

## Všeobecný protokol MLPA

### Požadované komponenty

Názov	Kat. čísla	Zloženie
SALSA® MLPA® probemix	viď popis produktu probemix	syntetické oligonukleotidy, oligonukleotidy syntetizované pomocou nepatogénneho bakteriálneho kmeňa, Tris-HCl a EDTA

K použitiu s:

- [SALSA® MLPA® Reagent Kit](#) (kat. Č.: EK1-FAM, EK1-CY5, EK5-FAM, EK5-CY5, EK20-FAM)
- [Software pre analýzu dát Coffalyser.Net™](#) (kat. č.: nie je k dispozícii)

Pre určité aplikácie možno použiť s:

Názov	Kat. čísla	Zloženie
SALSA® Binning/Reference Selection/Artificial Duplication DNA	SDXXX	Tris-HCl, EDTA, syntetická/kontrolná plazmidová DNA, ľudská genómová ženská DNA, DNA bunkovej línie

### Skladovanie a trvanlivosť komponentov

Doporučené podmienky		
----------------------	--	--

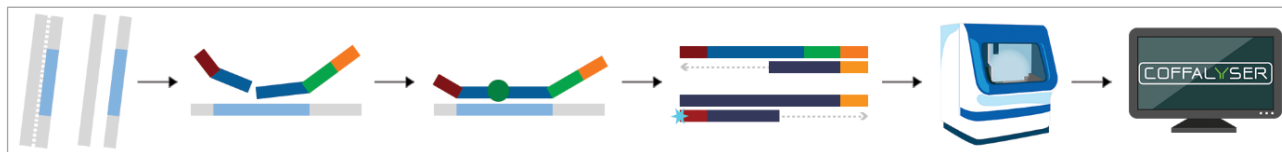
Pri skladovaní v pôvodnom obale za doporučených podmienok je zaručená trvanlivosť do dátumu expirácie, a to aj po otvorení. Presný dátum expirácie je uvedený na štítku príslušnej skúmavky. Produkty by nemali byť vystavené viac než 25 cyklom zmrazenia a rozmrazenia. Produkty nepoužívajte, ak je obal pri dodaní poškodený alebo otvorený. Produkty ponechajte v pôvodných obaloch. Odpadový materiál musí byť zlikvidovaný v súlade s národnými a miestnymi predpismi.

### Bezpečnosť komponentov

Žiadna zo zložiek nie je ľudského či živočíšneho pôvodu a neobsahuje patogénne baktérie alebo patogénne vírusy. Na základe prítomných koncentrácií nepredstavuje žiadna zo zložiek nebezpečenstvo, ako je definované v štandarde pre hlásenie nebezpečnosti (Hazard Communication Standard). [Bezpečnostný list \(BL\) nie je pre tieto produkty vyžadovaný](#): žiadny z prípravkov neobsahuje nebezpečné látky v koncentráciách, vyžadujúcich distribúciu BL (podľa nariadení (ES) č. 1272/2008 [EU-GHS/CLP] a 1907/2006 [REACH] a ich novelizácií). V prípade rozliatia výrobku ho umyte vodou, pričom na pracovisku uplatnite príslušné zavedené postupy.

### Princíp testu (MLPA)

SALSA® MLPA® je semikvantitatívna technika, založená na amplifikácii až 60 sond, z ktorých každá deteguje špecifickú sekvenciu DNA. Technika začína denaturáciou DNA vo vzorke (viď obrázok 1 nižšie). Ďalej sa pridá zmes sond MLPA, pričom každá sonda zostáva z dvoch alebo troch oligonukleotidov. Keď je hybridizácia všetkých oligosond so vzorkou DNA dokončená, sondy naviazané na vzorku DNA sú ligované. Všetky ligované sondy sú amplifikované pomocou univerzálneho páru PCR primerov, pričom jeden primer je fluorescenčne značený. Výsledkom je súbor PCR amplikónov jedinečných pre každú sondu, z ktorých každý amplikón má svoju jedinečnú dĺžku. Amplikóny sa potom rozdelia podľa dĺžky na prístroji pre kapilárnu elektroforézu. Výsledný elektroferogram, špecifický pre danú vzorku, sa analyzuje pomocou Coffalyser.Net. Porovnaním elektroferogramu vzorky s elektroferogramom sady referenčných vzoriek možno určiť počet genómových cieľov, prítomných vo vyšetrovanej vzorke.



Obrázok 1. Pracovný postup MLPA

**Požadované, ale neposkytované materiály**

- Ultračistá voda
- TE<sub>0.1</sub> (10 mM Tris-HCl pH 8.0 + 0,1 mM EDTA)
- Kalibrovaný termocyklér s vyhrievaným vekom (99-105°C) a štandardným laboratórnym vybavením
- 0,2 ml PCR skúmavky/stripy /doštičky
- Prístroj pre kapilárnu elektroforézu, ktorý pracuje v podmienkach denaturácie a má software pre analýzu fragmentov; ďalšie podrobnosti viď [tento článok Centra pomoci](#)
- Vysoko kvalitný formamid
- Značený veľkostný standard: Applied Biosystems GeneScan™ 500 LIZ®/ROX™; SCIEX CEQ™ DNA Size Standard kit - 600
- Gélový polymér: POP-1, POP-4 or POP-7 (Applied Biosystems); GenomeLab™ Linear Polyacrylamide denaturing gel (SCIEX); Spectrum Compact Polymer4 (Promega); Hitachi DS3000 Polymer4 (Hitachi)

**Požiadavky na vzorky**

50-250 ng ľudskej DNA (ak nie je uvedené inak) extrahovanej z tkaniva uvedeného v popise produktu probemix. Vzorky DNA by mali obsahovať 5-10 mM pufof Tris-HCl s pH 8,0-8,5.

Doporučené metódy extrakcie:

- QIAGEN Autopure LS (automatizovaná) a QIAamp DNA mini/midi/maxi kit (manuálna)
- Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (manuálna)
- Vysolovanie (manuálna)

**Preventívne opatrenia a výstrahy**Všeobecné preventívne opatrenia

1. Produkt nepoužívajte ak je poškodený alebo doba jeho expirácie uplynula.
2. Iba pre profesionálne použitie. Test by mali vykonávať odborníci vyškolení v molekulárnych technikách.
3. Je vyžadované interná validácia každého testu, najmä pri jeho prvom použití alebo pri zmene postupu manipulácie so vzorkou, metódy extrakcie DNA alebo použitých nástrojov. Použite  $\geq 16$  rôznych vzoriek DNA od zdravých jedincov. Validácia by mala vykazovať štandardnú odchýlku  $\leq 0,10$  pre každú sondu, ak nie je v popise produktu probemix uvedené inak.
4. 4Osoba zodpovedná za interpretáciu výsledkov by mala poznať najnovšie vedecké poznatky o aplikácii a všetky obmedzenia techniky MLPA, ktoré by mohli viesť k nesprávnym výsledkom.
5. Pre analýzu dát by mal byť použitý nástroj Coffalyser.Net. Použitie iného software môže viesť k nesprávnym výsledkom.
6. Pred samotnou interpretáciou výsledkov vždy skontrolujte skóre kontroly kvality. Spoľahlivo interpretovať je možné iba výsledky vzoriek s dobrým skóre kvality.
7. Zjavné homozygótne delécie by mali byť potvrdené vizuálnym preskúmaním elektroferogramu, aby sa vylúčili nesprávne výsledky spôsobené problémami s binningom alebo nízkymi signálmi.
8. Výsledky MLPA sú určené k použitiu v spojení s ďalšími klinickými a diagnostickými nálezmi v súlade s profesionálnymi štandardami praxe, vrátane prípadného potvrdenia alternatívnymi metódami, posúdení rodičov, klinického genetického hodnotenia a poradenstva. Výsledky testov by mal interpretovať klinický molekulárny genetik alebo odborník s rovnakými skúsenosťami a znalosťami.

Preventívne opatrenia týkajúce sa kvality vzoriek

9. Depurinácia DNA spôsobená nedostatočnou pufovcou kapacitou DNA vzorky môže viesť k nesprávnym výsledkom. Pokiaľ nie je známe, či je prítomné dostatočné množstvo pufof, pridajte Tris-HCl: 4  $\mu$ l DNA vzorky + 1  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl pH 8,5.
10. Kontaminanty, zostávajúce po extrakcii DNA, vrátane solí, heparínu, EDTA ( $> 1,5$  mM) a železa, môžu ovplyvniť účinnosť testu.
11. Soli vo vzorkách DNA môže spôsobiť nedostatočnú denaturáciu. To môže viesť k zdaničným deléciám, dokonca aj niekoľkých sond, rozoznávajúcich susedné genómové ciele. Nepoužívajte systémy QIAGEN M6, M48 a M96, pretože tie zanechávajú príliš mnoho soli. Pre QIAGEN EZ1 použite [doplnujúci protokol QIAGEN](#) pre MLPA.
12. Nekonzentrujte DNA odparovaním alebo pomocou zariadenia SpeedVac, pretože to vedie k vysokým koncentráciám EDTA a solí.

Bezpečnostné opatrenia počas vykonávania

13. V jednej reakcii nepoužívajte nikdy viac než 5  $\mu$ l roztoku DNA. Požadované množstvo DNA je uvedené v popise produktu probemix.
14. Nemiešajte rôzne šarže probemix MLPA.
15. Počas hybridizácie cez noc alebo pri pipetovaní ligačného master mixu môže dôjsť k odparovaniu, ktoré zvyšuje koncentráciu kontaminantov a solí. Postup na zabránenie/zníženie odparovania:
  - a. Použite viackanálovú pipetu a tím skráťte potrebnú dobu manipulácie.
  - b. Uistite sa, že vyhrievané veko funguje správne.
  - c. Zvýšte alebo znížte tlak vyhrievaného veka.
  - d. Skúste použiť rôzne reakčné skúmavky.
  - e. Naneste malú kvapku minerálneho oleja na vzorku DNA, aby ste pokryli povrch kvapaliny.
16. Pravidelne meňte kapiláry a polymér. Polymér sa po dlhšej expozícii pri teplotách  $>25^{\circ}\text{C}$  rýchlo kazí. Ak sú píky veľkostného štandardu opakovane nízke a široké, mohlo dôjsť k poškodeniu kapilár alebo polyméru.
17. Formamid sa môže stať kyslým a spôsobiť pri zahrievaní PCR produktov ich depurináciu a fragmentáciu. Použite vysoko kvalitný formamid a skladujte ho v alikvótoch pri teplote  $-20^{\circ}\text{C}$ .
18. Objem produktu PCR by nikdy nemal byť  $>10\%$  celkovej nastrekovanej zmesi. Ak sú píky nízke, zvýšte dobu nástreku a/alebo napätia – ďalší produkt PCR nepridávajte.
19. Nesprávne výsledky môžu byť získané, ak je jeden alebo viac píkov mimo rozsahu stupnice. Riziko píkov mimo rozsahu stupnice je vyššie, keď sa používajú zmesi sond probemix, ktoré obsahujú relatívne nízky počet sond. Ak chcete znížiť signál, spustite analýzu produktov PCR znovu, pričom použijete:
  - a. nižšie napätie pri nástreku / kratšiu dobu nástreku;
  - b. nižšie množstvo produktov PCR.
20. Kontaminácia vzoriek DNA s cDNA alebo PCR amplikónmi jednotlivých exónov môže viesť k zvýšenému signálu sondy. Analýza druhej, nezávisle odobranej a izolovanej vzorky DNA môže tieto artefakty kontaminácie vylúčiť

Bezpečnostné opatrenia špecifické pre aplikáciu

Viď popis produktu probemix.

**Postup testovania, časť I – reakcia MLPA**

Pokyny	Program termocykléra
<b>1. Denaturácia DNA</b>	
1.1 Označte 0,2ml skúmavky/stripy /doštičky. 1.2 Do každej skúmavky pridajte 5 µl vzorku DNA alebo TE (kontrola bez DNA). 1.3 Umiestnite skúmavky do termocykléra, zahrievajte na 98°C po dobu 5 minút, ochladte na 25°C.	98°C po dobu 5 minút  pozastavenie pri teplote 25°C
<b>2. Hybridizácia</b>	
2.1 Rozmrazte pufof MLPA Buffer a produkt MLPA Probemix, vortexujte a krátko odstredte. Pipetujte ak má izbovú teplotu. 2.2 Pripravte si [HYBRIDIZAČNÚ ZMES MASTER MIX]. Pre jednu reakciu*: ● MLPA Buffer: 1,5 µl ● MLPA probemix: 1,5 µl Dobre premiešajte vortexovaním alebo pipetovaním. 2.3 Pridajte 3 µl [HYBRIDIZAČNEJ ZMESI MASTER MIX] do každej skúmavky. V tomto kroku je nevyhnutné presné pipetovanie! Premiešajte pipetovaním. 2.4 Umiestnite skúmavky do termocykléra, inkubujte pri teplote 95°C po dobu 1 minúty a hybridizujte pri teplote 60°C po dobu 16–20 hodín.	95°C po dobu 1 minúty  pozastavenie pri teplote 60°C (16-20 h)
<b>3. Ligácia</b>	
3.1 Rozmrazte pufof Ligase Buffer A a Ligase Buffer B, premiešajte vortexovaním a krátko odstredte. Pipetujte ak majú izbovú teplotu. Zahrejte roztok Ligase-65 v ruke po dobu 10 sekúnd. Nevortexujte, iba krátko stočte. 3.2 Pripravte si zmes [LIGASE-65 MASTER MIX]**. Pre jednu reakciu*: ● Ultračistá voda: 25 µl ● Ligase Buffer A: 3 µl ● Ligase Buffer B: 3 µl ● Ligase-65: 1 µl, pridaný ako posledný. Dobre premiešajte jemným pipetovaním hore a dolu, nevortexujte. 3.3 Pokračujte v programe termocykléra a ochladte skúmavky na 54°C. 3.4 Pri teplote 54°C otvorte skúmavky v termocykléri a do každej skúmavky pridajte 32 µl [LIGASE-65 MASTER MIX] dobre premiešajte pipetovaním, uzavrite skúmavky a pokračujte v inkubácii pri teplote 54°C po dobu 15 minút. 3.5 Zahrejte na 98°C a inkubujte po dobu 5 minút, aby sa ligáza inaktivovala. Ochladte na 20°C.***	pozastavenie pri teplote 54°C  54°C po dobu 15 minút  98°C po dobu 5 minút  pozastavenie pri teplote 20°C
<b>4. PCR</b>	
4.1 Rozmrazte zmes PCR Primer Mix, vortexujte a krátko stočte. Polymerázu zahrejte v ruke po dobu 10 sekúnd, nevortexujte, iba krátko stočte. 4.2 Pripravte si zmes [POLYMERASE MASTER MIX]. Pre jednu reakciu*: ● Ultračistá voda: 7,5 µl ● PCR Primer Mix: 2 µl ● Polymeráza: 0,5 µl Dobre premiešajte pipetovaním hore a dolu, nevortexujte. 4.3 Pri teplote 20°C pridajte do každej skúmavky 10 µl zmesi [POLYMERASE MASTER MIX] premiešajte pipetovaním a ihneď pokračujte v programe PCR. 4.4 Aby ste zabránili kontaminácii, po PCR neotvárajte skúmavky v rovnakej miestnosti a pre manipuláciu s produktami PCR použite inú mikropipetu. 4.5 Produkty PCR skladujte chránené pred svetlom pri teplote 4°C po dobu až 1 týždňa alebo v rozmedzí teplôt -25°C až -15°C po dlhšiu dobu.	35 cyklov PCR: ● 95°C po dobu 30 sekúnd ● 60°C po dobu 30 sekúnd ● 72°C po dobu 60 sekúnd  72°C po dobu 20 minút  pozastavenie pri teplote 15°C

\* Aby ste minimalizovali variácie vo vzorkách, pripravte dostatočne veľké objemy roztokov zmesi master mix: Prebytok objemu 5-10%.

\*\* Pokiaľ sú zmesi master mix pripravené vopred (viac než 1 hodinu pred použitím), skladujte ich na fide alebo pri teplote 4°C a pred použitím ich zahrejte na izbovú teplotu.

\*\*\* Keď sú skúmavky premiestnené do samostatného laboratória pre PCR, predhrejte termocyklér pre PCR, napr. nastavte na teplotu 95°C na 1 sekundu a potom pozastavenie pri 20°C. Minimalizujte dobu prenosu (napr. < 5 min.), vložte skúmavky do termocykléra a pokračujte krokom 4.1. To minimalizuje tvorbu nešpecifických pákov.

**Postup testovania, časť II – separácia fragmentov**

<b>1. Nastavenie nástreku pre bežne používané zariadenie pre kapilárnu elektroforézu podporovanú v Coffalyser.Net</b>	
Označenie PCR primeru: FAM	
ABI SeqStudio	Kapiláry: 28 cm Zmes nástreku: <ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR produkt 0,8 µl</li> <li>• GS500 size standard 0,3 µl (ROX/LIZ)</li> <li>• HiDi formamid 12 µl</li> </ul> Uzavrite injekčnú doštičku, zahrejte na 86°C po dobu 3 minút, ochladte na teplotu 4°C po dobu 2 minút.
ABI Prism 3100 ABI 3130 (xL) ABI 3500 (xL) ABI 3730 (xL) ABI SeqStudio Flex RUO/Dx	Kapiláry: 36 alebo 50 cm Zmes nástreku: <ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR produkt 0,7 µl</li> <li>• GS500 size standard 0,3 µl (ROX) or 0,2 µl (LIZ)</li> <li>• HiDi formamid 9 µl</li> </ul> Uzavrite injekčnú doštičku, zahrejte na 86°C po dobu 3 minút, ochladte na teplotu 4°C po dobu 2 minút.
Hitachi DS3000*	Uzavrite injekčnú doštičku, zahrejte na 86°C po dobu 3 minút, ochladte na teplotu 4°C po dobu 2 minút.
Promega Spectrum Compact*	*Iba 36 cm kapiláry.
Označenie PCR primeru: Cy5	
SCIEX CEQ 2000 SCIEX CEQ 8000 SCIEX CEQ 8800 SCIEX GenomeLab GeXP	Kapiláry: 33 cm Zmes nástreku: <ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR produkt 1 µl</li> <li>• SS600 size standard 0,5 µl</li> <li>• HiDi formamid / Beckman SLS 28,5 µl</li> </ul> Pridajte 1 kvapku vysoko kvalitného minerálneho oleja.
<b>2. Nastavenie elektroforézy</b>	
Použite východiskové nastavenie analýzy fragmentov vhodné pre aplikáciu, prístroj, polymér a dĺžku kapiláry. Nastavenie prístroja môže vyžadovať optimalizáciu, aby sa zaistilo, že signály spadajú do optimálneho rozsahu detekcie a že beh je dostatočne dlhý k detekcii všetkých fragmentov. Optimálne rozsahy signálu (v RFU) a minimálne/maximálne signálu daného prístroja je možné nájsť v <a href="#">Referenčnej príručke k nástroju Coffalyser.Net</a> .	

**Kontrola kvality a analýza dát**

Pre kontrolu kvality a analýzu dát by mala byť použitá najnovšia verzia nástroja Coffalyser.Net™ (k stiahnutiu z [webových stránok MRC Holland](#)). Podrobné pokyny nájdete v [Referenčnej príručke k nástroju Coffalyser.Net](#).

Prečítajte si tiež tieto články v našom Centre pomoci:

- [Vysvetlenie kontrolných fragmentov pre stanovenie množstva a denaturácie](#)
- [Informácie o kontrolách bez DNA](#)

Ďalšiu pomoc s riešením problémov nájdete na stránkach s riešením problémov v [Centre pomoci MRC Holland](#).

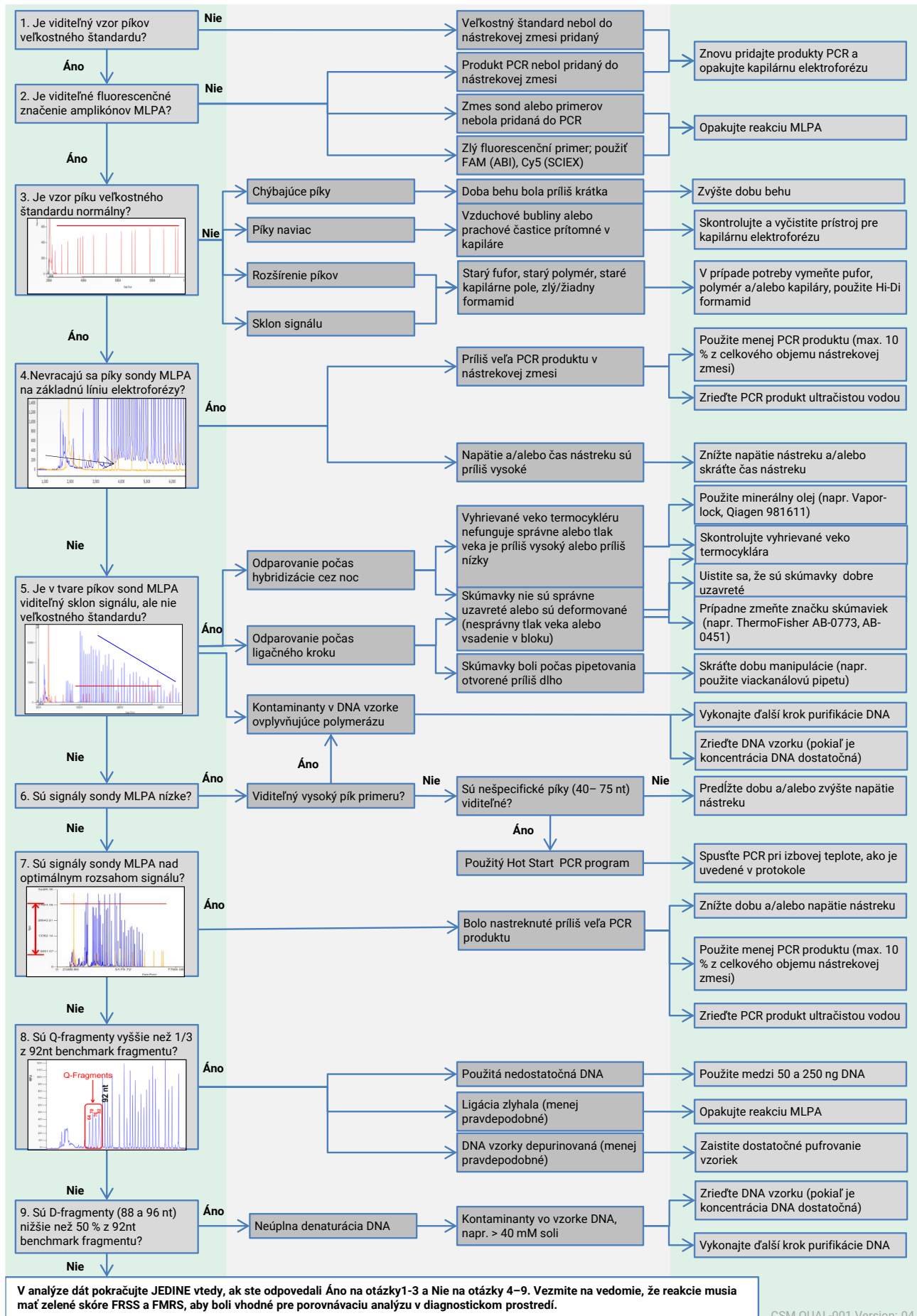
**Interpretácia a potvrdenie výsledkov a vlastností z hľadiska funkčnej spôsobilosti**

Závisí na aplikácii; viď popis produktu probemix.

**Obmedzenia**

1. Vo väčšine populácie a pre väčšinu aplikácií MLPA sú hlavnou príčinou genetických defektov malé (bodové) mutácie, z ktorých väčšinu MLPA neodhalí.
2. MLPA neodhalí väčšinu inverzií, vyvážených translokácií alebo zmien počtu kópií, ktoré ležia (čiastočne) mimo sekvencie detegovaných sondou MLPA.
3. Analytický výkon môže byť ohrozený nečistotami v DNA vzorke, neúplnou denaturáciou DNA (napr. v dôsledku kontaminácie soľami), použitím nedostatočného alebo príliš veľkého množstva DNA vzorky, nedostatočnými alebo nevhodnými referenčnými vzorkami, problémami s kapilárnou elektroforézou alebo nesprávnym postupom normalizácie dát a ďalšími technickými chybami.
4. Drobné rozdiely vo vykonaní experimentu môžu ovplyvniť vzor píkov MLPA. Do analýzy zahrňte iba vzorky, ktoré a) boli zahrnuté do rovnakého experimentu MLPA a b) boli testované s rovnakou šaržou produktu probemix.
5. V niektorých prípadoch môže byť pre správnu interpretáciu výsledkov nevyhnutná analýza rodičovských vzoriek.
6. Určité aberácie počtu kópií môžu byť spôsobené somatickými zmenami, vrátane rozsiahlych delécií a duplikácií celých chromozómov.
7. Malé zmeny (napr. SNVs, malé indels) v sekvencii, na ktorú je sonda zacielená, môžu falošne pozitívne výsledky, aj keď sú vzdialené >20 nt od miesta ligácie sondy. Sekvenčné zmeny môžu znížiť signál sondy zabránením ligácie oligonukleotidov sondy alebo destabilizáciou väzby oligonukleotidu sondy k DNA vzorke. Odchýlky zistené MLPA by mali byť potvrdené a odchýlky s jednou sondou vždy vyžadujú potvrdenie. Odporúča sa sekvenovanie cieľovej oblasti.
8. DNA z celogenómových amplifikačných reakcií nie je vhodná pre MLPA kvôli skresleniu amplifikácie.
9. Testy MLPA poskytujú *priemerný* počet kópií cieľových sekvencií v bunkách, z ktorých bola vzorka DNA extrahovaná. V prípade, že niekoľko sond cieľiacich na susedné sekvencie má neobvyklú hodnotu, ale nedosahuje obvyklých prahových hodnôt pre deléciu/duplikáciu, je možnou príčinou mozaicismus. Jemné zmeny, ako sú tie pozorované v prípadoch mozaiky, je možné rozlíšiť iba vtedy, keď sú sondy usporiadané podľa umiestnenia chromozómov.
10. Nie všetky zmeny počtu kópií detegované MLPA sú patogénne. MRC Holland nemôže poskytnúť informácie, či konkrétna delécia alebo duplikácia bude mať za následok ochorenie.


**Vývojový diagram pre riešenie problémov**



**Ďalšie podrobnosti**

Online inštruktážne video [Ako vykonať reakciu MLPA](#).

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

Ďalšie informácie	
<a href="http://www.mrcholland.com">www.mrcholland.com</a> ; <a href="mailto:support.mrcholland.com">support.mrcholland.com</a>	
	MRC Holland BV; Willem Schoutenstraat 1 1057 DL, Amsterdam, the Netherlands
E-mail	<a href="mailto:info@mrcholland.com">info@mrcholland.com</a> (informácie a technické otázky); <a href="mailto:order@mrcholland.com">order@mrcholland.com</a> (objednávky)
Telefón	+31 888 657 200

MRC Holland, SALSA, MLPA, digitalMLPA, Coffalyser.Net, Coffalyser digitalMLPA a ich logá sú ochranné známky alebo registrované ochranné známky spoločnosti MRC Holland BV. Všetky ostatné tu uvedené značky a názvy sú majetkom ich príslušných vlastníkov.



Vykonalé zmeny v protokole
<p>Verzia 010-SK1 – 21. mája 2025</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ABI SeqStudio Flex premenované na ABI SeqStudio Flex RUO/Dx na strane 4.</li> <li>- Chyba vo vývojovom diagrame na strane 5 bola opravená.</li> </ul> <p>Verzia 009-SK1 – 21. mája 2024</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Predchádzajúce verzie dokumentu sú dostupné iba v angličtine.</li> <li>- Protokol dostal novú štruktúru a nový design.</li> <li>- Tabuľky v komponentoch testu MLPA SALSA boli nahradené odkazmi na popisy komponentov produktov.</li> <li>- Časť o štandardných štítkoch na obaloch boli odstránené.</li> <li>- Časť o princípe MLPA bola prepísaná a bol vylepšený obrázok pracovného postupu. Obrázok o výpočtoch bol odstránený.</li> <li>- Časť „Požadované, ale neposkytované materiály“ bola aktualizovaná.</li> <li>- Informácie v časti „Spracovanie a skladovanie vzoriek“ bola preusporiadaná. Táto časť je teraz kratšia a nesie názov „Požiadavky na vzorky“. Niektoré informácie boli presunuté do časti „Preventívne opatrenia a výstrahy“.</li> <li>- Časť „Výber referenčných a iných kontrolných vzoriek“ bola odstránená, pretože tieto informácie sú tiež uvedené v popisoch produktov.</li> <li>- Informácie v kapitole 3 „Poznámky, ktoré je potrebné si prečítať pred zahájením“ boli presunuté do časti I skúšobného postupu.</li> <li>- Informácie v kapitole 5 a 6 (Skrátený protokol MLPA a Protokol MLPA) spojené v časti I skúšobného postupu v novom tabuľkovom formáte.</li> <li>- Pokyn k vyňatiu skúmaviek z termocykléra po denaturácii a ich umiestnení späť po pridaní hybridizačnej zmesi master mix bol odstránený.</li> <li>- Pokyn k umiestneniu skúmaviek do termocykléra pred pridaním polymerázovej zmesi master mix bol odstránený, pretože neexistuje žiaden predchádzajúci pokyn k ich vyňatiu.</li> <li>- Do časti I skúšobného postupu bola pridaná poznámka pod čiarou s pokynmi pre situácie, kedy sú skúmavky odnesené do samostatného laboratória pre PCR.</li> <li>- Informácie v časti 7.1. „Poznámky, ktoré je potrebné si prečítať pred zahájením,“ sa presunuli do časti Preventívne opatrenia a výstrahy.</li> <li>- Tabuľka o rozsahu signálov v prístrojoch pre kapilárnu elektroforézu v časti 7.2. bola nahradená odkazom na zodpovedajúcu tabuľku v Referenčnej príručke k nástroji Coffalyser.Net.</li> <li>- Informácie v kapitole 8 (kontrola kvality a riešenie problémov) boli nahradené odkazy na Referenčnú príručku k nástroju Coffalyser.Net a články vedomostnej báze o kontrolných fragmentoch a kontrolách bez DNA.</li> <li>- Kapitola 9 (Analýza dát) bola nahradená pokynmi k stiahnutiu nástroja Coffalyser.Net a preštudovaniu Referenčnej príručky k nástroju Coffalyser.Net.</li> <li>- Informácie v kapitole 10 (Interpretácia a potvrdenie) boli buď presunuté do časti „Preventívne opatrenia a výstrahy“, do časti „Obmedzenia“ a/alebo boli odstránené, pretože sú špecifické pre určité aplikácie.</li> </ul>