

Protocolo geral de MLPA

Componentes necessários

Nome	Números de cat.	Ingredientes
SALSA® MLPA® probemix	consulte a descrição do produto probemix	oligonucleótidos sintéticos, oligonucleótidos sintetizados utilizando uma estirpe bacteriana não patogénica, Tris-HCl e EDTA


Para ser utilizado com:

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

Em determinadas aplicações, pode ser utilizado com:

Nome	Números de cat.	Ingredientes
SALSA® Binning/Reference Selection/Artificial Duplication DNA	SDXXX	Tris-HCl, EDTA, ADN de plasmídeo de controlo/sintético, ADN genómico feminino humano, ADN de linha celular

Armazenamento e período de vida útil dos componentes

Condições recomendadas		
------------------------	---	---

É garantido um período de vida útil até à data de validade, mesmo após a abertura, quando armazenado na embalagem original e nas condições recomendadas. Para saber a data de validade exata, consulte os rótulos dos frascos. Os produtos não devem ser sujeitos a mais de 25 ciclos de congelação-descongelação. Não utilize os produtos se a embalagem estiver danificada ou aberta à chegada. Deixe os produtos nas embalagens originais. Os resíduos devem ser eliminados de acordo com os regulamentos nacionais e locais.

Segurança dos componentes

Nenhum dos ingredientes é derivado de seres humanos, animais, bactérias patogénicas ou vírus patogénicos. Com base nas concentrações presentes, nenhum dos ingredientes é considerado perigoso segundo a norma de comunicação de riscos (Hazard Communication Standard). [Não é necessária uma Ficha de Dados de Segurança \(FDS\)](#) para estes produtos: nenhum dos preparados contém substâncias perigosas em concentrações que exijam a distribuição de uma FDS (de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 [EU-GHS/CLP] e 1907/2006 [REACH] e alterações). Em caso de derrame, limpe com água e siga os procedimentos adequados do local.

Princípio do ensaio (MLPA)

SALSA® MLPA® é uma técnica semiquantitativa baseada na amplificação de até 60 sondas, em que cada uma deteta uma sequência de ADN específica. A técnica começa com a desnaturação do ADN da amostra (consulte a Figura 1 abaixo). Em seguida, é adicionada uma mistura de sondas de MLPA, sendo cada sonda constituída por dois ou três oligonucleótidos. Uma vez concluída a hibridação de todos os oligoelementos com o ADN da amostra, as sondas vinculadas ao ADN da amostra são ligadas. Todas as sondas ligadas são amplificadas utilizando um par de primers de PCR universal, dos quais um primer é marcado com fluorescência. Isto resulta num conjunto de amplicões de PCR exclusivos para cada sonda, cada um com um comprimento único. Os amplicões são então separados por comprimento num instrumento de eletroforese capilar. O eletroferograma específico da amostra resultante é analisado com o software Coffalyser.Net. Através da comparação do eletroferograma de uma amostra com o de um conjunto de amostras de referência, é possível determinar o número de alvos genómicos presentes na amostra em questão.

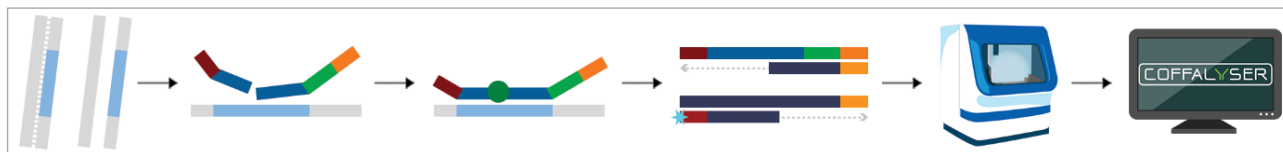


Figura 1. Fluxo de trabalho de MLPA

Materiais necessários mas não fornecidos

- Água ultrapura
- TE_{0,1} (10 mM de Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM de EDTA)
- Termociclador calibrado com tampa aquecida (99 a 105 °C) e equipamento normal de laboratório
- Tubos/tiras/placas de PCR de 0,2 ml
- Instrumento de eletroforese capilar que funciona em condições de desnaturação e possui software de análise de fragmentos; consulte mais informações [neste artigo do Centro de Ajuda](#)
- Formamida de alta qualidade
- Padrão de tamanho rotulado: Applied Biosystems GeneScan™ 500 LIZ®/ROX™; SCIEX CEQ™ DNA Size Standard kit - 600
- Polímero em gel: POP-1, POP-4 or POP-7 (Applied Biosystems); GenomeLab™ Linear Polyacrylamide denaturing gel (SCIEX); Spectrum Compact Polymer4 (Promega); Hitachi DS3000 Polymer4 (Hitachi)

Requisitos das amostras

50 a 250 ng de ADN humano (salvo indicação em contrário) extraído do tecido indicado na descrição do produto probemix. As amostras de ADN devem conter entre 5 e 10 mM de buffer Tris-HCl, pH entre 8,0 e 8,5.

Métodos de extração recomendados:

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

Precauções e advertênciasPrecauções gerais

1. Não utilize o produto se estiver danificado ou fora do prazo de validade.
2. Apenas para uso profissional. O ensaio deve ser realizado por profissionais com formação em técnicas moleculares.
3. Cada ensaio está sujeito a validação interna, nomeadamente aquando da primeira utilização ou em caso de alteração do procedimento de manuseamento da amostra, do método de extração de ADN ou dos instrumentos utilizados. Utilize ≥ 16 amostras de ADN diferentes de indivíduos saudáveis. A validação deve apresentar um desvio padrão $\leq 0,10$ para cada sonda, exceto se indicado de forma diferente na descrição do produto probemix.
4. A pessoa responsável pela interpretação dos resultados deverá estar a par dos conhecimentos científicos mais recentes da aplicação e de eventuais limitações da técnica MLPA que possam conduzir a resultados incorretos.
5. O software Coffalyser.Net deve ser utilizado para a análise dos dados. A utilização de outro software pode conduzir a resultados falsos.
6. Verifique sempre os valores de controlo da qualidade antes da interpretação dos resultados. Apenas os resultados de amostras com bons valores de qualidade podem ser interpretados de forma fiável.
7. As deleções homozigóticas aparentes devem ser confirmadas por exame visual do eletroferograma para excluir resultados falsos causados por problemas de compartimentação ou sinais baixos.
8. Os resultados de MLPA destinam-se a ser utilizados em conjunto com outros dados clínicos e de diagnóstico, de acordo com as normas de prática profissional, incluindo confirmação por métodos alternativos, avaliação parental, avaliação genética clínica e aconselhamento, conforme adequado. Os resultados dos testes devem ser interpretados por um geneticista molecular clínico ou equivalente.

Precauções relativas à qualidade das amostras

9. A depuração do ADN causada por uma capacidade de buffer insuficiente do ADN da amostra pode dar origem a resultados falsos. Se não for possível determinar se o buffer é suficiente, adicione Tris-HCl: 4 μ l de ADN da amostra + 1 μ l de Tris-HCl 50 mM pH 8,5.
10. Os contaminantes remanescentes após a extração do ADN, incluindo sais, heparina, EDTA ($>1,5$ mM) e ferro, podem influenciar o desempenho do ensaio.
11. O sal nas amostras de ADN pode causar uma desnaturação deficiente. Isto pode resultar em deleções aparentes, mesmo de várias sondas que reconhecem alvos genómicos adjacentes. Não utilize os sistemas QIAGEN M6, M48 e M96, pois deixam demasiado sal. Para QIAGEN EZ1, utilize o [Protocolo suplementar QIAGEN](#) para MLPA.
12. Não utilize evaporação ou SpeedVac para concentração do ADN; isto conduz a concentrações elevadas de EDTA e sal.

Precauções durante a execução

13. Nunca utilize mais de 5 μ l de solução de ADN por reação. A quantidade de ADN necessária é especificada na descrição do produto probemix.
14. Não misture lotes diferentes de MLPA probemix.
15. Durante a hibridação noturna ou ao pipetar a mistura principal de ligação, pode ocorrer evaporação que aumenta as concentrações de contaminantes e sal. Para evitar/reduzir a evaporação:
 - a. Utilize uma pipeta multicanal para reduzir o tempo de manuseamento;
 - b. Certifique-se de que se a tampa aquecida funciona corretamente;
 - c. Aumente ou diminua a pressão da tampa aquecida;
 - d. Tente utilizar tubos de reação diferentes;
 - e. Coloque uma pequena gota de óleo mineral em cima da amostra de ADN para cobrir a superfície líquida.
16. Substitua regularmente os capilares e o polímero. O polímero deteriora-se rapidamente após exposição prolongada a >25 °C. Se os picos do padrão de tamanho forem repetidamente baixos e amplos, os capilares ou o polímero podem ter-se deteriorado.
17. A formamida pode acidificar, causando a depuração e fragmentação dos produtos de PCR após o aquecimento. Utilize formamida de alta qualidade e armazene-a em alíquotas a -20 °C.
18. O volume do produto de PCR nunca deve ser $>10\%$ do total da mistura de injeção. Quando os picos são baixos, aumente o tempo e/ou a tensão de injeção, não adicione mais produto de PCR.
19. Podem obter-se resultados falsos se um ou mais picos estiverem fora da escala. O risco de picos fora da escala é maior quando se utilizam probemixes que contêm um número relativamente baixo de sondas. Para reduzir o sinal, execute novamente os produtos de PCR utilizando:
 - a. Uma tensão de injeção mais baixa/um tempo de injeção mais curto;
 - b. Uma quantidade reduzida de produtos de PCR.
20. A contaminação de amostras de ADN com cADN ou amplicões de PCR de exões individuais pode levar a um aumento do sinal da sonda. A análise de uma segunda amostra de ADN colhida e isolada de forma independente pode excluir estes artefactos de contaminação.

Precauções específicas da aplicação

Consulte a descrição do produto probemix.

Parte I do procedimento de teste – Reação de MLPA

Instruções	Programa do termociclador
1. Desnaturação do ADN	
1.1 Etiquete os tubos/as tiras/as placas de 0,2 ml. 1.2 Adicione 5 µl de amostra de ADN ou TE (controlo sem ADN) a cada tubo. 1.3 Coloque os tubos no termociclador, aqueça a 98 °C durante 5 minutos e arrefeça a 25 °C.	98 °C durante 5 min. pausa a 25 °C
2. Hibridação	
2.1 Descongele o MLPA Buffer e o MLPA Probemix, agite em vórtex e centrifugue brevemente. Pipete quando estiver à temperatura ambiente. 2.2 Prepare a MISTURA PRINCIPAL DE HIBRIDAÇÃO. Para uma reação*: ● MLPA Buffer: 1,5 µl ● MLPA probemix: 1,5 µl Misture bem, agitando em vórtex ou pipetando. 2.3 Adicione 3 µl de MISTURA PRINCIPAL DE HIBRIDAÇÃO a cada tubo. Nesta fase, é essencial uma pipetagem exata! Misture por pipetagem. 2.4 Coloque os tubos no termociclador, deixe incubar a 95 °C durante 1 minuto e proceda à hibridação a 60 °C durante 16 a 20 horas.	95 °C durante 1 min. pausa a 60 °C (16 a 20 h)
3. Ligação	
3.1 Descongele o Ligase Buffer A e o Ligase Buffer B, agite em vórtex e centrifugue brevemente. Pipete quando estiver à temperatura ambiente. Aqueça o Ligase-65 nas mãos durante 10 segundos. Não agite em vórtex, apenas centrifugue brevemente. 3.2 Prepare a mistura principal LIGASE-65**. Para uma reação*: ● Água ultrapura: 25 µl ● Ligase Buffer A: 3 µl ● Ligase Buffer B: 3 µl ● Ligase-65: 1 µl, adicionado por último. Misture bem, pipetando suavemente para cima e para baixo, sem agitar em vórtex. 3.3 Continue o programa do termociclador e arrefeça os tubos a 54 °C. 3.4 A 54 °C, abra os tubos no termociclador , adicione 32 µl de MISTURA PRINCIPAL LIGASE-65 a cada tubo, misture bem por pipetagem, feche os tubos e continue a incubar a 54 °C durante 15 minutos. 3.5 Aqueça a 98 °C e deixe incubar durante 5 minutos para inativar a ligase e arrefeça a 20 °C.***	pausa a 54 °C 54 °C durante 15 min. 98 °C durante 5 min. pausa a 20 °C
4. PCR	
4.1 Descongele a mistura de primers para PCR, agite em vórtex e centrifugue brevemente. Aqueça a polimerase nas mãos durante 10 segundos, não agite em vórtex, apenas centrifugue brevemente. 4.2 Prepare a MISTURA PRINCIPAL DA POLIMERASE. Para uma reação*: ● Água ultrapura: 7,5 µl ● Mistura de primers para PCR: 2 µl ● Polimerase: 0,5 µl Misture bem, pipetando para cima e para baixo, sem agitar em vórtex. 4.3 A 20 °C, adicione 10 µl de MISTURA PRINCIPAL DE POLIMERASE a cada tubo, misture bem por pipetagem e prossiga imediatamente com o programa de PCR. 4.4 Após a PCR, para evitar a contaminação, não abra os tubos na mesma sala e utilize uma micropipeta diferente para manusear os produtos de PCR. 4.5 Armazene os produtos de PCR protegidos da luz a 4 °C durante 1 semana, no máximo, ou entre -25 °C e -15 °C durante mais tempo.	35 ciclos de PCR: ● 95 °C durante 30 s ● 60 °C durante 30 s ● 72 °C durante 60 s 72 °C durante 20 min. pausa a 15 °C

*Para minimizar a variação das amostras, prepare volumes suficientemente grandes de soluções de mistura principal: 5 a 10% de excedente de volume.

**Quando preparadas com antecedência (não mais de 1 hora antes da utilização), armazene as misturas principais em gelo ou a 4 °C e aqueça-as à temperatura ambiente antes de as adicionar aos tubos.

***Quando os tubos forem levados para um laboratório separado para a PCR, pré-aqueça o termociclador para a PCR, por exemplo, coloque-o a 95 °C durante 1 seg. seguido de uma pausa a 20 °C. Minimize o tempo de transferência (por exemplo, <5 min), coloque os tubos no termociclador e continue para o passo 4.1. Desta forma, minimiza a formação de picos não específicos.

Parte II do procedimento de teste – Separação de fragmentos

1. Definições de injeção para os dispositivos de eletroforese capilar mais comuns suportados no Coffalyser.Net	
Etiqueta do primer de PCR: FAM	
ABI SeqStudio	Capilares: 28 cm Mistura de injeção: <ul style="list-style-type: none"> • Produto de PCR de 0,8 µl • GS500 Size Standard 0,3 µl (ROX/LIZ) • Formamida HiDi de 12 µl Sele a placa de injeção, aqueça a 86 °C durante 3 minutos, arrefeça a 4 °C durante 2 minutos.
ABI Prism 3100 ABI 3130 (xL) ABI 3500 (xL) ABI 3730 (xL) ABI SeqStudio Flex RUO/Dx	Capilares: 36 ou 50 cm Mistura de injeção: <ul style="list-style-type: none"> • Produto de PCR de 0,7 µl • GS500 Size Standard de 0,3 µl (ROX) ou 0,2 µl (LIZ) • Formamida HiDi de 9 µl Sele a placa de injeção, aqueça a 86 °C durante 3 minutos, arrefeça a 4 °C durante 2 minutos.
Hitachi DS3000*	
Promega Spectrum Compact*	*Apenas capilares de 36 cm.
Etiqueta do primer de PCR: Cy5	
SCIEX CEQ 2000 SCIEX CEQ 8000 SCIEX CEQ 8800 SCIEX GenomeLab GeXP	Capilares: 33 cm Mistura de injeção: <ul style="list-style-type: none"> • Produto de PCR de 1 µl • SS600 Size Standard de 0,5 µl • Formamida HiDi/Beckman SLS de 28,5 µl Adicione 1 gota de óleo mineral de alta qualidade.
2. Definições de eletroforese	
Utilize as predefinições de análise de fragmentos adequadas à aplicação, ao instrumento, ao polímero e ao comprimento do capilar. Pode ser necessário otimizar as definições do instrumento para garantir que os sinais se situam dentro do intervalo de detecção ótimo e que o processamento é suficientemente longo para detetar todos os fragmentos. Os intervalos de sinal ótimos (em RFU) e os sinais mínimo/máximo por instrumento podem ser consultados no Manual de Referência do Coffalyser.Net .	

Controlo da qualidade e análise de dados

Para efeito de controlo da qualidade e análise de dados, deve ser utilizada a versão mais recente do Coffalyser.Net™ (disponível para transferência no [Website da MRC Holland](#)). Para obter instruções pormenorizadas, consulte o [Manual de Referência Coffalyser.Net](#).

Consulte também estes artigos no nosso Centro de Ajuda:

- [Explicação sobre fragmentos de controlo da quantidade e desnaturação](#)
- [Informações sobre controlos sem ADN](#)

Para obter mais ajuda na resolução de problemas, visite as páginas de resolução de problemas no [Centro de Ajuda MRC Holland](#).

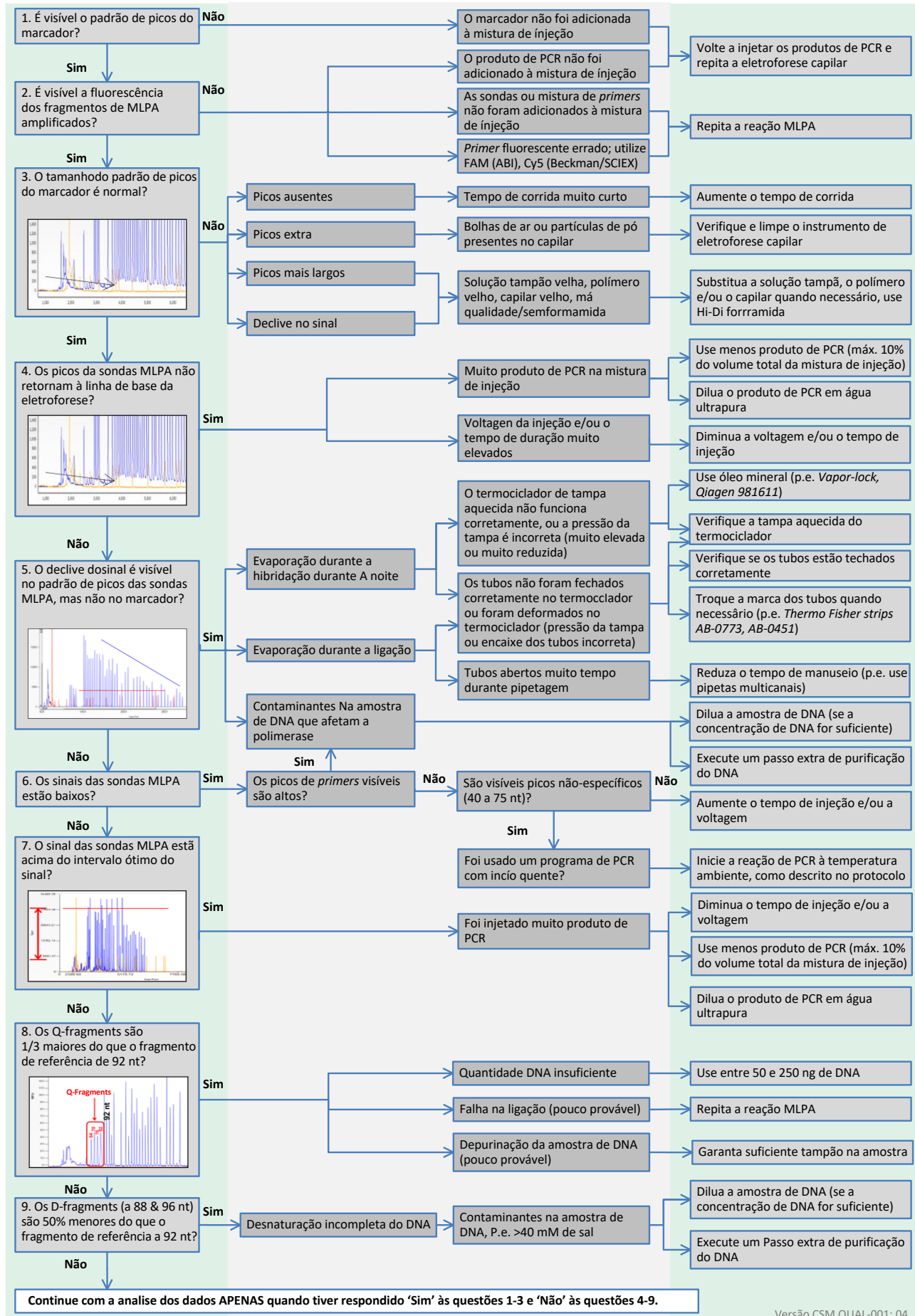
Interpretação e confirmação de resultados e características de desempenho

Depende da aplicação; consulte a descrição do produto probemix.

Limitações

1. Na maioria das populações e para a maioria das aplicações de MLPA, a principal causa de defeitos genéticos são pequenas mutações (pontuais), a maioria das quais não será detetada por MLPA.
2. A MLPA não detetará a maioria das inversões, translocações equilibradas ou alterações do número de cópias que se encontrem (parcialmente) fora da sequência detetada por uma sonda MLPA.
3. O desempenho analítico pode ser comprometido por impurezas na amostra de ADN, desnaturação incompleta do ADN (por exemplo, devido a contaminação por sal), utilização de ADN de amostra insuficiente ou em excesso, amostras de referência insuficientes ou inadequadas, problemas com a eletroforese capilar ou um procedimento de normalização de dados deficiente e outros erros técnicos.
4. Pequenas diferenças na execução experimental podem afetar o padrão de picos da MLPA. Inclua apenas amostras numa análise que tenham sido a) incluídas na mesma experiência e MLPA e b) testadas com o mesmo lote probemix.
5. Em certos casos, poderá ser necessária a análise de amostras parentais para uma interpretação correta dos resultados.
6. Algumas aberrações no número de cópias podem dever-se a alterações somáticas, incluindo grandes deleções e duplicações de cromossomas inteiros.
7. Pequenas alterações (por exemplo, SNVs, pequenos indels) na sequência visada por uma sonda podem causar resultados falsos positivos, mesmo quando superiores a 20 nt do local de ligação da sonda. As alterações de sequência podem reduzir o sinal da sonda, ao impedir a ligação dos oligonucleótidos da sonda ou desestabilizar a ligação de um oligonucleótido da sonda ao ADN da amostra. Os desvios detetados pela MLPA devem ser confirmados e os desvios de sonda única exigem sempre confirmação. Recomenda-se a sequenciação da região alvo.
8. O ADN proveniente de reações de amplificação do genoma completo não é adequado para MLPA devido ao enviesamento da amplificação.
9. Os testes MLPA fornecem o número *médio* de cópias das sequências alvo nas células das quais a amostra de ADN foi extraída. Se várias sondas direcionadas para sequências adjacentes apresentarem um valor invulgar, mas não atingirem os valores-limite habituais para uma deleção/duplicação, o mosaicismo é uma causa possível. Só é possível distinguir alterações subtis, como as observadas em casos de mosaico, quando as sondas estão dispostas de acordo com a localização cromossómica.
10. Nem todas as alterações do número de cópias detetadas por MLPA são patogénicas. A MRC Holland não pode fornecer informações quanto à possibilidade de uma deleção ou duplicação específica resultar em doença.


Fluxograma de resolução de problemas



Mais detalhes

Vídeo de instruções online [Como executar uma reação 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.

Mais informações	
www.mrcholland.com ; support.mrcholland.com	
	MRC Holland BV; Willem Schoutenstraat 1 1057 DL, Amesterdão, Holanda
E-mail	info@mrcholland.com (informações e questões técnicas); order@mrcholland.com (encomendas)
Telefone	+31 888 657 200

MRC Holland, SALSA, MLPA, digitalMLPA, Coffalyser.Net, Coffalyser digitalMLPA e os respetivos logótipos são marcas comerciais ou marcas comerciais registadas da MRC Holland BV. Todas as outras marcas e nomes aqui mencionados são propriedade dos respetivos proprietários.



Implementação de alterações no protocolo
<p><i>Versão 010-PT1 – 21 de maio de 2025</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - ABI SeqStudio Flex renomeado para ABI SeqStudio Flex RUO/Dx na página 4. <p><i>Versão 009-PT1 – 21 de maio de 2024</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - O protocolo recebeu uma nova estrutura e uma nova conceção. - A tabelas de componentes do ensaio SALSA MLPA foram substituídas por referências às descrições dos produtos dos componentes. - A secção relativa aos rótulos das embalagens normalizadas foi removida. - A secção sobre o princípio da MLPA foi reescrita e a figura do fluxo de trabalho foi melhorada. A figura relativa aos cálculos foi removida. - A secção relativa aos materiais necessários mas não fornecidos foi atualizada. - As informações da secção relativa ao tratamento e armazenamento de amostras foi reorganizada. A secção foi reduzida e o nome alterado para Requisitos das amostras. Algumas informações foram transferidas para Precauções e advertências. - A secção relativa à seleção de amostras de referência e outras amostras de controlo foi removida, uma vez que esta informação também consta das descrições dos produtos. - As informações do capítulo 3, Notas a ler antes de iniciar, foram transferidas para a Parte I do procedimento de teste. - As informações dos capítulos 5 e 6 (resumo do protocolo MLPA e protocolo MLPA) foram combinadas na Parte I do procedimento de teste, num novo formato de tabela. - As instruções para retirar os tubos do termociclador após a desnaturação e voltar a colocá-los após a adição da mistura principal de hibridação foram removidas. - A instrução para colocar os tubos no termociclador antes de adicionar a mistura principal de polimerase foi removida, porque não há nenhuma instrução anterior para os remover. - Foi adicionada uma nota de rodapé à Parte I do procedimento de teste, com instruções para a situação em que os tubos são levados para um laboratório separado para a PCR. - Informações na secção 7.1. Notas a ler antes de iniciar passou para Precauções e advertências. - A tabela sobre intervalos de sinal em instrumentos de eletroforese capilar na secção 7.2. foi substituída por uma referência à tabela correspondente no Manual de Referência do Coffalyser.Net. - As informações do capítulo 8 (controlo da qualidade e resolução de problemas) foram substituídas por referências ao Manual de Referência do Coffalyser.Net e a artigos da base de conhecimentos sobre fragmentos de controlo e controlos sem ADN. - O capítulo 9 (Análise de dados) foi substituído pela instrução para transferir o Coffalyser.Net e ler o Manual de Referência do Coffalyser.Net. - As informações do capítulo 10 (Interpretação e confirmação) foram transferidas para Precauções e advertências, para Limitações ou removidas por serem específicas de determinadas aplicações.