

Obecný protokol MLPA

Požadované komponenty

Název	Kat. čísla	Složení
SALSA® MLPA® probemix	viz popis produktu probemix	syntetické oligonukleotidy, oligonukleotidy syntetizované pomocí nepatogenního bakteriálního kmene, Tris-HCl a EDTA

K použití s:

- [SALSA® MLPA® Reagent Kit](#) (kat. č.: EK1-FAM, EK1-CY5, EK5-FAM, EK5-CY5, EK20-FAM)
- [Software pro analýzu dat Coffalyser.Net™](#) (kat. č.: není k dispozici)

Pro určité aplikace lze použít s:

Název	Kat. čísla	Složení
SALSA® Binning/Reference Selection/Artificial Duplication DNA	SDXXX	Tris-HCl, EDTA, syntetická/kontrolní plazmidová DNA, lidská genomová ženská DNA, DNA buněčné linie

Skladování a trvanlivost komponent

Doporučené podmínky		
---------------------	--	--

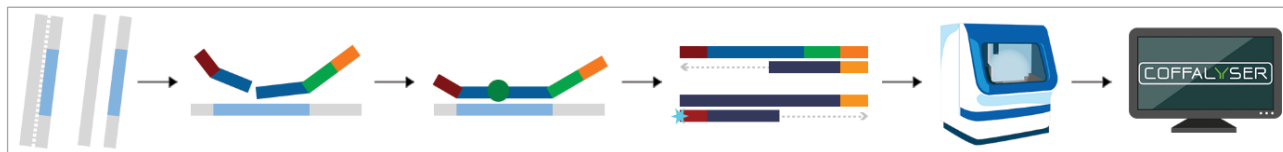
Při skladování v původním obalu za doporučených podmínek je zaručena trvanlivost do data expirace, a to i po otevření. Přesné datum expirace je uvedeno na štítku příslušné lahvičky. Produkty by neměly být vystaveny více než 25 cyklům zmrazení a rozmrazení. Produkty nepoužívejte, pokud je obal při dodání poškozený nebo otevřený. Produkty ponechejte v původních obalech. Odpadní materiál musí být zlikvidován v souladu s národními a místními předpisy.

Bezpečnost komponent

Žádná ze složek není lidského či živočišného původu ani neobsahuje patogenní bakterie či patogenní viry. Na základě přítomných koncentrací nepředstavuje žádná ze složek nebezpečí, jak je definováno ve standardu pro sdělování nebezpečnosti (Hazard Communication Standard). [Bezpečnostní list \(BL\) není pro tyto produkty vyžadován](#): žádný z přípravků neobsahuje nebezpečné látky v koncentracích vyžadujících distribuci BL (podle nařízení (ES) č. 1272/2008 [EU-GHS/CLP] a 1907/2006 [REACH] a jejich novelizací). Pokud dojde k rozlití výrobku, umyjte jej vodou, přičemž následujte příslušné zavedené postupy na pracovišti.

Princip testu (MLPA)

SALSA® MLPA® je semikvantitativní technika založená na amplifikaci až 60 sond, z nichž každá detekuje specifickou sekvenci DNA. Technika začíná denaturací DNA ve vzorku (viz obrázek 1 níže). Dále se přidá směs sond MLPA, přičemž každá sonda sestává ze dvou nebo tří oligonukleotidů. Když je hybridizace všech oligosond s DNA ve vzorku dokončena, sondy navázané na vzorek DNA jsou ligovány. Všechny ligované sondy jsou amplifikovány pomocí univerzálního páru primerů PCR, přičemž jeden primer je fluorescenčně značen. Výsledkem je sada ampliconů PCR jedinečných pro každou sondu, z nichž každý amplicon má svou jedinečnou délku. Amplicony se pak rozdělí podle délky na přístroji pro kapilární elektroforézu. Výsledný elektroferogram specifický pro daný vzorek se analyzuje pomocí Coffalyser.Net. Porovnáním elektroferogramu vzorku s elektroferogramem sady referenčních vzorků lze určit počet genomových cílů přítomných v zájmovém vzorku.



Obrázek 1. Pracovní postup MLPA

Požadované, ale neposkytované materiály

- Ultračistá voda
- TE_{0,1} (10mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1mM EDTA)
- Kalibrováný termocykler s vyhřívaným víkem (99–105 °C) a standardním laboratorním vybavením
- 0,2ml PCR zkumavky/stripy / destičky
- Přístroj pro kapilární elektroforézu, který pracuje v podmínkách denaturace a má software pro analýzu fragmentů; další podrobnosti viz [tento článek Centra nápovědy](#)
- Vysoce kvalitní formamid
- Značený velikostní standard: Applied Biosystems GeneScan™ 500 LIZ®/ROX™; SCIEX CEQ™ DNA Size Standard kit - 600
- Gelový polymer: POP-1, POP-4 nebo POP-7 (Applied Biosystems); GenomeLab™ Linear Polyacrylamide denaturing gel (SCIEX); Spectrum Compact Polymer4 (Promega); Hitachi DS3000 Polymer4 (Hitachi)

Požadavky na vzorky

50–250 ng lidské DNA (pokud není uvedeno jinak) extrahované z tkáně uvedené v popisu produktu probemix. Vzorky DNA by měly obsahovat 5–10mM pufr Tris-HCl o pH 8,0–8,5.

Doporučené metody extrakce:

- QIAGEN Autopure LS (automatizované) a QIAamp DNA mini/midi/maxi kit (manuální)
- Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (manuální)
- Vysolování (manuální)

Preventivní opatření a výstrahyObecná preventivní opatření

1. Produkt nepoužívejte, pokud je poškozený nebo u něj uplynula doba expirace.
2. Pouze pro profesionální použití. Test by měli provádět odborníci vyškolení v molekulárních technikách.
3. Je vyžadována interní validace každého testu, zejména při jeho prvním použití nebo při změně postupu manipulace se vzorkem, metody extrakce DNA nebo použitých nástrojů. Použijte ≥ 16 různých vzorků DNA od zdravých jedinců. Validace by měla vykazovat standardní odchylku $\leq 0,10$ pro každou sondu, pokud není v popisu produktu probemix popsáno jinak.
4. Osoba odpovědná za interpretaci výsledků by měla znát nejnovější vědecké poznatky o aplikaci a veškerá omezení techniky MLPA, která by mohla vést k nesprávným výsledkům.
5. Pro analýzu dat by měl být použit nástroj Coffalyser.Net. Použití jiného softwaru může vést k nesprávným výsledkům.
6. Před interpretací výsledků vždy zkontrolujte skóre kontroly kvality. Spolehlivě interpretovat lze pouze výsledky vzorků s dobrým skóre kvality.
7. Zjevné homozygotní delece by měly být potvrzeny vizuálním prozkoumáním elektroferogramu, aby se vyloučily nesprávné výsledky způsobené problémy s binningem nebo nízkými signály.
8. Výsledky MLPA jsou určeny k použití ve spojení s dalšími klinickými a diagnostickými nálezy v souladu s profesionálními standardy praxe, včetně případného potvrzení alternativními metodami, posouzení rodičů, klinického genetického hodnocení a poradenství. Výsledky testů by měl interpretovat klinický molekulární genetik nebo odborník se stejnými zkušenostmi a znalostmi.

Preventivní opatření týkající se kvality vzorků

9. Depurinace DNA způsobená nedostatečnou pufrovací kapacitou DNA ve vzorku může vést k nesprávným výsledkům. Pokud není známo, zda je přítomno dostatečné množství pufru, přidejte Tris-HCl: 4 μ l vzorku s DNA + 1 μ l 50mM Tris-HCl pH 8,5.
10. Kontaminanty zbývající po extrakci DNA, včetně solí, heparinu, EDTA ($> 1,5$ mM) a železa, mohou ovlivnit účinnost testu.
11. Sůl ve vzorcích DNA může způsobit špatnou denaturaci. To může vést ke zdánlivým delecím, dokonce i několika sond rozpoznávajících sousední genomové cíle. Nepoužívejte systémy QIAGEN M6, M48 a M96, neboť ty zanechávají příliš mnoho soli. Pro QIAGEN EZ1 použijte [doplnující protokol QIAGEN](#) pro MLPA.
12. Nekonzentrujte DNA odpařováním nebo pomocí zařízení SpeedVac, neboť to vede k vysokým koncentracím EDTA a solí.

Bezpečnostní preventivní opatření při provádění

13. V jedné reakci nepoužívejte nikdy více než 5 μ l roztoku DNA. Požadované množství DNA je uvedeno v popisu produktu probemix.
14. Nemíchejte různé šarže probemix MLPA.
15. Během hybridizace přes noc nebo při pipetování ligační směsi master mix může dojít k odpařování, které zvyšuje koncentrace kontaminantů a solí. Postup zabránění/snížení odpařování:
 - a. Použijte vícekanálovou pipetu, a tím zkrátte potřebnou dobu manipulace.
 - b. Ujistěte se, že vyhřívané víko funguje správně.
 - c. Zvyšte nebo snižte tlak vyhřívaného víka.
 - d. Zkuste použít různé reakční zkumavky.
 - e. Naneste malou kapku minerálního oleje na vzorek DNA, abyste pokryli povrch kapaliny.
16. Pravidelně vyměňujte kapiláry a polymer. Polymer se po delší expozici při teplotách > 25 °C rychle kazí. Pokud jsou píky standardu velikostí opakovaně nízké a široké, mohlo dojít k poškození kapilár nebo polymeru.
17. Formamid se může stát kyselým a způsobit při zahřívání produktů PCR jejich depurinaci a fragmentaci. Použijte vysoce kvalitní formamid a skladujte jej v alikvótech při teplotě -20 °C.
18. Objem produktu PCR by nikdy neměl být > 10 % celkové nastříkované směsi. Když jsou píky nízké, zvyšte dobu nástřiku a/nebo napětí – další produkt PCR nepřidávejte.
19. Nesprávné výsledky mohou být získány, pokud je jeden nebo více píků mimo rozsah stupnice. Riziko píků mimo rozsah stupnice je vyšší, když se používají směsi sond probemix, které obsahují relativně nízký počet sond. Chcete-li snížit signál, spusťte znovu analýzu produktů PCR, přičemž použijte:
 - a. nižší napětí při nástřiku / kratší dobu nástřiku,
 - b. nižší množství produktů PCR.
20. Kontaminace vzorků DNA s cDNA nebo PCR amplikony jednotlivých exonů může vést ke zvýšenému signálu sondy. Analýza druhého nezávisle odebraného a izolovaného vzorku DNA může tyto artefakty kontaminace vyloučit.

Bezpečnostní opatření specifická pro aplikaci

Viz popis produktu probemix.

Postup testování, část I – reakce MLPA

Pokyny	Program termocyklieru
1. Denaturace DNA	
1.1 Označte 0,2ml zkumavky/stripy /destičky. 1.2 Do každé zkumavky přidejte 5 µl vzorku DNA nebo TE (kontrola bez DNA). 1.3 Umístěte zkumavky do termocyklieru, zahřívte na 98 °C po dobu 5 minut, ochlaďte na 25 °C.	98 °C po dobu 5 minut pozastavení při teplotě 25 °C
2. Hybridizace	
2.1 Rozmrazte pufr MLPA Buffer a produkt MLPA Probemix, vortexujte a krátce odstředte. Pipetujte při pokojové teplotě. 2.2 Připravte si HYBRIDIZAČNÍ SMĚS MASTER MIX . Pro jednu reakci*: ● MLPA Buffer: 1,5 µl ● MLPA probemix: 1,5 µl Dobře promíchejte vortexováním nebo pipetováním. 2.3 Přidejte 3 µl HYBRIDIZAČNÍ SMĚSI MASTER MIX do každé zkumavky. V tomto kroku je nezbytné přesné pipetování! Promíchejte pipetováním. 2.4 Umístěte zkumavky do termocyklieru, inkubujte při teplotě 95 °C po dobu 1 minuty a hybridizujte při teplotě 60 °C po dobu 16–20 hodin.	95 °C po dobu 1 minuty pozastavení při teplotě 60 °C (16–20 h)
3. Ligace	
3.1 Rozmrazte pufr Ligase Buffer A a Ligase Buffer B, promíchejte vortexováním a krátce odstředte. Pipetujte při pokojové teplotě. Zahřejte roztok Ligase-65 v rukou po dobu 10 sekund. Nevortexujte, pouze krátce stočte. 3.2 Připravte si směs LIGASE-65 MASTER MIX ** . Pro jednu reakci*: ● Ultračistá voda: 25 µl ● Ligase Buffer A: 3 µl ● Ligase Buffer B: 3 µl ● Ligase-65: 1 µl, přidán jako poslední. Dobře promíchejte jemným pipetováním nahoru a dolů, nevortexujte. 3.3 Pokračujte v programu termocyklieru a ochlaďte zkumavky na 54 °C. 3.4 Při teplotě 54 °C otevřete zkumavky v termocyklieru a do každé zkumavky přidejte 32 µl směsi LIGASE-65 MASTER MIX , dobře promíchejte pipetováním, uzavřete zkumavky a pokračujte v inkubaci při teplotě 54 °C po dobu 15 minut. 3.5 Zahřejte na 98 °C a inkubujte po dobu 5 minut, aby se ligáza inaktivovala. Ohlaďte na 20 °C.***	pozastavení při teplotě 54 °C 54 °C po dobu 15 minut 98 °C po dobu 5 minut pozastavení při teplotě 20 °C
4. PCR	
4.1 Rozmrazte směs PCR Primer Mix, vortexujte a krátce stočte. Polymerázu zahřejte v rukou po dobu 10 sekund, nevortexujte, pouze krátce stočte . 4.2 Připravte si polymerázovou směs MASTER MIX . Pro jednu reakci*: ● Ultračistá voda: 7,5 µl ● PCR Primer Mix: 2 µl ● Polymeráza: 0,5 µl Dobře promíchejte pipetováním nahoru a dolů, nevortexujte. 4.3 Při teplotě 20 °C přidejte do každé zkumavky 10 µl polymerázové směsi MASTER MIX , dobře promíchejte pipetováním a ihned pokračujte v programu PCR. 4.4 Abyste zabránili kontaminaci, neotevírejte zkumavky po PCR ve stejné místnosti a pro manipulaci s produkty PCR použijte jinou mikropipetu. 4.5 Produkty PCR skladujte chráněné před světlem při teplotě 4 °C po dobu až 1 týdne anebo v rozmezí teplot –25 °C až –15 °C po delší dobu.	35 cyklů PCR: ● 95 °C po dobu 30 sekund ● 60 °C po dobu 30 sekund ● 72 °C po dobu 60 sekund 72 °C po dobu 20 minut pozastavení při teplotě 15 °C

*Abyste minimalizovali variace vzorků, připravte dostatečně velké objemy roztoků směsi master mix: Přebytek objemu 5–10 %.

**Pokud jsou směsi master mix připraveny předem (ne více než 1 hodinu před použitím), skladujte je na ledu nebo při teplotě 4 °C a před přidáním do zkumavek je zahřejte na pokojovou teplotu.

***Když jsou zkumavky odvezeny do samostatné laboratoře pro PCR, předejte termocyklier pro PCR, např. nastavte na teplotu 95 °C na 1 sekundu a poté pozastavení při 20 °C. Minimalizujte dobu přenosu (např. < 5 min.), vložte zkumavky do termocyklieru a pokračujte krokem 4.1. To minimalizuje tvorbu nespecifických píků.

Postup testování, část II – separace fragmentů

1. Nastavení nástřiku pro běžně používaná zařízení pro kapilární elektroforézu podporovaná v Coffalyser.Net	
Označení PCR primeru: FAM	
ABI SeqStudio	Kapiláry: 28 cm Směs nástřiku: • PCR produkt 0,8 µl • GS500 Size Standard 0,3 µl (ROX/LIZ) • HiDi formamid 12 µl Uzavřete injekční destičku, zahřívejte při teplotě 86 °C po dobu 3 minut, ochlazujte při teplotě 4 °C po dobu 2 minut.
ABI Prism 3100 ABI 3130 (xL) ABI 3500 (xL) ABI 3730 (xL) ABI SeqStudio Flex RUO/Dx	Kapiláry: 36 nebo 50 cm Směs nástřiku: • PCR produkt 0,7 µl • GS500 Size Standard 0,3 µl (ROX) nebo 0,2 µl (LIZ) • HiDi formamid 9 µl
Hitachi DS3000*	Uzavřete injekční destičku, zahřívejte při teplotě 86 °C po dobu 3 minut, ochlazujte při teplotě 4 °C po dobu 2 minut.
Promega Spectrum Compact*	*Pouze 36cm kapiláry.
Označení PCR primeru: Cy5	
SCIEX CEQ 2000 SCIEX CEQ 8000 SCIEX CEQ 8800 SCIEX GenomeLab GeXP	Kapiláry: 33 cm Směs nástřiku: • PCR produkt 1 µl • SS600 Size Standard 0,5 µl • HiDi formamid / Beckman SLS 28,5 µl Přidejte 1 kapku vysoce kvalitního minerálního oleje.
2. Nastavení elektroforézy	
Použijte výchozí nastavení analýzy fragmentů vhodné pro aplikaci, přístroj, polymer a délku kapiláry. Nastavení přístroje může vyžadovat optimalizaci, aby se zajistilo, že signály spadají do optimálního rozsahu detekce a že běh je dostatečně dlouhý k detekci všech fragmentů. Optimální rozsahy signálu (v RFU) a minimální/maximální signály u daného přístroje lze nalézt v Referenční příručce k nástroji Coffalyser.Net .	

Kontrola kvality a analýza dat

Pro kontrolu kvality a analýzu dat by měla být použita nejnovější verze nástroje Coffalyser.Net™ (ke stažení z [webových stránek MRC Holland](#)). Podrobné pokyny naleznete v [Referenční příručce k nástroji Coffalyser.Net](#).

Přečtěte si také tyto články v našem Centru nápovědy:

- [Vysvětlení kontrolních fragmentů pro stanovení množství a denaturaci](#)
- [Informace o kontrolách bez DNA](#)

Další pomoc s řešením problémů naleznete na stránkách s řešením problémů v [Centru nápovědy MRC Holland](#).

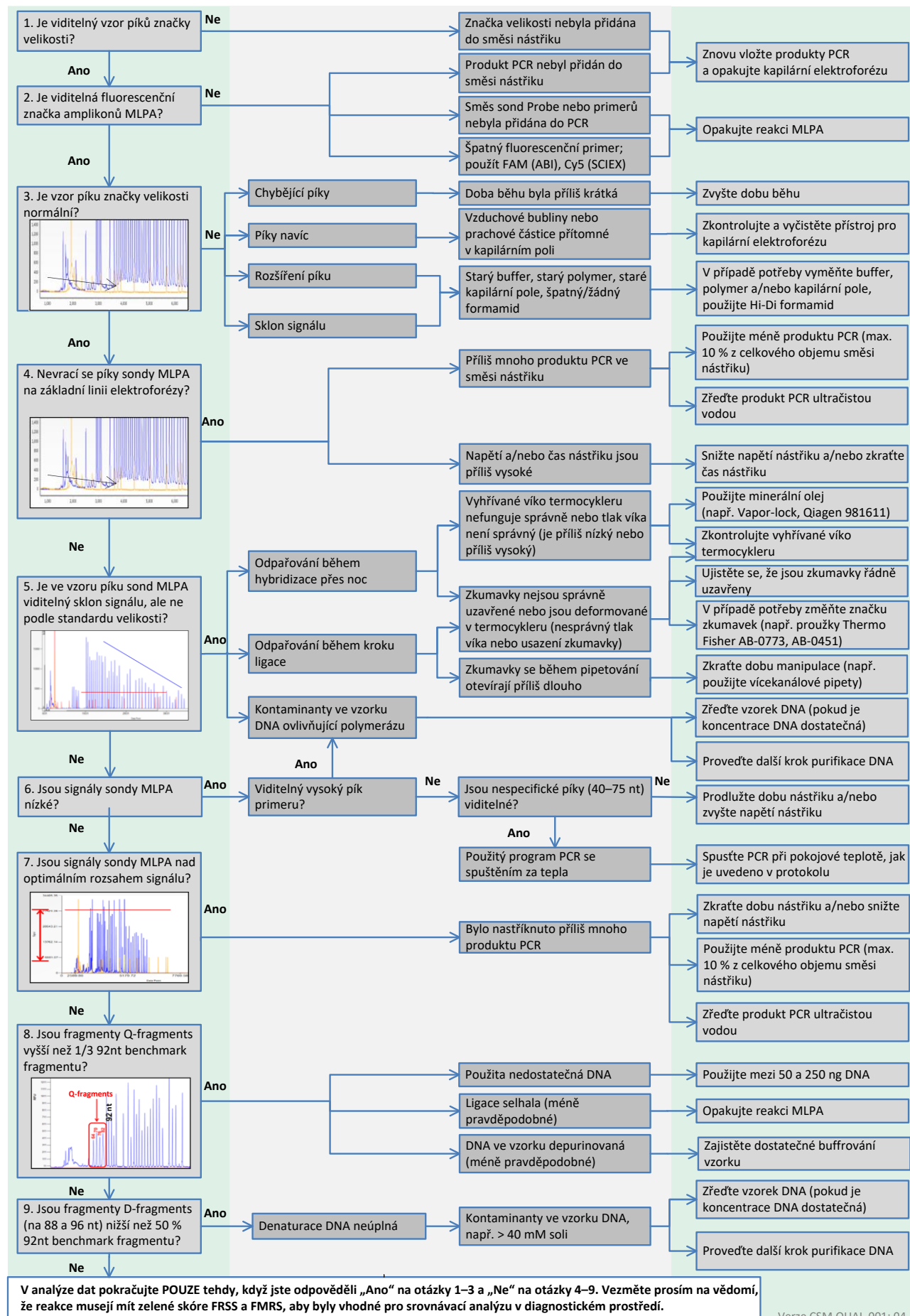
Interpretace a potvrzení výsledků a vlastností z hlediska funkční způsobilosti

Závisí na aplikaci; viz popis produktu probemix.

Omezení

1. Ve většině populací a pro většinu aplikací MLPA jsou hlavní příčinou genetických defektů malé (bodové) mutace, z nichž většinu MLPA neodhalí.
2. MLPA neodhalí většinu inverzí, vyvážených translokací nebo změn počtu kopií, které leží (částečně) mimo sekvenci detekovanou sondou MLPA.
3. Analytický výkon může být ohrožen nečistotami ve vzorku DNA, neúplnou denaturací DNA (např. v důsledku kontaminace solí), použitím nedostatečného nebo příliš velkého množství DNA vzorku, nedostatečnými nebo nevhodnými referenčními vzorky, problémy s kapilární elektroforézou nebo špatným postupem normalizace dat a dalšími technickými chybami.
4. Drobné rozdíly v provedení experimentu mohou ovlivnit vzor píků MLPA. Do analýzy zahrňte pouze vzorky, které a) byly zahrnuty do stejného experimentu MLPA a b) byly testovány se stejnou šarží produktu probemix.
5. V některých případech může být pro správnou interpretaci výsledků nezbytná analýza rodičovských vzorků.
6. Určité aberace počtu kopií mohou být způsobeny somatickými změnami, včetně rozsáhlých delecí a duplikací celých chromozomů.
7. Malé změny (např. SNVs, malé indels) v sekvenci, na kterou je sonda zacílena, mohou způsobit falešně pozitivní výsledky, i když jsou vzdáleny > 20 nt od místa ligace sondy. Sekvenční změny mohou snížit signál sondy zabráněním ligace oligonukleotidů sondy nebo destabilizací vazby oligonukleotidu sondy ke vzorku DNA. Odchyly zjištěné MLPA by měly být potvrzeny a odchyly s jednou sondou vždy vyžadují potvrzení. Doporučuje se sekvenování cílové oblasti.
8. DNA z amplifikačních reakcí celého genomu není vhodná pro MLPA kvůli zkreslení amplifikace.
9. Testy MLPA poskytují *průměrný* počet kopií cílových sekvencí v buňkách, ze kterých byl vzorek DNA extrahován. V případě, že několik sond cílících na sousední sekvence má neobvyklou hodnotu, ale nedosahuje obvyklých prahových hodnot pro delecii/duplikaci, je možnou příčinou mozaicismus. Jemné změny, jako jsou ty pozorované v případech mozaiky, lze rozlišit pouze tehdy, když jsou sondy uspořádány podle umístění chromozomů.
10. Ne všechny změny počtu kopií detekované MLPA jsou patogenní. MRC Holland nemůže poskytnout informace, zda konkrétní delece nebo duplikace bude mít za následek onemocnění.


Vývojový diagram pro řešení problémů



Další podrobnosti

Online instruktážní video [Jak provést reakci MLPA](#).

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

Další informace	
www.mrcholland.com ; support.mrcholland.com	
	MRC Holland BV; Willem Schoutenstraat 1 1057 DL, Amsterdam, Nizozemsko
E-mail	info@mrcholland.com (informace a technické otázky); order@mrcholland.com (objednávky)
Telefon	+31 888 657 200

MRC Holland, SALSA, MLPA, digitalMLPA, Coffalyser.Net, Coffalyser digitalMLPA a jejich loga jsou ochranné známky nebo registrované ochranné známky společnosti MRC Holland BV. Všechny ostatní zde uvedené značky a názvy jsou majetkem jejich příslušných vlastníků.



Provedené změny v protokolu
<p>Verze 010-CS1 – 21. května 2025</p> <ul style="list-style-type: none"> - ABI SeqStudio Flex přejmenováno na ABI SeqStudio Flex RUO/Dx na straně 4. <p>Verze 009-CS1 – 21. května 2024</p> <ul style="list-style-type: none"> - Protokol dostal novou strukturu a nový design. - Tabulky v komponentách testu MLPA SALSA byly nahrazeny odkazy na popisy komponent produktů. - Část o standardních štítcích na obalech byla odstraněna. - Část o principu MLPA přepsána a byl vylepšen obrázek pracovního postupu. Obrázek o výpočtech byl odstraněn. - Část „Požadované, ale neposkytované materiály“ byla aktualizována. - Informace v části „Zpracování a skladování vzorků“ byla přeuspořádána. Tato část je nyní kratší a nese název „Požadavky na vzorky“. Některé informace byly přesunuty do části „Preventivní opatření a výstrahy“. - Část „Výběr referenčních a jiných kontrolních vzorků“ byla odstraněna, protože tyto informace jsou také uvedeny v popisech produktů. - Informace v kapitole 3 „Poznámky, které je třeba si přečíst před zahájením“ byly přesunuty do části I zkušební postupu. - Informace v kapitole 5 a 6 (Zkrácený protokol MLPA a Protokol MLPA) spojené v části I zkušební postupu v novém tabulkovém formátu. - Pokyn k vyjmutí zkumavek z termocykleru po denaturaci a jejich umístění zpět po přidání hybridizační směsi master mix byl odstraněn. - Pokyn k umístění zkumavek do termocykleru před přidáním polymerázové směsi master mix byl odstraněn, protože neexistuje žádný předchozí pokyn k jejich vyjmutí. - Do části I zkušební postupu byla přidána poznámka pod čarou s pokyny pro situaci, kdy jsou zkumavky odneseny do samostatné laboratoře pro PCR. - Informace v části 7.1. „Poznámky, které je třeba si přečíst před zahájením,“ se přesunuly do části Preventivní opatření a výstrahy. - Tabulka o rozsahu signálů v přístrojích pro kapilární elektroforézu v části 7.2. byla nahrazena odkazem na odpovídající tabulku v Referenční příručce k nástroji Coffalyser.Net. - Informace v kapitole 8 (kontrola kvality a řešení problémů) byly nahrazeny odkazy na Referenční příručku k nástroji Coffalyser.Net a články znalostní báze o kontrolních fragmentech a kontrolách bez DNA. - Kapitola 9 (Analýza dat) byla nahrazena pokyny ke stažení nástroje Coffalyser.Net a prostudování Referenční příručky k nástroji Coffalyser.Net. - Informace v kapitole 10 (Interpretace a potvrzení) byly buď přesunuty do části „Preventivní opatření a výstrahy“, do části „Omezení“ nebo byly odstraněny, protože jsou specifické pro určité aplikace.