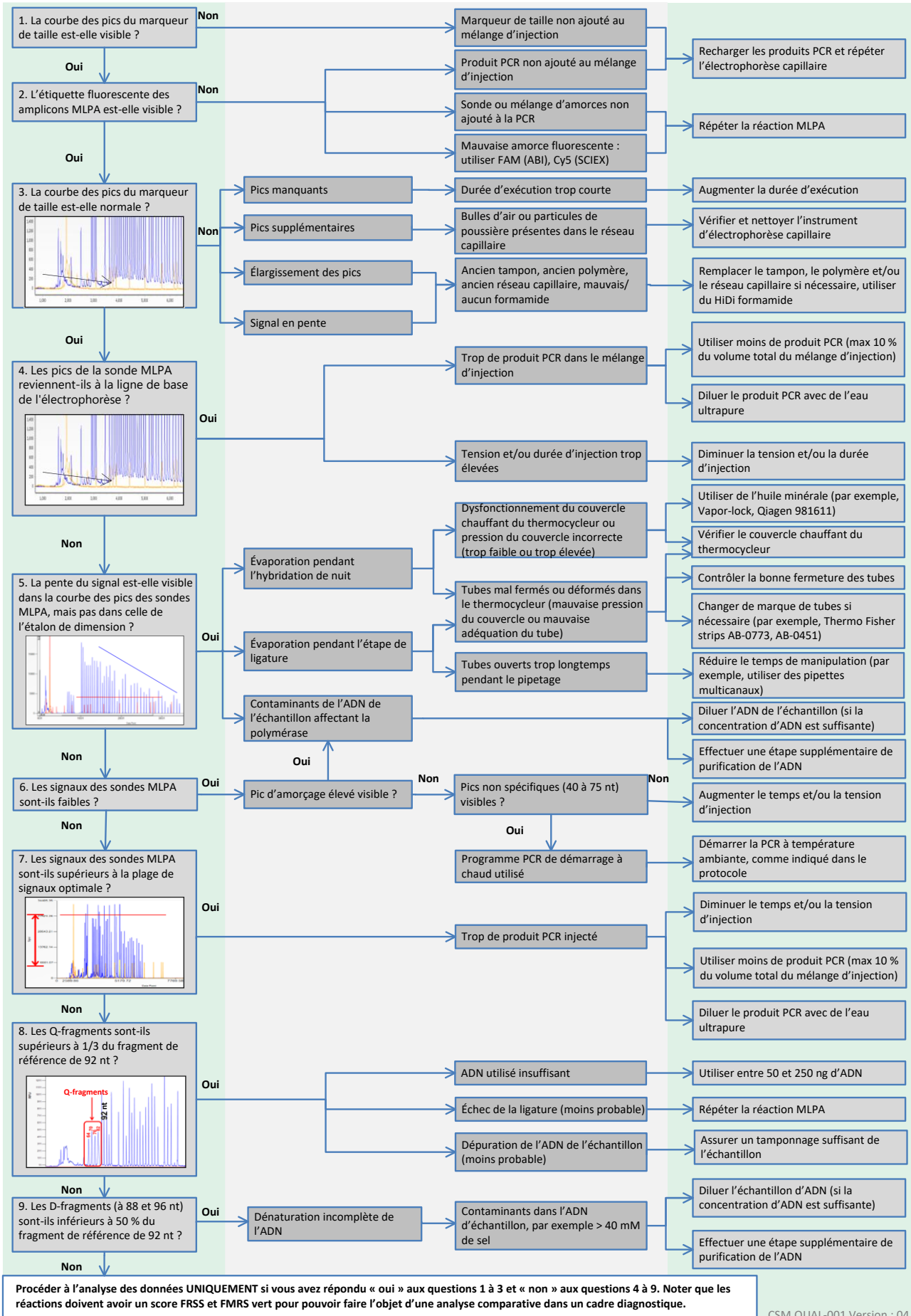
Interprétation et confirmation des résultats et caractéristiques en matière de performances

Dépend de l'application, voir la description du produit probemix.

Restrictions

1. Dans la plupart des populations et pour la plupart des applications de MLPA, la principale cause de défauts génétiques concerne de petites mutations (ponctuelles), dont la plupart ne seront pas détectées par la MLPA.
2. La MLPA ne détectera pas la plupart des inversions, des translocations équilibrées ou des modifications du nombre de copies qui se situent (partiellement) en dehors de la séquence détectée par une sonde MLPA.
3. La performance analytique peut être compromise par des impuretés dans l'échantillon d'ADN, une dénaturation incomplète de l'ADN (par exemple, en raison d'une contamination par le sel), l'utilisation d'une quantité insuffisante ou excessive d'ADN d'échantillon, des échantillons de référence insuffisants ou inadaptés, des problèmes avec l'électrophorèse capillaire ou une mauvaise procédure de normalisation des données, ainsi que d'autres erreurs techniques.
4. Des différences mineures dans l'exécution de l'expérience peuvent affecter la courbe des pics MLPA. N'inclure dans une analyse que les échantillons a) inclus dans la même expérience MLPA et b) testés avec le même lot de probemix.
5. Dans certains cas, l'analyse des échantillons parentaux peut être nécessaire pour une interprétation correcte des résultats.
6. Certaines aberrations du nombre de copies peuvent être dues à des altérations somatiques, notamment de grandes délétions et duplications de chromosomes entiers.
7. De petites modifications (par exemple, des SNV, de petits indels) dans la séquence ciblée par une sonde peuvent entraîner des résultats faussement positifs, même à > 20 nt du site de ligature de la sonde. Les changements de séquence peuvent réduire le signal de la sonde en empêchant la ligature des oligonucléotides de la sonde ou en déstabilisant la liaison d'un oligonucléotide de la sonde à l'ADN de l'échantillon. Les écarts détectés par MLPA doivent être confirmés, et les écarts détectés par une sonde unique doivent toujours être confirmés. Le séquençage de la région cible est recommandé.
8. L'ADN provenant de réactions d'amplification du génome entier n'est pas adapté à la MLPA en raison du biais d'amplification.
9. Les tests MLPA indiquent le nombre *moyen* de copies des séquences cibles dans les cellules à partir desquelles l'échantillon d'ADN a été extrait. Si plusieurs sondes ciblant des séquences adjacentes présentent une valeur inhabituelle, mais n'atteignent pas les valeurs seuils habituelles pour une délétion/duplication, le mosaïcisme est une cause possible. Des changements subtils, tels que ceux observés dans les cas de mosaïque, ne peuvent être distingués que lorsque les sondes sont disposées en fonction de la localisation chromosomique.
10. Toutes les modifications du nombre de copies détectées par MLPA ne sont pas pathogènes. MRC Holland ne peut pas dire si une délétion ou une duplication spécifique entraînera une maladie.


Organigramme de dépannage



Plus de détails

Vidéo d'instruction en ligne [Comment effectuer une réaction MLPA](#) (en anglais).

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

Plus d'informations	
www.mrcholland.com ; support.mrcholland.com	
	MRC Holland BV ; Willem Schoutenstraat 1 1057 DL, Amsterdam, Pays-Bas
Email	info@mrcholland.com (informations et questions techniques) ; order@mrcholland.com (commandes)
Téléphone	+31 888 657 200

MRC Holland, SALSA, MLPA, digitalMLPA, Coffalyser.Net, Coffalyser digitalMLPA et leurs logos sont des marques commerciales ou des marques déposées de MRC Holland BV. Toutes les autres marques et tous les autres noms cités dans les présentes sont la propriété de leurs détenteurs respectifs.



Changements apportés dans le protocole
<p><i>Version 010-FR1 – 21 mai 2025</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - ABI SeqStudio Flex renommé ABI SeqStudio Flex RUO/Dx en page 4. <p><i>Version 009-FR1 – 21 mai 2024</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Nouvelle structure et nouvelle mise en page du protocole. - Les tableaux des composants de l'essai SALSA MLPA ont été remplacés par des références aux descriptions des composants. - Suppression de la section relative aux étiquettes d'emballage standard. - Réécriture de la section sur le principe de la MLPA et amélioration de la figure du flux de travail. Suppression de la figure concernant les calculs. - Mise à jour de la section Matériel nécessaire, mais non fourni. - Réorganisation des informations de la section Traitement et stockage des échantillons. Raccourcissement et renommage de la section Exigences en matière d'échantillons. Certaines informations ont été déplacées vers Précautions et mises en garde. - Suppression de la section Sélection des échantillons de référence et d'autres échantillons de contrôle, car ces informations sont également présentes dans les descriptions des produits. - Déplacement des informations du chapitre 3 Notes à lire avant de commencer vers Procédure d'essai, partie I. - Regroupement des informations des chapitres 5 et 6 (Protocole MLPA en bref et Protocole MLPA) avec Procédure d'essai, partie I sous la forme d'un nouveau tableau. - Suppression de l'instruction de retirer les tubes du thermocycleur après la dénaturation et de les remettre en place après l'ajout du mélange maître d'hybridation. - Suppression de l'instruction de placer les tubes dans le thermocycleur avant d'ajouter le mélange maître de polymérase, car il n'y a pas d'instruction préalable de les retirer. - Ajout d'une note de bas de page à Procédure d'essai, partie I, donnant des instructions pour le cas où les tubes sont transportés dans un autre laboratoire pour la PCR. - Déplacement des informations de la section 7.1. Notes à lire avant de commencer à la section Précautions et mises en garde. - Remplacement du tableau sur les plages de signaux dans les instruments d'électrophorèse capillaire de la section 7.2. par une référence au tableau correspondant dans le Manuel de référence de Coffalyser.Net. - Remplacement des informations du chapitre 8 (Contrôle qualité et dépannage) par des références au Manuel de référence de Coffalyser.Net et aux articles de la base de connaissances sur les fragments de contrôle et les contrôles sans ADN. - Remplacement du chapitre 9 (Analyse des données) par l'instruction de télécharger Coffalyser.Net et de lire le Manuel de référence de Coffalyser.Net. - Déplacement de certaines informations du chapitre 10 (Interprétation et confirmation) vers Précautions et mises en garde ou vers Restrictions, et suppression d'autres informations, car elles sont spécifiques à certaines applications.