

Protocollo generale MLPA

Componenti necessari

Nome	Numeri di catalogo	Ingredienti
SALSA® MLPA® probemix	vedi descrizione del prodotto probemix	oligonucleotidi sintetici, oligonucleotidi sintetizzati utilizzando ceppi batterici non patogeni, Tris-HCl ed EDTA

Da utilizzare con:

- [SALSA® MLPA® Reagent Kit](#) (N. cat.: EK1-FAM, EK1-CY5, EK5-FAM, EK5-CY5, EK20-FAM)
- [Software di analisi dei dati Coffalyser.Net™](#) (N. cat.: n.d.)

Per alcune applicazioni, può essere utilizzato con:

Nome	Numeri di catalogo	Ingredienti
SALSA® Binning/Reference Selection/Artificial Duplication DNA	SDXXX	Tris-HCl, EDTA, DNA plasmide di controllo/sintetica, DNA femminile genomico umano, DNA di linee cellulari

Conservazione e durata dei componenti

Condizioni consigliate		
------------------------	--	--

È garantita una durata di conservazione fino alla data di scadenza, anche dopo l'apertura, se conservato nella confezione originale alle condizioni raccomandate. Per la data di scadenza esatta, consultare le etichette sulle fiale. I prodotti non devono essere esposti a più di 25 cicli di congelamento-scongelamento. Non utilizzare i prodotti se la confezione è danneggiata o aperta all'arrivo. Lasciare i prodotti nei contenitori originali. I materiali di scarto devono essere smaltiti in conformità alle normative nazionali e locali.

Sicurezza dei componenti

Nessuno dei componenti è di origine umana, animale o deriva da batteri o virus patogeni. Secondo la definizione dello Standard per la comunicazione dei pericoli (Hazard Communication Standard) in base alle concentrazioni presenti, nessuno dei componenti è considerato pericoloso. Per questi prodotti [non è richiesta una Scheda di Sicurezza \(Safety Data Sheet SDS\)](#): nessuno dei preparati contiene sostanze pericolose in concentrazioni tali da richiedere la distribuzione di una SDS (come da Regolamento (CE) n. 1272/2008 [EU-GHS/CLP] e 1907/2006 [REACH] ed emendamenti). In caso di fuoriuscite, pulire con acqua e seguire le opportune procedure in loco.

Principio del test (MLPA)

SALSA® MLPA® è una tecnica semi-quantitativa basata sull'amplificazione di un massimo di 60 sonde, ciascuna delle quali rileva una specifica sequenza di DNA. La tecnica inizia con la denaturazione del DNA del campione (vedi Figura 1). Successivamente, viene aggiunta una miscela di sonde MLPA, ciascuna composta da due o tre oligonucleotidi. Quando l'ibridazione di tutti gli oligonucleotidi con il DNA del campione è completa, le sonde legate al DNA del campione vengono ligate. Tutte le sonde ligate vengono amplificate utilizzando una coppia di primer per PCR universali, di cui un primer è marcato in modo fluorescente. In questo modo si ottiene una serie di ampliconi per PCR unici per ogni sonda, ciascuno con una lunghezza unica. Gli ampliconi vengono quindi separati per lunghezza su uno strumento per elettroforesi capillare. L'elettroferogramma specifico del campione risultante viene analizzato con Coffalyser.Net. Confrontando l'elettroferogramma di un campione con quello di una serie di campioni di riferimento, è possibile determinare il numero di target genomici presenti nel campione di interesse.

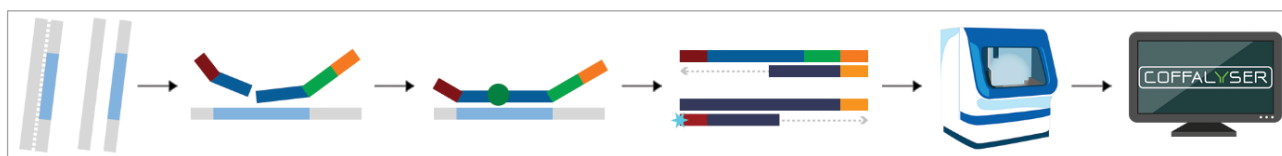


Figura 1. Flusso di lavoro MLPA

Materiali richiesti ma non forniti

- Acqua ultrapura
- TE_{0.1} (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM EDTA)
- Termociclatore calibrato con coperchio riscaldato (99-105°C) e attrezzatura di laboratorio standard
- Provette per PCR da 0,2 ml, strip o piastre per PCR
- Strumento per elettroforesi capillare che opera in condizioni di denaturazione e dispone di un software per l'analisi dei frammenti; si vedano ulteriori dettagli in [questo articolo del Centro assistenza](#)
- Formammide di alta qualità
- Standard dimensionale con etichetta: Applied Biosystems GeneScan™ 500 LIZ®/ROX™; SCIEX CEQ™ DNA Size Standard kit - 600
- Polimero gel: POP-1, POP-4 o POP-7 (Applied Biosystems); GenomeLab™ Linear Polyacrylamide denaturing gel (SCIEX); Spectrum Compact Polymer4 (Promega); Hitachi DS3000 Polymer4 (Hitachi)

Requisiti dei campioni

50-250 ng di DNA umano (salvo diversa indicazione) estratto dal tessuto indicato nella descrizione del prodotto probemix. I campioni di DNA devono contenere 5-10 mM di buffer Tris-HCl con un pH di 8,0-8,5.

Metodi di estrazione consigliati:

- QIAGEN Autopure LS (automatizzato) e QIAamp DNA mini/midi/maxi kit (manuale)
- Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (manuale)
- Salting out (manuale)

Precauzioni e avvertenzePrecauzioni generali

1. Non utilizzare il prodotto se è danneggiato o scaduto.
2. Solo per uso professionale. Il test deve essere eseguito da professionisti esperti in tecniche molecolari.
3. È necessaria la convalida interna di ogni test, in particolare quando lo si utilizza per la prima volta o quando si cambia la procedura di manipolazione del campione, il metodo di estrazione del DNA o gli strumenti utilizzati. Utilizzare ≥16 diversi campioni di DNA provenienti da individui sani. La convalida deve mostrare una deviazione standard ≤0,10 per ogni sonda, a meno che non sia descritta diversamente nella descrizione del prodotto probemix.
4. La persona responsabile dell'interpretazione dei risultati deve essere a conoscenza delle più recenti conoscenze scientifiche sull'applicazione e delle restrizioni della tecnica MLPA che potrebbero portare a risultati errati.
5. Per l'analisi dei dati è raccomandato utilizzare Coffalyser.Net. L'uso di altri software può portare a risultati errati.
6. Controllare sempre i punteggi del controllo di qualità prima di interpretare i risultati. Solo i risultati dei campioni con un buon punteggio di qualità possono essere interpretati in modo affidabile.
7. Nel caso di un'apparente delezione omozigote, l'elettroferogramma deve essere controllato visivamente per escludere falsi risultati causati da problemi di binning o da bassi segnali.
8. I risultati dell'MLPA devono essere utilizzati insieme ad altri risultati clinici e diagnostici, in linea con gli standard professionali, compresa la conferma con metodi alternativi, la valutazione di campioni parentali, la valutazione genetica clinica e la consulenza, come appropriato. I risultati dei test devono essere interpretati da un genetista molecolare clinico o equivalente.

Precauzioni per la qualità dei campioni

9. La depurinazione del DNA causata da un'insufficiente capacità tampone del DNA campione può dare luogo a risultati errati. Se non si sa se il buffer è sufficiente, aggiungere Tris-HCl: 4 µl di DNA campione + 1 µl di 50 mM Tris-HCl pH 8,5.
10. I contaminanti rimasti dopo l'estrazione del DNA, tra cui sali, eparina, EDTA (>1,5 mM) e ferro, possono influenzare le prestazioni del test.
11. Il sale nei campioni di DNA può causare una scarsa denaturazione. Questo può portare a delezioni apparenti, anche di più sonde che riconoscono target genomici adiacenti. Non utilizzare i sistemi QIAGEN M6, M48 e M96, che lasciano una quantità eccessiva di sale. Per QIAGEN EZ1, utilizzare il [QIAGEN Supplementary Protocol](#) per MLPA.
12. Non concentrare il DNA mediante evaporazione o SpeedVac; ciò comporta elevate concentrazioni di EDTA e sali.

Precauzioni durante l'esecuzione

13. Non utilizzare mai più di 5 µl di soluzione di DNA per reazione. La quantità di DNA richiesta è specificata nella descrizione del prodotto probemix.
14. Non mescolare lotti diversi di MLPA probemix.
15. Durante l'ibridazione notturna o durante il pipettaggio della master mix di ligazione può verificarsi un'evaporazione che aumenta le concentrazioni di contaminanti e sale. Per prevenire/ridurre l'evaporazione:
 - a. Utilizzare una pipetta multicanale per ridurre i tempi di manipolazione;
 - b. Assicursi che il coperchio riscaldato funzioni correttamente;
 - c. Aumentare o diminuire la pressione del coperchio riscaldato;
 - d. Provare a utilizzare provette di reazione diverse;
 - e. Mettere una piccola goccia di olio minerale sul campione di DNA per coprire la superficie liquida.
16. Sostituire regolarmente i capillari e il polimero. Il polimero si deteriora rapidamente dopo un'esposizione prolungata a >25°C. Se i picchi di standard dimensionale sono ripetutamente bassi e ampi, i capillari o il polimero potrebbero essersi deteriorati.
17. La formammide può diventare acida, causando la depurinazione e la frammentazione dei prodotti PCR durante il riscaldamento. Utilizzare formammide di alta qualità e conservarla in aliquote a -20°C.
18. Il volume del prodotto di PCR non deve mai essere >10% della miscela di iniezione totale. Se i picchi sono bassi, aumentare il tempo di iniezione e/o la tensione – non aggiungere altro prodotto PCR.
19. Si possono ottenere risultati errati se uno o più picchi sono fuori scala. Il rischio di picchi fuori scala è maggiore quando vengono utilizzate probemix che contengono un numero relativamente basso di sonde. Per ridurre il segnale, rieseguire i prodotti della PCR utilizzando:
 - a. Tensione di iniezione inferiore / tempo di iniezione più breve;
 - b. Una quantità ridotta di prodotti di PCR.
20. La contaminazione dei campioni di DNA con ampliconi di cDNA o PCR di singoli esoni può portare a un aumento del segnale della sonda. L'analisi di un secondo campione di DNA isolato e raccolto in modo indipendente può escludere questi artefatti di contaminazione.

Precauzioni specifiche per l'applicazione

Vedere la descrizione del prodotto probemix.

Procedura di test parte I – Reazione MLPA

Istruzioni	Programma del termociclatore
1. Denaturazione del DNA	
1.1 Etichettare le provette da 0,2 ml, strip o piastre.	98°C per 5 min
1.2 Aggiungere 5 µl di campione di DNA o TE (controllo senza DNA) a ciascuna provetta.	
1.3 Posizionare le provette nel termociclatore, riscaldare a 98°C per 5 minuti, raffreddare a 25°C.	25°C pausa
2. Ibridazione	
2.1 Scongelare MLPA Buffer e MLPA Probemix, agitare e centrifugare brevemente. Pipettare a temperatura ambiente.	95°C per 1 min
2.2 Preparare la MASTER MIX DI IBRIDAZIONE . Per una reazione*: ● MLPA Buffer: 1,5 µl ● MLPA probemix: 1,5 µl Mescolare bene con vortex o pipettaggio.	60°C pausa (16-20 h)
2.3 Aggiungere 3 µl di MASTER MIX DI IBRIDAZIONE a ciascuna provetta. In questa fase è essenziale un pipettaggio accurato! Mescolare tramite pipettaggio.	
2.4 Inserire le provette nel termociclatore, incubare a 95°C per 1 minuto e ibridare a 60°C per 16-20 ore.	
3. Ligazione	
3.1 Scongelare Ligase Buffer A e Ligase Buffer B, agitare con vortex e centrifugare brevemente. Pipettare a temperatura ambiente. Riscaldare Ligase-65 nelle mani per 10 secondi. Non agitare con vortex, ma centrifugare brevemente.	54°C pausa 54°C per 15 min
3.2 Preparare la master mix LIGASE-65 **.	98°C per 5 min 20°C pausa
● Acqua ultrapura: 25 µl ● Ligase Buffer A: 3 µl ● Ligase Buffer B: 3 µl ● Ligase-65: 1 µl, aggiunto per ultimo.	
Mescolare bene pipettando delicatamente su e giù, non agitare con vortex.	
3.3 Continuare il programma del termociclatore e raffreddare le provette a 54°C.	
3.4 A 54°C aprire le provette nel termociclatore , aggiungere 32 µl di MASTER MIX LIGASE-65 a ciascuna provetta, mescolare bene con una pipetta, chiudere le provette e continuare a incubare a 54°C per 15 minuti.	
3.5 Riscaldare a 98°C e incubare per 5 minuti per inattivare la ligasi, raffreddare a 20°C.***	
4. PCR	
4.1 Scongelare la miscela di primer PCR, agitare con vortex e centrifugare brevemente. Scaldare la polimerasi tra le mani per 10 secondi, non agitare con vortex, ma centrifugare brevemente.	35 cicli di PCR:
4.2 Preparare la MASTER MIX POLIMERASI . Per una reazione*: ● Acqua ultrapura: 7,5 µl ● Miscela di primer PCR: 2 µl ● Polimerasi: 0,5 µl Mescolare bene pipettando su e giù, non agitare con vortex.	● 95°C per 30 s ● 60°C per 30 s ● 72°C per 60 s 72°C per 20 min
4.3 A 20°C, aggiungere 10 µl di MASTER MIX POLIMERASI a ciascuna provetta, mescolare bene con una pipetta e continuare immediatamente con il programma di PCR.	15°C pausa
4.4 Dopo la PCR, per evitare contaminazioni, non aprire le provette nella stessa stanza e utilizzare una micropipetta diversa per manipolare i prodotti della PCR.	
4.5 Conservare i prodotti di PCR al riparo dalla luce a 4°C per un massimo di 1 settimana, o tra -25°C e -15°C per un periodo più lungo.	

*Per ridurre al minimo la variazione dei campioni, preparare volumi sufficientemente grandi di soluzioni di master mix: 5-10% di surplus di volume.

**Se preparate in anticipo (non più di 1 ora prima dell'uso), conservare le master mix su ghiaccio o a 4°C e riscaldarle a temperatura ambiente prima di aggiungerle alle provette.

***Quando le provette vengono portate in un laboratorio separato per la PCR, preriscaldare il termociclatore per la PCR, ad esempio impostandolo a 95°C per 1 secondo seguito da una pausa di 20°C. Ridurre al minimo il tempo di trasferimento (ad es. <5 min), inserire le provette nel termociclatore e continuare con il punto 4.1. Questo riduce al minimo la formazione di picchi non specifici.

Procedura di test parte II - Separazione dei frammenti

1. Impostazioni di iniezione per i dispositivi di elettroforesi capillare comunemente utilizzati e supportati in Coffalyser.Net	
Etichetta del primer PCR: FAM	
ABI SeqStudio	Capillari: 28 cm Miscela di iniezione: <ul style="list-style-type: none"> • 0,8 µl di prodotto per PCR • 0,3 µl GS500 Size Standard (ROX/LIZ) • 12 µl di formammide di HiDi Sigillare la piastra di iniezione, riscaldare a 86°C per 3 minuti, raffreddare a 4°C per 2 minuti.
ABI Prisma 3100 ABI 3130 (xL) ABI 3500 (xL) ABI 3730 (xL) ABI SeqStudio Flex RUO/Dx	Capillari: 36 o 50 cm Miscela di iniezione: <ul style="list-style-type: none"> • 0,7 µl di prodotto per PCR • 0,3 µl (ROX) o 0,2 µl (LIZ) GS500 Size Standard • 9 µl di formammide di HiDi Sigillare la piastra di iniezione, riscaldare a 86°C per 3 minuti, raffreddare a 4°C per 2 minuti.
Hitachi DS3000*	
Promega Spectrum Compact*	*Solo 36 cm di capillari.
Etichetta del primer PCR: Cy5	
SCIEX CEQ 2000 SCIEX CEQ 8000 SCIEX CEQ 8800 SCIEX GenomeLab GeXP	Capillari: 33 cm Miscela di iniezione: <ul style="list-style-type: none"> • 1 µl di prodotto per PCR • 0,5 µl SS600 Size Standard • 28,5 µl di formammide di HiDi / Beckman SLS Aggiungere 1 goccia di olio minerale di alta qualità.
2. Impostazioni dell'elettroforesi	
Utilizzare le impostazioni predefinite per l'analisi dei frammenti appropriate all'applicazione, allo strumento, al polimero e alla lunghezza del capillare. Le impostazioni dello strumento possono richiedere un'ottimizzazione per garantire che i segnali rientrino nell'intervallo di rilevamento ottimale e che la corsa sia sufficientemente lunga per rilevare tutti i frammenti. Gli intervalli di segnale ottimali (in RFU) e i segnali minimi/massimi per strumento sono riportati nel Manuale di consultazione di Coffalyser.Net .	

Controllo di qualità e analisi dei dati



Per il controllo di qualità e l'analisi dei dati è raccomandato utilizzare l'ultima versione di Coffalyser.Net™ (scaricabile dal [sito web MRC Holland](#)). Per istruzioni dettagliate, consultare il [Manuale di consultazione di Coffalyser.Net](#).

Si vedano anche questi articoli del nostro Centro assistenza:

- [Spiegazione sulla quantità e sul controllo della denaturazione dei frammenti](#)
- [Informazioni sui controlli senza DNA](#)

Per ulteriori informazioni sulla risoluzione dei problemi, visitare le pagine dedicate alla risoluzione dei problemi sul [Centro assistenza MRC Holland](#).

Interpretazione e conferma dei risultati e delle caratteristiche di prestazione

Dipende dall'applicazione; vedere la descrizione del prodotto probemix.


Restrizioni

1. Nella maggior parte delle popolazioni e per la maggior parte delle applicazioni MLPA, la causa principale dei difetti genetici è rappresentata da piccole mutazioni (puntiformi), la maggior parte delle quali non viene rilevata dall'MLPA.
2. L'MLPA non rileva la maggior parte delle inversioni, delle traslocazioni bilanciate o delle modifiche del numero di copie che si trovano (parzialmente) al di fuori della sequenza rilevata da una sonda MLPA.
3. Le prestazioni analitiche possono essere compromesse da impurità nel campione di DNA, da una denaturazione incompleta del DNA (ad esempio a causa di una contaminazione salina), dall'uso di una quantità insufficiente o eccessiva di DNA del campione, da campioni di riferimento insufficienti o inadatti, da problemi con l'elettroforesi capillare o da una procedura di normalizzazione dei dati inadeguata e da altri errori tecnici.
4. Piccole differenze nell'esecuzione sperimentale possono influenzare il pattern di picco MLPA. Includere in un'analisi solo i campioni che sono stati a) inclusi nello stesso esperimento MLPA e b) analizzati con lo stesso lotto di probemix.
5. In alcuni casi, l'analisi dei campioni parentali potrebbe essere necessaria per una corretta interpretazione dei risultati.
6. Alcune aberrazioni del numero di copie possono essere dovute ad alterazioni somatiche, tra cui grandi delezioni e duplicazioni di interi cromosomi.
7. Piccoli cambiamenti (ad esempio SNVs, piccole indel) nella sequenza bersaglio di una sonda possono causare risultati falsi positivi, anche quando si trovano a >20 nt dal sito di legatura della sonda. Le variazioni di sequenza possono ridurre il segnale della sonda impedendo la ligazione degli oligonucleotidi della sonda o destabilizzando il legame di un oligonucleotide della sonda al DNA del campione. Le deviazioni rilevate da MLPA devono essere confermate e le deviazioni di una singola sonda richiedono sempre una conferma. Si raccomanda il sequenziamento della regione target.
8. Il DNA proveniente da reazioni di amplificazione dell'intero genoma non è adatto alla MLPA a causa del bias dell'amplificazione.
9. I test MLPA forniscono il numero *medio* di copie delle sequenze target nelle cellule da cui è stato estratto il campione di DNA. Nel caso in cui diverse sonde destinate a sequenze adiacenti presentino un valore insolito, ma non raggiungano i valori soglia usuali per una delezione/duplicazione, il mosaicismo è una possibile causa. Cambiamenti sottili, come quelli osservati nei casi di mosaico, possono essere distinti solo quando le sonde sono disposte in base alla posizione cromosomica.
10. Non tutte le alterazioni del numero di copie rilevate da MLPA sono patologiche. MRC Holland non è in grado di informare se una specifica delezione o duplicazione provocherà una malattia.

Maggiori dettagli

Video di istruzioni online [Come eseguire una reazione MLPA](#).

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

Ulteriori informazioni	
www.mrcholland.com ; support.mrcholland.com	
	MRC Holland BV; Willem Schoutenstraat 1 1057 DL, Amsterdam, Paesi Bassi
Email	info@mrcholland.com (informazioni e domande tecniche); order@mrcholland.com (ordini)
Telefono	+31 888 657 200

MRC Holland, SALSA, MLPA, digitalMLPA, Coffalyser.Net, Coffalyser digitalMLPA e i loro loghi sono marchi o marchi registrati di MRC Holland BV. Tutti gli altri marchi e nomi riportati nel presente documento sono di proprietà dei rispettivi titolari.



Implementazione delle modifiche al protocollo
<p><i>Versione 010-IT1 – 21 maggio 2025</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - ABI SeqStudio Flex rinominato ABI SeqStudio Flex RUO/Dx a pagina 4. <p><i>Versione 009-IT1 – 21 maggio 2024</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Il protocollo ha ricevuto una nuova struttura e un nuovo design. - Le tabelle dei componenti del test SALSA MLPA sono state sostituite con riferimenti alle descrizioni dei prodotti dei componenti. - Eliminata la sezione relativa alle etichette delle confezioni standard. - Riscrittura della sezione sul principio del MLPA e miglioramento della figura del flusso di lavoro. Rimozione della figura sui calcoli. - Aggiornamento della sezione Materiali richiesti ma non forniti. - Riorganizzazione delle informazioni nella sezione Trattamento e conservazione dei campioni. La sezione è stata accorciata e rinominata in Requisiti dei campioni. Alcune informazioni sono state spostate in Precauzioni e avvertenze. - Rimozione della sezione Selezione di campioni di riferimento e altri campioni di controllo, in quanto queste informazioni sono presenti anche nelle descrizioni dei prodotti. - Spostamento di informazioni dal capitolo 3 Note da leggere prima di iniziare la Procedura di prova parte I. - Le informazioni contenute nei capitoli 5 e 6 (protocollo MLPA in breve e protocollo MLPA) sono state riunite nella parte I della procedura di prova in un nuovo formato tabellare. - Rimozione dell'istruzione di rimuovere le provette dal termociclatore dopo la denaturazione e rimetterle dopo l'aggiunta della master mix di ibridazione. - Rimozione dell'istruzione di inserire le provette nel termociclatore prima di aggiungere la master mix polimerasi perché non esiste un'istruzione precedente per rimuoverle. - Aggiunta di una nota a piè di pagina alla parte I della procedura del test, che fornisce istruzioni per la situazione in cui le provette vengono portate in un laboratorio separato per la PCR. - Spostamento delle informazioni dalla sezione 7.1. Spostamento delle Note da leggere prima di iniziare in Precauzioni e avvertenze. - Sostituzione della tabella relativa agli intervalli di segnale negli strumenti di elettroforesi capillare nella sezione 7.2. con un riferimento alla tabella corrispondente nel Manuale di consultazione di Coffalyser.Net. - Sostituzione delle informazioni del capitolo 8 (controllo di qualità e risoluzione dei problemi) con riferimenti al Manuale di consultazione di Coffalyser.Net e agli articoli della Knowledge Base sui frammenti di controllo e sui controlli senza DNA. - Sostituzione del Capitolo 9 (Analisi dei dati) con le istruzioni per scaricare Coffalyser.Net e leggere il Manuale di consultazione di Coffalyser.Net. - Le informazioni del capitolo 10 (Interpretazione e conferma) sono state spostate a Precauzioni e avvertenze, a Restrizioni o rimosse perché specifiche per alcune applicazioni.