



Obecný protokol MLPA®

Návod k použití

MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) Obecný protokol MLPA pro detekci a kvantifikaci DNA sekvencí.

Tento protokol obsahuje informace, které jsou nezbytné pro dosažení spolehlivých výsledků MLPA. Seznamte se s ním v celé jeho délce a používejte jej v kombinaci s manuálem k příslušnému probemixu MLPA.

Reagenční kity SALSA® MLPA® a analytický software Coffalyser.Net jsou v konkrétních zemích registrovány pro diagnostické použití in vitro (IVD) (viz www.mrcholland.com). Ve všech ostatních zemích jsou tyto produkty určeny pouze pro výzkumné účely (RUO). Při použití probemixu registrovaného pro IVD je nezbytné kombinovat jej s reagenčními kity SALSA® MLPA® a analytickým softwarem Coffalyser.Net. Informace ohledně zemí, kde jsou probemixy registrované pro IVD, naleznete v příslušném produktovém manuálu a na adrese www.mrcholland.com.

Pro detekci počtu kopií DNA a stavu metylace (MS-MLPA®) existuje samostatný protokol. Tento protokol je k dispozici na www.mrcholland.com.



Výrobce : MRC Holland B.V. Willem Schoutenstraat 1, 1057 DL Amsterdam, Nizozemsko
Web: www.mrcholland.com; Telefon : +31 888 657 200
E-mail: info@mrcholland.com (informace a technické dotazy), order@mrcholland.com (objednávky)

Obsah

1.	ÚVOD	2
1.1.	SOUČÁSTI A PODMÍNKY SKLADOVÁNÍ	2
1.1.1.	ČÍSLA POLOŽEK REAGENČNÍHO KITU	2
1.1.2.	SOUČÁSTI REAGENČNÍHO KITU	3
1.1.3.	MLPA PROBEMIX	3
1.1.4.	OPATŘENÍ PRO UCHOVÁNÍ A DOBA POUŽITELNOSTI	3
1.1.5.	OBALOVÉ ŠTÍTKY	3
1.2.	PRINCIP TESTU MLPA	3
2.	POKYNY PRO PŘÍPRAVU TESTU	4
2.1.	POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ BALENÍ	4
2.2.	PŘÍPRAVA VZORKŮ A SKLADOVÁNÍ	5
2.3.	VÝBĚR REFERENČNÍCH A DALŠÍCH KONTROLNÍCH VZORKŮ	5
3.	NEŽ ZAČNETE	6
4.	INFORMACE KRITICKY DŮLEŽITÉ PRO ZÍSKÁNÍ DOBRÝCH VÝSLEDKŮ	6
5.	PROTOKOL MLPA – STRUČNĚ	6
6.	PROTOKOL MLPA	7
6.1.	PROGRAM TERMOCYKLÉRU PRO MLPA REAKCI	7
6.2.	DENATURACE DNA (DEN 1)	7
6.3.	HYBRIDIZAČNÍ REAKCE (DEN 1)	7
6.4.	LIGAČNÍ REAKCE (DEN 2)	7
6.5.	PCR REAKCE (DEN 2)	7
7.	SEPARACE FRAGMENTŮ POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY	8
7.1.	ČTĚTĚ PŘED ZAPOČETÍM	8
7.2.	TECHNICKÁ SPECIFIKACE PRO ELEKTROFORÉZU	8
8.	KONTROLA KVALITY MLPA A ODSTRAŇOVÁNÍ PROBLÉMŮ	8
8.1.	KONTROLNÍ FRAGMENTY	8
8.2.	NEGATIVNÍ KONTROLA	9
8.3.	EVAPORACE	10
8.4.	POSTUP KONTROLY KVALITY	11
9.	ANALÝZA DAT	12
10.	INTERPRETACE A POTVRZENÍ	12
11.	BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ A UPOZORNĚNÍ	12
12.	OMEZENÍ TOHOTO POSTUPU	12

1. ÚVOD

Variabilita počtu kopií (CNV) je významným zdrojem genetické variace v lidské DNA a má svůj význam u velkého počtu chorob. Mnohonásobná amplifikace závislá na ligaci sond (tzv. MLPA[®]) představuje semikvantitativní, neautomatizovanou techniku, která se používá ke stanovení relativního počtu kopií až 60 DNA sekvencí v rámci jediné reakce využívající multiplexní PCR.

1.1. SOUČÁSTI A PODMÍNKY SKLADOVÁNÍ

1.1.1. ČÍSLA POLOŽEK REAGENČNÍHO KITU

Kat. č.	Popis	Počet reakcí	Fluorescenční barvivo
EK1-FAM or EK1-Cy5	Reagenční kit SALSA MLPA EK1	100	FAM nebo Cy5
EK5-FAM or EK5-Cy5	Reagenční kit SALSA MLPA EK5	500	FAM nebo Cy5
EK20-FAM	Reagenční kit SALSA MLPA EK20	2000	FAM

1.1.2. SOUČÁSTI REAGENČNÍHO KITU

Součást reagenčního kitu	Objemy			Složky ¹
	EK1	EK5	EK20	
SALSA MLPA Buffer (žlutý uzávěr)	180 µl	5×180 µl	5×700 µl	KCl, Tris-HCl, EDTA, PEG-6000, DTT, oligonukleotidy
SALSA Ligase-65 (zelený uzávěr)	115 µl	5×115 µl	5×460 µl	Glycerol, EDTA, DTT, KCl, Tris-HCl, neiontový detergent, Ligáza-65 (bakteriální původ)
SALSA Ligase Buffer A (průhledný uzávěr)	360 µl	5×360 µl	5×1420 µl	Coenzyme NAD (bakteriální původ)
SALSA Ligase Buffer B (bílý uzávěr)	360 µl	5×360 µl	5×1420 µl	Tris-HCl, MgCl ₂ , neiontový detergent
SALSA PCR Primer Mix (hnědý uzávěr)	240 µl	5×240 µl	5×940 µl	Syntetické oligonukleotidy s fluorescenčním barvivem (FAM nebo Cy5), dNTPs, Tris-HCl, KCl, EDTA, neiontový detergent
SALSA Polymerase (oranžový uzávěr)	65 µl	5×65 µl	5×240 µl	Glycerol, neiontový detergent, EDTA, DTT, KCl, Tris-HCl, polymeráza (bakteriální původ)

1.1.3. MLPA PROBEMIX

MLPA probemix	Nabízené objemy (R= počet reakcí)	Složky
Probemix* (černý uzávěr)	40 µl (25R), 80 µl (50R), 160 µl (100R)	Syntetické oligonukleotidy, oligonukleotidy purifikované z bakterií, Tris-HCl, EDTA
Vzorek DNA [#] (SD) (modrý uzávěr)	30 µl nebo 100 µl	Tris-HCl, EDTA, syntetická/kontrolní plazmidová DNA, lidská genomová DNA (ženská), DNA z buněčné linie











* Probemixy jsou určeny k použití pouze v kombinaci s reagenčními kity SALSA MLPA.

[#] Zkumavka SD (reference (selekcce), binning nebo umělý duplikátní vzorek DNA) je buď součástí dodávky probemixu, nebo ji lze objednat zvlášť. Objemy a složky se odvíjí od typu SD.

1.1.4. OPATŘENÍ PRO UCHOVÁNÍ A DOBA POUŽITELNOSTI

Všechny součásti musí být uloženy ihned po jejich doručení a po použití, a to při teplotě mezi -25°C a -15°C, chráněny před světlem a v původním obalu. Při skladování za doporučených podmínek je zaručena možnost použití do data expirace (i po otevření). Přesné datum expirace naleznete na štítcích na každé zkumavce. Výrobky by neměly být vystaveny více než 25 cyklům zmrazení a rozmrazení.

1.1.5. OBALOVÉ ŠTÍTKY

	Výrobce		Uchovávejte při
	Číslo šarže		Chraňte před teplem a přímým slunečním zářením.
	Datum expirace		Katalogové číslo
	Počet testů		Před použitím se seznamte s návodem
	Diagnostika in vitro		Pouze pro výzkumné účely.

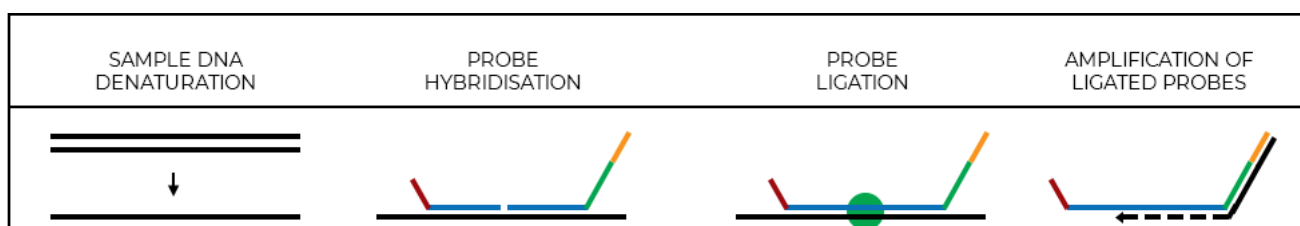
1.2. PRINCIP TESTU MLPA

Princip MLPA je založen na amplifikaci až 60 sond, z nichž každá detekuje specifickou sekvenci DNA o délce přibližně 60 nt (Obrázek 1)². Výsledkem MLPA reakce je soubor jedinečných PCR amplikonů o délce 64 až 500 nt, které jsou separovány kapilární elektroforézou. Po denuraci DNA vzorku se ke vzorku přidá směs MLPA sond.

¹ Žádná ze součástí nepochází od lidí, zvířat nebo patogenních bakterií. Na základě přítomných koncentrací není žádná součást nebezpečná dle definice normy o sdělování rizik Hazard Communication Standard. **Bezpečnostní list (SDS) není vyžadován u těchto výrobků:** žádný z přípravků neobsahuje nebezpečné látky (podle nařízení (ES) č. 1272/2008 [EU-GHS/CLP] a příslušných změn) v koncentracích vyžadujících distribuci BL (podle nařízení (ES) č. 1272/2008 [EU-GHS/CLP] a 1907/2006 [REACH] a příslušných změn). Pokud dojde k rozlití, umyjte vodou a dodržujte příslušné postupy platné na pracovišti.

² Schouten JP et al. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 30:e57.

Obecně řečeno, každá MLPA sonda sestává ze dvou oligonukleotidů, které musí hybridizovat s přímo sousedícími cílovými sekvencemi, aby byly ligovány do jediné sondy (Obrázek 1). Během následné PCR reakce jsou všechny ligované sondy amplifikovány s použitím stejného páru primerů, čímž vzniká soubor jedinečných PCR amplikonů. Jeden PCR primer je fluorescenčně označen, což umožňuje vizualizaci produktů amplifikace během separace fragmentů na elektroforetickém analyzátoru. Separace fragmentů poskytuje elektroferogram specifický pro vzorek: profil píků (Obrázek 2, nahoře).



Obrázek 1. Reakce MLPA.

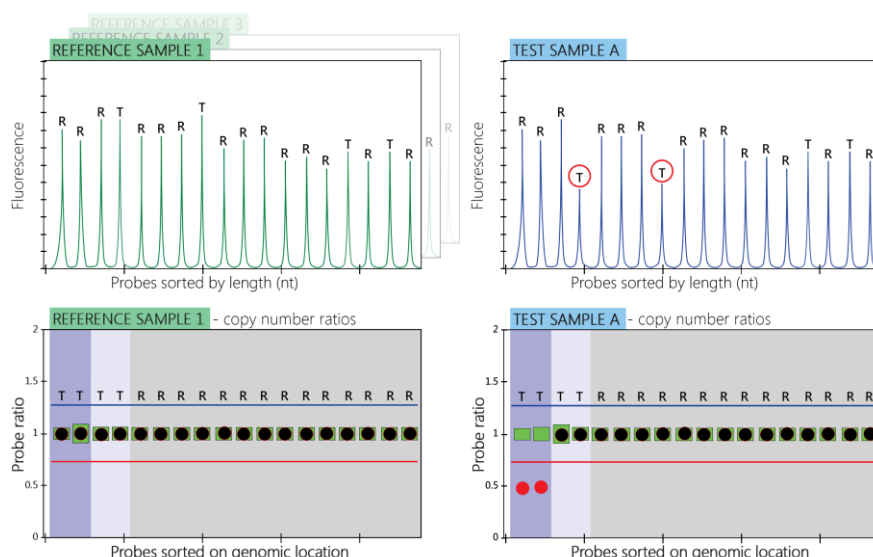
MLPA představuje relativní metodu: porovnáním MLPA píků vzorků DNA lze detekovat pouze relativní rozdíly. Relativní výška každého jednotlivého píku sondy odráží (ve srovnání s relativními výškami píků sondy v různých referenčních vzorcích DNA) relativní počet kopií příslušné cílové sekvence ve vzorku. Zahrnutí referenčních vzorků do runu je proto nezbytné. Delece jedné nebo více cílových sekvencí se projevuje jako relativní snížení výšky píku (Obrázek 2, dole), zvýšení relativní výšky píku naopak značí zvýšení počtu kopií.

Obrázek 2. Porovnání dat.

Nahoře: Elektroferogram testovaného vzorku A (vpravo) je porovnán s elektroferogramem referenčních vzorků (vlevo). Ve vzorku A je možné pozorovat relativní pokles u dvou sond (zakroužkováno červeně).

Dole: Vypočítané poměry sond vzorku A (vpravo) normalizované k referenčním vzorkům (vlevo) – obrázek ze softwaru Coffalyser.Net. Uspořádání sond podle polohy na chromozomu ukazuje na heterozygotní deleci (poměr 0,5) v testovaném vzorku (červené tečky).

T: cílové sondy, R: cílové sondy.



2. POKYNY PRO PŘÍPRAVU TESTU

2.1. POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ BALENÍ

- Ultračistá voda
- TE_{0.1} (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM EDTA)
- Kalibrovaný termocyklér s vyhřívaným víkem (99–105°C) a standardní laboratorní vybavení
- 0,2 ml PCR zkumavky, stripy nebo destičky
- Kapilární elektroforetický analyzátor³ se softwarem pro fragmentační analýzu
 - Applied Biosystems: Standard Foundation Data Collection Software
 - SCIEX: GeXP Software Package
- Vysoce kvalitní formamid (např. Hi-Di Formamide, Applied Biosystems)
- Velikostní standard
 - Applied Biosystems: GeneScan™ 500 LIZ®/ROX™ (preferovaný, nutný pro použití s probemixy registrovanými pro IVD), GeneScan™ 600 LIZ®, GeneScan™ 500 TAMRA™
 - SCIEX: CEQ™ DNA Size Standard Kit - 600

³ Kapilární elektroforetické analyzátoři, které nevyužívají denaturační podmínky, jako např. QIAGEN QIAxcel nebo Agilent Fragment Analyzer, nelze pro MLPA použít.

- Polymery
 - Applied Biosystems: Preferovány jsou POP-4 nebo POP-7. POP-6 není doporučen z důvodu jeho vysokého rozlišení.
SeqStudio: POP-1 je integrován v kartridži a je možné jej použít.
 - SCIEX: GenomeLab™ Linear Polyacrylamide (LPA) denaturační gel
 - Analytický software Coffalyser.Net (volně ke stažení na www.mrcholland.com)

2.2. PŘÍPRAVA VZORKŮ A SKLADOVÁNÍ

- Použijte celkové množství 50-250 ng lidské DNA (50-100 ng je optimální, pokud není v produktovém popisu příslušného probemixu uvedeno jinak) v 5 μ l⁴ na každou reakci MLPA⁵. V případě potřeby mohou být vzorky DNA koncentrovány srážením ethanolem, jako nosič je možné použít glykogen (Roche 901393). Pro více informací navštivte www.mrcholland.com.
- DNA přípravky by měly obsahovat 5-10 mM Tris pufr s pH 8,0-8,5, aby se zabránilo depurinaci během počátečního denaturačního kroku při 98°C. Například, rozpustte a naředte vzorek DNA v **TE_{0.1}** (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM EDTA). Pokud není známo, zda je pufrovací kapacita dostatečná, přidejte Tris-HCl: 4 μ l vzorku DNA + 1 μ l 50 mM Tris-HCl pH 8,5.
- Kontaminanty přítomné po extrakci DNA, včetně NaCl nebo KCl (> 40 mM) a dalších solí, fenolu, ethanolu, heparinu, EDTA (>1,5 mM) a Fe, mohou ovlivnit výkon MLPA. MLPA je citlivější na nečistoty než monoplexní PCR testy. Nekonzentrujte DNA pomocí odpařování nebo SpeedVac. Takový postup vede k vysokým koncentracím EDTA a solí.
- Zajistěte, aby metoda extrakce, typ tkáně, koncentrace DNA a příprava byly u testovaných a referenčních vzorků co nejvíce podobné.
- Extrakční metody by neměly zanechávat vysokou koncentraci kontaminantů. Nepoužívejte systémy QIAGEN M6, M48 a M96, protože zanechávají příliš mnoho soli. V případě použití QIAGEN EZ1 se řiďte protokolem *QIAGEN Supplementary Protocol: Purification of genomic DNA from whole blood, optimized for use in MRC-Holland MLPA assays, using EZ1® DNA Blood Kits* (viz www.mrcholland.com). Společnost MRC Holland otěstovala a může doporučit následující metody extrakce:
 - QIAGEN Autopure LS (automatizovaná) a QIAamp DNA mini/midi/maxi kit (manuální)
 - Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (manuální)
 - Vysolování (manuální)
- Heparinovanou krev je možné použít, pouze pokud byl vzorek podroben purifikační metodě odstraňující kontaminaci heparinem (např. Nucleospin gDNA Clean-up XS).
- Ošetření RNázou je nezbytné pouze při zkoumání genů, které jsou v testované tkáni vzorku vysoce exprimovány. Např. *HBA* a *HBB* ve vzorcích získaných z krve, (mitochondriální) ribozomální RNA geny (všechny tkáně).
- V některých případech může stabilizační roztok SALSA Sample Stabilising Solution (S4, kat. Č. SMR04, SMR45, RUO) zlepšit kvalitu MLPA reakce. Další informace naleznete na www.mrcholland.com.
- DNA z WGA (celogenomová amplifikace) reakcí není pro MLPA vhodná z důvodu amplifikačního zkreslení.
- Alikvotované vzorky uchovávejte při -20°C. Kontaminace mikroorganismy může ovlivnit kvalitu vzorků, které jsou po delší dobu skladovány při 4°C.

2.3. VÝBĚR REFERENČNÍCH A DALŠÍCH KONTROLNÍCH VZORKŮ

- VÝBĚR REFERENČNÍCH VZORKŮ. Referenční vzorky představují vzorky DNA získané od zdravých jedinců s normálním počtem kopií sekvencí detekovaných cílovými a referenčními sondami. Ve všech ostatních aspektech by měly být co nejvíce podobné testovaným vzorkům, včetně metody extrakce a zdroje vzorků. Vezměte prosím na vědomí, že ne všechny probemixy jsou vhodné pro použití s DNA ze všech zdrojů (např. vzorky tkání fixovaných formalínem a zalitých v parafínu, FFPE). Vhodné zdroje DNA jsou uvedeny v produktové informaci příslušného probemixu.
- REFERENČNÍ VZORKY. V každém experimentu MLPA by měly být obsaženy nejméně tři referenční vzorky. Při testování >21 vzorků přidejte jeden dodatečný referenční vzorek na sedm dalších zkušebních vzorků. Referenční vzorky distribuujte náhodně v rámci experimentu, aby se minimalizovaly variace. Pro odhad reprodukovatelnosti každé sondy v každém MLPA runu je potřeba **vícero referenčních vzorků**.
- KOMERČNÍ DNA. V případě pochybností ohledně kvality vzorku přidejte pro porovnání jeden nebo více komerčních vzorků DNA. Doporučujeme Promega G1471 male & G1521 female DNA. Komerční DNA by měla být použita pouze jako kontrola kvality vzorku, nelze ji použít jako referenční vzorek..

⁴ Nikdy nepoužívejte více než 5 μ l vzorku DNA na reakci. Použití více než 5 μ l DNA snižuje koncentraci sondy a soli. Tím dochází ke snížení rychlosti hybridizace a stability vázání MLPA sond ke vzorku DNA.

⁵ Měření optické hustoty (260 nm) často nadhodnocují koncentraci DNA, např. z důvodu kontaminace RNA. Zda je množství DNA dostatečné, lze odhadnout na základě Q-fragmentů, jak je vysvětleno v bodě 8.1.

- **NEGATIVNÍ KONTROLA.** Do každého runu MLPA doporučuje zahrnout negativní kontrolu (tzv. no-DNA kontrolu). Nahradte 5 μ l DNA TE_{0.1} pufrém (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM EDTA), abyste zkontrolovali kontaminaci TE, reagentů MLPA, elektroforézních reagentů nebo kapilár.
- **POZITIVNÍ KONTROLA.** Doporučuje se zahrnout vzorky pozitivní kontroly, pokud jsou k dispozici. MRC Holland nedodává pozitivní kontroly, ale seznam komerčně dostupných pozitivních kontrol naleznete na www.mrcholland.com. Při použití buněčné linie je nutné mít na paměti, že u buněčných linií může dojít ke změnám počtu kopií, včetně získání nebo ztráty celých chromozomů.

3. NEŽ ZAČNETE

- Rozmražené pufrы a probemix vždy vortexujte a následně krátce odstředte. Všechny zkumavky s enzymovými reagenty by měly být krátce odstředěny. Pufr MLPA je při -20°C obvykle zmrazený, může však zůstat v kapalné formě vzhledem k vysoké koncentraci soli.
- Před použitím zkumavky s enzymy (Ligáza-65 a polymeráza) zahřejte v ruce po dobu 10 sekund, aby se snížila viskozita.
- Enzymové roztoky obsahují 50% glycerol a při -20°C zůstávají kapalné. Master mixy obsahující enzymy by měly být důkladně promíchány jemným pipetováním nahoru a dolů. Nedostatečné promíchání může vést k nespolehlivým výsledkům. Při přípravě master mixů přidávejte enzymy vždy jako poslední. **Roztoky obsahující enzymy nikdy nevortexujte**, jelikož vortexování může způsobit inaktivaci enzymů..
- Pro minimalizaci variability připravte dostatečně velké objemy master mixu (5–10 % navíc).
- Master mixy připravujte (Ligáza-65 a polymeráza) při pokojové teplotě (RT) a bezprostředně před použitím. Pokud jsou master mixy připravovány >1 hodinu před použitím, uchovejte je na ledu nebo při 4°C. Před přidáním k MLPA reakcím master mixy zahřejte na pokojovou teplotu. U reakce s no-DNA kontrolou se mohou tvořit nespecifické píky, a to pokud se přidá velmi studený master mix s ligázou.
- Používejte vícekanálové pipety pro zabránění nadměrného odpařování.
- Video demonstrující provedení MLPA reakce v laboratoři najdete na www.mrcholland.com.

4. INFORMACE KRITICKY DŮLEŽITÉ PRO ZÍSKÁNÍ DOBRÝCH VÝSLEDKŮ

- Zajistěte, aby všechny vzorky DNA obsahovaly 5-10 mM Tris-HCl pH 8–8,5 (část 2.2)
- Do každého experimentu MLPA zahrňte nejméně tři referenční vzorky pocházející ze stejného typu tkáně a ošetřené stejným způsobem jako testované vzorky (část 2.3)
- Pro získání spolehlivých výsledků je nezbytné přesné pipetování reagentů. Toto je zvláště důležité u 3 μ l hybridizačního master mixu (část 6)
- Pro analýzu dat použijte program Coffalyser.Net (část 9)
- Zkontrolujte fragmenty kontroly kvality. Úplná denaturace vzorku DNA je mimořádně důležitá (část 8)
- Provádějte pravidelnou údržbu kapilárního elektroforetického analyzátoru, výměnu kapilár a polymerů realizujte podle doporučení výrobce (část 7)

5. PROTOKOL MLPA – STRUČNĚ

1. DENATURACE DNA
 - Vzorek o objemu 5 μ l DNA zahřejte po dobu 5 minut při 98°C
2. HYBRIDIZACE SOND KE VZORKU DNA
 - Ochladte na pokojovou teplotu, otevřete zkumavky
 - Přidejte 3 μ l hybridizačního master mixu*
 - Inkubujte 1 minutu při 95°C a hybridizujte 16 hodin při 60°C
3. LIGACE HYBRIDIZOVANÝCH SOND
 - Teplotu termocykléru snižte na 54°C, otevřete zkumavky
 - Přidejte 32 μ l master mixu s Ligázou-65*, inkubujte 15 minut při 54°C
 - Enzym inaktivujte teplem: 5 minut při 98°C
4. PCR AMPLIFIKACE LIGOVANÝCH SOND
 - Ochladte na pokojovou teplotu, otevřete zkumavky
 - Přidejte 10 μ l master mixu * s polymerázou o pokojové teplotě
 - Spusťte PCR {35 x {95°C 30 sekund, 60°C 30 sekund, 72°C 60 sekund}, 72°C 20 minut, 15°C pauza}
5. SEPARACE FRAGMENTŮ POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY
6. ANALÝZA VÝSLEDKŮ POMOCÍ COFFALYSER.NET

* Master mixy:

- Hybridizace: 1,5 μ l SALSA probemixu +1,5 μ l MLPA pufru – na reakci
- Ligáza-65: 3 μ l ligázového pufru A + 3 μ l ligázového pufru B + 25 μ l ultračisté vody + 1 μ l Ligázy-65 – na reakci
- Polymeráza: 7,5 μ l ultračisté vody + 2 μ l PCR primer mixu + 0,5 μ l SALSA polymerázy – na reakci

6. PROTOKOL MLPA

6.1. PROGRAM TERMOCYKLÉRU PRO MLPA REAKCI

Denaturace DNA			
1.	98°C		5 minut
2.	25°C		pauza
Hybridizační reakce			
3.	95°C		1 minuta
4.	60°C		16-20 hodin
Ligační reakce			
5.	54°C		pauza
6.	54°C		15 minut
7.	98°C		5 minut
8.	20°C		pauza
PCR reakce			
9.	35 cyklů:	<ul style="list-style-type: none"> • 95°C 30 sekund • 60°C 30 sekund • 72°C 60 sekund 	
10.	72°C		20 minut
11.	15°C		pauza

Poznámka: Při nastavování termocykléru dodržujte tento program, pokud není v produktovém popisu příslušného probemixu uvedeno jinak.

6.2. DENATURACE DNA (DEN 1)

- Označte 0,2ml zkumavky, stripy nebo destičky..
- Do každé zkumavky přidejte 5 µl vzorku DNA (50–250 ng; 50–100 ng je optimální) nebo TE (no-DNA kontrola).
- Zkumavky umístěte do termocykléru, spusťte kroky 1–2 programu MLPA (viz část 6.1).
- Před vyjmutím zkumavek z termocykléru se ujistěte, že vzorky mají teplotu 25°C.

6.3. HYBRIDIZAČNÍ REAKCE (DEN 1)

- Připravte hybridizační master mix. Pro každou reakci smíchejte: 1,5 µl MLPA pufru (žlutý uzávěr) + 1,5 µl probemixu (černý uzávěr). Důkladně promíchejte pipetováním nebo vortexováním.
- Po denuraci DNA přidejte do každé reakce 3 µl hybridizačního master mixu. Přesné pipetování je mimořádně důležité. Důkladně promíchejte jemným pipetováním nahoru a dolů.
- Pokračujte v programu termocykléru kroky 3–4.

6.4. LIGAČNÍ REAKCE (DEN 2)

- Připravte master mix s Ligázou-65. Pro každou reakci smíchejte: 25 µl ultračisté vody + 3 µl ligázového pufru A (průhledný uzávěr) + 3 µl ligázového pufru B (bílý uzávěr), poté přidejte 1 µl ligázy-65 (zelený uzávěr). Důkladně promíchejte jemným pipetováním nahoru a dolů.
- Pokračujte v programu termocykléru krokem 5.
- Jakmile termocyklér dosáhne 54°C, přidejte do každé MLPA reakce 32 µl master mixu s Ligázou-65 (**vzorky jsou umístěny v termocykléru**). Důkladně promíchejte jemným pipetováním nahoru a dolů.
- Pokračujte v programu termocykléru kroky 6-8.

6.5. PCR REAKCE (DEN 2)

- Připravte master mix s polymerázou. Pro každou reakci smíchejte: 7,5 µl ultračisté vody + 2 µl SALSA PCR primer mixu (hnědý uzávěr), poté přidejte 0,5 µl SALSA polymerázy (oranžový uzávěr). Důkladně promíchejte jemným pipetováním nahoru a dolů.
- **Při pokojové teplotě**, přidejte do každé MLPA reakce 10 µl master mixu s polymerázou. Důkladně promíchejte jemným pipetováním nahoru a dolů. Zkumavky **bezprostředně** vložte do termocykléru a pokračujte v programu termocykléru kroky 9-11.
- Po PCR reakci zkumavky neotevírejte ve stejné místnosti, kde se nachází termocyklér. Abyste předešli kontaminaci, použijte v rámci provádění MLPA reakcí a manipulace s PCR produkty různé mikropipety.
- PCR produkty lze skladovat chráněně před světlem při 4°C po dobu 1 týdne. Delší doba skladování vyžaduje teploty mezi -25°C a -15°C.

7. SEPARACE FRAGMENTŮ POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

7.1. ČTĚTĚ PŘED ZAPOČETÍM

- Velikostní standard, podmínky runu, polymer, fluorescenční barvivo a objem MLPA PCR reakce – to vše se odvíjí od typu kapilárního elektroforézního analyzátoru. Použijte výchozí nastavení fragmentační analýzy vašeho elektroforetickém analyzátoru, které odpovídá danému použití, polymeru a délce kapiláry. Nastavení přístroje může vyžadovat optimalizaci pro správnou separaci fragmentů.
- Kapiláry a polymer pravidelně vyměňujte dle doporučení výrobce. Při delším vystavení teplotám >25°C dochází ke znehodnocení polymeru. Pokud jsou píky velikostního standardu opakovaně nízké a široké, mohlo dojít k degradaci kapilár nebo polymeru.
- Používejte vysoce kvalitní formamid a skladujte jej v alikvotních podílech při -20°C. Formamid se může po zahřátí stát kyselým a způsobovat depurinaci a fragmentaci DNA.

7.2. TECHNICKÁ SPECIFIKACE PRO ELEKTROFORÉZU

Přístroj	Barvivo	Kapiláry	Injektovaný mix
SCIEX CEQ-2000 CEQ-8000 CEQ-8800 GeXP	Cy5	33 cm	1 µl PCR reakce ^a 0,5 µl CEQ - velikostní standard 600 ^b 28,5 µl HiDi formamidu / Beckman SLS Přidejte jednu kapku vysoce kvalitního minerálního oleje.
ABI-Prism 3100 (Avant) ABI-3130 (xL) ABI-3500 ^c (xL) ABI-3730 (xL)	FAM	36, 50 cm	0,7 µl PCR reakce ^a 0,3 µl ROX nebo 0,2 µl LIZ GS 500 velikostního standardu 9 µl HiDi formamidu Uzavřete injektážní destičku. Zahřejte po dobu 3 minut při 86°C, ochladte po dobu 2 minut při 4°C ^d .
ABI-SeqStudio	FAM	28 cm	0,8 µl PCR reakce ^a 0,3 µl ROX/LIZ GS500 velikostního standard 12 µl HiDi formamidu Uzavřete injektážní destičku. Zahřejte po dobu 3 minut při 86°C, ochladte po dobu 2 minut při 4°C ^d .

^a Objem přidaného PCR produktu by nikdy neměl překročit 10 % celkového injektovaného mixu.

^b V případě potřeby snižte objem velikostního standardu.

^c V případě použití ABI-3500: nastavte napětí „run voltage“ na 15 kV a zajistěte dostatečnou délku runu.

^d Před započítím kapilární elektroforézy je doporučeno injektovaný mix krátce zahřát.

Níže uvedená tabulka uvádí optimální, minimální a maximální rozsahy signálů pro kapilární elektroforetické přístroje. Pokud signály klesnou mimo tyto hodnoty, může to znamenat falešné výsledky. Může být nutná optimalizace nastavení fragmentační analýzy.

Přístroj	Optimální rozsah signálu (v RFU)	Minimální signál (v RFU)	Maximální signál (v RFU)
SCIEX CEQ/GeXP	9,375 - 136,000	5000	170,000
ABI 310, 3100 & 3130 series	375 - 6,000	200	7,500
ABI 3500, 3730 series & SeqStudio	375 - 24,800	300	31,000

8. KONTROLA KVALITY MLPA A ODSTRAŇOVÁNÍ PROBLÉMŮ

8.1. KONTROLNÍ FRAGMENTY

Pro analýzu dat MLPA použijte software Coffalyser.Net, jelikož automaticky provádí ověření kontrolních fragmentů, čímž se zjišťuje splnění minimálních požadavků na kvalitu. Probemixy MLPA obsahují fragmenty kontroly kvality, které upozorňují na problémy ohrožující výsledky MLPA. Kvalitu reakce MLPA, včetně fragmentů kontroly kvality, vyhodnoťte pomocí diagramu kontroly kvality (část 8.4). Pro interpretaci výsledků MLPA jsou vhodné pouze taková data, která splňují požadavky na kvalitu. Pro usnadnění hodnocení kvality naleznete na adrese www.mrcholland.com e-learningové moduly a průvodce řešení problémů.

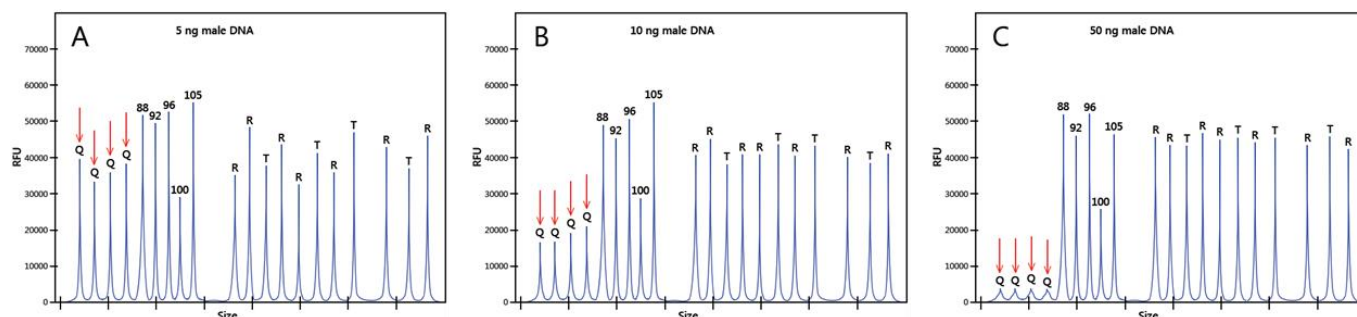
Téměř všechny probemixy SALSA MLPA obsahují devět kontrolních fragmentů, viz níže:

Název	Délka (nt)	Interpretace
Benchmark fragment	92	Pro porovnání s ostatními fragmenty kontroly kvality.
Kvantitativní fragmenty (Q-fragmenty)	64, 70, 76, 82	Vysoký , pokud je množství DNA příliš nízké nebo došlo k selhání ligace. Medián signálů Q-fragmentů >33 % 92nt benchmarkového fragmentu → množství DNA je nedostatečné nebo došlo k selhání ligace. Viz Obrázek 3.
Denaturační	88, 96	Nízké v případě špatné denaturace vzorku DNA. Signál <50 % 9nt

fragmenty (D-fragmenty)		benchmarkového fragmentu → nedostatečná denaturace DNA. Viz Obrázek 4.
X & Y fragmenty	100, 105	Kontrola k možnému pomíchání vzorků ⁶ .

Q-FRAGMENTY

Čtyři Q-fragmenty (64, 70, 76 a 82 nt) poskytují kontrolu pro přidání dostatečného množství DNA a pro úspěšnou ligaci. Q-fragmenty nemusí být hybridizovány s DNA nebo ligovány, aby byly amplifikovány během PCR. Výška Q-fragmentů se snižuje s přidáním většího množství vzorku DNA (Obrázek 3).

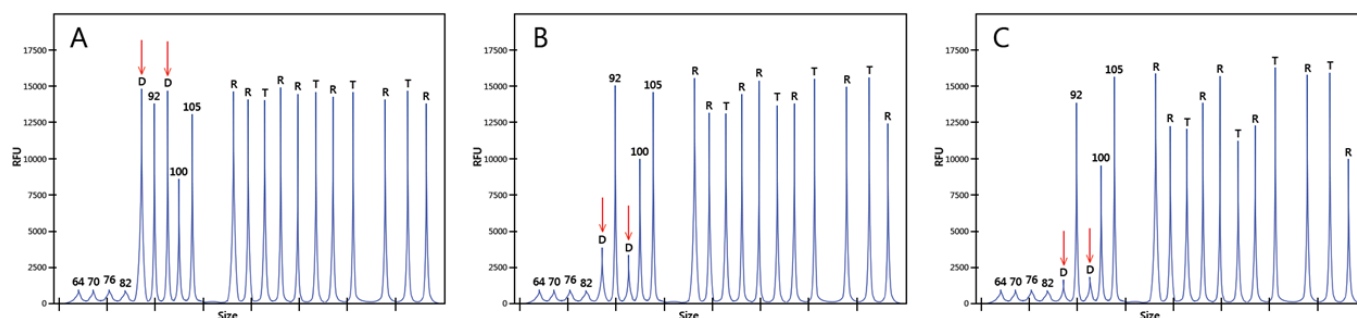


Obrázek 3. Vliv množství DNA na Q-fragmenty. Čím více množství DNA je použito, tím nižší jsou Q-fragmenty. Výsledky MLPA – **A.** 5 ng, **B.** 10 ng, **C.** 50 ng DNA. Vzorky **A.** a **B.** obsahují nedostatečné množství DNA.

D-FRAGMENTY

Dva D-fragmenty (88 a 96 nt) detekují sekvence v lokusech s výjimečně vysokým obsahem GC. „Ostrovy CpG (CpG islands)“ mají vysoký obsah GC a je obtížné je denarovat. Jsou-li 88 a 96nt D-fragmenty nízké ($\leq 50\%$ 92nt benchmarkového fragmentu), znamená to, že DNA vzorku nebyla dostatečně denarována. Špatná denaturace může být způsobena přítomností >40 mM soli ve vzorku DNA. Neúplná denaturace vzorku DNA může vést k falešným výsledkům!

POZNÁMKA: Při použití polymeru ABI POP7 je obvykle přítomen nespecifický fragment o délce 80-90 nt, který se může shodovat s kontrolními fragmenty!



Obrázek 4. Vliv špatné denaturace na D-fragmenty. D-fragmenty jsou nízké, pokud je denaturace vzorku DNA neúplná (zde přidáním soli do vzorku). Výsledky MLPA na vzorku DNA obsahující v případě **A.** TE, **B.** TE + 40 mM NaCl, **C.** TE + 100 mM NaCl. Vzorky **B.** a **C.** vykazují nedostatečnou denaturaci.

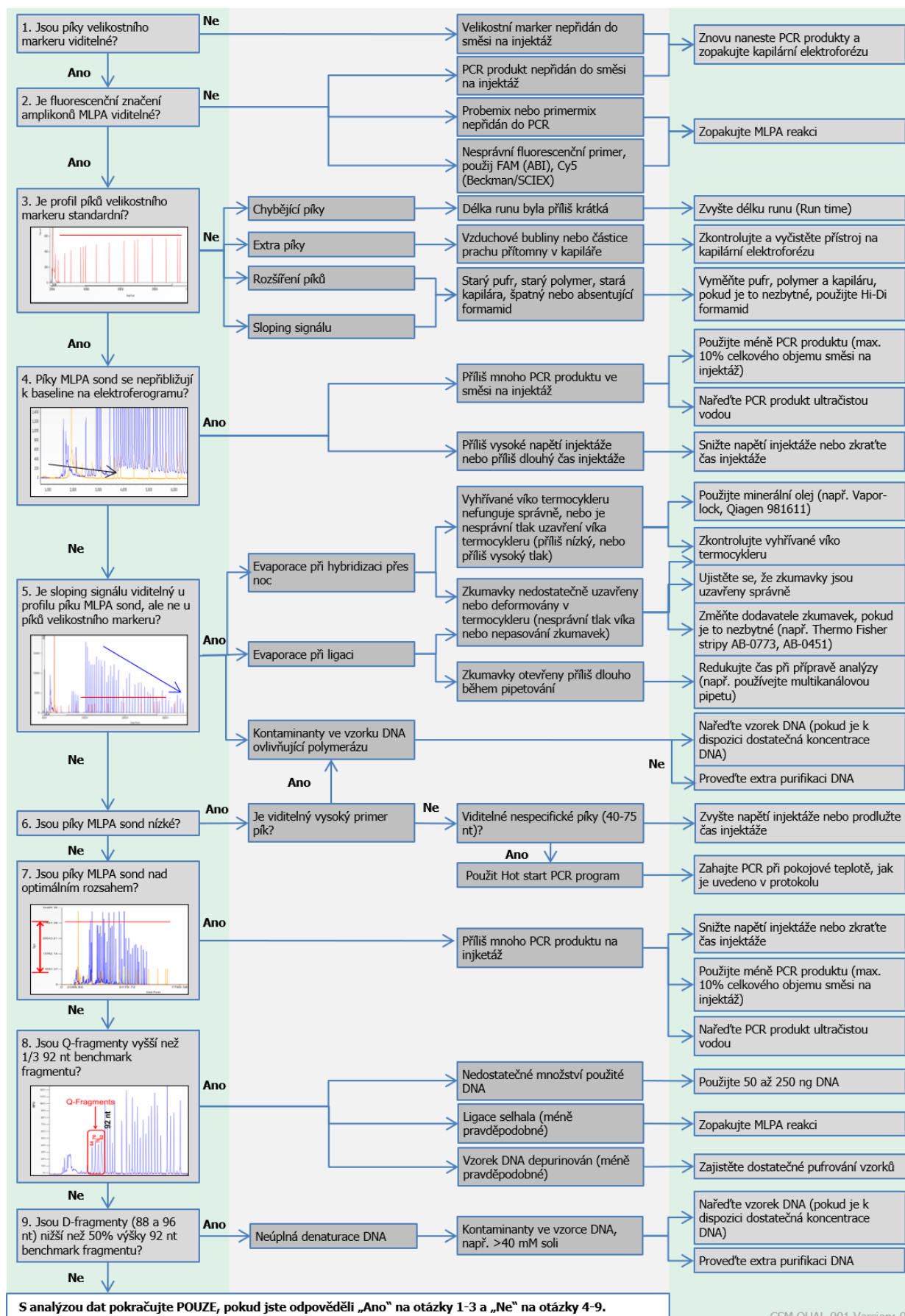
8.2. NEGATIVNÍ KONTROLA

V případě kontroly bez DNA (no-DNA kontrola) jsou obvykle viditelné pouze čtyři Q-fragmenty. U některých probemixů je v no-DNA kontrole možné vidět několik málo pík delších než 100 nt. Tyto nespecifické píky nemají vliv na výsledky MLPA, pokud je použito dostatečné množství DNA, protože jsou vykompenzovány exponenciální amplifikací MLPA sond. Informujte MRC Holland v případě, že nespecifický pik v no-DNA kontrole je reprodukovatelně vyšší než 50 % střední výšky Q-fragmentů.

⁶ Jsou známy případy mužů postrádajících tuto Y specifickou sekvenci a žen nesoucích tuto Y sekvenci na X chromozomu.

8.3. EVAPORACE

K evaporaci může docházet během (A) pipetování ligační reakce při 54°C nebo (B) během hybridizace přes noc. Odpařování může způsobit zvýšenou koncentraci soli. Výsledkem může být vznik silné sekundární struktury DNA vzorku, což může bránit určitým sondám v navázání na jejich cílové sekvence. Obecně platí, že destičky jsou náchylnější k odpařování než stripy. V případě podezření na odpařování inkubujte 8 µl H₂O přes noc při 60°C, ráno by mělo zůstat >5 µl H₂O. Doporučení, jak eliminovat odpařování, je uvedeno v části 8.4, krok 5. Pokud používáte minerální olej, přidejte ho jen tolik množství, aby pokryl povrch. Olej není nutné odstraňovat. Po přidání probemixu a master mixu s polymerázou zkumavky krátce odstředte. Po přidání master mixu s ligázou pipetujte nahoru a dolů pod olejovou vrstvou.

8.4. POSTUP KONTROLY KVALITY


CSM.QUAL-001 Version: 03

9. ANALÝZA DAT

K analýze dat MLPA by měl být použit software Coffalyser.Net v kombinaci s příslušným Coffalyser listem specifickým pro danou šarži. V obou případech by měla být použita nejnovější verze. Referenční příručka Coffalyser.Net Reference Manual obsahuje podrobné pokyny ohledně analýzy dat MLPA. Jak software, tak manuál jsou volně ke stažení na www.mrcholland.com.

Absolutní fluorescence měřená kapilární elektroforézou pro každou sondu je ovlivněna mnoha proměnnými a nelze ji použít přímo. Fluorescence každé sondy musí být nejprve normalizována v rámci MLPA reakce. Při normalizaci se využívají referenční sondy, u kterých se očekává, že budou mít normální počet kopií ve všech vzorcích. Relativní signály sond z každého vzorku jsou porovnávány se signály získanými z referenčních vzorků. Předpokládá se, že referenční vzorky budou mít normální počet kopií pro všechny referenční a cílové sondy. Takové srovnání pak umožňuje stanovení relativního počtu kopií cílových sekvencí ve vzorku.

Coffalyser.Net vybírá nejlepší metodu analýzy pro každý MLPA probemix a nabízí rozsáhlou kontrolu kvality⁷. Další informace ohledně provádění analýzy dat naleznete v referenční příručce Coffalyser.Net Reference Manual. **V rámci použití MLPA pro IVD je použití Coffalyser.Net nutné! Použití jiného softwaru může vést k neprůkazným nebo falešným výsledkům!**

10. INTERPRETACE A POTVRZENÍ

- Abnormality zjištěné pomocí MLPA by měly být potvrzeny konfirmačním MLPA probemixem nebo nezávislou technikou, a to kdykoli je to možné. Změny počtu kopií detekované jedinou sondou vždy vyžadují potvrzení. Sekvenování cílových sekvencí sondy může ukázat, že snížený signál sondy je způsoben mutací/polymorfismem. Nález dvou heterozygotních sekvencí obvykle naznačuje, že vzorek DNA obsahuje dvě různé alely. Mějte na paměti, že nalezení jediné vzácné alely pomocí sekvenování neznamená, že došlo k delecí jedné alely, jelikož mohou být přítomny dvě kopie vzácné alely. Homozygotní SNP může vést k částečné redukci signálu, který pak připomíná heterozygotní delecí.
- Ne všechny delecce a duplikace detekované MLPA jsou patogenní. Varianty počtu kopií zárodečné linie u zdravých jedinců lze nalézt na adrese <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>. MRC Holland neposkytuje informace o tom, zda delecce nebo duplikace konkrétního exonu vyústí v onemocnění.
- Některé odchylky počtu kopií mohou být způsobeny somatickými změnami, včetně velkých delecí a duplikací celých chromozomů.
- V případě zjevné homozygotní delecce by měl být elektroferogram vizuálně zkontrolován, zda signál skutečně chybí. Chybějící signály sondy mohou být způsobeny problémy s binningem nebo slabými signály.
- Změny počtu kopií detekované referenčními sondami nebo ohraničujícími sondami pravděpodobně nesouvisí s onemocněním, na které je zkouška prováděna. Podrobnosti o referenčních sondách jsou k dispozici na vyžádání.

11. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ A UPOZORNĚNÍ

- Jen pro profesionální použití. Výkon testu závisí na odbornosti obsluhy a dodržování pokynů. Test by měl provádět odborník vyškolený v molekulárních technikách. Osoba odpovědná za interpretaci výsledků by si měla být vědoma nejnovějších vědeckých poznatků o daném použití a všech omezeních MLPA, které by mohly vést k nesprávným výsledkům.
- Interní validace každé aplikace MLPA je nezbytná, zejména při prvním použití MLPA nebo při změně postupu manipulace se vzorkem, metody extrakce DNA nebo používaných přístrojů. V takovém případě použijte alespoň 16 normálních vzorků DNA. Validace by měla vykazovat standardní odchylku $\leq 0,10$ pro každou sondu (pokud produktový popis příslušného probemixu nestanoví jinak). Vzorky použité pro validaci by měly odpovídat vzorkům používaným v každodenní praxi.

12. OMEZENÍ TOHOTO POSTUPU

- V případě většiny aplikací MLPA jsou hlavní příčinou genetických defektů malé (bodové) mutace, jejichž většinu nelze pomocí MLPA probemixů detekovat.
- MLPA nedetekuje žádné delecce nebo duplikace, které leží mimo cílovou sekvenci sond, a nezjistí počet kopií neutrální inverze nebo translokace.

⁷ Coffalyser.Net začíná analýzou hrubých (tzv. raw) dat (korekce baseline, identifikace píků) a poskytuje rozsáhlou kontrolu kvality (např. použité množství DNA, kompletní denaturace DNA, korekce slope).

- Změny (např. SNP, bodové mutace, malé indely) uvnitř nebo v blízkosti cílové sekvence detekované sondou mohou vyvolat falešně pozitivní výsledky.⁸
- Kontaminace vzorků DNA cDNA nebo PCR amplikony jednotlivých exonů může vést ke zvýšenému signálu sondy⁹. Analýza druhého, nezávisle odebraného a izolovaného vzorku DNA může tyto kontaminanty vyloučit.
- V případě nedostatečné denaturace vzorku DNA mohou zřejmé delece, dokonce i několika sond rozpoznávajících přiléhající genomické cíle, představovat falešně pozitivní výsledky. Chromozomální oblasti bohaté na GC nejsou při 98°C denaturovány, pokud je přítomno více než 40 mM NaCl nebo KCl.
- Testy MLPA poskytují informaci o průměrném počtu kopií cílových sekvencí v buňkách, z nichž byl vzorek DNA extrahován. V případě, že má několik sond cílících na přiléhající sekvence neobvyklou hodnotu, ale nedosahuje obvyklých prahových hodnot pro delece/duplikaci, může mozaicismus představovat možnou příčinu.
- Menší rozdíly v experimentálním provedení mohou mít vliv na profil MLPA píků. Do analýzy zahrňte pouze vzorky, které byly a) zahrnuty ve stejném MLPA experimentu a b) byly testovány se stejnou šarží probemixu.
- Drobné změny, jako jsou změny pozorované v případech s mozaicismem, lze rozlišit pouze tehdy, jsou-li sondy uspořádány podle lokalizace na chromozomu.
- V některých případech může být pro správnou interpretaci výsledků nezbytná analýza rodičovských vzorků.
- Používání produktů MLPA může vyžadovat optimalizaci protokolu kapilární elektroforézy. Pokud se jeden nebo více píků nachází mimo měřítko (off-scale), existuje riziko falešných výsledků. Například duplikace jednoho nebo více exonů může zůstat zakryta, pokud jsou píky off-scale, což vede k falešně negativním výsledkům. Riziko píků nacházejících se off-scale je vyšší, pokud jsou použity takové probemixy, které obsahují relativně nízký počet sond. Narozdíl od jiných programů, software Coffalyser.Net varuje před off-scale píky. Pokud se jeden nebo více píků nachází off-scale, opakujte run s PCR produkty, a to buď pomocí nastavení nižšího injektážního napětí/času, nebo snížením množství vzorku (zředěním PCR produktů).

Obecný protokol MLPA – Změny dokumentu

Verze-007-CS1 (1. března 2019)

- Předchozí verze dokumentu jsou k dispozici pouze v angličtině.
- Struktura protokolu byla změněna a některé části byly přepsány. Nedošlo k žádným změnám, které by se dotýkaly provádění MLPA metody.
- DTT nahradil beta-merkaptoethanol v SALSA MLPA Buffer a SALSA Ligase-65.
- Bylo přidáno nové omezení postupu týkající se píků přesahujících měřítko.

Verze-006 (23. března 2018)

- Přidán nový obrázek 2.
- Výchozí nastavení a ABI-310 odstraněny z tabulky nastavení elektroforézy.
- ABI-SeqStudio přidán do tabulky nastavení elektroforézy.
- Byla přidána tabulka obsahující signálové rozsahy pro kapilární elektroforetické analyzátoři.
- Byl přidán vývojový diagram kontroly kvality.
- Byly přidány informace kriticky důležité pro získání dobrých výsledků.
- Informace v protokolu byly reorganizovány a přepsány.

⁸ Při navrhování sond se podle možnosti vyhýbá známým SNP. Hlášeny jsou však stále nové SNP. Upozorněte nás prosím, pokud polymorfismus nebo častá patogenní mutace ovlivňuje signál sondy.

⁹ Varga RE et al. (2012). MLPA-based evidence for sequence gain: pitfalls in confirmation and necessity for exclusion of false positives. *Anal Biochem.* 421:799-801.