

Protocolo general de MLPA

Componentes necesarios

Nombre	Números de cat.	Ingredientes
SALSA® MLPA® Probemix	Consulte la descripción del producto probemix	Oligonucleótidos sintéticos, oligonucleótidos sintetizados con una cepa bacteriana no patógena, Tris-HCl y EDTA

Para uso con:

- [SALSA® MLPA® Reagent Kit](#) (N.º de cat.: EK1-FAM, EK1-CY5, EK5-FAM, EK5-CY5, EK20-FAM)
- [Software de análisis de datos Coffalyser.Net™](#) (N.º de cat.: n. d.)

En determinadas aplicaciones, puede utilizarse con:

Nombre	Números de cat.	Ingredientes
SALSA® Binning/Reference Selection/Artificial Duplication DNA	SDXXX	Tris-HCl, EDTA, ADN plasmídico sintético/de control, ADN genómico humano femenino, ADN de estirpe celular

Almacenamiento y vida útil de los componentes

Condiciones recomendadas		
--------------------------	--	--

Se garantiza la vida útil hasta la fecha de caducidad, incluso después de abierto, si se almacena en el embalaje original bajo las condiciones recomendadas. Para conocer la fecha de caducidad exacta, consulte las etiquetas de los viales. Los productos no deben exponerse a más de 25 ciclos de congelación y descongelación. No utilice los productos si el embalaje está dañado o abierto al recibirlo. Deje los productos en sus envases originales. El material de desecho debe eliminarse según la normativa nacional y local.

Seguridad de los componentes

Ninguno de los ingredientes procede de seres humanos, animales, bacterias patógenas ni virus patógenos. Con base en las concentraciones presentes, ninguno de los ingredientes se considera peligroso según la definición de la Norma de Comunicación de Peligros (Hazard Communication Standard). [No se necesita una ficha de datos de seguridad \(Safety Data Sheet, SDS\)](#) para estos productos: ninguna de las preparaciones contiene sustancias peligrosas en concentraciones que requieran la distribución de una SDS (según las normas [CE] n.º 1272/2008 [UE-GHS/CLP] y 1907/2006 [REACH] y las modificaciones). Si se producen derrames, limpie con agua y siga los procedimientos apropiados del centro.

Principio de ensayo (MLPA)

SALSA® MLPA® es una técnica semicuantitativa basada en la amplificación de hasta 60 sondas, cada una de las cuales detecta una secuencia de ADN específica. La técnica comienza con la desnaturalización del ADN de la muestra (consulte la figura 1 que aparece a continuación). Posteriormente, se añade una mezcla de sondas de MLPA, donde cada sonda consta de dos o tres oligonucleótidos. Una vez completada la hibridación de todos los oligonucleótidos con el ADN de la muestra, se ligan las sondas unidas al ADN de la muestra. Todas las sondas ligadas se amplifican utilizando un par de primers de PCR universales, uno de los cuales está marcado con fluorescencia. De esta forma, se produce un conjunto de amplicones de PCR únicos para cada sonda, cada uno con una longitud única. A continuación, los amplicones se separan por longitud en un instrumento de electroforesis capilar. El electroferograma obtenido específico de la muestra se analiza con Coffalyser.Net. Al comparar el electroferograma de una muestra con el de un conjunto de muestras de referencia, se puede determinar el número de dianas genómicas presentes en la muestra de interés.

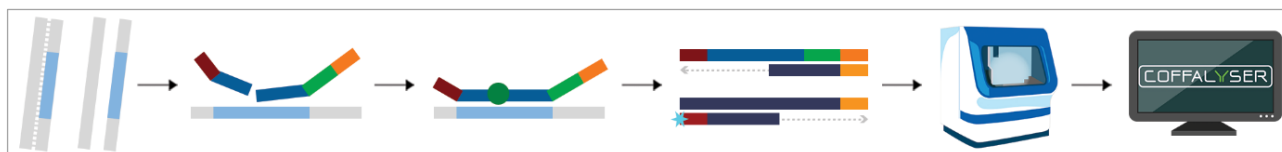


Figura 1. Flujo de trabajo de la MLPA

Material es necesarios pero no proporcionados

- Agua ultrapura
- TE_{0,1} (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 + 0,1 mM EDTA)
- Termociclador calibrado con tapa térmica (entre 99 y 105 °C) y equipo estándar de laboratorio
- Tubos//tiras/placas de PCR de 0,2 ml
- Instrumento de electroforesis capilar que se usa con condiciones desnaturizantes y dispone de un software de análisis de fragmentos; consulte más detalles en [este artículo del Centro de ayuda](#).
- Formamida de alta calidad
- Patrones de tamaño etiquetados: Applied Biosystems GeneScan™ 500 LIZ®/ROX™; SCIEX CEQ™ DNA Size Standard kit – 600
- Gel polímero: POP-1, POP-4 o POP-7 (Applied Biosystems); GenomeLab™ Linear Polyacrylamide denaturing gel (SCIEX); Spectrum Compact Polymer4 (Promega); Hitachi DS3000 Polymer4 (Hitachi)

Requisitos de la muestra

50-250 ng de ADN humano (salvo que se indique lo contrario) extraído del tejido indicado en la descripción del producto probemix. Las muestras de ADN deben contener buffer Tris-HCl de entre 5 y 10 mM, pH de entre 8,0 y 8,5.

Métodos de extracción recomendados:

- QIAGEN Autopure LS (automatizado) y QIAamp DNA mini/midi/maxi kit (manual)
- Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (manual)
- Precipitación salina (manual)

Precauciones y advertencias

Precauciones generales

1. No utilice el producto si está dañado o si ha caducado.
2. Solo para uso profesional. El ensayo lo deben realizar profesionales formados en técnicas moleculares.
3. Se requiere la validación interna de cada ensayo, en especial cuando se utiliza por primera vez, o bien cuando se cambia el procedimiento de manipulación de la muestra, el método de extracción del ADN o los instrumentos utilizados. Utilice ≥ 16 muestras diferentes de ADN de individuos sanos. La validación debe mostrar una desviación estándar $\leq 0,10$ para cada sonda, a menos que la descripción del producto de probemix indique lo contrario.
4. La persona responsable de la interpretación de los resultados debe tener en cuenta los conocimientos científicos más recientes con respecto a la aplicación y cualquier limitación de la técnica MLPA que pueda generar resultados incorrectos.
5. Se recomienda utilizar Coffalyser.Net para el análisis de los datos. El uso de otro software puede generar resultados falsos.
6. Compruebe siempre los resultados del control de calidad antes de interpretar los resultados. Solo pueden interpretarse de forma fiable los resultados de las muestras con resultados de buena calidad.
7. Las presuntas deleciones homocigóticas deben confirmarse mediante la examinación visual del electroferograma para excluir resultados falsos causados por problemas de seccionamiento o señales bajas.
8. Los resultados de la MLPA tienen la finalidad de utilizarse junto con otros hallazgos clínicos y de diagnóstico, en consonancia con los estándares profesionales del sector, incluida la confirmación mediante métodos alternativos, la evaluación parental, la evaluación genética clínica y el asesoramiento, según corresponda. Un genetista molecular clínico o un profesional equivalente debe interpretar los resultados de las pruebas.

Precauciones relativas a la calidad de las muestras

9. La depurinación del ADN derivada de la capacidad insuficiente de buffer del ADN de la muestra puede generar resultados falsos. Si no se sabe si hay suficiente buffer, añada Tris-HCl: 4 μ l de ADN de la muestra + 1 μ l de Tris-HCl 50 mM, pH 8,5.
10. Los restos de contaminantes que quedan después de la extracción del ADN, incluidas las sales, la heparina, el EDTA ($>1,5$ mM) y el hierro, pueden afectar el funcionamiento del ensayo.
11. La sal en las muestras de ADN puede conducir a una desnaturización deficiente. De este modo, se pueden generar presuntas deleciones, incluso de varias sondas que reconocen dianas genómicas adyacentes. No utilice los sistemas QIAGEN M6, M48 y M96 ya que dejan demasiada sal. Para QIAGEN EZ1, utilice el [protocolo suplementario de QIAGEN](#) para la MLPA.
12. No concentre el ADN mediante evaporación o SpeedVac ya que se pueden generar altas concentraciones de EDTA y sal.

Precauciones durante la ejecución

13. Nunca utilice más de 5 μ l de solución de ADN por cada reacción. La cantidad de ADN necesaria se especifica en la descripción del producto probemix.
14. No mezcle lotes diferentes de MLPA Probemix.
15. Durante la hibridación nocturna o al pipetear la mezcla maestra de ligación, puede producirse una evaporación que aumente las concentraciones de contaminantes y sal. Para evitar o reducir la evaporación:
 - a. Utilice una pipeta multicanal para reducir el tiempo de manipulación.
 - b. Asegúrese de que la tapa térmica funciona correctamente.
 - c. Aumente o disminuya la presión de la tapa térmica.
 - d. Intente utilizar diferentes tubos de reacción.
 - e. Coloque una pequeña gota de aceite mineral sobre la muestra de ADN para cubrir la superficie del líquido.
16. Sustituya regularmente los capilares y el polímero. El polímero se deteriora rápidamente tras la exposición prolongada a >25 °C. Si los picos de los patrones de tamaño son bajos y amplios en repetidas ocasiones, es posible que se hayan deteriorado los capilares o el polímero.
17. La formamida puede acidificarse, lo que causa la depurinación y la fragmentación de los productos de PCR al calentarse. Utilice formamida de alta calidad y guárdela en alícuotas a -20 °C.
18. El volumen del producto de PCR nunca debe ser >10 % del total de la mezcla de inyección. Cuando los picos sean bajos, aumente el tiempo de inyección o el voltaje: no añada más producto de PCR.
19. Se pueden obtener resultados falsos si uno o más picos están fuera de escala. El riesgo de que haya picos fuera de escala es mayor cuando se utilizan probemixes que contienen un número relativamente bajo de sondas. Para reducir la señal, vuelva a procesar los productos de PCR mediante los elementos que se indican a continuación:
 - a. Menor tensión de inyección/menor tiempo de inyección.
 - b. Reducción de la cantidad de productos de PCR.
20. La contaminación de las muestras de ADN con ADNc o amplicones de PCR de exones individuales puede aumentar la señal de la sonda. Mediante el análisis de una segunda muestra de ADN recogida y aislada de forma independiente, se pueden excluir estos artefactos de contaminación.

Precauciones específicas de la aplicación

Consulte la descripción del producto probemix.

Procedimiento de prueba parte I: Reacción de la MLPA

Instrucciones	Programa del termociclador
1. Desnaturalización del ADN	
1.1 Marcar los tubos/tiras/placas de 0,2 ml. 1.2 Añadir 5 µl de muestra de ADN o TE (control sin ADN) a cada tubo. 1.3 Colocar los tubos en el termociclador, calentar a 98 °C durante 5 minutos, enfriar a 25 °C.	98 °C durante 5 minutos Pausa a 25 °C
2. Hibridación	
2.1 Descongelar el MLPA Buffer y la MLPA Probemix, agitar en vórtex y centrifugar brevemente. Pipetear cuando esté a temperatura ambiente. 2.2 Preparar la MEZCLA MAESTRA DE HIBRIDACIÓN . Para una reacción*: ● MLPA Buffer: 1,5 µl ● MLPA Probemix: 1,5 µl Mezclar bien mediante agitación en vórtex o pipeteo. 2.3 Añadir 3 µl de MEZCLA MAESTRA DE HIBRIDACIÓN a cada tubo. En este paso es importante pipetear con precisión. Mezclar mediante pipeteo. 2.4 Colocar los tubos en el termociclador, incubar a 95 °C durante 1 minuto e hibridar a 60 °C durante un período de entre 16 y 20 horas.	95 °C durante 1 minuto Pausa a 60 °C (entre 16 y 20 horas)
3. Ligación	
3.1 Descongelar el Ligase Buffer A y el Ligase Buffer B, agitar en vórtex y centrifugar brevemente. Pipetear cuando esté a temperatura ambiente. Calentar la Ligase-65 en las manos durante 10 segundos. No agitar en vórtex, solo centrifugar brevemente. 3.2 Preparar la MEZCLA MAESTRA LIGASE-65 ** para una reacción*: ● Agua ultrapura: 25 µl ● Ligase Buffer A: 3 µl ● Ligase Buffer B: 3 µl ● Ligase-65: 1 µl, añadida en último lugar. Mezclar bien pipeteando con movimientos suaves hacia arriba y abajo, sin agitar en vórtex. 3.3 Continuar el programa del termociclador y enfriar los tubos a 54 °C. 3.4 A 54 °C, abrir los tubos en el termociclador , añadir 32 µl de la MEZCLA MAESTRA LIGASE-65 a cada tubo, mezclar bien mediante pipeteo, cerrar los tubos y continuar incubando a 54 °C durante 15 minutos. 3.5 Calentar a 98 °C e incubar durante 5 minutos para inactivar la ligasa, enfriar a 20 °C.***	Pausa a 54 °C 54 °C durante 15 minutos 98 °C durante 5 minutos Pausa a 20 °C
4. PCR	
4.1 Descongelar la mezcla de Primer de PCR, agitar en vórtex y centrifugar brevemente. Calentar la polimerasa en las manos durante 10 segundos, no agitar en vórtex, solo centrifugar brevemente. 4.2 Preparar la MEZCLA MAESTRA DE POLIMERASA . Para una reacción*: ● Agua ultrapura: 7,5 µl ● Mezcla de Primer de PCR: 2 µl ● Polimerasa: 0,5 µl Mezclar bien pipeteando con movimientos hacia arriba y abajo, sin agitar en vórtex. 4.3 A 20 °C, añadir 10 µl de MEZCLA MAESTRA DE POLIMERASA a cada tubo, mezclar bien mediante pipeteo y continuar con el programa de PCR inmediatamente. 4.4 Después de la PCR, para evitar la contaminación, no abrir los tubos en la misma habitación y utilice una micropipeta diferente para manipular los productos de PCR. 4.5 Almacenar los productos de PCR protegidos de la luz a 4 °C durante 1 semana como máximo, o bien entre -25 °C y -15 °C durante más tiempo.	35 ciclos de PCR: ● 95 °C durante 30 segundos. ● 60 °C durante 30 segundos. ● 72 °C durante 60 segundos. 72 °C durante 20 minutos. Pausa a 15 °C

*Para reducir al mínimo la variación de las muestras, prepare volúmenes suficientemente grandes de soluciones de mezcla maestra: exceso de volumen de entre 5 y 10 %.

**Cuando se preparen con antelación (no más de 1 hora antes de su uso), almacene las mezclas maestras en hielo o a 4 °C y caliéntelas a temperatura ambiente antes de añadirles a los tubos.

***Cuando los tubos se lleven a un laboratorio distinto para la PCR, caliente previamente el termociclador para la PCR; por ejemplo, póngalo a 95 °C durante 1 segundo seguido de pausa a 20 °C. Reduzca al mínimo el tiempo de transferencia (por ejemplo, <5 minutos), coloque los tubos en el termociclador y continúe con el paso 4.1. Esto reducirá al mínimo la formación de picos no específicos.

Procedimiento de ensayo parte II: Separación de fragmentos

1. Ajustes de inyección para dispositivos de electroforesis capilar de uso común compatibles con Coffalyser.Net

Etiqueta de primers de PCR: FAM	
ABI SeqStudio	<p>Capilares: 28 cm</p> <p>Mezcla de inyección:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Producto de PCR, 0,8 µl • GS500 Size Standard, 0,3 µl (ROX/LIZ) • Formamida HiDi, 12 µl <p>Sellar la placa de inyección, calentar a 86 °C durante 3 minutos, enfriar a 4 °C durante 2 minutos.</p>
ABI Prisma 3100 ABI 3130 (xL) ABI 3500 (xL) ABI 3730 (xL) ABI SeqStudio Flex RUO/Dx	<p>Capilares: 36 o 50 cm</p> <p>Mezcla de inyección:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Producto de PCR, 0,7 µl • GS500 Size Standard, 0,3 µl (ROX) o 0,2 µl (LIZ) • Formamida HiDi, 9 µl <p>Sellar la placa de inyección, calentar a 86 °C durante 3 minutos, enfriar a 4 °C durante 2 minutos.</p>
Hitachi DS3000*	Sellar la placa de inyección, calentar a 86 °C durante 3 minutos, enfriar a 4 °C durante 2 minutos.
Spectrum Compact de Promega*	*Solo capilares de 36 cm.
Etiqueta de primers de PCR: Cy5	
SCIEX CEQ 2000 SCIEX CEQ 8000 SCIEX CEQ 8800 SCIEX GenomeLab GeXP	<p>Capilares: 33 cm</p> <p>Mezcla de inyección:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Producto de PCR, 1 µl • SS600 Size Standard, 0,5 µl • Formamida HiDi/Beckman SLS, 28,5 µl <p>Añadir 1 gota de aceite mineral de alta calidad.</p>

2. Ajustes de electroforesis

Utilice los ajustes predeterminados del análisis de fragmentos que sean adecuados para la aplicación, el instrumento, el polímero y la longitud del capilar. Es posible que sea necesario optimizar los ajustes del instrumento para garantizar que las señales estén dentro del intervalo óptimo de detección y que el ciclo sea lo suficientemente largo como para detectar todos los fragmentos. Los intervalos óptimos de señal (en unidad de fluorescencia relativa [Relative Fluorescence Unit, RFU]) y las señales mínimas/máximas para cada instrumento se pueden encontrar en el [Manual de referencia de Coffalyser.Net](#).

Control de calidad y análisis de datos



Se recomienda utilizar la versión más reciente de Coffalyser.Net™ (descargable desde el [sitio web de MRC Holland](#)) para el control de calidad y el análisis de datos. Para obtener instrucciones detalladas, consulte el [Manual de referencia de Coffalyser.Net](#).

También consulte estos artículos de nuestro Centro de ayuda:

- [Explicación sobre los fragmentos de control de cantidad y desnaturalización](#)
- [Información sobre los controles sin ADN](#)

Para obtener más ayuda con la solución de problemas, visite las páginas de solución de problemas en el [Centro de ayuda de MRC Holland](#).

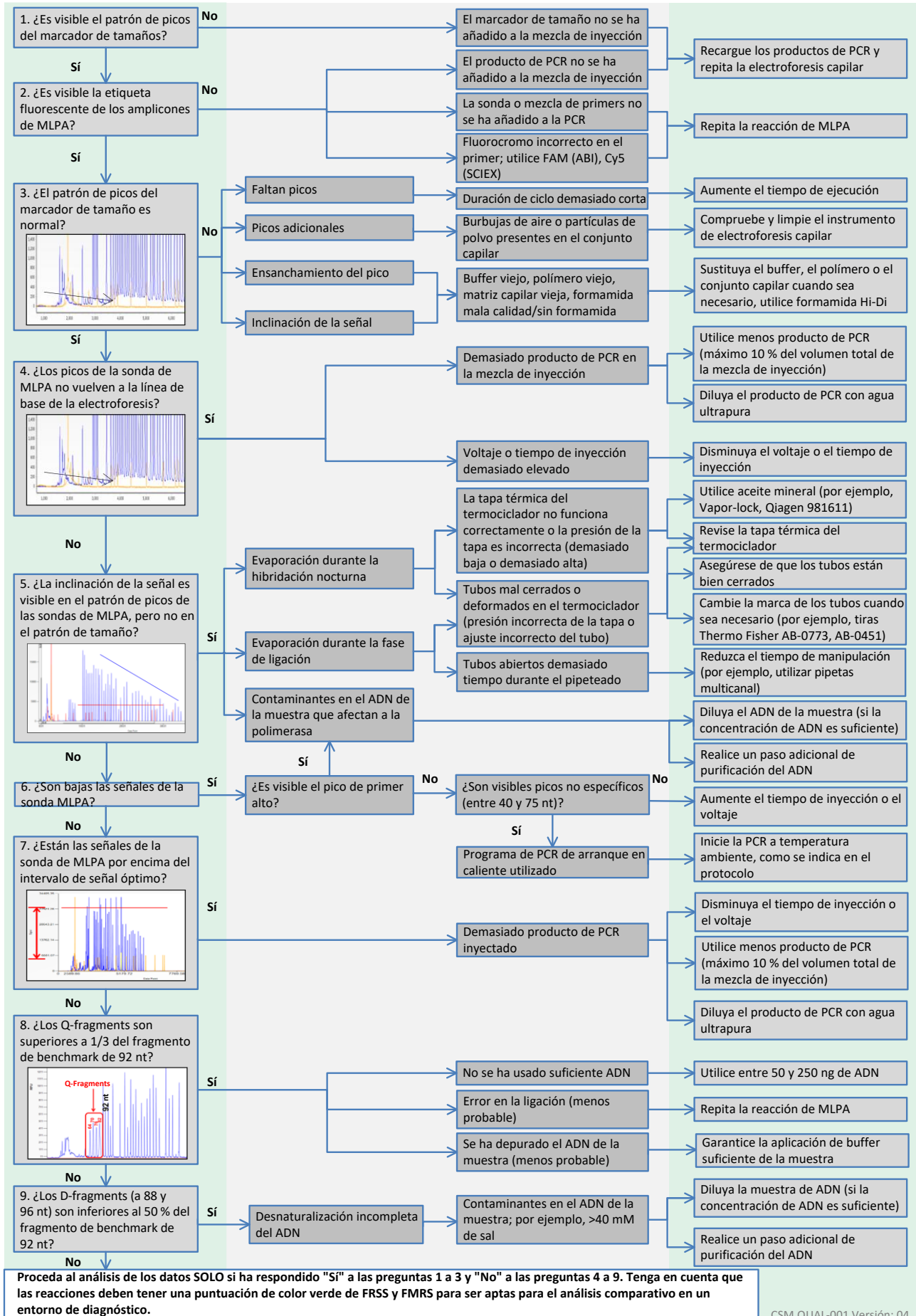
Interpretación y confirmación de los resultados y características del funcionamiento

En función de la aplicación; consulte la descripción del producto probemix.

Limitaciones

1. En la mayoría de las poblaciones y para la mayoría de las aplicaciones de la MLPA, la principal causa de defectos genéticos son las mutaciones pequeñas (puntuales), la mayoría de las cuales no podrán ser detectadas con la MLPA.
2. La MLPA no podrá detectar la mayoría de las inversiones, las translocaciones equilibradas o los cambios en el número de copias que se encuentren (parcialmente) fuera de la secuencia detectada por una sonda de MLPA.
3. El funcionamiento analítico puede verse comprometido debido a impurezas en la muestra de ADN, la desnaturalización incompleta del ADN (por ejemplo, debido a la contaminación con sal), el uso de una cantidad insuficiente o excesiva de ADN de la muestra, las muestras de referencia insuficientes o inadecuadas, los problemas con la electroforesis capilar o un procedimiento deficiente de normalización de datos y otros errores técnicos.
4. Las pequeñas diferencias en la ejecución experimental pueden afectar el patrón de picos de MLPA. Incluya en un análisis únicamente muestras que a) se incluyeron en el mismo experimento de MLPA y que b) se analizaron con el mismo lote de probemix.
5. En algunos casos, es posible que sea necesario analizar las muestras parentales para interpretar correctamente los resultados.
6. Se pueden originar determinadas aberraciones del número de copias a partir de alteraciones somáticas, como las deleciones grandes y las duplicaciones de cromosomas completos.
7. Los pequeños cambios (por ejemplo, SNVs, pequeñas indels [inserción-delección]) en la secuencia diana de una sonda pueden generar resultados falsos positivos, incluso cuando hay >20 nt del sitio de ligación de la sonda. Los cambios de secuencia pueden reducir la señal de la sonda impidiendo la ligadura de los oligonucleótidos de la sonda o desestabilizando la unión de un oligonucleótido de la sonda al ADN de la muestra. Deben confirmarse las desviaciones detectadas por la MLPA y las desviaciones de una sola sonda siempre requerirán confirmación. Se recomienda realizar la secuenciación de la región diana.
8. El ADN procedente de reacciones de amplificación del genoma completo no es adecuado para la MLPA debido al sesgo de la amplificación.
9. Las pruebas de MLPA proporcionan el número de copias promedio de las secuencias diana en las células de las que se extrajo la muestra de ADN. En caso de que varias sondas que tienen como diana secuencias adyacentes tengan un valor inusual, pero que no alcanzan los valores de umbral habituales para una delección o duplicación, podría haber mosaicismo. Los cambios sutiles, como los observados en los casos de mosaicismo, solo pueden distinguirse cuando las sondas se disponen según la localización cromosómica.
10. No todos los cambios del número de copias detectados por la MLPA son patogénicos. MRC Holland no puede proporcionar información sobre si una delección o duplicación específica dará lugar a una enfermedad.


Diagrama de flujo de la resolución de problemas



Más información

Vídeo de instrucciones en línea [Cómo realizar una reacción de MLPA](#).

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

Más información	
www.mrcholland.com ; support.mrcholland.com	
	MRC Holland BV; Willem Schoutenstraat 1 1057 DL, Ámsterdam, Países Bajos
Correo electrónico	info@mrcholland.com (información y cuestiones técnicas); order@mrcholland.com (pedidos)
Teléfono	+31 888 657 200

MRC Holland, SALSA, MLPA, digitalMLPA, Coffalyser.Net, Coffalyser digitalMLPA y sus logotipos son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de MRC Holland BV. Todas las demás marcas y nombres aquí mencionados son propiedad de sus respectivos dueños.



Cambios implementados en el protocolo
<p><i>Versión 010-ES1 – 21 de mayo de 2025</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - ABI SeqStudio Flex renombrado a ABI SeqStudio Flex RUO/Dx en la página 4. <p><i>Versión 009-ES1 – 21 de mayo de 2024</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - El protocolo se ha dotado de una nueva estructura y un nuevo diseño. - Las tablas de los componentes del ensayo SALSA MLPA se han sustituido por referencias a las descripciones de los productos de los componentes. - Se ha eliminado la sección sobre etiquetas estándar de embalaje. - Se ha vuelto a redactar la sección sobre el principio de MLPA y se ha mejorado la figura del flujo de trabajo. Se ha eliminado la figura sobre los cálculos. - Se ha actualizado la sección Materiales necesarios pero no proporcionados. - Se ha reorganizado la información de la sección Tratamiento y almacenamiento de muestras. Se ha acortado la sección y se le ha cambiado el nombre a Requisitos de la muestra. Parte de la información se ha trasladado a Precauciones y advertencias. - Se ha eliminado la sección Selección de muestras de referencia y otras muestras de control, ya que esta información también está presente en las descripciones de los productos. - La información en el capítulo 3 Notas para leer antes de comenzar se ha trasladado a Procedimiento de prueba parte I. - La información de los capítulos 5 y 6 (protocolo de la MLPA: resumen y protocolo de la MLPA) se ha combinado en Procedimiento de prueba parte I en un nuevo formato de tabla. - Se ha eliminado la instrucción para retirar los tubos del termociclador tras la desnaturalización y volver a colocarlos tras la adición de la mezcla maestra de hibridación. - Se ha eliminado la instrucción para colocar los tubos en el termociclador antes de añadir la mezcla maestra de polimerasa ya que no hay ninguna instrucción previa para retirarlos. - Se ha añadido la nota a pie de página a Procedimiento de prueba parte I, con instrucciones para el escenario en que los tubos se lleven a un laboratorio distinto para la PCR. - La información en la sección 7.1. Notas para leer antes de comenzar se ha trasladado a Precauciones y advertencias. - La tabla sobre los intervalos de señal en los instrumentos de electroforesis capilar en la sección 7.2. se ha sustituido por una referencia a la tabla correspondiente en el Manual de referencia de Coffalyser.Net. - La información del capítulo 8 (control de calidad y resolución de problemas) se ha sustituido por referencias al Manual de referencia de Coffalyser.Net y a los artículos de la base de conocimientos sobre fragmentos de control y controles sin ADN. - El capítulo 9 (Análisis de datos) se ha sustituido por la instrucción para descargar Coffalyser.Net y consultar el Manual de referencia de Coffalyser.Net. - La información del capítulo 10 (Interpretación y confirmación) se ha trasladado a Precauciones y advertencias, a Limitaciones, o bien se ha eliminado ya que es específica para determinadas aplicaciones.