



Protocolo general de MLPA®

Instrucciones de uso

MLPA (amplificación de sondas múltiple dependiente de ligación) Protocolo general para la detección y cuantificación de secuencias de ADN.

Este protocolo contiene información que es esencial para obtener resultados fiables en la MLPA. Debe leerse en su totalidad y usarse en combinación con la descripción del producto de la Probemix MLPA correspondiente.

Los kits de reactivos SALSA® MLPA® y el software de análisis Coffalyser.Net están registrados para el diagnóstico *in vitro* (en inglés *in vitro* diagnostic, IVD) en ciertos países (véase www.mrcholland.com). En todos los demás países estos productos son para uso exclusivo en investigación (en inglés *research use only* RUO). Cuando se utiliza una probemix registrada como IVD con fines de diagnóstico, es esencial combinarla con los kits de reactivos SALSA® MLPA® y el software de análisis Coffalyser.Net. La información específica acerca del estatus IVD de las probemixes en cada país se puede encontrar en la descripción del producto específica de la probemix y en www.mrcholland.com.

Existe un protocolo separado para la detección del número de copias de ADN y el estado de metilación (MS-MLPA®). Este protocolo está disponible en www.mrcholland.com.



Fabricante: MRC Holland BV Willem Schoutenstraat 1, 1057 DL Ámsterdam, Países Bajos
Sitio web: www.mrcholland.com; Teléfono: +31 888 657 200
Correo electrónico: info@mrcholland.com (información y preguntas técnicas), order@mrcholland.com (pedidos)

Índice

1.	INTRODUCCIÓN	2
1.1.	COMPONENTES DE LA REACCIÓN SALSA MLPA Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO....	2
1.1.1.	NÚMEROS DE CATÁLOGO DEL KIT DE REACTIVOS	2
1.1.2.	COMPONENTES DEL KIT DE REACTIVOS	3
1.1.3.	APLICACIÓN ESPECÍFICA DE LA PROBEMIX MLPA	3
1.1.4.	ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ.....	3
1.1.5.	SÍMBOLOS.....	3
1.2.	FUNDAMENTO DE LA REACCIÓN DE MLPA.....	4
2.	INSTRUCCIONES DE PREPARACIÓN DEL ENSAYO.....	4
2.1.	MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS	4
2.2.	TRATAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS.....	5
2.3.	SELECCIÓN DE MUESTRAS DE REFERENCIA Y OTRAS MUESTRAS DE CONTROL	6
3.	NOTAS PARA LEER ANTES DE COMENZAR.....	6
4.	PUNTOS CRÍTICOS PARA OBTENER BUENOS RESULTADOS EN LA REACCIÓN DE MLPA	6
5.	PROTOCOLO DE LA MLPA: RESUMEN	7
6.	PROTOCOLO DE LA MLPA.....	7
6.1.	PROGRAMA DE TERMOCICLADOR PARA LA REACCIÓN DE MLPA.....	7
6.2.	DESNATURALIZACIÓN DEL ADN (DÍA 1)	7
6.3.	REACCIÓN DE HIBRIDACIÓN (DÍA 1)	8
6.4.	REACCIÓN DE LIGACIÓN (DÍA 2).....	8
6.5.	PCR (DÍA 2).....	8
7.	SEPARACIÓN DE FRAGMENTOS POR ELECTROFORESIS CAPILAR.....	8
7.1.	NOTAS PARA LEER ANTES DE COMENZAR	8
7.2.	ESPECIFICACIONES DE LA ELECTROFORESIS.....	8
8.	CONTROL DE CALIDAD DE LA MLPA Y RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS.....	9
8.1.	FRAGMENTOS DE CONTROL DE CALIDAD DE LA MLPA.....	9
8.2.	CONTROL SIN ADN	10
8.3.	EVAPORACIÓN	10
8.4.	DIAGRAMA DE FLUJO DEL CONTROL DE CALIDAD	11
9.	ANÁLISIS DE DATOS	12
10.	INTERPRETACIÓN Y CONFIRMACIÓN	12
11.	PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS.....	12
12.	LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	13

1. INTRODUCCIÓN

Las variaciones en el número de copias (en inglés copy number variations CNVs) son una fuente importante de variación genética en el ADN humano y desempeñan un papel importante en una gran cantidad de trastornos genéticos. La amplificación de sondas múltiple dependiente de ligación (MLPA®) es una técnica semicuantitativa y no automatizada que se utiliza para determinar el número relativo de copias de hasta 60 secuencias de ADN en una única reacción basada en la PCR múltiple.

1.1. COMPONENTES DE LA REACCIÓN SALSA MLPA Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

1.1.1. NÚMEROS DE CATÁLOGO DEL KIT DE REACTIVOS

N.º de catálogo	Descripción	Número de reacciones	Fluorocromo en el cebador
EK1-FAM o EK1-Cy5	Kit de reactivos SALSA MLPA EK1	100	FAM o Cy5
EK5-FAM o EK5-Cy5	Kit de reactivos SALSA MLPA EK5	500	FAM o Cy5
EK20-FAM	Kit de reactivos SALSA MLPA EK20	2000	FAM

1.1.2. COMPONENTES DEL KIT DE REACTIVOS

Componente del kit de reactivos	Volúmenes			Ingredientes ¹
	EK1	EK5	EK20	
SALSA MLPA Buffer (tapón amarillo)	180 µl	5×180 µl	5×700 µl	KCl, Tris-HCl, EDTA, PEG-6000, DTT, oligonucleótidos
SALSA Ligase-65 (tapón verde)	115 µl	5×115 µl	5×460 µl	Glicerol, EDTA, DTT, KCl, Tris-HCl, detergente no iónico, ADN Ligasa-65 (enzima de origen bacteriano)
SALSA Ligase Buffer A (tapón transparente)	360 µl	5×360 µl	5×1420 µl	NAD (coenzima de origen bacteriano)
SALSA Ligase Buffer B (tapón blanco)	360 µl	5×360 µl	5×1420 µl	Tris-HCl, MgCl ₂ , detergente no iónico
SALSA PCR Primer Mix (tapón marrón)	240 µl	5×240 µl	5×940 µl	Oligonucleótidos sintéticos marcados con fluorocromo (FAM o Cy5), dNTPs, Tris-HCl, KCl, EDTA, detergente no iónico
SALSA Polymerase (tapón naranja)	65 µl	5×65 µl	5×240 µl	Glicerol, detergentes no iónicos EDTA, DTT, KCl, Tris-HCl, ADN polimerasa (enzima de origen bacteriano)

1.1.3. APLICACIÓN ESPECÍFICA DE LA PROBEMIX MLPA

Aplicación específica de la probemix MLPA	Volúmenes disponibles (R = número de reacciones)	Ingredientes
Probemix* (tapón negro)	40 µl (25 R), 80 µl (50 R), 160 µl (100 R)	Oligonucleótidos sintéticos, oligonucleótidos purificados de bacterias, Tris-HCl, EDTA
ADN muestra# (en inglés Sample DNA, SD) (tapón azul)	30 µl o 100 µl	Tris-HCl, EDTA, plásmido sintético /control, ADN genómico humano del sexo femenino, ADN de una línea celular









* Las probemixes están diseñadas para usarse solo en combinación con los kits de reactivos SALSA MLPA.

Un vial con SD (de referencia (selección), binning, o duplicación artificial), es suministrado, o bien se puede ordenar por separado para su uso con ciertas probemixes MLPA. Los volúmenes e ingredientes dependen del tipo de SD.

1.1.4. ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ

Todos los componentes deben almacenarse directamente al llegar y después de su uso, entre -25 °C y -15 °C, protegidos de la luz y en su envase original. Cuando los reactivos se almacenan en las condiciones recomendadas, queda garantizada su validez hasta la fecha de caducidad, incluso después de su apertura. Para conocer la fecha exacta de vencimiento, consulte las etiquetas de cada vial. Los reactivos no deben ser congelados y descongelados más de 25 veces.

1.1.5. SÍMBOLOS

	Fabricante		Temperatura de conservación (conservar a)
	Número de lote		Proteger del calor y la luz solar directa
	Fecha de caducidad		Número de catálogo
	Número de pruebas		Consulte las instrucciones de uso
IVD	Para uso en diagnóstico <i>in vitro</i> (IVD)	RUO	Para uso exclusivo en investigación

¹ Ninguno de los ingredientes se deriva de seres humanos, animales o bacterias patógenas. Basándose en las concentraciones presentes, ninguno de los ingredientes es peligroso de acuerdo con la Norma de Comunicación de Riesgos. No es necesaria una ficha de datos de seguridad (en inglés Safety Data Sheet, SDS) para estos productos: puesto que ninguna de las preparaciones contiene sustancias peligrosas (según el Reglamento (CE) N.º 1272/2008 [UE-CLP / SGA] y las enmiendas) en concentraciones que requieran la distribución de una SDS (según el Reglamento (CE) N.º 1272/2008 [UE-CLP / SGA] y 1907/2006 [REACH] y las enmiendas). Si se producen derrames, limpie con agua y siga los procedimientos correspondientes del lugar de trabajo.

1.2. FUNDAMENTO DE LA REACCIÓN DE MLPA

El fundamento de la reacción de MLPA se basa en la amplificación de hasta 60 sondas, las cuales detectan individualmente secuencias específicas de ADN de aproximadamente 60 nt de longitud (Figura 1)². La reacción de MLPA da como resultado un conjunto de amplicones de PCR únicos de entre 64-500 nt de longitud los cuales pueden ser separados por medio de electroforesis capilar. Después de la desnaturalización inicial de la muestra de ADN se agrega una mezcla de sondas MLPA. En general, cada sonda MLPA consta de dos oligonucleótidos los cuales deben hibridarse con secuencias diana directamente contiguas para poder ser ligados entre sí y formar una sonda única (Figura 1). Posteriormente, durante la PCR, todas las sondas ligadas son amplificadas simultáneamente usando el mismo par de cebadores de PCR, dando como resultado un conjunto de amplicones de PCR únicos. Debido a que uno de los cebadores de PCR está marcado con un fluorocromo, los productos de la amplificación pueden ser visualizados por medio de la separación de fragmentos en un instrumento de electroforesis capilar. La separación de fragmentos genera un electroferograma específico para cada muestra: el patrón de picos de la muestra (Figura 2, parte superior).

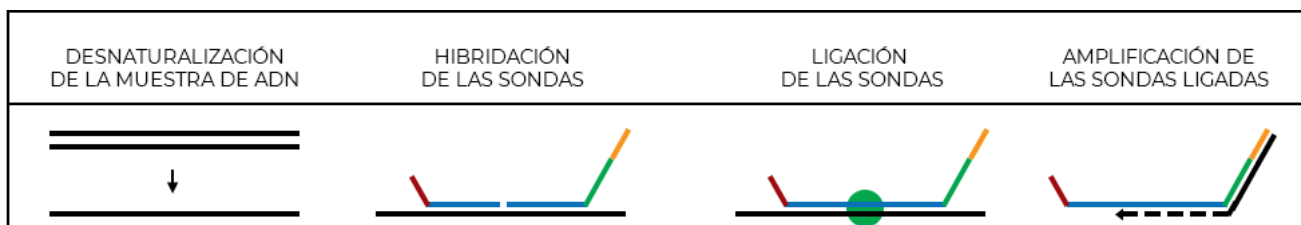


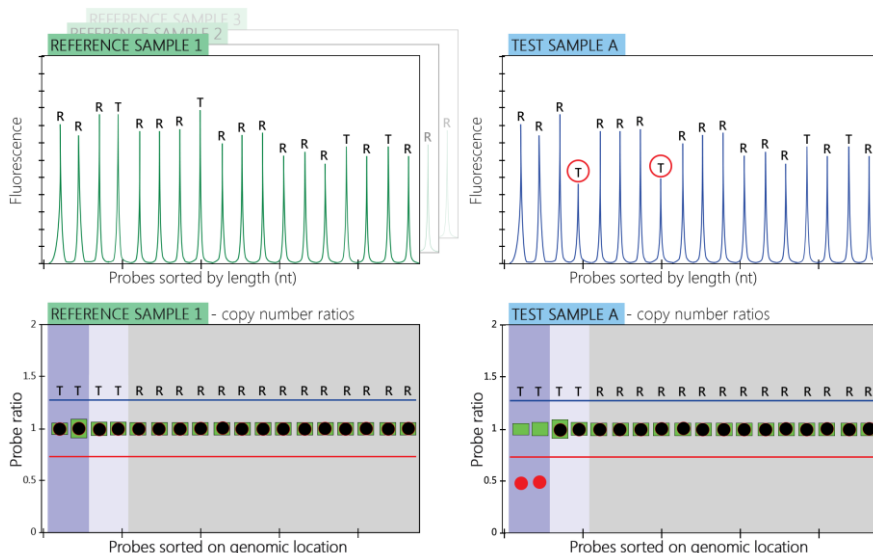
Figura 1. Reacción de MLPA.

La MLPA es una técnica de cuantificación relativa: cuando se comparan los patrones de picos de diferentes muestras de ADN obtenidos mediante la MLPA, solo se pueden detectar diferencias relativas. La altura relativa de cada uno de los picos generados por las sondas, comparada con las alturas relativas de los picos generados por las sondas en varias muestras de ADN de referencia, refleja el número de copias relativas de la secuencia diana correspondiente en la muestra. Por ello, es fundamental incluir muestras de referencia en el mismo experimento. La delección de una o más secuencias diana se puede visualizar como la disminución relativa en la altura del pico (Figura 2, parte inferior), mientras que un aumento relativo en la altura de un pico refleja un aumento en el número de copias.

Figura 2. Comparación de reportes de datos de la MLPA.

Parte superior: Al comparar el electroferograma de la muestra A (derecha) con los de las muestras de referencia (izquierda) se observa la disminución relativa de dos sondas en la muestra A (círculos rojos).

Parte inferior: Visualización en el software Coffalyser.Net de las relaciones de las sondas de la muestra A (derecha) normalizadas con las muestras de referencia (izquierda). Al ordenar las sondas de acuerdo con su localización cromosómica, se hace evidente una delección heterocigota la cual está representada en la muestra A con una relación de la sonda de 0.5 (puntos rojos).



T: sondas diana, R: sondas de referencia.

2. INSTRUCCIONES DE PREPARACIÓN DEL ENSAYO

2.1. MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Agua ultrapura

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

- TE_{0.1} (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 + EDTA 0.1 mM)
- Termociclador calibrado con tapa térmica (99-105 °C) y equipo de laboratorio estándar
- Tubos para PCR de 0.2 ml, tiras o placas
- Instrumento de electroforesis capilar³ con software de análisis de fragmentos
 - Applied Biosystems: Standard Foundation Data Collection Software
 - SCIEX: Paquete de Software GeXP
- Formamida de alta calidad (por ejemplo, Hi-Di Formamide, Applied Biosystems)
- Marcador de peso molecular
 - Applied Biosystems: GeneScan™ 500 LIZ[®]/ROX™ (preferible; el uso de este marcador es obligatorio con probemixes para uso IVD), GeneScan™ 600 LIZ[®], GeneScan™ 500 TAMRA™
 - SCIEX: CEQ™ DNA Size Standard Kit - 600
- Polímeros
 - Applied Biosystems (incluyendo SeqStudio Flex): los polímeros POP-4 o POP-7 son preferibles. No es aconsejable utilizar el polímero POP-6 debido a su alta resolución. SeqStudio: el polímero POP-1 está integrado en el cartucho y es adecuado para este protocolo.
 - SCIEX: gel desnaturante GenomeLab™ Linear Polyacrylamide (LPA)
 - Promega Spectrum Compact: Spectrum Compact Polymer4
- Software de análisis Coffalyser.Net (se puede descargar gratuitamente en www.mrcholland.com)

2.2. TRATAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

- Use una cantidad total de 50-250 ng de ADN humano (50-100 ng es óptimo, a menos que se indique lo contrario en la descripción del producto específica de la probemix) en un volumen de 5 µl⁴ por cada reacción de MLPA⁵. Si es necesario, las muestras de ADN pueden ser concentradas mediante la precipitación con etanol, también se puede añadir glucógeno (Roche 901393) como portador inerte. Para obtener más información, visite www.mrcholland.com.
- Los preparados de ADN deben contener tampón (buffer) Tris 5-10 mM, pH 8.0-8.5 para evitar la depurinación durante el paso inicial de desnaturalización a 98 °C. Por ejemplo, disuelva y diluya la muestra de ADN en TE_{0.1} (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 + EDTA 0.1 mM). Si no se tiene constancia de que haya suficiente capacidad de tamponamiento, agregue Tris-HCl: 4 µl de muestra de ADN + 1 µl de Tris-HCl 50 mM, pH 8.5.
- Los contaminantes que permanecen después de la extracción de ADN como NaCl o KCl (>40 mM) y otras sales, así como fenol, etanol, heparina, EDTA (>1.5 mM) y Fe, pueden influir en el rendimiento de la MLPA. La MLPA es más sensible a las impurezas que los ensayos de PCR simples. No concentre el ADN por evaporación o SpeedVac; ya que esto conduce a altas concentraciones de EDTA y sales.
- Asegúrese de que el método de extracción, el tipo de tejido, la concentración de ADN y el tratamiento sean lo más parecido posible en las muestras a analizar y las muestras de referencia.
- Los métodos de extracción de ADN no deben dejar una concentración alta de contaminantes. No utilice los sistemas QIAGEN M6, M48 y M96, ya que dejan demasiadas sales. Si usa QIAGEN EZ1, utilice el protocolo adicional *QIAGEN Supplementary Protocol: Purification of genomic DNA from whole blood, optimized for use in MRC-Holland MLPA[®] assays, using EZ1[®] DNA Blood Kits* (consúltelo en www.mrcholland.com). MRC Holland ha probado y puede recomendar los siguientes métodos de extracción:
 - QIAGEN Autopure LS (automatizado) y QIAamp DNA mini / midi / maxi kit (manual)
 - Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (manual)
 - Precipitación salina (manual)
- La sangre heparinizada solo puede ser utilizada cuando la muestra se ha sometido a un método de purificación para remover la contaminación con heparina (por ejemplo, Nucleospin gDNA Clean-up XS).
- Solo es imprescindible llevar a cabo un tratamiento con ARNasa cuando se examinen genes con un alto grado de expresión en la muestra de tejido estudiada. Por ejemplo, *HBA* y *HBB* en muestras derivadas de sangre; genes de ARN ribosómico (mitocondrial; todos los tejidos).
- En ciertos casos, la adición de SALSA Sample Stabilising Solution (S4; n.º de catálogo SMR04, SMR45) (RUO) puede mejorar la calidad de la reacción de MLPA. Consulte más información en la descripción del producto en www.mrcholland.com.
- El ADN usado en las reacciones de amplificación del genoma completo (en inglés whole genome amplification reactions, WGA) no es adecuado para la MLPA debido al riesgo de amplificación sesgada.

³ Los instrumentos de electroforesis capilar que no usan condiciones de desnaturalización, como QIAGEN QIAxcel o Agilent Fragment Analyzer, no se pueden usar para la MLPA.

⁴ Nunca use más de 5 µl de muestra de ADN por reacción. Cuando se utilizan más de 5 µl de muestra de ADN se reducen la concentración de sonda y de sal. Esto reduce la velocidad de hibridación y la estabilidad de la unión de las sondas MLPA con la muestra de ADN.

⁵ Las mediciones de densidad óptica (260 nm) suelen sobrestimar la concentración de ADN, p. ej., debido a la contaminación con ARN. Se puede estimar si la cantidad de ADN fue suficiente a partir de los fragmentos Q. Puede consultar una explicación al respecto en 8.1.

- Prepare alícuotas de las muestras y almacénelas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La contaminación con microorganismos puede deteriorar las muestras almacenadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un período prolongado.

2.3. SELECCIÓN DE MUESTRAS DE REFERENCIA Y OTRAS MUESTRAS DE CONTROL

- **SELECCIÓN DE MUESTRAS DE REFERENCIA.** Las muestras de referencia son muestras de ADN obtenidas de individuos sanos con un número de copias normal en las secuencias detectadas por las sondas diana y las sondas de referencia. Estas muestras deben ser lo más parecido posible a las muestras a analizar incluyendo aspectos como el método de extracción y el origen de la muestra. Tenga en cuenta que no todas las probemixes son compatibles para su uso con ADN de diferentes orígenes (por ejemplo, tejido fijado en formalina e incluido en parafina [en inglés formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE]). Revise siempre la descripción del producto de la probemix para identificar los tipos de ADN compatibles.
- **MUESTRAS DE REFERENCIA.** En cada experimento de MLPA deben incluirse al menos tres muestras de referencia. Si analiza más de 21 muestras, incluya una muestra de referencia adicional por cada siete muestras a analizar adicionales. Distribuya las muestras de referencia aleatoriamente en todo el experimento para minimizar la variación. **Múltiples muestras de referencia son requeridas** para estimar la reproducibilidad de cada sonda dentro de cada experimento de MLPA.
- **ADN COMERCIAL.** En caso de tener dudas sobre la calidad de la muestra, incluya una o más muestras de ADN comercial para comparar. Nosotros recomendamos el ADN de Promega masculino con el n.º de catálogo G1471, y femenino con el n.º de catálogo G1521. El ADN comercial solo debe usarse como control para verificar la calidad de la muestra y nunca como muestra de referencia.
- **CONTROL SIN ADN.** Es recomendable incluir un control sin ADN en cada experimento de MLPA. Reemplace los $5\text{ }\mu\text{l}$ de ADN por TE₀₁ (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 + EDTA 0.1 mM) para revisar si hay contaminación en TE, los reactivos de la MLPA, los reactivos de la electroforesis o capilares.
- **MUESTRAS DE CONTROL POSITIVAS.** Se recomienda la inclusión de muestras de control positivas cuando se disponga de ellas. MRC Holland no suministra muestras positivas, sin embargo, una lista de muestras positivas comerciales se encuentra disponible en www.mrcholland.com. Si utiliza ADN de una línea celular tenga en cuenta que las líneas celulares pueden adquirir cambios adicionales en el número de copias, incluyendo ganancias o pérdidas de cromosomas completos.

3. NOTAS PARA LEER ANTES DE COMENZAR

- Agite siempre en un vórtex los buffers descongelados y la probemix, a continuación centrifugue brevemente. Todos los tubos con reactivos enzimáticos deben centrifugarse brevemente. El buffer MLPA generalmente se congela a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pero debido a su alta concentración de sales también puede permanecer líquido a esta temperatura.
- Antes de su uso, caliente los viales que contienen enzimas (Ligase-65 y Polymerase) durante 10 segundos en su mano para reducir la viscosidad.
- Las soluciones enzimáticas contienen 50 % de glicerol y permanecen líquidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las master mixes (mezclas maestras) que contienen enzimas se deben mezclar completamente pipeteando con cuidado hacia arriba y hacia abajo. Si la master mix no se mezcla adecuadamente puede conducir a resultados poco fiables. Cuando prepare master mixes agregue siempre las enzimas al final. **No agite nunca en un vórtex soluciones que contengan enzimas**, ya que esto puede causar inactivación de las enzimas.
- Para minimizar la variación en las muestras, prepare volúmenes suficientemente grandes de soluciones master mix (5-10 % excedente de volumen).
- Prepare las master mixes (Ligase-65 y polymerase) a temperatura ambiente (en inglés room temperature, RT) justo antes de usarlas. Cuando haya preparado las master mixes más de 1 hora antes de usarlas, consérvelas en hielo o a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las master mixes deben equilibrarse a temperatura ambiente antes de añadirlas a las reacciones de MLPA. Picos no específicos se pueden formar en la reacción sin ADN cuando la master mix de ligasa se agrega muy fría.
- Use pipetas multicanal para evitar el exceso de evaporación.
- Puede ver un vídeo sobre cómo llevar a cabo una reacción de MLPA en el laboratorio en www.mrcholland.com.

4. PUNTOS CRÍTICOS PARA OBTENER BUENOS RESULTADOS EN LA REACCIÓN DE MLPA

- Asegúrese de que todas las muestras de ADN contengan Tris-HCl 5-10 mM, pH 8-8.5. (Sección 2.2)
- Incluya en cada experimento de MLPA al menos tres muestras de referencia derivadas del mismo tipo de tejido y tratadas de la misma manera que las muestras a analizar. (Sección 2.3)
- Es fundamental pipetear con precisión los reactivos para obtener resultados fiables. Esto es especialmente importante para los $3\text{ }\mu\text{l}$ de la master mix de hibridación. (Sección 6)
- Utilice Coffalyser.Net para el análisis de los datos. (Sección 9)
- Compruebe los fragmentos de calidad. Es fundamental que las muestras de ADN se desnaturalicen por completo. (Sección 8)

- Realice mantenimiento regular al dispositivo de electroforesis capilar (en inglés capillary electrophoresis, CE) reemplazando los capilares y el polímero según las recomendaciones del fabricante. (Sección 7)

5. PROTOCOLO DE LA MLPA: RESUMEN

1. DESNATURALIZACIÓN DEL ADN
 - Caliente 5 µl de una muestra de ADN durante 5 minutos a 98 °C
2. HIBRIDACIÓN DE LAS SONDAS CON LA MUESTRA DE ADN
 - Enfríe a temperatura ambiente, abra los tubos
 - Añada 3 µl de la master mix de hibridación*
 - Incube 1 minuto a 95 °C e hibride durante 16 horas a 60 °C
3. LIGACIÓN DE LAS SONDAS HIBRIDADAS
 - Baje la temperatura del termociclador a 54 °C, abra los tubos
 - Añada 32 µl de la master mix con Ligase-65*, incube 15 minutos a 54 °C
 - Inactive mediante calor la ligasa: 5 minutos a 98 °C
4. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LAS SONDAS LIGADAS
 - Enfríe a temperatura ambiente, abra los tubos
 - Añada 10 µl de la master mix de polimerasa* a temperatura ambiente
 - Inicie la PCR (35 x {95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 60 segundos}, 72 °C durante 20 minutos, 15 °C en pausa)
5. SEPARACIÓN DE FRAGMENTOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS CON COFFALYSER.NET

* Master mixes:

- Hibridación: 1.5 µl de SALSA probemix + 1.5 µl de MLPA buffer, por cada reacción
- Ligase-65: 3 µl de ligase buffer A + 3 µl de ligase buffer B + 25 µl de agua ultrapura + 1 µl de Ligase-65, por cada reacción
- Polimerasa: 7.5 µl de agua ultrapura + 2 µl de PCR primer mix + 0.5 µl de SALSA polymerase, por cada reacción

6. PROTOCOLO DE LA MLPA

6.1. PROGRAMA DE TERMOCICLADOR PARA LA REACCIÓN DE MLPA

Desnaturalización del ADN			
1.	98 °C	5 minutos	
2.	25 °C	pausa	
Reacción de hibridación			
3.	95 °C	1 minuto	
4.	60 °C	16-20 horas	
Reacción de ligación			
5.	54 °C	pausa	
6.	54 °C	15 minutos	
7.	98 °C	5 minutos	
8.	20 °C	pausa	
PCR			
9.	35 ciclos:	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C 30 segundos • 60 °C 30 segundos • 72 °C 60 segundos 	
10.	72 °C	20 minutos	
11.	15 °C	pausa	

Nota: este programa de termociclador debe seguirse a menos que se indique lo contrario en la descripción del producto específica de la probemix.

6.2. DESNATURALIZACIÓN DEL ADN (DÍA 1)

- Rotule los tubos de 0.2 ml, tiras o placas.
- Agregue 5 µl de muestra de ADN (50-250 ng; 50-100 ng es lo óptimo) o TE (control sin ADN) en cada tubo.
- Coloque los tubos en el termociclador e inicie los pasos 1-2 del programa de termociclador para la reacción MLPA (consulte la sección 6.1).
- Asegúrese de que las muestras estén a 25 °C antes de retirar los tubos del termociclador.

6.3. REACCIÓN DE HIBRIDACIÓN (DÍA 1)

- Prepare la master mix de hibridación. Por cada reacción mezcle: 1.5 µl de MLPA buffer (tapón amarillo) + 1.5 µl de probemix (tapón negro). Mezcle bien mediante el pipeteo o la agitación con vórtex.
- Tras la desnaturalización del ADN, añada 3 µl de la master mix de hibridación a cada reacción. Es fundamental pipetear con precisión. Mezcle bien y con cuidado mediante pipeteo hacia arriba y hacia abajo.
- Continúe con los pasos 3-4 del programa del termociclador.

6.4. REACCIÓN DE LIGACIÓN (DÍA 2)

- Prepare un master mix de Ligase-65. Por cada reacción mezcle: 25 µl de agua ultrapura + 3 µl de ligase buffer A (tapón transparente) + 3 µl de ligase buffer B (tapón blanco), añada al final 1 µl de enzima Ligase-65 (tapón verde). Mezcle bien y con cuidado mediante pipeteo hacia arriba y hacia abajo.
- Continúe con el paso 5 del programa de termociclador.
- Cuando el termociclador esté a 54 °C y **mientras las muestras estén aún DENTRO del termociclador**, añada 32 µl de la master mix de Ligase-65 a cada reacción de MLPA. Mezcle bien y con cuidado mediante pipeteo hacia arriba y hacia abajo.
- Continúe con los pasos 6-8 del programa de termociclador.

6.5. PCR (DÍA 2)

- Prepare la master mix de polimerasa. Por cada reacción mezcle: 7.5 µl de agua ultrapura + 2 µl de SALSA PCR primer mix (tapón marrón) + 0.5 µl de SALSA Polymerase (tapón naranja). Mezcle bien y con cuidado mediante pipeteo hacia arriba y hacia abajo.
- **A temperatura ambiente**, añada 10 µl de la master mix de polimerasa a cada reacción de MLPA. Mezcle bien y con cuidado mediante pipeteo hacia arriba y hacia abajo. **Inmediatamente** después coloque los tubos en el termociclador y continúe con los pasos 9-11 del programa de termociclador.
- Después de la PCR, no abra los tubos en la misma habitación que el termociclador. Para evitar contaminación, use diferentes micropipetas para las reacciones de MLPA y para manipular productos de PCR de la MLPA.
- El producto de la PCR se puede almacenar protegido de la luz a 4 °C durante 1 semana. Para períodos más largos, almacene entre -25 °C y -15 °C.

7. SEPARACIÓN DE FRAGMENTOS POR ELECTROFORESIS CAPILAR

7.1. NOTAS PARA LEER ANTES DE COMENZAR

- El marcador de peso molecular, las condiciones de la carrera, el polímero, el fluorocromo y el volumen de producto de PCR proveniente de la reacción MLPA dependen del tipo de instrumento de electroforesis capilar. Use en su instrumento de electroforesis capilar la configuración de análisis de fragmentos predeterminada correspondiente al tipo de aplicación, polímero y longitud de los capilares. La configuración del instrumento puede requerir optimización para obtener una separación de fragmentos adecuada.
- Reemplace los capilares y el polímero con regularidad siguiendo las recomendaciones del fabricante. El polímero se deteriora rápidamente después de una exposición prolongada a más de 25 °C. Si los picos obtenidos con el marcador de peso molecular son bajos y amplios en repetidas ocasiones, es posible que los capilares o el polímero se hayan deteriorado.
- Use formamida de alta calidad y almacénela en alícuotas a -20 °C. La formamida puede acidificarse, lo cual puede causar depurinación y fragmentación del ADN al calentarse.

7.2. ESPECIFICACIONES DE LA ELECTROFORESIS

Instrumento	Fluorocromo	Capilares	Mezcla de inyección
SCIEX CEQ-2000 CEQ-8000 CEQ-8800 GeXP	Cy5	33 cm	1 µl de la reacción de PCR ^a 0.5 µl de CEQ – marcador de peso molecular 600 ^b 28.5 µl de Hi-Di Formamide / Beckman SLS Añada una gota de aceite mineral de alta calidad.
ABI-Prism 3100 (Avant) ABI-3130 (xL) ABI-3500c (xL) ABI-3730 (xL) ABI-SeqStudio Flex Hitachi DS3000 Promega Spectrum Compact	FAM	36.50 cm	0.7 µl de la reacción de PCR ^a 0.3 µl de ROX o 0.2 µl del marcador de peso molecular LIZ GS 500 9 µl de Hi-Di Formamide Selle la placa de inyección. Caliente 3 min a 86 °C, enfríe durante 2 min a 4 °C ^d .
ABI-SeqStudio	FAM	28 cm	0.8 µl de la reacción de PCR ^a 0.3 µl del marcador de peso molecular ROX / LIZ GS500 12 µl de Hi-Di Formamide Selle la placa de inyección. Caliente 3 min a 86 °C, enfríe

			durante 2 min a 4 °C ^d .
--	--	--	-------------------------------------

^a El volumen del producto de la PCR añadido no debe superar nunca el 10 % del total de la mezcla de inyección.

^b Reduzca el volumen del marcador de peso molecular si es requerido.

^c En ABI-3500: establezca el voltaje de la carrera a 15 kV y asegúrese de que la duración de la carrera sea suficiente.

^d Es aconsejable calentar brevemente la mezcla de inyección antes de la electroforesis capilar.

La tabla siguiente contiene el rango de señal mínimo, máximo y óptimo de los instrumentos de electroforesis capilar. Si la señal está fuera de estos valores, se pueden obtener resultados falsos. La optimización de los parámetros del análisis de fragmentos puede ser requerida.

Instrumento	Rango de señal óptimo (en UFR)	Señal mínima (en UFR)	Señal máxima (en UFR)
SCIEX CEQ/GeXP	9375 - 136 000	3000	170 000
Series 310, 3100 y 3130 de ABI	375 - 6000	200	7500
Series 3500 y 3730 de ABI, SeqStudio, SeqStudio Flex, Hitachi DS3000, y Promega Spectrum Compact	375 - 24 800	300	31 000

8. CONTROL DE CALIDAD DE LA MLPA Y RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

8.1. FRAGMENTOS DE CONTROL DE CALIDAD DE LA MLPA

Para analizar los datos de la MLPA debe emplearse Coffalyser.Net, ya que el programa verifica automáticamente los fragmentos de calidad a fin de garantizar que se cumpla al menos con los requisitos de calidad mínimos. Las probemixes MLPA contienen fragmentos de control de calidad que indican si hay problemas que puedan afectar los resultados de la MLPA. Evalúe la calidad de la reacción de MLPA, incluidos los fragmentos de control de calidad, mediante el diagrama de flujo de control de calidad (sección 8.4). Solo los datos que cumplan los requisitos de calidad son aptos para proceder con la interpretación de resultados. Los módulos de aprendizaje en línea para fragmentos de control de calidad y el asistente de resolución de problemas, se encuentran disponibles en el sitio web www.mrcholland.com para asistirle con la evaluación de calidad.

Casi todas las probemixes SALSA MLPA contienen nueve fragmentos de control, como se describe a continuación:

Nombre	Longitud (nt)	Interpretación
Fragmento de referencia	92	Punto de referencia para comparar los otros fragmentos de control de calidad.
Fragmentos de cantidad (fragmentos Q)	64, 70, 76, 82	Señal alta cuando la cantidad de ADN es demasiado baja o la ligación falló. Si la mediana de las señales de los fragmentos Q es $\geq 33\%$ del valor del fragmento de referencia 92 nt \rightarrow entonces la cantidad de ADN es insuficiente o la ligación falló. Consulte la Figura 3.
Fragmentos de desnaturalización (fragmentos D)	88, 96	Señal baja en caso de mala desnaturalización de la muestra de ADN. Si la señal $\leq 50\%$ del fragmento de referencia 92 nt \rightarrow entonces la desnaturalización del ADN fue insuficiente. Consulte la Figura 4.
Fragmentos X e Y	100, 105	Control en caso de confusión de muestras ⁶ .

FRAGMENTOS Q

Los cuatro fragmentos Q (64, 70, 76 y 82 nt) proveen un control para saber si la cantidad de ADN utilizada es suficiente y la ligación es exitosa. Los fragmentos Q no necesitan hibridarse con el ADN ni estar ligados para poder amplificarse durante la PCR. Los fragmentos Q disminuyen en tamaño cuando se usa más ADN en la reacción (Figura 3).

⁶ Se conocen casos de hombres que carecen de esta secuencia específica de Y, así como también de mujeres que llevan esta secuencia Y en un cromosoma X.

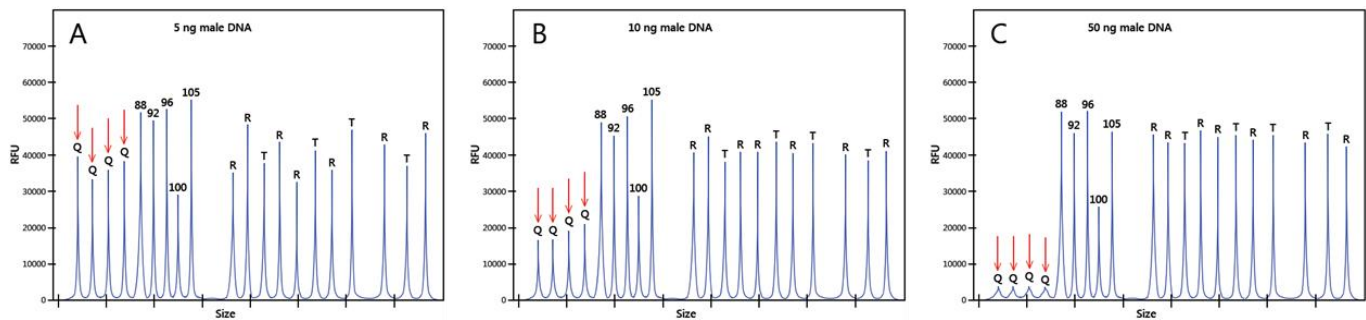


Figura 3. Efecto de diferentes cantidades de ADN en los Fragmentos Q. Cuanta más muestra de ADN es usada, los fragmentos Q son más bajos. Resultados de la MLPA con **A.** 5 ng, **B.** 10 ng, **C.** 50 ng de ADN. Las muestras **A.** y **B.** no contienen suficiente ADN.

FRAGMENTOS D

Los dos fragmentos D (88 y 96 nt) detectan secuencias localizadas en islas CpG extraordinariamente marcadas. Las islas CpG tienen un alto contenido de GC y son difíciles de desnaturalizar. Cuando los fragmentos D de 88 y 96 nt son bajos ($\leq 50\%$ del tamaño del fragmento de referencia 92 nt), significa que la muestra de ADN no se ha desnaturalizado lo suficiente. Una desnaturalización deficiente puede ser causada por la presencia de >40 mM de sales en la muestra de ADN. La desnaturalización incompleta de la muestra de ADN puede conducir a resultados falsos.

NOTA: Cuando se utiliza el polímero ABI POP7, se suele observar un fragmento no específico alrededor de 80-90 nt que puede coincidir con los fragmentos de control.

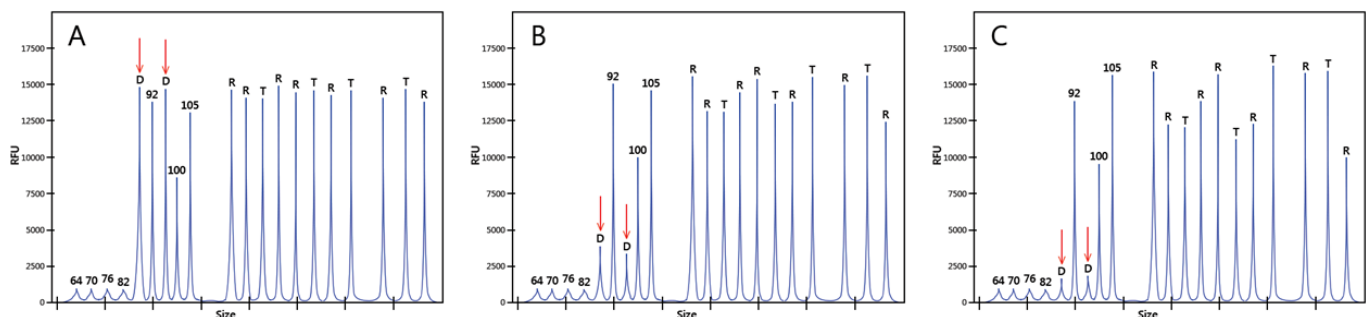


Figura 4. Efecto de una desnaturalización deficiente en los fragmentos D. Los fragmentos D son bajos cuando la desnaturalización de la muestra de ADN es incompleta (aquí, la desnaturalización incompleta se ha inducido al añadir sales a la muestra). Resultados de la MLPA en muestras de ADN que contienen: **A.** TE, **B.** TE + NaCl 40 mM, **C.** TE + NaCl 100 mM. Las muestras **B.** y **C.** muestran una desnaturalización deficiente.

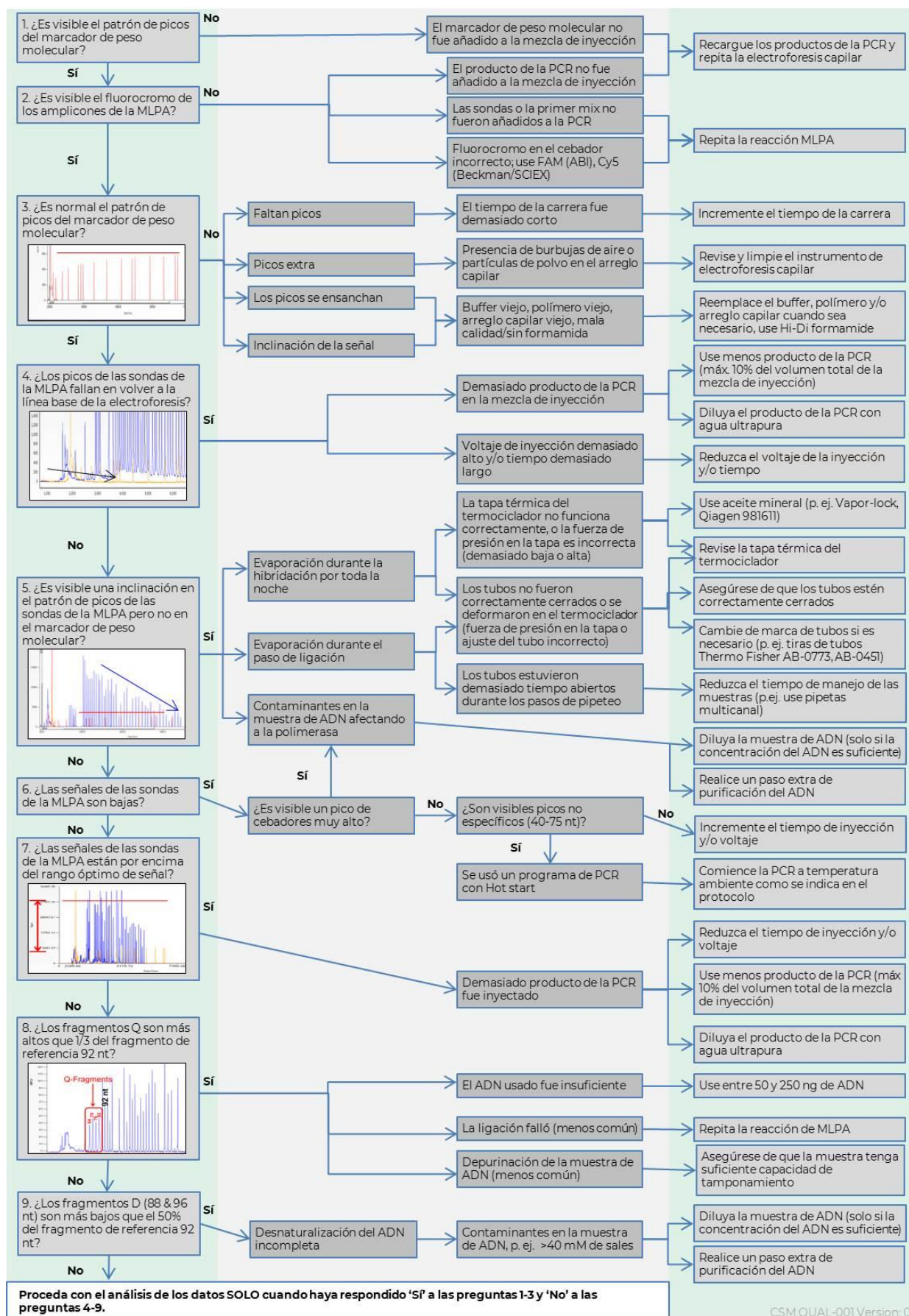
8.2. CONTROL SIN ADN

En los controles sin ADN habituales solo son visibles los cuatro fragmentos Q. En algunas probemixes, algunos picos con una longitud mayor a 100 nt pueden ser visibles en los controles sin ADN. Estos picos no específicos no influyen en los resultados de la MLPA cuando se usa suficiente ADN, ya que son anulados por la amplificación exponencial de las sondas de la MLPA. Informe a MRC Holland en caso de que un pico no específico en el control sin ADN sea reproducible y su señal sea más alta que el 50 % de la mediana de la altura de los fragmentos Q.

8.3. EVAPORACIÓN

Puede haber evaporación durante (A) el pipeteo de la reacción de ligación a 54 °C o (B) la hibridación por toda la noche. La evaporación causa que aumente la concentración de sales. Esto puede aumentar la estabilidad de la estructura secundaria del ADN e inhibir la hibridación de ciertas sondas con sus secuencias diana. En general, las placas son más propensas a la evaporación que las tiras de tubos de PCR. En caso de que sospeche que hay evaporación, incube 8 μ l de H₂O durante toda la noche a 60 °C; por la mañana deben quedar >5 μ l de H₂O. Puede consultar sugerencias sobre cómo evitar la evaporación en la sección 8.4, paso 5. Si usa aceite mineral, añada solo lo suficiente para cubrir la superficie. No es necesario remover el aceite. Después de añadir la probemix y master mix de polimerasa, centrifugue los tubos brevemente. Después de añadir la master mix de ligasa, pipetee hacia arriba y hacia abajo por debajo de la capa de aceite.

8.4. DIAGRAMA DE FLUJO DEL CONTROL DE CALIDAD



9. ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis de datos de la MLPA, use el software Coffalyser.Net junto con la hoja de trabajo de Coffalyser específica para cada lote. Use siempre la versión más reciente de ambos. El Manual de referencia de Coffalyser.Net contiene instrucciones paso a paso para el análisis de datos de la MLPA. Tanto el software como su manual se pueden descargar gratuitamente en www.mrcholland.com.

La fluorescencia absoluta obtenida para cada sonda durante la electroforesis capilar se ve afectada por muchas variables, por lo cual no se puede utilizar directamente. La fluorescencia de cada sonda debe normalizarse primero dentro de la reacción de MLPA. Esta normalización utiliza sondas de referencia la cuales se espera tengan un número de copias normal en todas las muestras. Las señales de sonda relativas de cada muestra son comparadas con las señales obtenidas en las muestras de referencia. Se espera que las muestras de referencia tengan un número de copias normal para todas las sondas diana y de referencia. De este modo la comparación puede ser usada para determinar el número de copias relativo de las secuencias diana en una muestra.

Coffalyser.Net selecciona el mejor método de análisis para cada probemix MLPA y ofrece además un amplio control de calidad⁷. Para obtener más información sobre cómo se realiza el análisis de datos, consulte el Manual de referencia de Coffalyser.Net. **Cuando la MLPA se utiliza con aplicaciones registradas como IVD, Coffalyser.Net debe ser usado siempre. El uso de otro software puede arrojar resultados no concluyentes o falsos.**

10. INTERPRETACIÓN Y CONFIRMACIÓN

- Siempre que sea posible, las anomalías que detecta la MLPA deben confirmarse mediante una probemix MLPA de confirmación o una técnica independiente. Los cambios en el número de copias detectados por una sola sonda siempre requieren confirmación. La secuenciación de las secuencias diana de una sonda pueden mostrar cuando una disminución en la señal de una sonda es causada por una mutación o un polimorfismo. El hallazgo de dos secuencias heterocigotas suele indicar que la muestra de ADN tiene dos alelos diferentes. Tenga en cuenta que el hallazgo de un solo alelo infrecuente mediante secuenciación no implica que un alelo tenga una delección ya que dos copias del alelo infrecuente pueden estar presentes. Un polimorfismo de nucleótido único (en inglés Single Nucleotide Polymorphism, SNP) homocigoto puede derivar en una reducción parcial de la señal que se asemeje a una eliminación heterocigota.
- No todas las delecciones y duplicaciones detectadas por la MLPA son patogénicas. En <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home> se pueden encontrar variaciones en el número de copias reportadas en la línea germinal de individuos sanos. MRC Holland no puede proporcionar información sobre si la delección o duplicación de un exón específico dará lugar a una enfermedad.
- Ciertas aberraciones en el número de copias pueden ser causadas por alteraciones somáticas tales como grandes delecciones y duplicaciones de cromosomas completos.
- En el caso de una presunta delección homocigota, el electroferograma debe ser inspeccionado visualmente para determinar si la señal está realmente ausente. La ausencia de señal en ciertas sondas puede deberse a problemas de binning o de señales bajas.
- Es poco probable que cambios en el número de copias detectados por las sondas de referencia y las sondas de flaqueo guarden relación con la afección que se está analizando. La identidad de las sondas de referencia está disponible bajo solicitud.

11. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- Solo para uso profesional. El rendimiento del ensayo depende de la competencia del usuario y del cumplimiento de las instrucciones del procedimiento. El ensayo debe ser realizado por profesionales con formación en técnicas moleculares. La persona responsable de la interpretación de los resultados debe estar informada de los conocimientos científicos más recientes de la condición evaluada y de cualquier limitación del procedimiento de la MLPA que pueda dar lugar a resultados incorrectos.
- Es fundamental validar internamente cada una de las aplicaciones de la MLPA, en particular cuando se usa la MLPA por primera vez, o cuando se cambia el procedimiento de manejo de muestras, el método de extracción de ADN o los instrumentos utilizados; es necesario incluir al menos 16 muestras de ADN normales. La validación debe mostrar una desviación estándar ≤ 0.10 en cada sonda (a menos que la descripción del producto específico de la probemix indique lo contrario). Las muestras utilizadas para la validación deben ser muestras representativas de las muestras utilizadas en la práctica diaria.

⁷ Coffalyser.Net comienza con el análisis de datos sin procesar (corrección de línea base, identificación de picos) y brinda un control de calidad amplio (p. ej., cantidad de ADN utilizada, desnaturalización completa del ADN, corrección de la pendiente).

12. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- En la mayoría de las aplicaciones evaluadas por la MLPA, la causa principal de defectos genéticos son mutaciones pequeñas (puntuales), la mayoría de las cuales no pueden ser detectadas por las probemixes MLPA.
- La MLPA no puede detectar ninguna delección o duplicación que se encuentre fuera de la secuencia diana de las sondas, ni tampoco puede detectar inversiones o translocaciones neutrales en el número total de copias.
- Cambios en las secuencias (p. ej., SNPs mutaciones puntuales, *indels* [inserción-delección] pequeñas) dentro o cerca de la secuencia diana detectada por una sonda pueden causar resultados de tipo falso positivo⁸.
- La contaminación de las muestras de ADN con ADNc o amplicones de PCR de exones individuales puede provocar un aumento de la señal de la sonda⁹. El análisis de una segunda muestra de ADN recolectada y aislada de forma independiente puede evitar estos artefactos de contaminación.
- En caso de que la desnaturalización de la muestra de ADN haya sido insuficiente, las delecciones aparentes, incluso de varias sondas que reconocen dianas genómicas contiguas, pueden dar un resultado de tipo falso positivo. Las regiones cromosómicas con extrema concentración de GC no se desnaturalizan a 98 °C cuando hay más de 40 mM de NaCl o KCl presentes.
- Los ensayos MLPA proveen el número promedio de copias de las secuencias diana en las células de las que se extrajo la muestra de ADN. En caso de que varias sondas dirigidas a secuencias contiguas tengan un valor inusual pero no alcancen los valores de umbral habituales para una delección/duplicación, podría haber mosaicismo.
- Aun diferencias mínimas en la ejecución del experimento pueden afectar el patrón de picos de la MLPA. En cada análisis incluya solamente muestras que a) se hayan incluido en el mismo experimento MLPA y b) se hayan procesado con probemix del mismo lote.
- Cambios sutiles como los observados en los casos de mosaicismo, solamente pueden ser distinguidos cuando las sondas se ordenan conforme a su localización cromosómica.
- En algunos casos, puede ser necesario analizar las muestras de los padres para interpretar correctamente los resultados.
- Cuando se usan productos para la MLPA, es posible que se tenga que optimizar el protocolo de electroforesis capilar. Si uno o más picos se salen de la escala, se pueden obtener resultados falsos. Por ejemplo, la duplicación de uno o más exones puede quedar oculta cuando los picos se salen de la escala, produciendo un resultado falso negativo. El riesgo de que los picos se salgan de la escala es mayor cuando se usan probemixes que contienen un número relativamente bajo de sondas. El software Coffalyser.Net produce una advertencia cuando hay picos que se salen de la escala pero otros programas no lo hacen. Si uno o más picos se salen de la escala, vuelva a procesar los productos de PCR usando: menor voltaje o tiempo de inyección, o reduciendo la cantidad de muestra mediante la dilución de los productos de PCR.

Protocolo general de la MLPA. Historial del documento

Versión-008-ES1 (06 de mayo de 2022)

- Información sobre instrumentos de electroforesis capilar actualizada en las secciones 2.1 y 7.2 para ser consistente con el software Coffalyser.Net.

Versión-007-ES1 (01 de marzo de 2019)

- Las versiones previas del documento solo se encuentran disponibles en inglés.
- Se ha reestructurado el protocolo y se han reescrito algunas secciones. No se han efectuado cambios en el método por el cual se realiza la MLPA.
- El beta-mercaptoetanol en el SALSA MLPA Buffer y en SALSA Ligase-65 ha sido reemplazado por DTT.
- Se ha añadido una nueva limitación del procedimiento en lo que respecta a los picos que se salen de la escala.

Versión-006 (23 de marzo de 2018)

- Se ha añadido una figura 2 nueva.
- Los ajustes iniciales y el ABI-310 se eliminaron de la tabla de especificaciones de la electroforesis.
- Se ha añadido el ABI-SeqStudio a la tabla de especificaciones de la electroforesis.
- Se ha añadido una tabla con los intervalos de señal de los instrumentos de electroforesis capilar.
- Se ha añadido el diagrama de flujo de control de calidad.
- Se han añadido puntos críticos para la obtención de buenos resultados.
- Se ha reorganizado y reescrito la información del protocolo.

⁸ Al diseñar sondas, los SNPs conocidos se evitan siempre que sea posible. Sin embargo, nuevos SNPs son continuamente descubiertos. Infórmenos cuando un polimorfismo o una mutación patógena frecuente influyan en la señal de una sonda.

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.