

MS-MLPA általános protokoll

Szükséges komponensek

Név	Katalógusszámok	Összetevők
SALSA® MLPA® probemix	lásd a probemix termékleírását	szintetikus oligonukleotidok, nem patogén baktériumtörzs alkalmazásával szintetizált oligonukleotidok, Tris- HCl és EDTA



A következőkkel használható együtt:

- [SALSA® MLPA® Reagent Kit](#) (katalógusszám: EK1-FAM, EK1-CY5, EK5-FAM, EK5-CY5, EK20-FAM)
- [SALSA® Hhal](#) (katalógusszám: SMR50)
- [Coffalyser.Net™ adatelemző szoftver](#) (katalógusszám: n.a.)

Bizonyos alkalmazásokhoz a következőkkel használható együtt:

Név	Katalógusszámok	Összetevők
SALSA® Binning/Reference Selection DNA	SDXXX	Tris-HCl, EDTA, szintetikus/kontroll plazmid-DNS, humán genomiális női DNS, sejtvonala DNS

A komponensek tárolása és eltarthatósága

Ajánlott körülmények		
----------------------	--	--

Az eredeti csomagolásban, az ajánlott körülmények között tárolva a lejárat dátumig garantált az eltarthatóság, felbontás után is. A pontos lejárat dátumot lásd a csövek címkéjén. A termékeket legfeljebb 25 fagyasztási-felolvasztási ciklusnak szabad kitenni. Ne használja a termékeket, ha a csomagolás sérült vagy megérkezésekor már felbontott. Hagyja a termékeket az eredeti tartályokban. A hulladékanyagot a nemzeti és helyi előírásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.

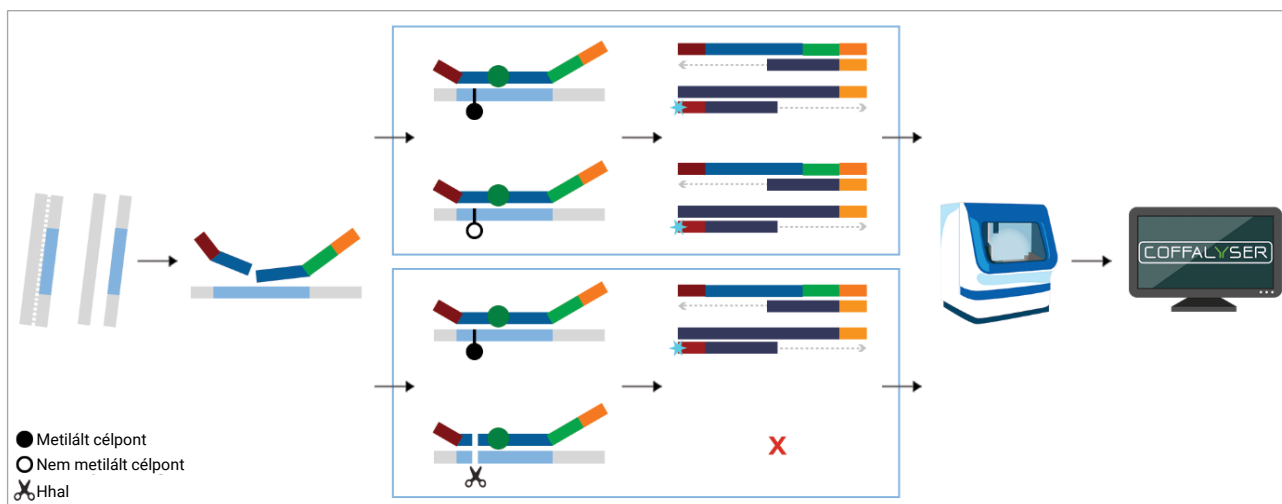
A komponensek biztonságossága

Az összetevők egyike sem származik emberből, állatból, kórokozó baktériumból vagy kórokozó vírusból. A jelen lévő koncentrációk alapján egyik összetevő sem veszélyes a Veszélykommunikációs szabvány (Hazard Communication Standard) meghatározása szerint. [Biztonsági adatlap \(SDS\) nem szükséges](#) ezeknél a termékeknél: egyik készítmény sem tartalmaz veszélyes anyagokat az SDS kiadását igénylő koncentrációkban (az 1272/2008/EK rendelet [EU-GHS/CLP], valamint az 1907/2006/EK rendelet [REACH] és módosításai szerint). Ha kiömlik, vízzel takarítsa fel, és kövesse a megfelelő helyszíni eljárásokat.

A vizsgálat elve (MS-MLPA)

A metilációs-specifikus MLPA (MS-MLPA) a meghatározott DNS-szekvenciákat kimutató, legfeljebb 60 próba amplifikációján alapuló félkvantitatív technika. A technika a minta DNS denaturálásával kezdődik (lásd az 1. ábrát alább). Ezt követően az MLPA-próbák keverékét adjuk hozzá, ahol mindegyik próba két vagy három oligonukleotidból áll. Amikor az összes oligonukleotid minta DNS-sel történő hibridizációja befejeződött, a keveréket két csőre kell osztani.

A próbák mindkét csőben ligáláson esnek át, de a második keverék Hhal-gyel is kezelve lesz, ami a nem metilált célponthoz hibridizálódó próbák emésztését eredményezi. Ezt követően az összes ligált próba egy időben egy univerzális PCR-primerpár alkalmazásával amplifikálódik, amelyek közül az egyik fluoreszcensen jelölt. Ez egy sor PCR-amplikont eredményez, amelyek mindegyike adott próbára jellemző egyedi hosszúságú. Az amplikonok ezután egy kapilláris-elektroforézis készüléken hosszuk szerint szétválasztásra kerülnek. A kapott mintaspecifikus elektroferogramokat a Coffalyser.Net segítségével elemezzük. Az emésztett és nem emésztett minták adatainak a hasonlóan kezelt referenciamintákkal történő összehasonlítása a célszekvenciák metilációs állapotában bekövetkezett változásokat mutatja.



1 ábra. MS-MLPA munkafolyamat

Szükséges, de nem biztosított anyagok

- Ultratiszta víz;
- TE_{0,1} (10 mM Tris-HCl [pH 8,0] + 0,1 mM EDTA);
- kalibrált thermocycler berendezés fűtött fedéllel (99–105 °C) és szabványos laboratóriumi felszerelés;
- 0,2 ml-es PCR-csővek/-csősorok/-lemezek;
- kapilláris-elektroforézis készülék, amely denaturáló körülmények között működik és fragmentumelemző szoftverrel rendelkezik; további részleteket lásd a [Súgó ezen cikkében](#);
- kiváló minőségű formamid;
- jelölt méretstandard: Applied Biosystems GeneScan™ 500 LIZ®/ROX™; SCIEX CEQ™ DNA Size Standard kit – 600;
- gél polimer: POP-1, POP-4 vagy POP-7 (Applied Biosystems); GenomeLab™ Linear Polyacrylamide denaturing gel (SCIEX); Spectrum Compact Polymer4 (Promega); Hitachi DS3000 Polymer4 (Hitachi).

A mintára vonatkozó követelmények

A probemix termékleírásában feltüntetett szövetből kivont 50–250 ng humán DNS (hacsak nincs másképpen megadva). A DNS-mintáknak 5–10 mM Tris-HCl puffert kell tartalmazniuk, pH = 8,0–8,5 érték mellett.

Ajánlott extrakciós módszerek:

- QIAGEN Autopure LS (automatizált) és QIAamp DNA mini/midi/maxi kit (manuális);
- Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (manuális);
- Kisózás (manuális)

Óvintézkedések és figyelmeztetések

Általános óvintézkedések

1. Ne használja a terméket, ha az sérült vagy lejárt.
2. Kizárólag szakember által történő alkalmazásra. A vizsgálatot molekuláris technikákban képzett szakembereknek kell elvégezniük.
3. Minden vizsgálat belső validálására szükség van, különösen az első alkalmazáskor, illetve a mintakezelési eljárás, a DNS-kivonási módszer vagy az alkalmazott készülékek megváltoztatásakor. Használjon egészséges egyénektől származó, ≥ 16 különböző DNS-mintát. A validálásnak $\leq 0,10$ -os értékű szórást kell mutatnia minden próbánál, hacsak a probemix termékleírásában másként nem szerepel.
4. Az eredmények értelmezéséért felelős személynek tisztában kell lennie az alkalmazással kapcsolatos legújabb tudományos ismeretekkel és az MLPA technika minden olyan korlátjával, amely helytelen eredményekhez vezethet.
5. Az adatok elemzéséhez a Coffalyser.Net használandó. Más szoftver alkalmazása téves eredményekhez vezethet.
6. Az eredmények értelmezése előtt mindig ellenőrizze a minőség-ellenőrzési pontszámokat. Kizárólag a jó minőségi pontszámú minták eredményei értelmezhetőek megbízhatóan.
7. A látszólagos homozigóta deléciókat meg kell erősíteni az elektroferogram vizuális vizsgálatával annak érdekében, hogy kizárják az átlagolási (binning) problémák vagy az alacsony jelek okozta hamis eredményeket.
8. Az MLPA-eredményeket más klinikai és diagnosztikai leletekkel történő együttes felhasználásra szánják, összhangban a szakmai gyakorlati standardokkal, beleértve adott esetben az alternatív módszerekkel történő megerősítést, a szülői értékelést, a klinikai genetikai értékelést és a tanácsadást. A vizsgálatok eredményeit klinikai molekuláris genetikusnak vagy azzal egyenértékű szakembernek kell értelmeznie.

A minta minőségére vonatkozó óvintézkedések

9. A minta DNS elégtelen pufferkapacitása által okozott DNS-depurináció hamis eredményekhez vezethet. Ha nem ismert, hogy elegendő puffer van-e jelen, adjon hozzá Tris-HCl-t: 4 μ l minta DNS + 1 μ l 50 mM Tris-HCl (pH = 8,5).
10. A DNS-extrakció után megmaradt szennyeződések, beleértve a sókat, a heparint, az EDTA-t ($> 1,5$ mM) és a vasat, befolyásolhatják a vizsgálat teljesítményét.
11. A DNS-mintákban lévő só elégtelen denaturációt okozhat. Ez látszólagos deléciókat eredményezhet, akár több, szomszédos genomikai célpontot felismerő próbánál is. Ne használjon QIAGEN M6, M48 és M96 rendszereket; ezek túl sok sót hagynak maguk után. QIAGEN EZ1 esetén használja az MLPA-ra vonatkozó [QIAGEN kiegészítő protokollt](#).
12. Ne koncentrálja a DNS-t bepárlással vagy SpeedVac eszközzel; ez magas EDTA- és sókoncentrációhoz vezet.

Óvintézkedések a végrehajtás során

13. Soha ne használjon 5 μ l DNS-oldatnál többet reakciónként. A szükséges DNS mennyiségét a probemix termékleírása határozza meg.
14. Ne keverje össze az MLPA probemix különböző gyártási tételeit.
15. A szennyezőanyagok és a só koncentrációját növelő párologás előfordulhat az éjszaka folyamán történő hibridizáció során vagy a ligációs mastermix pipettázásakor. A párologás megelőzése/csökkentése érdekében:
 - a. használjon többcsatornás pipettát a kezelési idő csökkentésére;
 - b. győződjön meg a fűtött fedél megfelelő működéséről;
 - c. növelje vagy csökkentse a fűtött fedél nyomását;
 - d. próbáljon különböző reakciócsöveket használni;
 - e. tegyen egy kis csepp ásványi olajat a DNS-minta tetejére a folyadék felületének befedésére.
16. Rendszeresen cserélje ki a kapillárisokat és a polimert. A polimer gyorsan tönkremegy, ha hosszabb ideig tartják > 25 °C hőmérsékleten. Ha a méretstandardok csúcsai ismételt alacsonyok és szélesek, akkor lehetséges, hogy a kapillárisok vagy a polimer minősége leromlott.
17. A formamid savassá válhat, ami a PCR-termékek depurinációját és fragmentálódását okozhatja melegítés hatására. Használjon kiváló minőségű formamidot, és tárolja alikotokban -20 °C-on.
18. A PCR-termék térfogata soha nem haladhatja meg a teljes befecskendezett keverék 10%-át. Ha a csúcsok alacsonyok, növelje a befecskendezési időt és/vagy a feszültséget – ne adjon a keverékhez több PCR-terméket.
19. Hamis eredményeket kaphatunk, ha egy vagy több csúcs a skálán kívül található. A skálán kívüli csúcsok kockázata nagyobb a viszonylag kevés próbát tartalmazó probemix alkalmazásakor. A jel csökkentése érdekében futtassa újra a PCR-termékeket a következők alkalmazásával:
 - a. alacsonyabb befecskendezési feszültség/rövidebb befecskendezési idő;
 - b. csökkentett mennyiségű PCR-termékek.
20. A DNS-minták cDNS-sel vagy egyedi exonok PCR-amplikonjaival való szennyeződése megnövekedett próbajelhez vezethet. Egy második, függetlenül gyűjtött és izolált DNS-minta elemzése kizárhatja ezeket a szennyeződésből eredő műtermékeket.
21. A SALSA® Hhal enzimet minden metilációspecifikus MLPA (MS-MLPA) kísérletben használni kell. Számos „Hhal” néven árult enzim ellenáll a hőinaktiválásnak, és NEM kompatibilis az MS-MLPA-val. Ide tartoznak többek között a Thermo Fisher Scientific Hhal, ANZA 59 Hhal és FastDigest Hhal enzimeit.

Alkalmazáspecifikus óvintézkedések

Lásd a probemix termékleírását.

Vizsgálati eljárás I. rész – MS-MLPA reakció

Utasítás	A termocikler program			
1. DNS-denaturáció				
1.1 Címkézzzen fel 0,2 ml-es csöveket/csősorokat/lemezeket.	98 °C-on 5 percig			
1.2 Adjón 5 µl DNS-mintát vagy TE-t (DNS-t nem tartalmazó kontroll) minden csőhöz.				
1.3 Helyezze a csöveket thermocyclerbe, melegítse 98 °C-on 5 percig, majd hűtse le 25 °C-ra.	25 °C-on pihentetés			
2. Hibridizáció				
2.1 Olvassa fel az MLPA Buffert és az MLPA Probemixet, majd rövid ideig vortexelje és centrifugálja. Ha szobahőmérsékletre melegedtek, akkor pipettázzon.	95 °C-on 1 percig			
2.2 Készítse elő a [HYBRIDISATION MASTERMIXET]. Egy reakcióhoz szükséges*: <ul style="list-style-type: none"> ● MLPA Buffer: 1,5 µl ● MLPA probemix: 1,5 µl Vortexeléssel vagy pipettával alaposan keverje össze.	60 °C-on pihentetés (16–20 óra)			
2.3 Adjón hozzá 3 µl [HYBRIDISATION MASTERMIXET] minden csőhöz. Ennél a lépésnél elengedhetetlen a pontos pipettázás! Pipettázással keverje össze.				
2.4 Inkubálja 95 °C-on 1 percig, és hibridizálja 60 °C-on 16–20 órán át.				
3. Ligáció és ligáció/emésztés				
3.1 Olvassa fel a Ligase Buffer A-t és a Ligase Buffer B-t, rövid ideig vortexelje és centrifugálja. Ha szobahőmérsékletre melegedtek, akkor pipettázzon. Melegítse a Ligase-65-öt és Hhal-et a kezében 10 másodpercig. Ne vortexelje, csak röviden centrifugálja.	20 °C-on pihentetés			
3.2 Készítse elő a nastermixeket. Egy reakcióhoz szükséges*: <table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> <p>[LIGASE BUFFER A MASTERMIX]</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Ultratiszta víz: 10 µl ○ Ligase Buffer A: 3 µl </td> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> <p>[LIGASE-65 MASTERMIX]**:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Ultratiszta víz: 8,25 µl ○ Ligase Buffer B: 1,5 µl ● Ligase-65: 0,25 µl, utoljára hozzáadva. </td> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> <p>[LIGASE-DIGESTION MASTERMIX]**:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Ultratiszta víz: 7,75 µl ○ Ligase Buffer B: 1,5 µl ● Ligase-65: 0,25 µl ● SALSA Hhal: 0,5 µl, utoljára hozzáadva. </td> </tr> </table>	<p>[LIGASE BUFFER A MASTERMIX]</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Ultratiszta víz: 10 µl ○ Ligase Buffer A: 3 µl 	<p>[LIGASE-65 MASTERMIX]**:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Ultratiszta víz: 8,25 µl ○ Ligase Buffer B: 1,5 µl ● Ligase-65: 0,25 µl, utoljára hozzáadva. 	<p>[LIGASE-DIGESTION MASTERMIX]**:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Ultratiszta víz: 7,75 µl ○ Ligase Buffer B: 1,5 µl ● Ligase-65: 0,25 µl ● SALSA Hhal: 0,5 µl, utoljára hozzáadva. 	48 °C-on 30 percig
<p>[LIGASE BUFFER A MASTERMIX]</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Ultratiszta víz: 10 µl ○ Ligase Buffer A: 3 µl 	<p>[LIGASE-65 MASTERMIX]**:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Ultratiszta víz: 8,25 µl ○ Ligase Buffer B: 1,5 µl ● Ligase-65: 0,25 µl, utoljára hozzáadva. 	<p>[LIGASE-DIGESTION MASTERMIX]**:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Ultratiszta víz: 7,75 µl ○ Ligase Buffer B: 1,5 µl ● Ligase-65: 0,25 µl ● SALSA Hhal: 0,5 µl, utoljára hozzáadva. 		
Óvatosan fel-le pipettázva keverje alaposan össze, ne vortexelje.	98 °C-on 5 percig			
3.3 Folytassa a thermocycler programot, és hűtse le a csöveket 20 °C-ra.	20 °C-on pihentetés			
3.4 Adjón hozzá 13 µl [LIGASE BUFFER A MASTERMIXET] minden csőhöz. Óvatosan fel-le pipettázva keverje alaposan össze.				
3.5 Helyezzen be egy második készlet csövet a thermocyclerbe, vigyen át 10 µl keveréket minden csőből egy másik csőbe, és folytassa a programot 48 °C-ra melegítéssel.				
3.6 48 °C-nál nyissa ki a csöveket a thermocyclerben , adjon hozzá 10 µl [LIGASE-65 MASTERMIXET] mindegyik eredeti csőhöz, pipettázással alaposan keverje össze, majd zárja le a csöveket.				
3.7 Adjón hozzá 10 µl [LIGASE-DIGESTION MASTERMIXET] az összes második csőhöz, majd jól keverje össze pipettával.				
3.8 Zárja le a csöveket, és folytassa az inkubálást 48 °C-on 30 percig.				
3.9 A ligáz inaktíválása érdekében melegítse fel 98 °C-ra, és inkubálja 5 percig, majd hűtse le 20 °C-ra.***				
4. PCR				
4.1 Olvassa fel a PCR Primer Mixet, röviden vortexelje és centrifugálja. Melegítse a polimerázát a kezében 10 másodpercig, ne vortexelje, csak röviden centrifugálja.	35 PCR-ciklus:			
4.2 Készítse elő a [POLYMERASE MASTERMIXET]. Egy reakciópárhoz*: <ul style="list-style-type: none"> ● Ultratiszta víz: 7,5 µl ● PCR Primer mix: 2 µl ● Polimeráz: 0,5 µl Fel-le pipettázva alaposan keverje össze, ne vortexelje.	<ul style="list-style-type: none"> ● 95 °C-on 30 másodpercig ● 60 °C-on 30 másodpercig ● 72 °C-on 60 másodpercig 			
4.3 20 °C-on minden csőhöz adjon hozzá 5 µl [POLYMERASE MASTERMIXET], pipettával alaposan keverje össze, de ne vortexelje, és azonnal folytassa a PCR-programot.	72 °C-on 20 percig			
4.4 A PCR után a szennyeződés elkerülése érdekében ne nyissa ki a csöveket ugyanabban a helyiségben, és használjon másik mikropipettát a PCR-termékek kezelésére.	15 °C-on pihentetés			
4.5 A PCR-termékeket fénytől védve 4 °C-on legfeljebb 1 hétig tárolja, vagy –25 °C és –15 °C között hosszabb ideig.				

* A mintaelterések minimalizálása érdekében készítsen elő kellően nagy mennyiségű mastermix oldatot: 5–10% térfogattöbblet.

** Ha előre elkészíti a master mixeket (legfeljebb 1 órával a felhasználás előtt), tárolja jégen vagy 4 °C-on, és melegítse fel szobahőmérsékletre, mielőtt a csövekhez adná.

*** Amikor a csöveket külön laborba viszik a PCR-hez, melegítse elő a thermocyclert a PCR-hez, például állítsa 95 °C-ra 1 másodpercre, majd pihentesse 20 °C-on. Minimalizálja az átviteli időt (pl. < 5 perc), helyezze a csöveket a thermocyclerbe, és folytassa a 4.1 lépéssel. Ez minimalizálja a nem specifikus csúcsok kialakulását.

Vizsgálati eljárás, II. rész – Fragmentumok szétválasztása

1. A Coffalyser.Net által támogatott, gyakran használt kapilláris-elektroforézis eszközök befecskendezési beállításai	
PCR-primer címkéje: FAM	
ABI SeqStudio	Kapillárisok: 28 cm Befecskendezett keverék: <ul style="list-style-type: none"> • PCR-termék, 0,8 µl • GS500 Size Standard, 0,3 µl (ROX/LIZ) • HiDi formamid, 12 µl Zárja le az injektáló lemezt, melegítse 86 °C-on 3 percig, majd hűtse 4 °C-on 2 percig.
ABI Prism 3100 ABI 3130 (xL) ABI 3500 (xL) ABI 3730 (xL) ABI SeqStudio Flex RUO/Dx	Kapillárisok: 36 vagy 50 cm Befecskendezett keverék: <ul style="list-style-type: none"> • PCR-termék, 0,7 µl • GS500 Size Standard, 0,3 µl (ROX) vagy 0,2 µl (LIZ) • HiDi formamid, 9 µl Zárja le az injektáló lemezt, melegítse 86 °C-on 3 percig, majd hűtse 4 °C-on 2 percig.
Hitachi DS3000*	
Promega Spectrum Compact*	* Kizárólag 36 cm-es kapillárisok.
PCR-primer címkéje: Cy5	
SCIEX CEQ 2000 SCIEX CEQ 8000 SCIEX CEQ 8800 SCIEX GenomeLab GeXP	Kapillárisok: 33 cm Befecskendezett keverék: <ul style="list-style-type: none"> • PCR-termék, 1 µl • SS600 Size Standard, 0,5 µl • HiDi formamid/Beckman SLS, 28,5 µl Adjon hozzá 1 csepp kiváló minőségű ásványi olajat.
2. Az elektroforézis beállításai	
Használja az alkalmazásnak, a műszernek, a polimernek és a kapilláris hosszának megfelelő alapértelmezett fragmentumelemzési beállításokat. Előfordulhat, hogy a készülékbeállítások optimalizálást igényelnek annak biztosítására, hogy a jelek az optimális érzékelési tartományon belülre essenek, és a futtatás elég hosszú legyen az összes fragmentum észleléséhez. Az optimális jeltartományok (RFU-ban) és a készülékenkénti minimális/maximális jelek a Coffalyser.Net Referencia kézikönyvében találhatóak meg.	

Minőség-ellenőrzés és adatelemzés



A Coffalyser.Net™ legújabb verziója (letölthető az [MRC Holland weboldaláról](#)) használható minőség-ellenőrzésre és adatelemzésre. A részletes útmutatókért lásd a [Coffalyser.Net Referencia kézikönyvét](#).

Tekintse meg ezeket a cikkeket is a Súlyóban:

- [Explanation about Quantity and Denaturation control fragments \(Magyarázat a mennyiségi és denaturációs kontrollfragmentumokról\)](#)
- [Information on no-DNA controls \(Információk a DNS-mentes kontrollokról\)](#)

Ha további segítségre van szüksége a hibaelhárításhoz, keresse fel a hibaelhárítási oldalakat az [MRC Holland Súlyó](#) felületén.

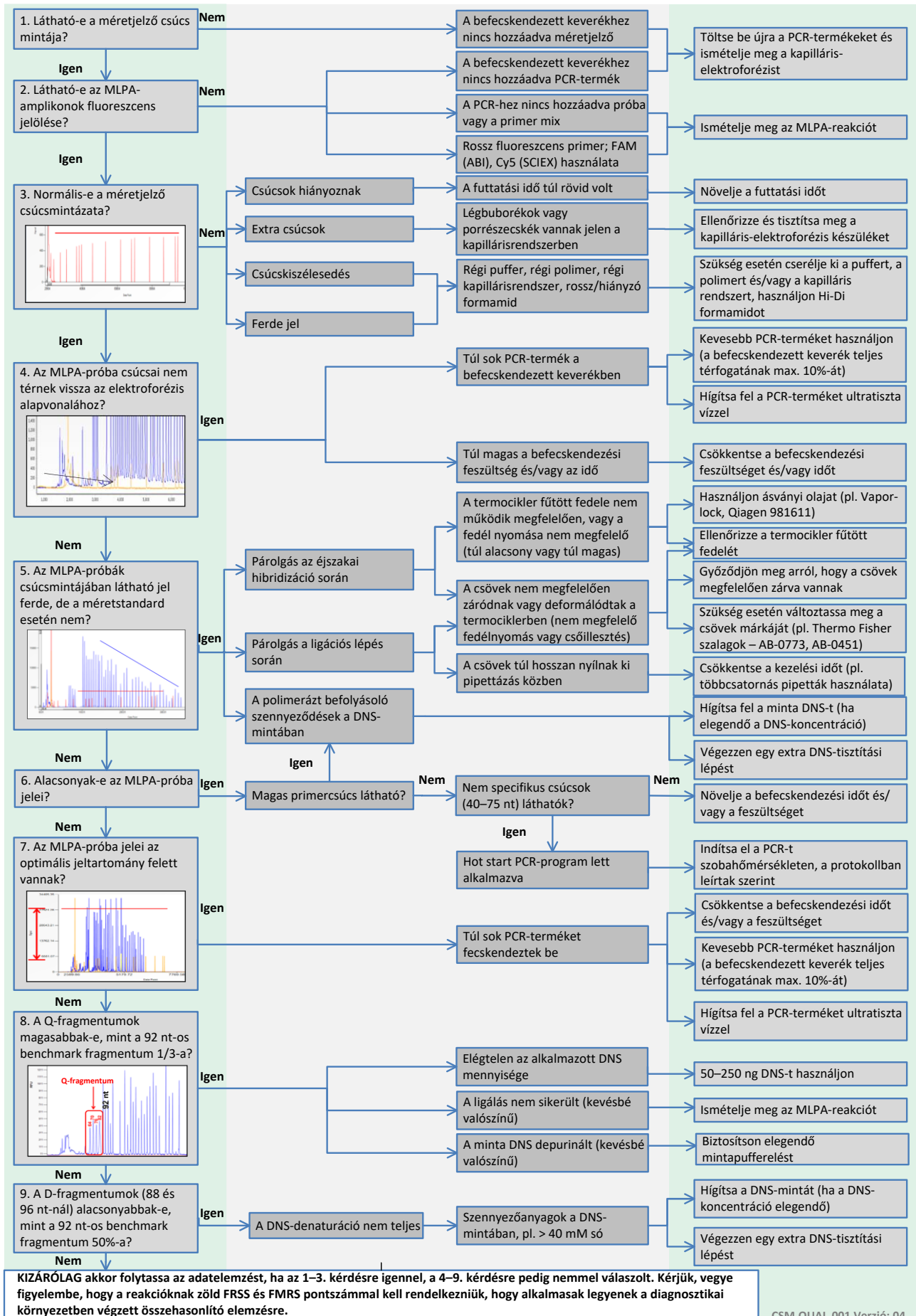
Eredmények és teljesítményjellemzők értelmezése és megerősítése

Alkalmazásfüggő; lásd a probemix termékleírását.

Korlátozások

1. A legtöbb populációban és a legtöbb MLPA-alkalmazás esetében a genetikai rendellenességek fő okozói kis mutációk (pontmutációk), amelyek többségét az MLPA nem fogja kimutatni.
2. Az MLPA nem érzékeli a legtöbb inverziót, kiegyensúlyozott transzlokációt vagy kópiaszám-változást, amelyek (részben) kívül esnek az MLPA-próba által észlelt szekvencián.
3. Az analitikai teljesítményt ronthatják a DNS-mintában lévő szennyeződések, a DNS nem teljes denaturációja (pl. sószennyeződés miatt), a nem elegendő vagy túl sok DNS-minta használata, az elégtelen vagy nem megfelelő referenciaminták, problémák a kapilláris-elektroforézis során, vagy az adatok rossz normalizálási eljárása, illetve egyéb műszaki hibák.
4. A kísérletes munka során előforduló kisebb eltérések hatással lehetnek az MLPA csúcsmintázatára. Kizárólag azokat a mintákat vegye bele az elemzésbe, amelyek a) ugyanabban az MLPA-kísérletben szerepeltek, és b) ugyanazzal a tételszámú probemix használatával vizsgálták őket.
5. Bizonyos esetekben az eredmények helyes értelmezéséhez szükség lehet a szülői minták elemzésére.
6. Bizonyos kópiaszám-rendellenességek szomatikus elváltozások miatt következhetnek be, beleértve a teljes kromoszómák nagy delécióit és duplikációit.
7. A próba által megcélzott szekvenciában lévő kis változások (pl. egynukleotidos variációk [SNV-k], kis indelek) téves pozitív eredményeket okozhatnak, még abban az esetben is, ha > 20 nt távolságra vannak a próba ligálási helyétől. A szekvenciaváltozások csökkenthetik a próba jelét azáltal, hogy megakadályozzák a próba oligonukleotidjainak ligálását, vagy destabilizálják a próba oligonukleotidjának kötődését a minta DNS-hez. A Hhal helyén belüli szekvenciaváltozások megzavarhatják a Hhal emésztését, és álpozitív metilációs jelet eredményezhetnek. Az MLPA által észlelt eltéréseket meg kell erősíteni, valamint az egyetlen próba által mutatott eltérések mindig megerősítést igényelnek. A célrégio szekvenálása javasolt.
8. A teljes genom amplifikációs reakciókból származó DNS nem alkalmas MS-MLPA-ra az amplifikációs torzítás és a metilációs mintázat eltávoztása miatt.
9. Az MLPA tesztek a célszekvenciák *átlagos* kópiaszámát és a metilációs állapotát adják meg azokban a sejtekben, amelyekből a DNS-mintát kivonták. Abban az esetben, ha több szomszédos szekvenciát célzó próba szokatlan értékkel rendelkezik, de nem éri el a deléció/duplikáció szokásos küszöbértékeit, annak a mozaikosság lehet az oka. A finom változások, mint amilyeneket mozaikos esetekben figyeltek meg, csak akkor különböztethetők meg, ha a próbákat kromoszomális elhelyezkedésük szerint csoportosítják.
10. Nem minden, az MLPA által észlelt kópiaszám- és metilációs változás patogén. Az MRC Holland nem tud tájékoztatást adni arról, hogy egy adott deléció vagy duplikáció vagy abnormális metiláció betegséget eredményez-e.
11. A biszulfittal kezelt DNS-minták nem alkalmasak MS-MLPA reakciókra.
12. A legtöbb MS-MLPA próba egyetlen Hhal-hely (GC^mGC) metilációját észleli a próba által detektált szekvencián belül. Ha ezen a CpG-helyen hiányzik a metiláció, az nem feltétlenül jelenti azt, hogy az egész CpG-sziget metilálatlan! Nincsenek arra utaló adatok, hogy egy adott próba által kimutatott metiláció valóban befolyásolja az adott gén mRNS-szintjét.

Hibaelhárítási folyamatábra




CSM.QUAL-001 Verzió: 04.

További részletek

Online oktató videó [How to perform an MLPA reaction \(Hogyan hajtsunk végre egy MLPA-reakciót?\)](#).

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

Nygren AO et al. (2005). Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res.* 33:e128.

További információk	
www.mrcholland.com ; support.mrcholland.com	
	MRC Holland BV; Willem Schoutenstraat 1 1057 DL, Amszterdam, Hollandia
E-mail	info@mrcholland.com (információs és műszaki kérdések); order@mrcholland.com (megrendelések)
Telefon	+31 888 657 200

Az MRC Holland, SALSA, MLPA, digitalMLPA, Coffalyser.Net, Coffalyser digitalMLPA és logóik az MRC Holland BV védjegyei vagy bejegyzett védjegyei. Az itt található összes többi márka és név a megfelelő tulajdonosok tulajdona.



A protokollban végrehajtott változtatások
<p>014-HU1-es verzió – 2025. május 21.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Az ABI SeqStudio Flex átnevezve ABI SeqStudio Flex RUO/Dx-re a 4. oldalon. <p>013-HU1-es verzió – 2024. június 20.</p> <ul style="list-style-type: none"> - A dokumentum korábbi verziói csak angol nyelven érhetőek el. - A protokoll új felépítést és új dizájnt kapott. - A SALSA MLPA vizsgálati összetevők táblázatait az összetevők termékleírásaira való hivatkozásokkal helyettesítették. - A kiegészítő PCR-reagens-készletről szóló rész eltávolítva. - A szabványos csomagolási címkékre vonatkozó rész el lett távolítva. - Az MS-MLPA-elvről szóló rész átírásra került és a munkafolyamat ábrája javítva lett. A számításokról szóló ábra el lett távolítva. - A szükséges, de nem biztosított anyagok rész frissítésre került. - A mintakezelés és -tárolás részben található információk átalakításra kerültek. Ez a rész lerövidült, új neve: A mintára vonatkozó követelmények. Néhány információ átkerült az Óvintézkedések és figyelmeztetések közé. - A referencia- és egyéb kontrollminták kiválasztása rész el lett távolítva, mivel ezek az információk a termékleírásokban is megtalálhatók. - A 3. Megjegyzések című fejezetben található információk, amelyeket a kezdés előtt el kell olvasni, átkerültek a Vizsgálati eljárás I. részébe. - Az 5. és 6. fejezetben található információk (az MS-MLPA protokoll röviden és az MS-MLPA protokoll) a Vizsgálati eljárás I. részében egy új formátumú táblázatban lettek egyesítve. - A csövek termociklerből történő, denaturációt követő eltávolítására és a Hybridisation mastermix hozzáadása utáni visszahelyezésére vonatkozó utasítások eltávolításra kerültek. - A csövek termociklerből történő, hibridizációt követő eltávolítására és a Ligase-65 és Ligase-Digestion mastermix hozzáadása utáni visszahelyezésére vonatkozó utasítások eltávolításra kerültek. - A Polymerase mastermix hozzáadása előtt a csövek termociklerbe történő elhelyezésére vonatkozó utasítás el lett távolítva, mert nincs korábbi utasítás az eltávolításukra. - Utasítás hozzáadva arra vonatkozóan, hogy a Polymerase mastermix hozzáadása után ne vortexeljék a csöveket. - A vizsgálati eljárás I. részéhez lábjegyzetet adtak hozzá, amely útmutatást ad arra a helyzetre, amikor a csöveket külön laboratóriumba viszik a PCR-hez. - Információk a 7.1 részben. A kezdés előtt elolvasandó megjegyzések átkerültek az Óvintézkedések és figyelmeztetések részhez. - A 7.2 fejezetben található, a kapilláris-elektroforézis készülékek jeltartományairól szóló táblázatot a Coffalyser.Net Referencia kézikönyv megfelelő táblázatára való hivatkozással cserélték ki. - A 8. fejezetben (Minőség-ellenőrzés és hibaelhárítás) szereplő információk helyébe a Coffalyser.Net Referencia kézikönyvre és a kontrollfragmentumokról, valamint a DNS nélküli kontrollokról szóló tudásbáziscikkekre való hivatkozások kerültek. - A 9. fejezet (Adatelemzés) helyébe a Coffalyser.Net letöltésére és a Coffalyser.Net Referencia kézikönyv elolvasására vonatkozó utasítás került. - A 10. fejezetben (Értelmezés és megerősítés) szereplő információk vagy átkerültek az Óvintézkedések és figyelmeztetések, vagy a Korlátozások közé, vagy eltávolították, mert bizonyos alkalmazásokra vonatkoznak.