

Všeobecný protokol MS-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)
- [SALSA® Hhal](#) (Kat. č.: SMR50)
- [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.

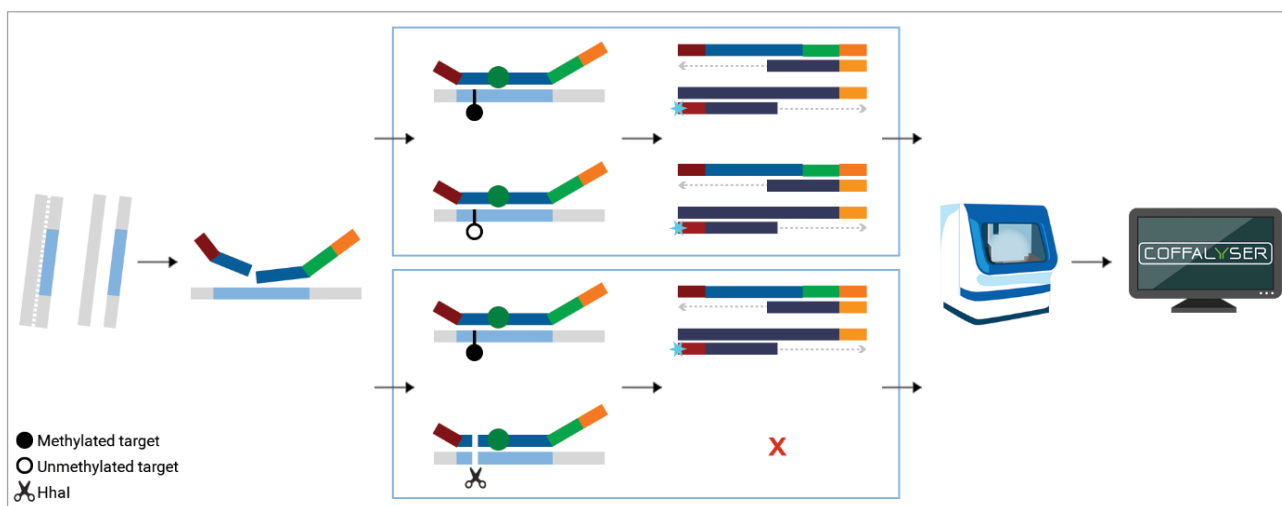
Bezpečnosť komponentov

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 (MS-MLPA)

Metylačne-špecifická MLPA (MS-MLPA) je semikvantitatívna technika, založená na amplifikácii až 60 sond, z ktorých každá deteguje špecifickú sekvenciu DNA. Technika začína denaturáciou DNA vzorky (viď obrázok 1 nižšie). Ďalej sa pridá zmes sond MLPA, pričom každá sonda zostáva z dvoch alebo troch oligonukleotidov. Keď je hybridizácia všetkých oligosond s DNA vo vzorke dokončená, zmes je rozdelená do dvoch skúmaviek.

Sondy v oboch skúmavkách sú ligované, ale zmes v druhej skúmavke je opracovaná s Hhal, čo vedie k štiepeniu sond, hybridizovaných na nemetylovaný cieľ. Následne sú všetky ligované sondy amplifikované pomocou univerzálneho páru PCR primerov, kde jeden primer je fluorescenčne značený. Výsledkom je súbor PCR amplikónov jedinečných pre každú sondu, pričom každý má svoju jedinečnú dĺžku. Amplikóny se potom rozdelia podľa dĺžky na prístroji pre kapilárnu elektroforézu. Výsledný elektroferogram, špecifický pre danú vzorku, sa analyzuje pomocou Coffalyser.Net. Porovnaním údajov zo štiepených a neštiepených vzoriek k podobne opracovaným referenčným vzorkám sa odhalia zmeny v metylačnom stave cieľových sekvencií.



Obrázok 1. Pracovný postup MS-MLPA

Požadované, ale neposkytované materiály

- Ultračistá voda
- TE_{0.1} (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 pufor 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 výstrahyVšeobecné 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 ≥ 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 pufovacou kapacitou DNA vzorky môže viesť k nesprávnym výsledkom. Pokiaľ nie je známe, či je prítomné dostatočné množstvo pufru, pridajte Tris-HCl: 4 μ l DNA vzorky + 1 μ 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 μ 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°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 použite:
 - 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
21. SALSA® Hhal enzým by mal byť použitý vo všetkých metylačne špecifických (MS-MLPA) experimentoch. Niektoré enzýmy, predávané ako "Hhal" sú rezistentné na tepelnú inaktiváciu a NIE SÚ s MS-MLPA kompatibilné. Tieto zahŕňajú, ale nemusia byť obmedzené na, Thermo Fisher Scientific enzýmy Hhal, ANZA 59 Hhal a FastDigest Hhal.

Bezpečnostné opatrenia špecifické pre aplikáciu

Viď popis produktu probemix.

Postup testovania, časť I – reakcia MS-MLPA

Pokyny	Program termocykléra
1. DNA denaturation	
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
2. Hybridisation	
2.1 Rozmrazte pufr 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)
3. Ligácia a ligácia/štiepenie	
3.1 Rozmrazte pufr Ligase Buffer A a Ligase Buffer B, premiešajte vortexovaním a krátko odstredte. Pipetujte ak majú izbovú teplotu. Zahrejte roztok Ligase-65 a Hhal v ruke po dobu 10 sekúnd. Nevortexujte, iba krátko stočte. 3.2 Pripravte master mixy. Pre jednu reakciu *: [LIGASE BUFFER A MASTER MIX] [LIGASE-65 MASTER MIX]**: [LIGASE-DIGESTION MASTER MIX]**: ● Ultračistá voda: 10 µl ● Ultračistá voda: 8,25 µl ● Ultračistá voda: 7,75 µl ○ Ligase Buffer A: 3 µl ○ Ligase Buffer B: 1,5 µl ○ Ligase Buffer B: 1,5 µl ● Ligase-65: 0,25 µl, pridaný ako posledný. ● Ligase-65: 0,25 µl ● SALSA Hhal: 0,5 µl, pridaný ako posledný.	pozastavenie pri teplote 20°C pozastavenie pri teplote 48°C 48°C po dobu 30 minút 98°C po dobu 5 minút pozastavenie pri teplote 20°C
3.3 Pokračujte v programe termocykléra a ochladte skúmavky na 20°C. 3.4 Do každej skúmavky pridajte 13 µl [LIGASE BUFFER A MASTER MIX]. Dobre premiešajte jemným pipetovaním hore a dolu. 3.5 Do termocykléra vložte druhú sadu skúmaviek, preneste 10 µl zmesi z každej skúmavky do druhej skúmavky a pokračujte programom ohrevu na 48°C. 3.6 Pri 48°C otvorte skúmavky v termocykléri, do každej pôvodnej skúmavky pridajte 10 µl [LIGASE-65 MASTER MIX] dobre premiešajte pipetovaním, uzavrite skúmavky. 3.7 Do každej z druhých skúmavok pridajte 10 µl [LIGASE-DIGESTION MASTER MIX] dobre premiešajte pipetovaním. 3.8 Uzavrite skúmavky a pokračujte v inkubácii pri 48°C po dobu 30 minút. 3.9 Ohrejte na 98°C a inkubujte 5 minút pre inaktiváciu ligázy. Následne schladte na 20°C.***	
4. PCR	
4.1 Rozmrazte zmes PCR Primer Mix, vortexujte a krátko stočte. Polymerázu zohrejte v ruke po dobu 10 sekúnd, nevortexujte, iba krátko stočte. 4.2 Pripravte si smes [POLYMERASE MASTER MIX]. Pre jeden pár reakcie*: ● 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 5 µl [POLYMERASE MASTER MIX] premiešajte pipetovaním ale necentrifugujte 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 ľade 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 pík.

Postup testovania, časť II – separácia fragmentov

1. Nastavenie nástreku pre bežne používané zariadenie pre kapilárnu elektroforézu podporovanú v Coffalyser.Net	
Označenie PCR primeru: FAM	
ABI SeqStudio	Kapiláry: 28 cm Zmes nástreku: <ul style="list-style-type: none"> • PCR produkt 0,8 µl • GS500 size standard 0,3 µl (ROX/LIZ) • HiDi formamid 12 µl Uzavrite injekčnú doštičku, zahrejte na 86°C po dobu 3 minút, ochlaďte 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"> • PCR produkt 0,7 µl • GS500 size standard 0,3 µl (ROX) or 0,2 µl (LIZ) • HiDi formamid 9 µl Uzavrite injekčnú doštičku, zahrejte na 86°C po dobu 3 minút, ochlaďte na teplotu 4°C po dobu 2 minút.
Hitachi DS3000*	Uzavrite injekčnú doštičku, zahrejte na 86°C po dobu 3 minút, ochlaďte 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"> • PCR produkt 1 µl • SS600 size standard 0,5 µl • HiDi formamid / Beckman SLS 28,5 µl Pridajte 1 kvapku vysoko kvalitného minerálneho oleja.
2. Nastavenie elektroforézy	
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 Referenčnej príručke k nástroju Coffalyser.Net .	

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](#).

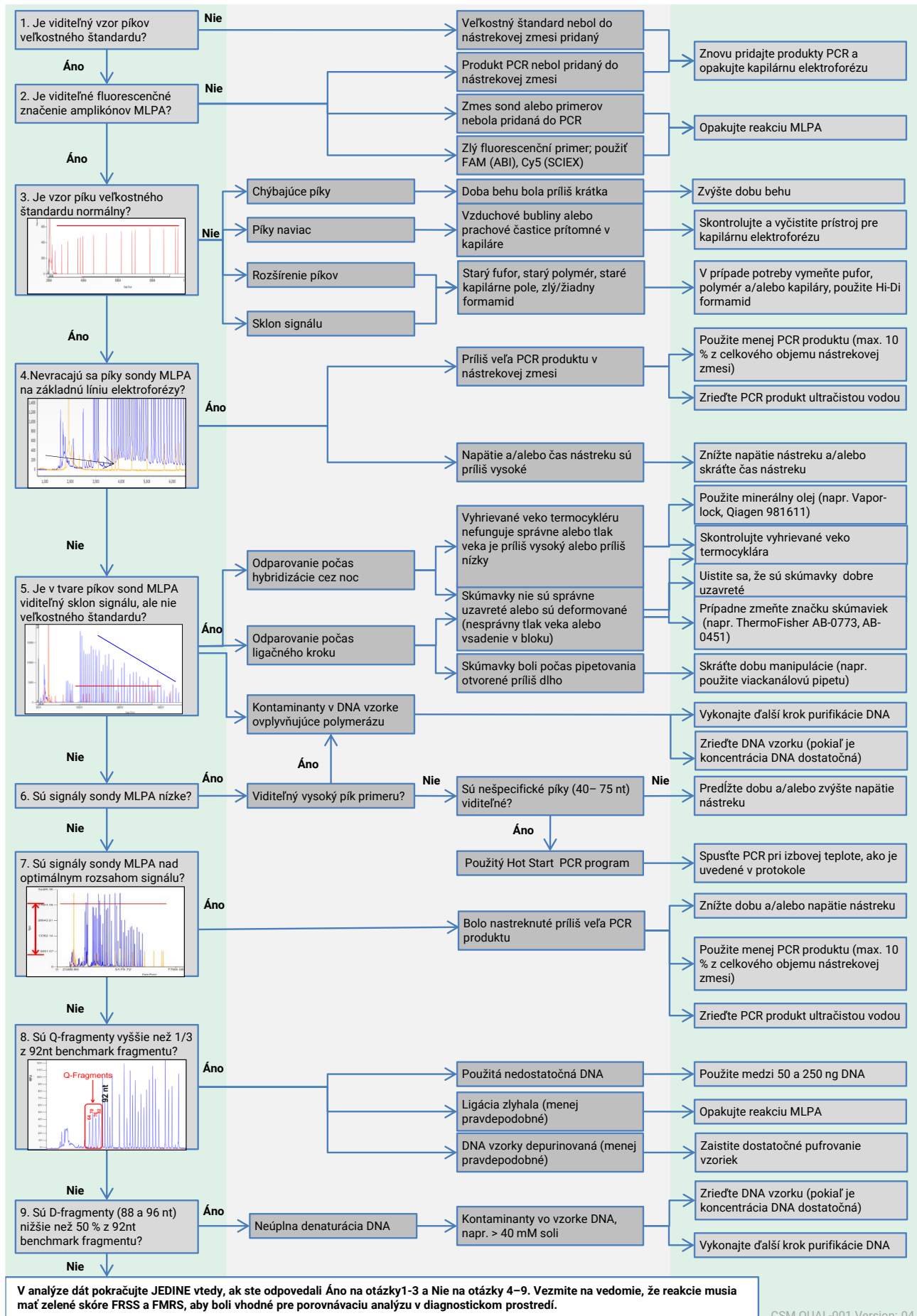
Interpretácia a potvrdenie výsledkov a vlastností z hľadiska funkčnej spôsobilosti

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 spôsobiť 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. Sekvenčné zmeny v Hhal mieste môžu viesť k falošne pozitívnemu metylačnému výsledku. 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 MS-MLPA kvôli skresleniu amplifikácie a odstráneniu metylačného podpisu.
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 a metylácie detegované MLPA sú patogénne. MRC Holland nemôže poskytnúť informácie, či konkrétna delécia alebo duplikácia či aberantná metylácia bude mať za následok ochorenie.
11. DNA vzorky ošetrené bisulfitom nie sú vhodné pre MS-MLPA reakcie.
12. Väčšina sond MS-MLPA deteguje metyláciu jedného Hhal miesta (GC^mGC), nájdeného v sekvencii detegovanej sondou. Ak pre toto konkrétne miesto CpG metylácia chýba, nemusí to nevyhnutne znamenať, že je celý ostrovček CpG nemetylovaný! Nemáme žiadne dáta ktoré by ukazovali, že metylácia, detegovaná konkrétnou sondou skutočne ovplyvňuje hladinu mRNA tohto génu.

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.

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.

Ďalšie informácie	
www.mrcholland.com ; support.mrcholland.com	
	MRC Holland BV; Willem Schoutenstraat 1 1057 DL, Amsterdam, the Netherlands
E-mail	info@mrcholland.com (informácie a technické otázky); order@mrcholland.com (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.



Implemented changes in the protocol
<p>Verzia 014-SK1 – 21. mája 2025</p> <ul style="list-style-type: none"> - ABI SeqStudio Flex premenované na ABI SeqStudio Flex RUO/Dx na strane 4. - Chyba vo vývojovom diagrame na strane 5 bola opravená. <p>Verzia-013-SK1 – 20. júna 2024</p> <ul style="list-style-type: none"> - Predchádzajúce verzie dokumentu sú dostupné iba v angličtine. - Protokol dostal novú štruktúru a nový design. - Tabuľky v komponentoch testu MLPA SALSA boli nahradené odkazmi na popisy komponentov produktov. - Časť o ďalšej reagenčnej súprave pre PCR bola odstránená. - Časť o štandardných štítkoch na obaloch bola odstránená. - Časť o princípe MS-MLPA bola prepísaná a bol vylepšený obrázok pracovného postupu. Obrázok o výpočtoch bol odstránený. - Časť „Požadované, ale neposkytované materiály“ bola aktualizovaná. - 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“. - Časť „Výber referenčných a iných kontrolných vzoriek“ bola odstránená, pretože tieto informácie sú tiež uvedené v popisoch produktov. - Informácie v kapitole 3 „Poznámky, ktoré je potrebné si prečítať pred zahájením“ boli presunuté do časti I skúšobného postupu. - Informácie v kapitole 5 a 6 (Skrátený protokol MS-MLPA a Protokol MS-MLPA) boli spojené v časti I skúšobného postupu v novom tabuľkovom formáte. - Pokyn k vyňatiu skúmaviek z termocykléra po denaturácii a ich umiestnení späť po pridaní hybridizačnej zmesi master mix bol odstránený. - Pokyn k vyňatiu skúmaviek z termocykléra po hybridizácii a ich umiestnení späť po pridaní Ligase-65 a Ligase-Digestion master mix bol odstránený. - Pokyn k umiestneniu skúmaviek do termocykléra pred pridaním polymerázovej zmesi master mix bol odstránený, pretože neexistuje žiaden predchádzajúci pokyn k ich vyňatiu. - Bol pridaný pokyn, aby sa skúmavky po pridaní Polymerase master mix neatáčali. - Do časti I skúšobného postupu bola pridaná poznámka pod čiarou s pokyny pre situácie, kedy sú skúmavky odnesené do samostatného laboratória pre PCR. - Informácie v časti 7.1. „Poznámky, ktoré je potrebné si prečítať pred zahájením,“ sa presunuli do časti Preventívne opatrenia a výstrahy. - Tabuľka o rozsahu signálov v prístrojoch pre kapilárnu elektroforézu v časti 7.2. bola nahradená odkazom na zodpovedajúcu tabuľku v Referenčnej príručke k nástroju Coffalyser.Net. - Informácie v kapitole 8 (Kontrola kvality a riešení problémov) boli nahradené odkazy na Referenčnú príručku k nástroju Coffalyser.Net a články vedomostnej báze o kontrolných fragmentoch a kontrolách bez DNA. - Kapitola 9 (Analýza dát) bola nahradená pokynmi k stiahnutiu nástroja Coffalyser.Net a preštudovaniu Referenčnej príručky k nástroju Coffalyser.Net. - 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.