

MS-MLPA Genel Protokolü

Gerekli bileşenler

İsim	Kat. numaraları	İçindekiler
SALSA® MLPA® probemix	probemix ürün açıklamasına bakın	sentetik oligonükleotidler, patojenik olmayan bakteri suşu, Tris-HCl ve EDTA kullanılarak sentezlenen oligonükleotidler

Şunlarla birlikte kullanılır:

- [SALSA® MLPA® Reagent Kit](#) (Kat. No: EK1-FAM, EK1-CY5, EK5-FAM, EK5-CY5, EK20-FAM)
- [SALSA® Hhal](#) (Kat. No: SMR50)
- [Veri analizi yazılımı Coffalyser.Net™](#) (Kat. No: yok)

Belirli uygulamalar için şunlarla birlikte kullanılabilir:

İsim	Kat. numaraları	İçindekiler
SALSA® Binning/Reference Selection DNA	SDXXX	Tris-HCl, EDTA, sentetik/kontrol plazmid DNA'sı, insan genomik dışı DNA'sı, hücre hattı DNA'sı

Bileşenlerin depolanması ve raf ömrü

Önerilen koşullar		
-------------------	--	--

Tavsiye edilen koşullarda orijinal ambalajında saklandığında, açıldıktan sonra da son kullanma tarihine kadar raf ömrü garanti edilir. Kesin son kullanma tarihi için flakon etiketlerine bakın. Ürünler 25'ten fazla dondurma-çözme döngüsüne maruz bırakılmamalıdır. Ürününüz size ulaştığında ambalajı açılmış veya hasarlıysa ürünü kullanmayın. Ürünleri orijinal ambalajında muhafaza edin. Atık malzemeler ulusal ve yerel yönetmeliklere uygun olarak bertaraf edilmelidir.

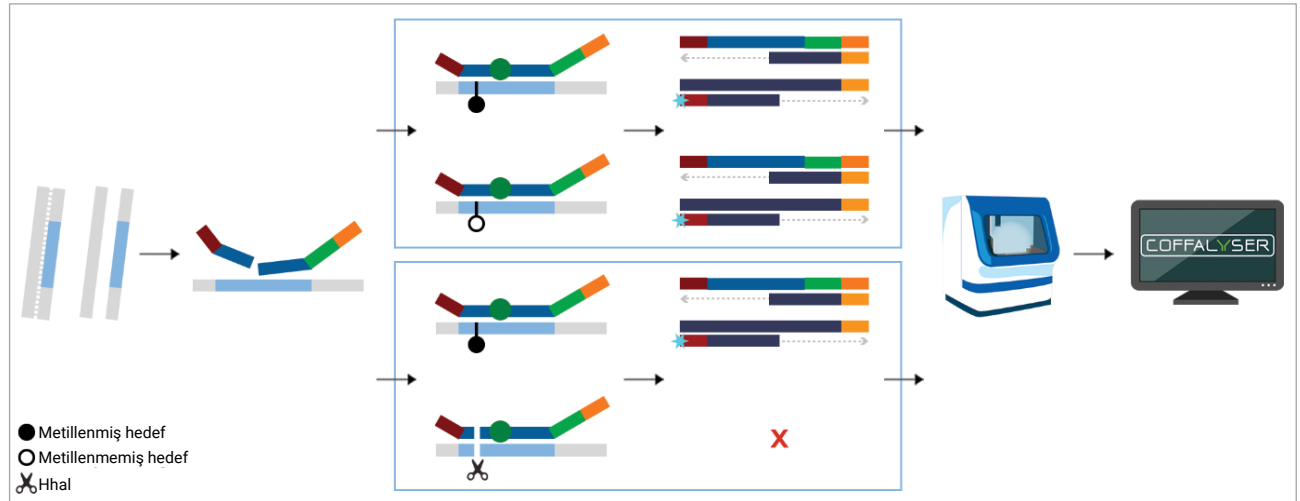
Bileşenlerin güvenliği

Hiçbir içerik maddesi insan, hayvan, patojenik bakteri veya patojenik virüslerden elde edilmemiştir. Mevcut konsantrasyonlara dayanarak, içerik maddelerinin hiçbirisi Tehlike İletişim Standardı'nda (Hazard Communication Standard) tanımlandığı şekilde tehlikeli değildir. Bu ürünler için [Güvenlik Bilgi Formu \(SDS\) gerekli değildir](#): Hiçbir preparat, SDS dağıtılmasını gerektiren konsantrasyonlarda tehlikeli maddeler içermez (Yönetmelik (EC) No. 1272/2008 [EU-GHS/CLP] ve 1907/2006 [REACH] ve değişiklikler uyarınca). Dökülme meydana gelirse suyla temizleyin ve uygun saha prosedürlerini izleyin.

Test prensibi (MS-MLPA)

Metilasyona özgü MLPA (MS-MLPA), her biri belirli bir DNA sekansını tespit eden 60'a kadar probe'un amplifikasyonuna dayanan yarı kantitatif bir tekniktir. Teknik, örnek DNA'sının denatürasyonu ile başlar (bkz. aşağıdaki Şekil 1). Daha sonra her biri iki veya üç oligonükleotidden oluşan bir MLPA probe karışımı eklenir. Tüm oligoların örnek DNA'sına hibridizasyonu tamamlandığında karışım iki tüpe bölünür.

Her iki tüpteki probe'lar bağlanır, ancak ikinci karışım da Hhal ile işlenir, bu da metillenmemiş bir hedefe hibridize edilen probe'ların sindirilmesiyle sonuçlanır. Daha sonra, bağlanan tüm probe'lar, bir primerin floresanla etiketlendiği evrensel PCR primer çifti kullanılarak amplifiye edilir. Bu, her probe için benzersiz olan ve her biri benzersiz uzunluğa sahip olan bir PCR ampikonları dizisiyle sonuçlanır. Daha sonra ampikonlar kapiler elektroforez cihazında uzunluklarına göre ayrılır. Elde edilen örneğe özgü elektroferogramlar, Coffalyser.Net kullanılarak analiz edilir. Sindirilmiş ve sindirilmemiş örneklerden alınan verilerin benzer şekilde işlenmiş referans örnekleriyle karşılaştırması, hedef sekansların metilasyon durumundaki değişiklikleri ortaya koyar.



Şekil 1. MS-MLPA iş akışı

Gerekli ancak sağlanmayan materyaller

- Ultra saf su
- TE_{0.1} (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM EDTA)
- Isıtılmalı kapaklı (99-105 °C) kalibre edilmiş termosikler ve standart laboratuvar ekipmanı
- 0,2 ml PCR tüpleri/şeritleri/plakaları
- Denatüre edici koşullarla çalışan ve parça analizi yazılımına sahip kapiler elektroforez cihazı; daha fazla ayrıntı için [bu Yardım Merkezi makalesine](#) bakın
- Yüksek kaliteli formamid
- Etiketli boyut standardı: Applied Biosystems GeneScan™ 500 LIZ®/ROX™; SCIEX CEO™ DNA Size Standard kit - 600
- Jel polimeri: POP-1, POP-4 veya POP-7 (Applied Biosystems); GenomeLab™ Linear Polyacrylamide denaturing gel (SCIEX); Spectrum Compact Polymer4 (Promega); Hitachi DS3000 Polymer4 (Hitachi)

Örnek gereksinimleri

Probemix ürün açıklamasında belirtilen dokudan ekstrakte edilen 50-250 ng insan DNA'sı (aksi belirtilmediği takdirde). DNA örnekleri 5-10 mM Tris-HCl buffer pH 8,0-8,5 içermelidir.

Önerilen ekstraksiyon yöntemleri:

- QIAGEN Autopure LS (automated) ve QIAamp DNA mini/midi/maxi kit (manuel)
- Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (manuel)
- Tuzla çöktürme (manuel)

Önlemler ve uyarılar

Genel önlemler

1. Ürün hasarlıysa veya son kullanma tarihi geçmişse ürünü kullanmayın.
2. Sadece profesyonel kullanım içindir. Test, moleküler teknikler konusunda eğitim almış profesyoneller tarafından yapılmalıdır.
3. Her bir testin, özellikle ilk kez kullanıldığında veya örnek işleme prosedürü, DNA ekstraksiyon yöntemi veya kullanılan cihazlar değiştirildiğinde dahili olarak doğrulanması gerekir. Sağlıklı bireylerden ≥ 16 farklı DNA örneği kullanın. Probemix ürün açıklamasında aksi belirtilmediği sürece doğrulama, her probe için $\leq 0,10$ standart sapma göstermelidir.
4. Sonuç yorumlamasından sorumlu kişi, uygulamayla ilgili en son bilimsel bilgileri ve MLPA tekniğinin yanlış sonuçlara yol açabilecek sınırlamalarını bilmelidir.
5. Veri analizi için Coffalyser.Net kullanılmalıdır. Başka yazılımların kullanılması yanlış sonuçlara yol açabilir.
6. Sonuçları yorumlamadan önce mutlaka kalite kontrol puanlarını kontrol edin. Yalnızca iyi kalite puanlarına sahip örneklerin sonuçları güvenilir bir şekilde yorumlanabilir.
7. Belirgin homozigot delesyonları, binning sorunları veya düşük sinyaller nedeniyle oluşan yanlış sonuçları hariç tutmak için elektroferogramın görsel incelemesiyle doğrulanmalıdır.
8. MLPA sonuçlarının, alternatif yöntemlerle doğrulama, parental değerlendirme, klinik genetik değerlendirme ve danışmanlık gibi uygun durumlarda mesleki uygulama standartlarına uygun olarak diğer klinik ve tanısal bulgularla birlikte kullanılması amaçlanmaktadır. Test sonuçlarının bir klinik moleküler genetik bilimci veya eşdeğeri tarafından yorumlanması gerekir.

Örnek kalite önlemleri

9. Örnek DNA'sının yetersiz buffering kapasitesinden kaynaklanan DNA depürasyonu yanlış sonuçlara yol açabilir. Yeterli buffer mevcut olup olmadığı bilinmiyorsa Tris-HCl ekleyin: 4 μ l örnek DNA'sı + 1 μ l 50 mM Tris-HCl pH 8,5.
10. DNA ekstraksiyonundan sonra kalan kontaminantlar (tuz, heparin, EDTA (>1,5 mM) ve demir dahil) test performansını etkileyebilir.
11. DNA örneklerindeki tuz, zayıf denatürasyona neden olabilir. Bu, bitişik genomik hedefleri tanıyan birkaç probe'un bile belirgin delesyonuna neden olabilir. QIAGEN M6, M48 ve M96 sistemlerini kullanmayın; bunlar çok fazla tuz bırakır. QIAGEN EZ1 için, MLPA'ya yönelik [QIAGEN Ek Protokolünü](#) kullanın.
12. DNA'yı konsantre etmeyin; bu işlem yüksek EDTA ve tuz konsantrasyonlarına yol açar.

Uygulama sırasında alınacak önlemler

13. Reaksiyon başına 5 μ l'den fazla DNA solüsyonu kullanmayın. Gerekli DNA miktarı probemix ürün açıklamasında belirtilmektedir.
14. Farklı MLPA probemix lotlarını karıştırmayın.
15. Gece boyunca hibridizasyon sırasında DNA lıgasyon ana karışımının pipetlenmesi sırasında kontaminantların ve tuz konsantrasyonlarının artmasına neden olan buharlaşma meydana gelebilir. Buharlaşmayı önlemek/azaltmak için:
 - a. İşleme süresini kısaltmak için çok kanallı pipet kullanın;
 - b. Isıtılmalı kapağın doğru çalıştığından emin olun;
 - c. Isıtılmalı kapağın basıncını artırın veya azaltın;
 - d. Farklı reaksiyon tüpleri kullanmayı deneyin;
 - e. DNA örneğinin üzerine sıvı yüzeyini kaplayacak şekilde küçük bir damla mineral yağı damlatın.
16. Kapillerleri ve polimeri düzenli olarak değiştirin. Polimer, >25 °C'ye uzun süre maruz kaldıktan sonra hızla bozulur. Boyut standardı pikleri tekrar eden şekilde düşük ve genişse kapillerler veya polimer bozulmuş olabilir.
17. Formamid ısıtıldığında asidik hale gelebilir ve PCR ürünlerinin depürasyonuna ve parçalanmasına neden olabilir. Yüksek kaliteli formamid kullanın ve alikotlar halinde -20 °C'de saklayın.
18. PCR ürününün hacmi hiçbir zaman toplam enjeksiyon karışımının %10'undan fazla olmamalıdır. Pikler düşük olduğunda enjeksiyon süresini ve/veya gerilimi artırın; daha fazla PCR ürünü eklemeyin.
19. Bir veya daha fazla pikin ölçek dışı olması durumunda yanlış sonuçlar elde edilebilir. Nispeten düşük sayıda probe içeren probemix'ler kullanıldığında ölçek dışı pik riski daha yüksektir. Sinyali azaltmak için PCR ürünlerini aşağıdakileri kullanarak tekrar çalıştırın:
 - a. Daha düşük enjeksiyon gerilimi / daha kısa enjeksiyon süresi;
 - b. Daha az miktarda PCR ürünü.
20. DNA örneklerinin tek ekzonların cDNA veya PCR amplikonları ile kontaminasyonu, probe sinyalinin artmasına yol açabilir. Bağımsız olarak toplanmış ve izole edilmiş ikinci bir DNA örneğinin analizi bu kontaminasyon artefaktlarını hariç tutabilir.
21. SALSA® Hhal enzimi tüm metilasyona özgü MLPA (MS-MLPA) deneylerinde kullanılmalıdır. "Hhal" olarak satılan çeşitli enzimler ısıyla inaktivasyona dirençlidir ve MS-MLPA ile uyumlu DEĞİLDİR. Bunlar arasında ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere Thermo Fisher Scientific enzimleri Hhal, ANZA 59 Hhal ve FastDigest Hhal bulunmaktadır.

Uygulamaya özgü önlemler

Probemix ürün açıklamasına bakın.

Test prosedürü bölüm I – MS-MLPA reaksiyonu

Talimatlar	Termosikler programı
1. DNA denatürasyonu	
1.1 0,2 ml tüpleri/şeritleri/plakları etiketleyin. 1.2 Her tüpe 5 µl DNA örneği veya TE (DNA içermeyen kontrol) ekleyin. 1.3 Tüpleri termosikler cihazına yerleştirin, 98 °C'de 5 dakika ısıtın, ardından 25 °C'ye soğutun.	5 dakika boyunca 98 °C 25 °C duraklama
2. Hibridizasyon	
2.1 MLPA Buffer'ı ve MLPA Probemix'i çözündürün, vorteksleyin ve kısa bir süre santrifüjleyin. Oda sıcaklığına geldiğinde pipetleyin. 2.2 HİBRİDİZASYON ANA KARIŞIMINI hazırlayın. Bir reaksiyon için*: ● MLPA Buffer: 1,5 µl ● MLPA probemix: 1,5 µl Vorteksleyerek veya pipetleyerek iyice karıştırın. 2.3 Her tüpe 3 µl HİBRİDİZASYON ANA KARIŞIMI ekleyin. Bu aşamada hassas pipetleme çok önemlidir! Pipetleyerek karıştırın. 2.4 95 °C'de 1 dakika inkübe edin ve 60 °C'de 16-20 saat hibridize edin.	1 dakika boyunca 95 °C 60 °C duraklama (16-20 saat)
3. Ligasyon ve ligasyon/sindirim	
3.1 Ligase Buffer A ve Ligase Buffer B'yi çözündürün, vorteksleyin ve kısa bir süre santrifüjleyin. Oda sıcaklığına geldiğinde pipetleyin. Ligase-65'i ve Hhal'ı 10 saniye boyunca ellerinizle ılıtın. Vortekslemeyin, yalnızca kısa bir süre santrifüjleyin. 3.2 Ana karışımları hazırlayın. Bir reaksiyon için*: LIGASE BUFFER A ANA KARIŞIMI : ● Ultra saf su: 10 µl ● Ligase Buffer A: 3 µl LIGASE-65 ANA KARIŞIMI** : ● Ultra saf su: 8,25 µl ● Ligase Buffer B: 1,5 µl ● Ligase-65: 0,25 µl, en son eklenir. LİGAZ-SİNDİRİM ANA KARIŞIMI** : ● Ultra saf su: 7,75 µl ● Ligase Buffer B: 1,5 µl ● Ligase-65: 0,25 µl ● SALSA Hhal: 0,5 µl, en son eklenir. Pipetleme yaparak yavaşça yukarı aşağı hareket ettirerek iyice karıştırın, vortekslemeyin.	20 °C duraklama 48 °C duraklama 30 dk boyunca 48 °C 5 dakika boyunca 98 °C 20 °C duraklama
3.3 Termosikler programını sürdürün ve tüpleri 20 °C'ye soğutun. 3.4 Her tüpe 13 µl LIGASE BUFFER A ANA KARIŞIMI ekleyin. Pipetleme yaparak yavaşça yukarı aşağı hareket ettirerek iyice karıştırın. 3.5 Termosikler cihazına ikinci bir tüp seti yerleştirin, her tüpten 10 µl karışımı ikinci bir tüpe aktarın ve 48 °C'ye ısıtarak programa devam edin. 3.6 48 °C'de termosikler içindeki tüpleri açın, her orijinal tüpe 10 µl LIGASE-65 ANA KARIŞIMI ekleyin, pipetleyerek iyice karıştırın, tüpleri kapatın. 3.7 Her ikinci tüpe 10 µl LİGAZ-SİNDİRİM ANA KARIŞIMI ekleyin, pipetleyerek iyice karıştırın. 3.8 Tüpleri kapatın ve 48 °C'de 30 dakika inkübe etmeye devam edin. 3.9 Ligazı inaktive etmek için 98 °C'ye ısıtın ve 5 dakika inkübe edin, ardından 20 °C'ye soğutun.***	
4. PCR	
4.1 PCR Primer Karışımını çözündürün, vorteksleyin ve kısa bir süre santrifüjleyin. Polimerazı 10 saniye boyunca elinizde ısıtın, vortekslemeyin, yalnızca kısa bir süre santrifüjleyin. 4.2 POLİMERAZ ANA KARIŞIMINI hazırlayın. Bir çift reaksiyon için*: ● Ultra saf su: 7,5 µl ● PCR Primer Karışımı: 2 µl ● Polimeraz: 0,5 µl Pipetleme yaparak yukarı aşağı hareket ettirerek iyice karıştırın, vortekslemeyin. 4.3 20 °C'de, her tüpe 5 µl POLİMERAZ ANA KARIŞIMI ekleyin, pipetleyerek iyice karıştırın ancak tüpleri ters çevirmeyin ve hemen PCR programına devam edin. 4.4 PCR sonrasında kontaminasyonu önlemek için tüpleri aynı odada açmayın ve PCR ürünlerini işlemek için farklı bir mikropipet kullanın. 4.5 PCR ürünlerini ışıktan koruyarak 4 °C'de 1 haftaya kadar, daha uzun süre için ise -25 °C ile -15 °C arasında saklayın.	35 PCR döngüsü: ● 30 saniye boyunca 95 °C ● 30 saniye boyunca 60 °C ● 60 saniye boyunca 72 °C 20 dakika boyunca 72 °C 15 °C duraklama

*Örnek varyasyonunu en aza indirmek için yeterli miktarda ana karışım solüsyonu hazırlayın: %5-10 hacim fazlası.

**Kullanımdan >1 saat önce hazırladığınızda, ana karışımları buz üzerinde veya 4 °C'de saklayın ve tüplere eklemeyen önce oda sıcaklığına getirin.

***Tüpler PCR için aynı bir laboratuvara götürüldüğünde PCR için termosikleri önceden ısıtın (örneğin 95 °C'de 1 saniye) ve ardından 20 °C'de duraklatın. Transfer süresini en aza indirin (örneğin <5 dk), tüpleri termosiklere yerleştirin ve 4.1. adımla devam edin. Bu, spesifik olmayan pik oluşumunu en aza indirir.

Test prosedürü bölüm II – Parça ayrımı

1. Coffalyser.Net'te desteklenen yaygın olarak kullanılan kapiler elektroforez cihazları için enjeksiyon ayarları	
PCR primer etiketi: FAM	
ABI SeqStudio	Kapilerler: 28 cm Enjeksiyon karışımı: • PCR ürünü 0,8 µl • GS500 boyut standardı 0,3 µl (ROX/LIZ) • HiDi formamid 12 µl Enjeksiyon plakasını kapatın, 86 °C'de 3 dakika ısıtın, 4 °C'de 2 dakika soğutun.
ABI Prism 3100 ABI 3130 (xL) ABI 3500 (xL) ABI 3730 (xL) ABI SeqStudio Flex RUO/Dx	Kapilerler: 36 veya 50 cm Enjeksiyon karışımı: • PCR ürünü 0,7 µl • GS500 boyut standardı 0,3 µl (ROX) veya 0,2 µl (LIZ) • HiDi formamid 9 µl Enjeksiyon plakasını kapatın, 86 °C'de 3 dakika ısıtın, 4 °C'de 2 dakika soğutun.
Hitachi DS3000*	
Promega Spectrum Compact*	*Sadece 36 cm kapilerler.
PCR primer etiketi: Cy5	
SCIEX CEQ 2000 SCIEX CEQ 8000 SCIEX CEQ 8800 SCIEX GenomeLab GeXP	Kapilerler: 33 cm Enjeksiyon karışımı: • PCR ürünü 1 µl • SS600 boyut standardı 0,5 µl • HiDi formamid / Beckman SLS 28,5 µl 1 damla yüksek kaliteli mineral yağı ekleyin.
2. Elektroforez ayarları	
Uygulamaya, cihaza, polimere ve kapiler uzunluğuna uygun varsayılan parça analizi ayarlarını kullanın. Sinyallerin optimum tespit aralığına girmesini ve çalışmanın tüm parçaları tespit etmeye yetecek kadar uzun olmasını sağlamak için cihaz ayarlarının optimizasyonu gerekebilir. Optimum sinyal aralıkları (RFU cinsinden) ve cihaz başına minimum/maksimum sinyaller şurada bulunabilir: Coffalyser.Net Referans Kılavuzu.	

Kalite kontrol ve veri analizi

Kalite kontrol ve veri analizi için en son Coffalyser.Net™ sürümü ([MRC Holland web sitesi](#) bağlantısından indirilebilir) kullanılmalıdır. Ayrıntılı talimatlar için bkz. [Coffalyser.Net Referans Kılavuzu.](#)

Yardım Merkezimizdeki şu makaleleri de inceleyebilirsiniz:

- [Miktar ve Denatürasyon kontrol parçaları hakkında açıklama](#)
- [DNA'sız kontroller hakkında bilgi](#)

Sorun giderme konusunda daha fazla yardım için [MRC Holland Yardım Merkezi](#)'ndeki sorun giderme sayfalarını ziyaret edin.

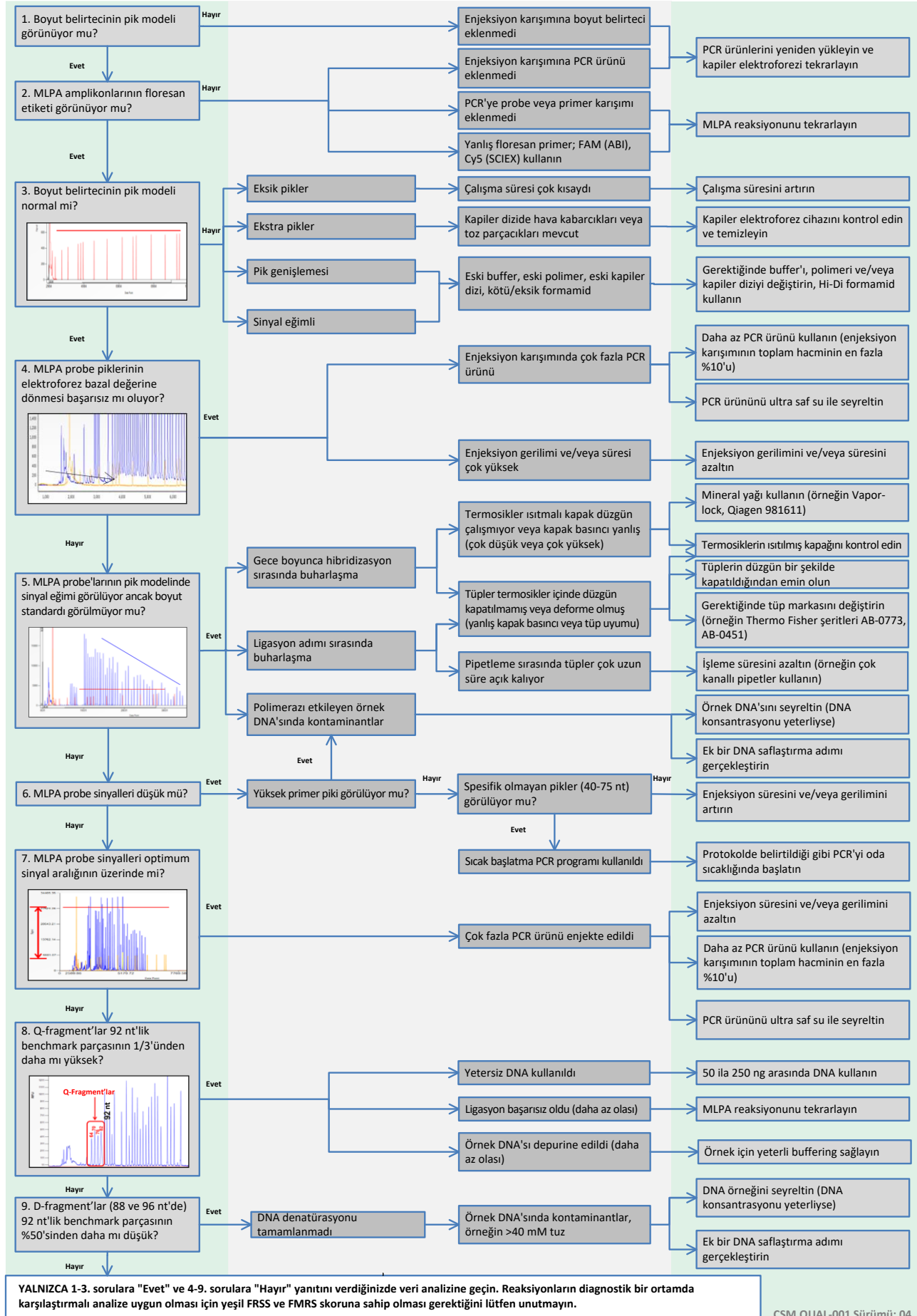
Sonuçların ve performans özelliklerinin yorumlanması ve doğrulanması

Uygulamaya bağlıdır; probemix ürün açıklamasına bakın.

Sınırlamalar

1. Çoğu popülasyonda ve çoğu MLPA uygulamasında, genetik defektlerin başlıca nedeni küçük (nokta) mutasyonlardır ve bunların çoğu MLPA tarafından tespit edilemez.
2. MLPA, MLPA probe'u tarafından tespit edilen sekansın (kısmen) dışında kalan çoğu inversiyonu, dengeli translokasyonu veya kopya sayısı değişimini tespit etmez.
3. Analitik performans, DNA örneğindeki safsızlıklar, eksik DNA denatürasyonu (örneğin tuz kontaminasyonu nedeniyle), yetersiz veya çok fazla örnek DNA'sı kullanımı, yetersiz veya uygun olmayan referans örnekleri, kapiler elektroforez sorunları veya yetersiz veri normalizasyon prosedürü ve diğer teknik hatalar nedeniyle tehlikeye girebilir.
4. Deneysel uygulamadaki küçük farklılıklar MLPA pik modelini etkileyebilir. Analize yalnızca a) aynı MLPA deneyine dahil edilen ve b) aynı probemix lotuyla test edilen örnekleri dahil edin.
5. Bazı durumlarda sonuçların doğru yorumlanması için parental örneklerin analizi gerekebilir.
6. Bazı kopya sayısı sapmaları, büyük delesyonlar ve tüm kromozomların duplikasyonu gibi somatik değişikliklerden kaynaklanabilir.
7. Bir probe tarafından hedeflenen sekanstaki küçük değişiklikler (örneğin SNV'ler, küçük indels) probe ligasyon bölgesinden >20 nt uzakta olsa bile yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir. Sekans değişiklikleri, probe oligonükleotidlerinin ligasyonunu önleyerek veya probe oligonükleotidinin örnek DNA'sına bağlanmasını stabilize ederek probe sinyalini azaltabilir. Hhal bölgesindeki sekans değişiklikleri Hhal sindirimini etkileyebilir ve yanlış pozitif metilasyon sinyaline neden olabilir. MLPA ile tespit edilen sapmaların doğrulanması gerekir ve tek probe'lu sapmaların her zaman doğrulanması gerekir. Hedef bölgenin sekanstanması önerilir.
8. Tüm genom amplifikasyon reaksiyonlarından elde edilen DNA, amplifikasyon sapması ve metilasyon imzasının çıkarılması nedeniyle MS-MLPA için uygun değildir.
9. MLPA testleri, DNA örneğinin ekstrakte edildiği hücrelerdeki hedef sekansların *ortalama* kopya sayısını ve metilasyon durumunu verir. Bitişik sekansları hedefleyen birden fazla probe'un alışılmadık bir değere sahip olması ancak bir delesyon/duplikasyon için olağan eşik değerlerine ulaşmaması durumunda mosaisizm olası bir nedendir. Mozaik vakalarda gözlenenler gibi belirsiz değişiklikler yalnızca probe'lar kromozomal konuma göre düzenlendiğinde ayırt edilebilir.
10. MLPA ile tespit edilen kopya sayısı ve metilasyon değişikliklerinin hepsi patojenik değildir. MRC Holland, belirli bir delesyonun veya duplikasyonun veya anormal metilasyonun hastalığa yol açıp açmayacağı konusunda bilgi sağlayamaz.
11. Bisülfitle işlenmiş DNA örnekleri MS-MLPA reaksiyonları için uygun değildir.
12. Çoğu MS-MLPA probe'u, probe tarafından tespit edilen sekans içerisinde bulunan tek bir Hhal bölgesinin (GC^{me}GC) metilasyonunu tespit eder. Bu özel CpG bölgesinde metilasyon yoksa, bu, CpG adasının tamamının metillenmemiş olduğu anlamına gelmez! Belirli bir probe tarafından tespit edilen metilasyonun o genin mRNA seviyesini etkilediğini gösteren hiçbir verimiz mevcut değildir.

Sorun giderme akış şeması




Daha fazla detay

Çevrimiçi eğitim videosu [MLPA reaksiyonu nasıl gerçekleştirilir](#).

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.

Daha fazla bilgi	
www.mrcholland.com ; destek.mrcholland.com	
	MRC Holland BV; Willem Schoutenstraat 1 1057 DL, Amsterdam, Hollanda
E-posta	info@mrcholland.com (bilgi ve teknik sorular); order@mrcholland.com (siparişler)
Telefon	+31 888 657 200

MRC Holland, SALSA, MLPA, digitalMLPA, Coffalyser.Net, Coffalyser digitalMLPA ve bunların logoları, MRC Holland BV'nin ticari markaları veya tescilli ticari markalarıdır. Burada yer alan diğer tüm markalar ve isimler ilgili sahiplerinin mülkiyetindedir.



Protokolde uygulanan değişiklikler
<p>Sürüm-014-TR1 – 21 Mayıs 2025</p> <ul style="list-style-type: none"> - ABI SeqStudio Flex, sayfa 4'te ABI SeqStudio Flex RUO/Dx olarak yeniden adlandırıldı. <p>Sürüm-013-TR1 – 20 Haziran 2024</p> <ul style="list-style-type: none"> - Protokol yeni bir yapıya ve yeni bir tasarıma kavuşmuştur. - SALSA MLPA test bileşenlerindeki tablolar, bileşenlerin ürün açıklamalarına yapılan referanslarla değiştirilmiştir. - Ek PCR reaktif kitiyle ilgili bölüm çıkarılmıştır. - Standart ambalaj etiketleriyle ilgili bölüm çıkarılmıştır. - MS-MLPA prensibiyle ilgili bölüm yeniden yazılmış ve iş akışının şekli geliştirilmiştir. Hesaplamalara ilişkin şekil kaldırılmıştır. - Gerekli ancak sağlanmayan materyaller bölümü güncellenmiştir. - Örnek işleme ve saklama bölümündeki bilgiler yeniden düzenlenmiştir. Bölüm kısaltılmıştır ve Örnek gereksinimleri olarak yeniden adlandırılmıştır. Bazı bilgiler Önlemler ve Uyarılar bölümüne taşınmıştır. - Referans ve diğer kontrol örneklerinin seçilmesi bölümü, bu bilginin ürün açıklamalarında da mevcut olması nedeniyle kaldırılmıştır. - Bölüm 3 Başlamadan önce okunması gereken notlar kısmındaki bilgiler Test prosedürü kısım l'e taşınmıştır. - Bölüm 5 ve 6'daki bilgiler (Kısaca MS-MLPA protokolü ve MS-MLPA protokolü) Test prosedürü kısım l'de yeni bir tablo formatında birleştirilmiştir. - Denatürasyondan sonra tüplerin termosiklerden çıkarılması ve çıkarılan Hibridizasyon ana karışımı eklendikten sonra tekrar yerleştirilmesine yönelik talimat. - Hibridizasyondan sonra tüplerin termosiklerden çıkarılması ve çıkarılan Ligase-65 ve Ligaz-Sindirim ana karışımı eklendikten sonra tekrar yerleştirilmesine yönelik talimat. - Polimeraz ana karışımını ekmeden önce tüpleri termosiklere yerleştirme talimatı kaldırılmıştır çünkü daha önceden bunları çıkarmaya yönelik bir talimat yoktur. - Polimeraz ana karışımı eklendikten sonra tüplerin döndürülmemesi talimatı eklenmiştir. - Test prosedürü kısım l'e, tüplerin PCR için ayrı bir laboratuvara götürülmesi durumuna ilişkin talimatlar veren bir dipnot eklenmiştir. - Bölüm 7.1'deki bilgiler. Başlamadan önce okunması gereken notlar, Önlemler ve uyarılar bölümüne taşınmıştır. - Bölüm 7.2'deki kapiler elektroforez cihazlarındaki sinyal aralıkları hakkındaki tablo, Coffalyser.Net Referans Kılavuzu'ndaki ilgili tabloya yapılan bir referansla değiştirilmiştir. - Bölüm 8'deki bilgiler (kalite kontrol ve sorun giderme) Coffalyser.Net Referans Kılavuzu'na ve kontrol parçaları ile DNA içermeyen kontroller hakkındaki bilgi tabanı makalelerine yapılan referanslarla değiştirilmiştir. - Bölüm 9 (Veri analizi) Coffalyser.Net'i indirme ve Coffalyser.Net Referans Kılavuzu'nu okuma talimatıyla değiştirilmiştir. - Bölüm 10'daki (Yorumlama ve doğrulama) bilgiler, Önlemler ve uyarılar bölümüne, Sınırlamalar bölümüne taşınmıştır veya belirli uygulamalara özgü olduğu için kaldırılmıştır.