

MS-MLPA 일반 프로토콜

필요한 구성요소

이름	카탈로그 번호	성분
SALSA® MLPA® probemix	Probemix 제품 설명 참조	합성 올리고뉴클레오타이드, 비병원성 박테리아 균주를 사용하여 합성된 올리고뉴클레오타이드, Tris-HCl 및 EDTA



To be used with:

- SALSA® MLPA® Reagent Kit (Cat. No: EK1-FAM, EK1-CY5, EK5-FAM, EK5-CY5, EK20-FAM)
- SALSA® HhaI (Cat. No: SMR50)
- 데이터 분석 소프트웨어 Coffalyser.Net™ (Cat. No: n.a.)

특정 응용 프로그램의 경우 다음과 함께 사용할 수 있습니다:

이름	카탈로그 번호	성분
SALSA® Binning/Reference Selection DNA	SDXXX	Tris-HCl, EDTA, 합성/컨트롤 플라스미드 DNA, 인간 유전체 여성 DNA, 세포주 DNA

성분의 보관 및 유효기간

권장 조건		
-------	---	---

권장 조건에서 원래 포장에 보관할 경우 개봉 후에도 유통기한까지 보장됩니다. 정확한 유통기한은 바이알 라벨을 참조하십시오. 제품은 25 회 이상의 동결-해동 주기에 노출되어서는 안 됩니다. 도착 시 포장 손상이거나 개봉된 경우 제품을 사용하지 마십시오. 제품은 원래 용기에 담아 두십시오. 폐기물은 국가 및 지역 규정에 따라 폐기해야 합니다.

성분의 안전성

어떤 성분도 인간, 동물, 병원성 박테리아 또는 병원성 바이러스에서 유래되지 않았습니다. 존재하는 농도를 기준으로, 어떤 성분도 Hazard Communication Standard 에서 정의한 대로 위험하지 않습니다. 이러한 제품에는 [Safety Data Sheet \(SDS\)](#) 가 필요하지 않습니다. 어떤 제제도 SDS 를 배포해야 하는 농도의 위험 물질을 포함하지 않습니다 (Regulation (EC) No 1272/2008 [EU-GHS/CLP] 및 1907/2006 [REACH] 및 개정안에 따라). 유출이 발생하면 물로 세척하고 적절한 현장 절차를 따르십시오.

분석 원리 (MS-MLPA)

Methylation-specific MLPA (MS-MLPA)는 각각 특정 DNA 서열을 감지하는 최대 60 개 프로브의 증폭을 기반으로 하는 반정량적 기술입니다. 이 기술은 샘플 DNA 의 denaturation 으로 시작합니다 (아래 그림 1 참조). 다음으로, 각 프로브가 2 개 또는 3 개의 올리고뉴클레오타이드로 구성된 MLPA 프로브 혼합물을 추가합니다. 모든 올리고의 샘플 DNA 에 대한 hybridization 이 완료되면 혼합물을 두 개의 튜브로 나눕니다.

두 튜브의 프로브는 모두 ligation 되지만, 두 번째 혼합물은 HhaI 로 처리하여 메틸화되지 않은 표적에 hybridization 된 프로브를 digestion 합니다. 다음으로, ligation 모든 프로브는 형광 표지 된 범용 PCR primer pair 를 사용하여 동시에 증폭됩니다. 그 결과 각 프로브에 고유한 PCR amplicon 세트가 생성되고 각각은 고유한 길이를 갖습니다. 그런 다음 amplicon 은 모세관 전기영동 장비에서 길이에 따라 분리됩니다. 생성된 샘플 별 electropherogram 은 Coffalyser.Net 을 사용하여 분석합니다. Digestion 된 샘플과 digestion 되지 않은 샘플의 데이터를 유사하게 처리한 참조 샘플과 비교하면 대상 시퀀스의 메틸화 상태의 변화가 드러납니다.

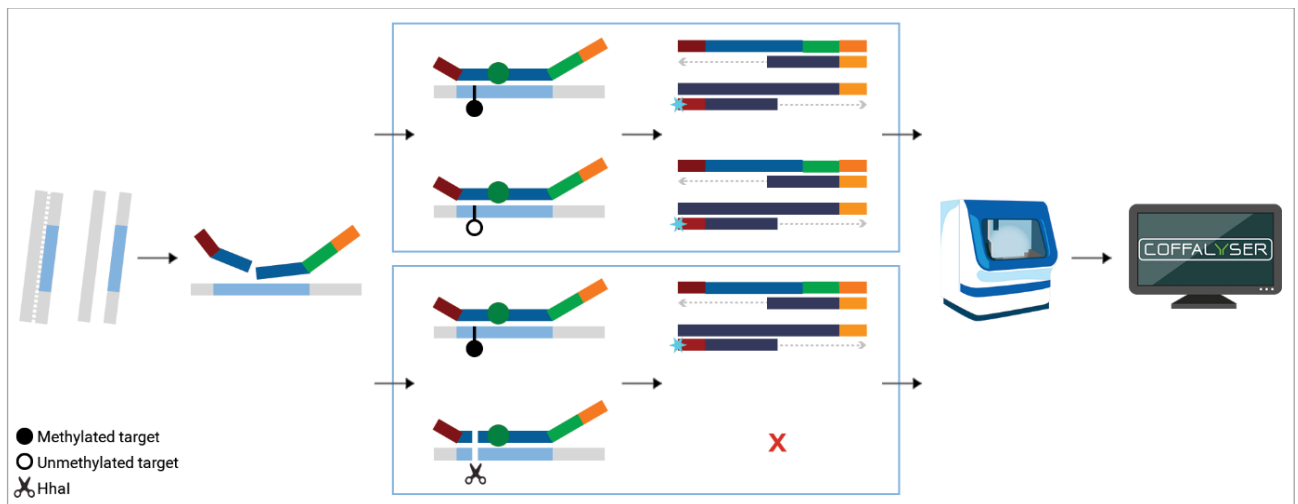


그림 1. MS-MLPA 작업 흐름

필요하지만 제공되지 않는 재료

- Ultrapure water
- TE_{0.1} (10 mM Tris-HCl pH 8.0 + 0.1 mM EDTA)
- Heated lid (99-105°C)가 있는 교정된 thermocycler 및 표준 실험실 장비
- 0.2 ml PCR 튜브/스트립/플레이트
- 변성 조건에서 작동하고 단편 분석 소프트웨어가 있는 모세관 전기영동 기기. [이 도움말 센터 문서](#)에서 자세한 내용 참조.
- 고품질 폼아마이드
- 표지 된 사이즈 스탠다드: Applied Biosystems GeneScan™ 500 LIZ®/ROX™; SCIEX CEQ™ DNA Size Standard kit - 600
- 겔 폴리머: POP-1, POP-4 or POP-7 (Applied Biosystems); GenomeLab™ Linear Polyacrylamide denaturing gel (SCIEX); Spectrum Compact Polymer4 (Promega); Hitachi DS3000 Polymer4 (Hitachi)

샘플 요구 사항

50-250 ng 의 인간 DNA (달리 명시되지 않는 한)를 probemix 제품 설명에 명시된 조직에서 추출합니다. DNA 샘플에는 5-10 mM Tris-HCl buffer pH 8.0-8.5 가 포함되어야 합니다.

관장 추출 방법:

- QIAGEN Autopure LS (자동) 및 QIAamp DNA mini/midi/maxi kit (수동)
- Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (수동)
- Salting out (수동)

주의 및 경고

일반 주의사항

1. 제품이 손상되었거나 만료 된 경우 사용하지 마십시오.
2. 전문가용으로만 사용하십시오. 분석은 분자 기술에 대한 교육을 받은 전문가가 수행해야 합니다.
3. 각 분석의 내부 검증이 필요합니다. 특히 처음 사용하거나 샘플 처리 절차, DNA 추출 방법 또는 사용된 기기를 변경할 때 필요합니다. 건강한 개인의 ≥16 개의 다른 DNA 샘플을 사용하십시오. 검증은 probemix 제품 설명에 다르게 설명되어 있지 않는 한 모든 프로브에 대해 표준 편차 ≤0.10 을 보여야 합니다.
4. 결과 해석을 담당하는 사람은 응용 프로그램에 대한 최신 과학적 지식과 잘못된 결과로 이어질 수 있는 MLPA 기술의 제한 사항을 알고 있어야 합니다.
5. 데이터 분석에는 Coffalyser.Net 을 사용해야 합니다. 다른 소프트웨어를 사용하면 잘못된 결과가 나올 수 있습니다..
6. 결과를 해석하기 전에 항상 품질 관리 점수를 확인하십시오. 품질 점수가 좋은 샘플의 결과만 신뢰할 수 있게 해석할 수 있습니다.
7. 명백한 동형접합성 결실은 전기영동도의 시각적 검사로 확인하여 bin 문제나 낮은 시그널로 인한 거짓 결과를 배제해야 합니다.
8. MLPA 결과는 대체 방법, 부모 평가, 임상 유전 평가 및 상담을 포함한 전문적 실무 표준에 따라 다른 임상 및 진단 결과와 함께 사용하도록 의도되었습니다. 검사 결과는 임상 분자 유전학자 또는 동등한 사람이 해석해야 합니다.

샘플 품질 주의사항

9. 샘플 DNA 의 버퍼 용량이 부족하여 DNA depurination 로 인해 거짓 결과가 나올 수 있습니다. 버퍼가 충분한지 알 수 없는 경우 Tris-HCl 을 추가합니다: 샘플 DNA 4µl + 50mM Tris-HCl pH 8.5 1µl.
10. Salt, heparin, EDTA (>1.5mM) 및 iron 을 포함하여 DNA 추출 후 남아 있는 오염 물질은 분석 성능에 영향을 미칠 수 있습니다
11. DNA 샘플의 salt 는 변성을 일으킬 수 있습니다. 이는 인접한 게놈 타겟을 인식하는 여러 프로브의 경우에도 명백한 결실을 초래할 수 있습니다. QIAGEN M6, M48 및 M96 시스템은 사용하지 마십시오. 이 시스템은 너무 많은 salt 를 남깁니다. QIAGEN EZ1 의 경우 MLPA 용 QIAGEN 보충 프로토콜을 사용하십시오.
12. 증발 또는 SpeedVac 으로 DNA 를 농축하지 마십시오. 이렇게 하면 EDTA 및 염 농도가 높아집니다.

실행 중 주의사항

13. 반응 당 5 µl 이상의 DNA 용액을 사용하지 마십시오. 필요한 DNA 양은 probemix 제품 설명에 명시되어 있습니다.
14. 다른 로트의 MLPA probemix 를 혼합하지 마십시오.
15. 오염 물질과 염분 농도를 증가시키는 증발은 야간 hybridization 중 또는 ligation master mix 를 피펫팅할 때 발생할 수 있습니다. 증발을 방지/줄이려면:
 - a. 멀티 채널 피펫을 사용하여 취급 시간을 줄입니다;
 - b. Heated lid 가 올바르게 작동하는지 확인합니다;
 - c. Heated lid 의 압력을 높이거나 낮춥니다;
 - d. 다른 반응 튜브를 사용해 봅니다;
 - e. DNA 샘플 위에 미네랄 오일을 소량 EJDDJEMFU 액체 표면을 덮습니다.
16. 모세관과 폴리머를 정기적으로 교체합니다. 폴리머는 25°C 이상에 장시간 노출되면 빠르게 저하 (deteriorate)됩니다. 사이즈 스탠다드 피크가 반복적으로 낮고 넓으면 모세관이나 폴리머가 저하되었을 수 있습니다.
17. 폼아마이드는 산성이 되어 가열 시 PCR 생성물의 depurination 및 단편화를 일으킬 수 있습니다. 고품질 폼아마이드를 사용하고 -20°C 에서 분주하여 보관하세요.
18. PCR product 의 양은 총 주입 혼합물의 10%를 초과해서는 안 됩니다. 피크가 낮으면 주입 시간 및/또는 전압을 늘리고 PCR 생성물을 더 추가하지 마세요.
19. 하나 이상의 피크가 스케일을 벗어나면 잘못된 결과를 얻을 수 있습니다. 프로브 수가 비교적 적은 probemix 를 사용하면 스케일을 벗어난 피크의 위험이 더 높습니다. 시그널을 줄이려면 다음을 사용하여 PCR product 를 다시 run 합니다.:
 - a. 낮은 injection voltage / 짧은 injection time;
 - b. PCR product 의 감소된 양.
20. 개별 엑손의 cDNA 또는 PCR amplicon 으로 DNA 샘플이 오염되면 프로브 시그널이 증가할 수 있습니다. 독립적으로 수집 및 분리된 두 번째 DNA 샘플을 분석하면 이러한 오염 인공물 (artefact)을 배제할 수 있습니다.
21. SALSA® HhaI enzyme 은 모든 methylation-specific MLPA (MS-MLPA) 실험에 사용해야 합니다. "HhaI"로 판매되는 여러 효소는 열 불활성화에 저항성이 있으며 MS-MLPA 와 호환되지 않습니다. 여기에는 Thermo Fisher Scientific enzyme HhaI, ANZA 59 HhaI 및 FastDigest HhaI 가 포함되지만 이에 국한되지 않습니다.

적용 분야별 주의사항

Probemix 제품 설명서 참조

테스트 절차 파트 I – MS-MLPA 반응

지침	Thermocycler 프로그램			
1. DNA denaturation				
1.1 0.2 ml 튜브/스트립/플레이트에 라벨.	98°C for 5 min			
1.2 튜브에 5 µl DNA 샘플 또는 TE (DNA 가 없는 대조군) 첨가.				
1.3 튜브를 thermocycler 에 넣고 98°C 에서 5 분간 가열한 후 25°C 로 쿨링.	25°C pause			
2. Hybridisation				
2.1 MLPA Buffer 와 MLPA probemix 를 해동하고, 볼텍싱 한 후 잠시 원심분리. 실온이 되면 피펫팅.	95°C for 1 min			
2.2 HYBRIDISATION MASTER MIX 준비. 한 반응 당*: <ul style="list-style-type: none"> ● MLPA Buffer: 1.5 µl ● MLPA probemix: 1.5 µl 볼텍싱이나 피펫팅으로 잘 믹스.	60°C pause (16-20 h)			
2.3 각 튜브에 HYBRIDISATION MASTER MIX 3 µl 첨가. 이 단계에서는 정확한 피펫팅이 필수! 피펫으로 믹스.				
2.4 튜브를 thermocycler 에 넣고 95°C 에서 1 분간 배양한 후 60°C 에서 16-20 시간 동안 hybridisation.				
3. Ligation and ligation/digestion				
3.1 Ligase Buffer A 와 B 를 해동하고, 볼텍싱 한 후 잠시 원심분리. 실온이 되면 피펫팅. Ligase-65 와 HhaI 을 손에 잡고 10 초간 데움. 볼텍싱하지 말고, 잠시 원심분리.	20°C pause			
3.2 Master mix 준비. 한 반응 당*: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> LIGASE BUFFER A MASTER MIX ● Ultrapure water: 10 µl ○ Ligase Buffer A: 3 µl </td> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> LIGASE-65 MASTER MIX**: ● Ultrapure water: 8.25 µl ○ Ligase Buffer B: 1.5 µl ● Ligase-65: 0.25 µl, added last. </td> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> LIGASE-DIGESTION MASTER MIX**: ● Ultrapure water: 7.75 µl ○ Ligase Buffer B: 1.5 µl ● Ligase-65: 0.25 µl ● SALSA HhaI: 0.5 µl, added last. </td> </tr> </table>	LIGASE BUFFER A MASTER MIX ● Ultrapure water: 10 µl ○ Ligase Buffer A: 3 µl	LIGASE-65 MASTER MIX**: ● Ultrapure water: 8.25 µl ○ Ligase Buffer B: 1.5 µl ● Ligase-65: 0.25 µl, added last.	LIGASE-DIGESTION MASTER MIX**: ● Ultrapure water: 7.75 µl ○ Ligase Buffer B: 1.5 µl ● Ligase-65: 0.25 µl ● SALSA HhaI: 0.5 µl, added last.	48°C pause
LIGASE BUFFER A MASTER MIX ● Ultrapure water: 10 µl ○ Ligase Buffer A: 3 µl	LIGASE-65 MASTER MIX**: ● Ultrapure water: 8.25 µl ○ Ligase Buffer B: 1.5 µl ● Ligase-65: 0.25 µl, added last.	LIGASE-DIGESTION MASTER MIX**: ● Ultrapure water: 7.75 µl ○ Ligase Buffer B: 1.5 µl ● Ligase-65: 0.25 µl ● SALSA HhaI: 0.5 µl, added last.		
위아래로 부드럽게 피펫팅하여 잘 믹스. 볼텍싱하지 않음.	48°C for 30 min			
3.3 Thermocycler 프로그램을 계속하고 튜브를 20°C 로 쿨링.	98°C for 5 min			
3.4 각 튜브에 LIGASE BUFFER A MASTER MIX 13 µl 를 첨가. 위아래로 부드럽게 피펫팅하여 잘 믹스.	20°C pause			
3.5 두 번째 튜브 세트를 thermocycler 에 넣고, 각 튜브에서 혼합물 10 µl 를 두 번째 튜브로 옮긴 후, 48 °C 로 가열하면서 프로그램을 계속.				
3.6 48° thermocycler 에서 튜브를 열고 각 튜브에 LIGASE-65 MASTER MIX 10 µl 를 넣고 피펫으로 잘 믹스 후 튜브를 닫음.				
3.7 두 번째 튜브 각각에 LIGASE-DIGESTION MASTER MIX 10 µl 를 넣고 피펫팅으로 잘 믹스.				
3.8 튜브를 닫고 48°C 에서 30 분 동안 계속 배양.				
3.9 98°C 로 가열하고 5 분 동안 배양하여 Ligase 를 불활성화하고 20°C 로 쿨링.***				
4. PCR				
4.1 PCR Primer Mix 를 해동하고, 볼텍싱 한 후 간단히 원심분리. Polymerase 를 손에 10 초 동안 데우고, 볼텍싱하지 말고, 간단히 원심분리.	35 PCR cycles:			
4.2 POLYMERASE MASTER MIX 준비. 한 반응 당*: <ul style="list-style-type: none"> ● Ultrapure water: 7.5 µl ● PCR Primer Mix: 2 µl ● Polymerase: 0.5 µl 위아래로 피펫팅하여 잘 믹스하고, 볼텍싱하지 않음.	<ul style="list-style-type: none"> ● 95°C for 30 s ● 60°C for 30 s ● 72°C for 60 s 			
4.3 20°C 에서 각 튜브에 POLYMERASE MASTER MIX 10 µl 를 넣고 피펫으로 잘 믹스한 다음 즉시 PCR 프로그램을 계속.	72°C for 20 min			
4.4 PCR 후 오염을 방지하기 위해 같은 방에서 튜브를 열지 말고 다른 마이크로 피펫을 사용하여 PCR product 를 처리	15°C pause			
4.5 PCR product 는 최대 1 주일 동안 4°C 에서 빛으로부터 보호하여 보관하거나 -25°C~-15°C 에서 더 오랜 기간 보관 가능.				

*샘플 변동을 최소화하기 위해 충분히 많은 양의 master mix 용액을 준비합니다: 5-10%의 잉여 용량.

**사전에 준비한 경우 (사용하기 1 시간 전 이내), master mix 를 아이스 위나 4°C 에서 보관하고 튜브에 첨가하기 전에 실온으로 따뜻하게 합니다.

***PCR 을 위해 튜브를 별도의 실험실로 가져갈 때 PCR 을 위해 thermocycler 를 예열합니다 (예: 95°C 에서 1 초간 설정 후 20°C 에서 일시 정지) 이동 시간을 최소화합니다 (예: <5 분), 튜브를 thermocycler 에 넣고 스텝 4.1 을 계속합니다. 이렇게 하면 비특이적 피크 형성이 최소화됩니다.

테스트 절차 파트 II -단편 분리

1. Coffalyser.Net 에서 지원하는 일반적으로 사용되는 모세관 전기영동 장치의 injection 설정	
PCR primer label: FAM	
ABI SeqStudio	Capillaries: 28 cm Injection mixture: • PCR product 0.8 µl • GS500 size standard 0.3 µl (ROX/LIZ) • HiDi formamide 12 µl Injection 플레이트를 밀봉하고, 86° C 에서 3 분간 가열 후 4°C 에서 2 분간 쿨링.
ABI Prism 3100 ABI 3130 (xL) ABI 3500 (xL) ABI 3730 (xL) ABI SeqStudio Flex RUO/Dx	Capillaries: 36 or 50 cm Injection mixture: • PCR product 0.7 µl • GS500 size standard 0.3 µl (ROX) or 0.2 µl (LIZ) • HiDi formamide 9 µl Injection 플레이트를 밀봉하고, 86° C 에서 3 분간 가열 후 4°C 에서 2 분간 쿨링.
Hitachi DS3000*	Injection 플레이트를 밀봉하고, 86° C 에서 3 분간 가열 후 4°C 에서 2 분간 쿨링.
Promega Spectrum Compact*	*36 cm capillary 만 해당
PCR primer label: Cy5	
SCIEX CEQ 2000 SCIEX CEQ 8000 SCIEX CEQ 8800 SCIEX GenomeLab GeXP	Capillaries: 33 cm Injection mixture: • PCR product 1 µl • SS600 size standard 0.5 µl • HiDi formamide / Beckman SLS 28.5 µl 고품질 미네랄 오일 1 방울 첨가.
2. 전기영동 설정	
응용 프로그램, 기기, polymer 및 Capillary 길이에 적합한 기본 단편 분석 설정을 사용합니다. 기기 설정은 시그널이 최적의 검출 범위 내에 있고 실행이 모든 단편을 검출하기에 충분히 길도록 최적화가 필요할 수 있습니다. 최적의 시그널 범위 (RFU)와 기기당 최소/최대 시그널은 Coffalyser.Net Reference Manual 에서 찾을 수 있습니다.	

품질 관리 및 데이터 분석



최신 버전의 Coffalyser.Net™ ([MRC Holland 웹사이트](#)에서 다운로드 가능)을 품질 관리 및 데이터 분석에 사용해야 합니다. 자세한 지침은 [Coffalyser.Net Reference Manual](#)을 참조하세요.

도움말 센터에서 다음 문서도 참조하세요:

- [Explanation about Quantity and Denaturation control fragments](#)
- [Information on no-DNA controls](#)

문제 해결에 대한 추가 도움말은 [MRC Holland Help Centre](#) 의 문제 해결 페이지를 방문하세요.

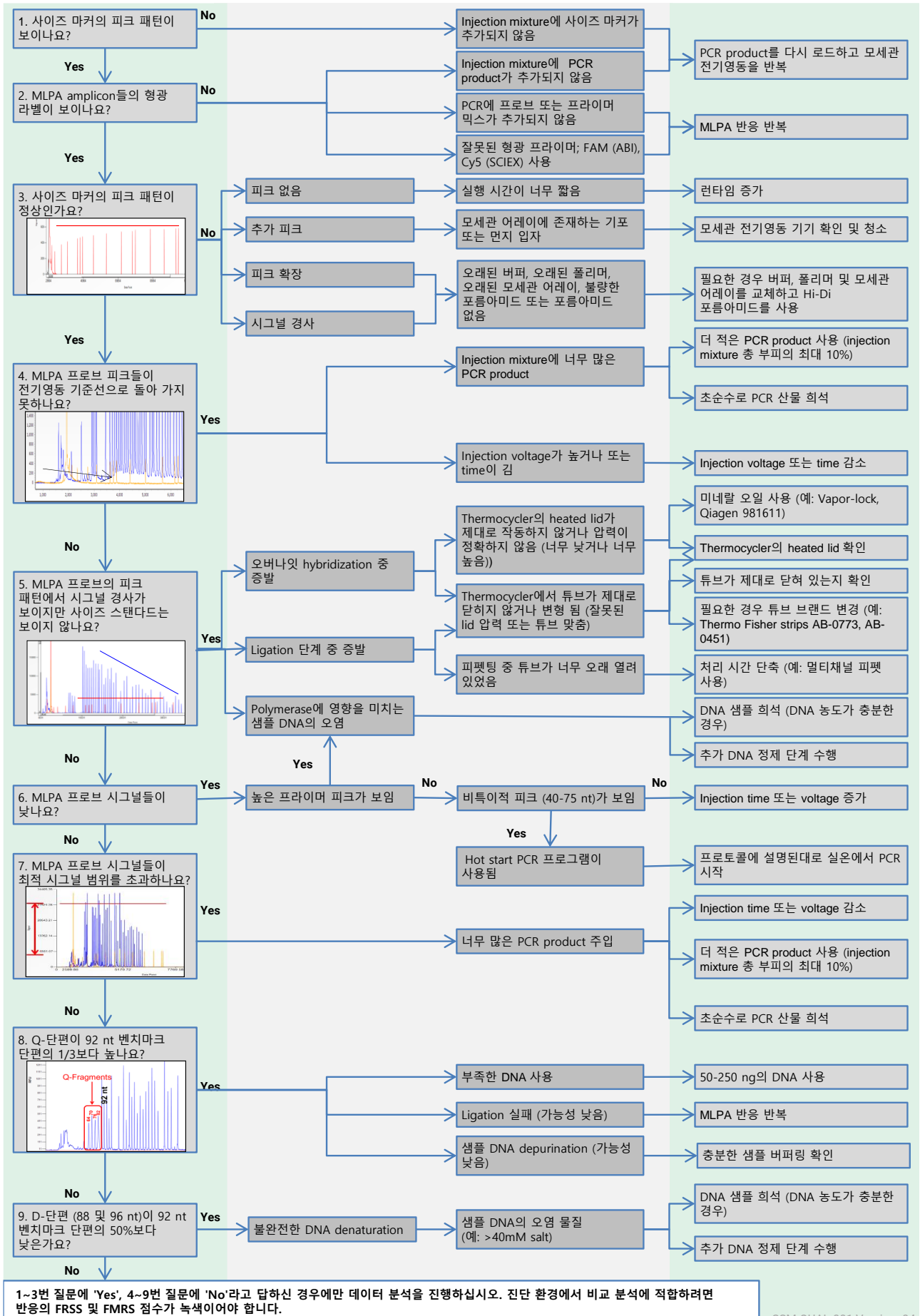
결과 해석 및 확인 & 성능 특성

응용 분야에 따라 다름; probemix 제품 설명 참조.

제한 사항

1. 대부분의 집단과 대부분의 MLPA 응용 프로그램에서 유전적 결함의 주요 원인은 작은 (점) 돌연변이이며, 이 중 대부분은 MLPA 에서 감지되지 않습니다.
2. MLPA 는 MLPA 프로브에서 감지한 (부분적으로) 시퀀스 외부에 있는 대부분의 역위, 균형 전좌 또는 사본 수 변화를 감지하지 못합니다.
3. 분석 성능은 DNA 샘플의 불순물, 불완전한 DNA denaturation (예: salt 오염으로 인해), 불충분하거나 너무 많은 샘플 DNA 사용, 불충분하거나 부적절한 참조 샘플, 모세관 전기영동 문제 또는 불량한 데이터 정규화 절차 및 기타 기술적 오류로 인해 손상될 수 있습니다.
4. 실험 실행의 사소한 차이가 MLPA 피크 패턴에 영향을 미칠 수 있습니다. a) 동일한 MLPA 실험에 포함되었고 b) 동일한 probemix 로트로 테스트된 샘플만 분석에 포함합니다.
5. 특정 케이스의 경우 올바른 결과 해석을 위해 부모 샘플 분석이 필요할 수 있습니다.
6. 특정 사본 수 이상은 전체 염색체의 큰 결실 및 중복을 포함한 체세포 변화로 인해 발생할 수 있습니다.
7. 프로브가 표적으로하는 시퀀스의 작은 변화 (예: SNV, small indels)는 프로브 ligation 부위에서 20 nt 이상 떨어져 있어도 위양성 결과를 초래할 수 있습니다. 시퀀스 변화는 프로브 올리고뉴클레오타이드의 ligation 을 방지하거나 프로브 올리고뉴클레오타이드와 샘플 DNA 의 결합을 불안정하게 만들어 프로브 시그널을 줄일 수 있습니다. HhaI 부위 내의 시퀀스 변화는 HhaI digestion 을 방해하여 위양성 메틸화 시그널을 초래할 수 있습니다. MLPA 에서 감지한 편차는 확인해야 하며 단일 프로브 편차는 항상 확인이 필요합니다. 타겟 영역의 시퀀싱이 권장됩니다.
8. 전체 게놈 증폭 반응의 DNA 는 증폭 편향으로 인해 MLPA 에 적합하지 않습니다.
9. MLPA 검사는 DNA 샘플이 추출된 세포에서 타겟 시퀀스의 평균 사본 수를 제공합니다. 인접한 시퀀스를 타겟팅하는 여러 프로브가 비정상적인 값을 갖지만 결실/중복에 대한 일반적인 임계값에 도달하지 못하는 경우 모자이크가 가능한 원인입니다. 모자이크 사례에서 관찰되는 것과 같은 미묘한 변화는 프로브가 염색체 위치에 따라 배열될 때만 구별될 수 있습니다.
10. MLPA 에서 감지된 모든 사본 수 변화가 병원성인 것은 아닙니다. MRC Holland 는 특정 결실 또는 중복이 질병을 초래할지 여부에 대한 정보를 제공할 수 없습니다.
11. Bisulfite-treated DNA 샘플은 MS-MLPA 반응에 적합하지 않습니다.
12. 대부분의 MS-MLPA 프로브는 프로브에서 감지한 시퀀스 내에서 발견된 단일 HhaI 부위 (GCmeGC)의 메틸화를 감지합니다. 이 특정 CpG-부위에 메틸화가 없다고 해서 반드시 CpG island 전체가 메틸화되지 않았다는 것을 의미하지는 않습니다! 특정 프로브에 의해 감지된 메틸화가 실제로 해당 유전자의 mRNA 수준에 영향을 미치는지 보여주는 데이터는 없습니다.

문제해결 흐름 차트



CSM.QUAL-001 Version: 04

더 자세한 내용

온라인 교육 비디오 [How to perform an MLPA reaction.](#)

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.

더 자세한 정보	
www.mrcholland.com ; support.mrcholland.com	
	MRC Holland BV; Willem Schoutenstraat 1 1057 DL, Amsterdam, the Netherlands
이메일	info@mrcholland.com (정보 및 기술 문의); order@mrcholland.com (주문)
전화	+31 888 657 200

MRC Holland, SALSA, MLPA, digitalMLPA, Coffalyser.Net, Coffalyser digitalMLPA, 및 해당 로고는 MRC Holland BV 의 상표 또는 등록 상표입니다. 여기에 있는 다른 모든 브랜드와 이름은 해당 소유자의 재산입니다.



프로토콜에서 구현된 변경 사항
<p>버전 014-KO1 - 2025 년 5 월 21 일</p> <ul style="list-style-type: none"> - ABI SeqStudio Flex 가 4 페이지에서 ABI SeqStudio Flex RUO/Dx 로 이름이 변경되었습니다. <p>버전 013-KO1 - 2024 년 6 월 20 일</p> <ul style="list-style-type: none"> - 프로토콜에 새로운 구조와 새로운 디자인 적용. - SALSA MLPA 분석 구성 요소의 표를 구성 요소의 제품 설명에 대한 참조로 대체. - 추가 PCR 시약 키트에 대한 섹션 제거. - 표준 포장 라벨에 대한 섹션 제거. - MS-MLPA 원리에 대한 섹션이 다시 작성되고 업무 절차 그림 개선. 계산에 대한 그림이 제거. - 필요하지만 제공되지 않은 재료 섹션 업데이트. - 샘플 처리 및 보관 섹션의 정보 재구성. 섹션이 더 짧아지고 샘플 요구 사항으로 이름 변경. 일부 정보가 예방 조치 및 경고로 이동. - 참조 및 기타 컨트롤 샘플 선택 섹션은 해당 정보가 제품 설명에도 있으므로 제거. - 챗터 3 의 시작하기 전에 읽어야 할 참고 사항 정보가 테스트 절차 파트 1 로 이동. - 챗터 5 와 6 (MLPA 프로토콜 간략 요약 및 MLPA 프로토콜)의 정보가 테스트 절차 파트 1 에 새로운 표 형식으로 결합. - Denaturation 후 튜브를 thermocycler 에서 제거하고 Hybridisation master mix 를 첨가한 후 다시 넣는 것에 대한 지침 제거. - Hybridization 후 튜브를 thermocycler 에서 제거하고 Ligase-65 와 Ligase-Digestion master mix 를 첨가한 후 다시 넣는 것에 대한 지침 제거. - Polymerase master mix 를 넣기 전에 튜브를 thermocycler 에 위치 시키라는 지침은 튜브를 제거하라는 지침이 없기 때문에 제거. - Polymerase master mix 를 첨가한 후 튜브를 스핀다운하지 말라는 지침 추가. - PCR 을 위해 튜브를 별도의 실험실로 가져갈 때의 상황에 대한 지침을 제공하는 각주를 테스트 절차 파트 1 에 추가. - 섹션 7.1 의 정보. 시작하기 전에 읽어야 할 참고 사항을 예방 조치 및 경고로 이동. - 섹션 7.2 의 모세관 전기영동 기기의 시그널 범위에 대한 표를 Coffalyser.Net Reference Manual 의 해당 표에 대한 참조로 대체. - 챗터 8 (품질 관리 및 문제 해결)의 정보를 Coffalyser.Net Reference Manual 와 컨트롤 단편 및 no-DNA 컨트롤에 대한 지식 기반 문서에 대한 참조로 대체. - 챗터 9 (데이터 분석)은 Coffalyser.Net 을 다운로드하고 Coffalyser.Net Reference Manual 을 읽으라는 지침으로 대체. - 챗터 10 (해석 및 확인)의 정보는 특정 적용 분야에만 국한되기 때문에 예방 조치 및 경고 또는 제한 사항으로 이동되었거나 삭제.