



Protocolo Geral MLPA®

Instruções de utilização

MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) Protocolo Geral para a deteção e quantificação de sequências de DNA.

Este protocolo contém informações essenciais para a obtenção de resultados fiáveis aplicando a técnica MLPA. Deve ser lido na íntegra e usado juntamente com a descrição do produto adequada à Probemix MLPA.

O kit de reagentes SALSA® MLPA® e o *software* de análise Coffalyser.Net estão registados para utilização em diagnóstico *in vitro* (em inglês *in vitro diagnostics*, IVD) em países específicos (ver www.mrcholland.com). Em todos os outros países, estes produtos destinam-se apenas a efeitos de investigação (em inglês *research use only*, RUO). Ao usar uma probemix registada como IVD, para efeitos de diagnóstico, é essencial que a mesma seja utilizada conjuntamente com o kit de reagentes SALSA® MLPA® e com o *software* de análise Coffalyser.Net. Informações relacionadas com o estatuto de IVD, específico para cada país, podem ser consultadas na descrição do produto específica para cada probemix em www.mrcholland.com.

Existe um protocolo específico para a deteção do número de cópias e do estado de metilação do DNA (MS-MLPA®). Este protocolo encontra-se disponível em www.mrcholland.com.



Fabricante: MRC Holland B.V. Willem Schoutenstraat 1, 1057 DL Amsterdam, Países Baixos
Website: www.mrcholland.com; Telefone: +31 888 657 200
E-mail: info@mrcholland.com (informações e questões técnicas), order@mrcholland.com (encomendas)

Índice

1.	INTRODUÇÃO.....	2
1.1.	COMPONENTES DO ENSAIO SALSA MLPA E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO.....	2
1.1.1.	REFERÊNCIA DOS ARTIGOS DO KIT DE REAGENTES.....	2
1.1.2.	COMPONENTES DO KIT DE REAGENTES.....	3
1.1.3.	APLICAÇÃO ESPECÍFICA DA PROBEMIX MLPA.....	3
1.1.4.	ARMAZENAMENTO E TEMPO DE PRATELEIRA.....	3
1.1.5.	RÓTULOS DAS EMBALAGENS.....	3
1.2.	PRINCÍPIO DO ENSAIO MLPA.....	4
2.	INSTRUÇÕES PARA A PREPARAÇÃO DO ENSAIO MLPA.....	5
2.1.	MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS.....	5
2.2.	TRATAMENTO E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS.....	5
2.3.	SELEÇÃO DE AMOSTRAS DE REFERÊNCIA E DE CONTROLOS POSITIVOS.....	6
3.	NOTAS A LER ANTES DE INICIAR O ENSAIO.....	6
4.	PONTOS CRÍTICOS PARA OBTENÇÃO DE BONS RESULTADOS APLICANDO A TÉCNICA MLPA.....	6
5.	PROTOCOLO MLPA - RESUMO.....	7
6.	PROTOCOLO MLPA.....	7
6.1.	PROGRAMA PARA A REAÇÃO MLPA NO TERMOCICLADOR.....	7
6.2.	DESNATURAÇÃO DO DNA (1º DIA).....	7
6.3.	REAÇÃO DE HIBRIDAÇÃO (1º DIA).....	8
6.4.	REAÇÃO DE LIGAÇÃO (2º DIA).....	8
6.5.	REAÇÃO DE PCR (2º DIA).....	8
7.	SEPARAÇÃO DE FRAGMENTOS POR ELETROFORESE CAPILAR.....	8
7.1.	NOTAS A LER ANTES DE INICIAR O ENSAIO.....	8
7.2.	ESPECIFICAÇÕES PARA A ELETROFORESE.....	8
8.	CONTROLO DE QUALIDADE DA TÉCNICA MLPA E <i>TROUBLESHOOTING</i>	9
8.1.	FRAGMENTOS DE CONTROLO DE QUALIDADE DA TÉCNICA MLPA.....	9
8.2.	BRANCO (CONTROLO SEM DNA).....	10
8.3.	EVAPORAÇÃO.....	10
8.4.	FLUXOGRAMA DO CONTROLO DE QUALIDADE.....	11
9.	ANÁLISE DE DADOS.....	12
10.	INTERPRETAÇÃO E CONFIRMAÇÃO.....	12
11.	PRECAUÇÕES E AVISOS.....	12
12.	LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO.....	13

1. INTRODUÇÃO

As variações do número de cópias (em inglês *copy number variation*, CNV) são uma fonte proeminente da variação genética no DNA humano, responsáveis por um grande número de patologias. A técnica *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA®) é uma técnica semi-quantitativa e não automatizada, usada para determinar o número relativo de cópias de DNA, até um máximo de 60 sequências de DNA numa única reação de multiplex PCR.

1.1. COMPONENTES DO ENSAIO SALSA MLPA E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

1.1.1. REFERÊNCIA DOS ARTIGOS DO KIT DE REAGENTES

Nº Cat	Descrição	Número de reações	Primer fluorescente para a reação de PCR
EK1-FAM ou EK1-Cy5	Kit de reagentes EK1 SALSA MLPA	100	FAM ou Cy5
EK5-FAM ou EK5-Cy5	Kit de reagentes EK5 SALSA MLPA	500	FAM ou Cy5
EK20-FAM	Kit de reagentes EK20 SALSA MLPA	2000	FAM

1.1.2. COMPONENTES DO KIT DE REAGENTES

Componentes do kit de reagentes	Volumes			Ingredientes ¹
	EK1	EK5	EK20	
Solução tampão SALSA MLPA (tampa amarela)	180 µl	5×180 µl	5×700 µl	KCl, Tris-HCl, EDTA, PEG-6000, DTT, oligonucleótidos
SALSA Ligase-65 (tampa verde)	115 µl	5×115 µl	5×460 µl	Glicerol, EDTA, DTT, KCl, Tris-HCl, detergente não-iônico, enzima Ligase-65 (origem bacteriana)
Solução tampão SALSA Ligase A (tampa transparente)	360 µl	5×360 µl	5×1420 µl	Coenzima NAD (origem bacteriana)
Solução tampão SALSA Ligase B (tampa branca)	360 µl	5×360 µl	5×1420 µl	Tris-HCl, MgCl ₂ , detergente não-iônico
Mistura de SALSA primers para a reação de PCR (tampa castanha)	240 µl	5×240 µl	5×940 µl	Oligonucleótidos sintéticos com pigmento fluorescente (FAM ou Cy5), dNTPs, Tris-HCl, KCl, EDTA, detergente não-iônico
SALSA Polimerase (tampa laranja)	65 µl	5×65 µl	5×240 µl	Glicerol, detergente não-iônico, EDTA, DTT, KCl, Tris-HCl, Enzima polimerase (origem bacteriana)

1.1.3. APLICAÇÃO ESPECÍFICA DA PROBEMIX MLPA

Aplicação específica da probemix MLPA	Volumes disponíveis (R=número de reações)	Ingredientes
Probemix* (tampa preta)	40 µl (25R), 80 µl (50R), 160 µl (100R)	Oligonucleótidos sintéticos, oligonucleótidos purificados de bactérias, Tris-HCl, EDTA
# Amostra de DNA (em inglês <i>Sample DNA</i> , SD) (tampa azul)	30 µl ou 100 µl	Tris-HCl, EDTA, DNA plasmídeo sintético/controle, DNA genómico humano feminino, DNA de linha celular









* As probemixes são concebidas para serem utilizadas exclusivamente com os kits de reagentes SALSA MLPA.

É fornecido um frasco de SD (DNA de referência (seleção), compartimentação (em inglês *binning*) ou duplicação artificial), ou o mesmo pode ser encomendado separadamente para determinadas probemixes MPLA. Os volumes e ingredientes dependem do tipo de SD.

1.1.4. ARMAZENAMENTO E TEMPO DE PRATELEIRA

Todos os componentes devem ser armazenados entre -25 °C e -15 °C, protegidos da luz e na embalagem original, imediatamente após serem recebidos, e depois de cada utilização. Quando armazenados nas condições recomendadas, o tempo de prateleira é garantido até à data de validade, mesmo depois de abertos. Para a data de validade exata, consulte as etiquetas de cada frasco. Os produtos não devem ser expostos a mais de 25 ciclos de congelamento-descongelamento.

1.1.5. RÓTULOS DAS EMBALAGENS

	Fabricante		Armazenar em
	Número de lote		Manter afastado do calor e da luz solar direta
	Usar até		Número de catálogo
	Número de análises		Ler instruções antes de utilizar
IVD	Diagnóstico in vitro	RUO	Apenas para efeitos de investigação

¹ Nenhum dos ingredientes é derivado de humanos, animais ou de bactérias patogénicas. Tendo em conta as concentrações presentes, nenhum dos ingredientes é perigoso segundo a definição da Norma de Comunicação de Perigo. **Não é exigida uma Ficha de Segurança (em inglês *Safety Data Sheet*, SDS) para estes produtos:** nenhuma das preparações contém substâncias perigosas (conforme o Regulamento (CE) N° 1272/2008 [EU-GHS/CLP] e alterações) em concentrações que exijam a distribuição de uma SDS (conforme o Regulamento (CE) N° 1272/2008 [EU-GHS/CLP] e 1907/2006 [REACH] e alterações). Caso ocorram derrames, limpe com água e siga os procedimentos locais adequados.

1.2. PRINCÍPIO DO ENSAIO MLPA

O princípio do ensaio MLPA baseia-se na amplificação de até 60 sondas, em que cada uma deteta uma sequência específica de DNA de aproximadamente 60 nt de comprimento (Figura 1)². A reação MLPA resulta num conjunto único de fragmentos de DNA amplificados por PCR, de comprimento entre 64 a 500 nt que são separados por eletroforese capilar. Após a desnaturação inicial da amostra de DNA, adiciona-se uma mistura de sondas MLPA à amostra. Em geral, cada sonda MLPA consiste em dois oligonucleótidos que devem hibridar com as sequências alvo diretamente adjacentes de modo a serem ligados numa única sonda (Figura 1). Durante a subsequente reação de PCR, todas as sondas ligadas são simultaneamente amplificadas usando o mesmo par de *primers*, resultando num conjunto único de fragmentos de DNA amplificados por PCR. Um dos *primers* de PCR é marcado de forma fluorescente, permitindo que os produtos da amplificação sejam visualizados durante a separação dos fragmentos num instrumento de eletroforese capilar. A separação dos fragmentos produz um eletroferograma específico para cada amostra: o padrão de picos da amostra (Figura 2, topo).

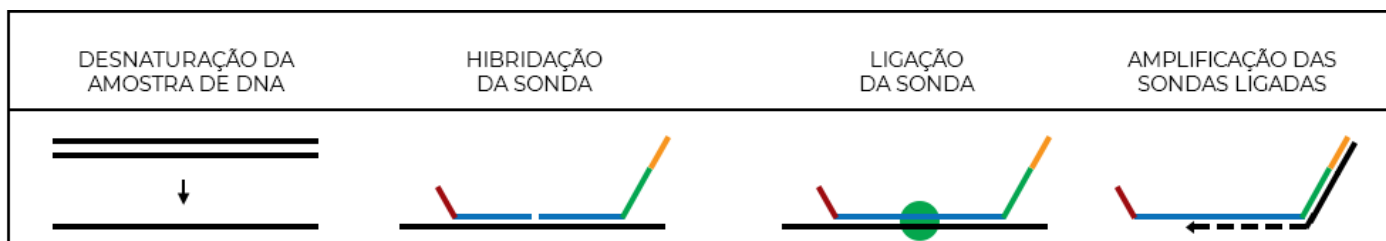


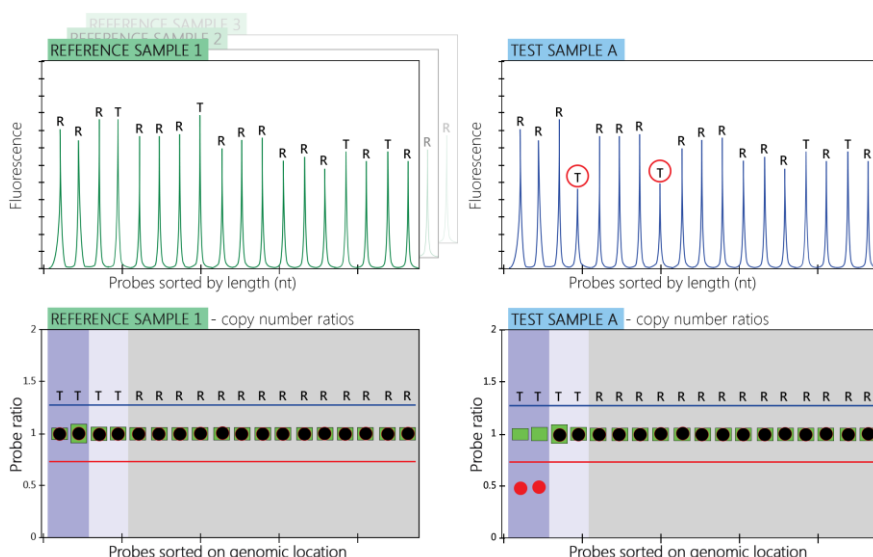
Figura 1. Reação MLPA.

A MLPA é uma técnica relativa: só podem ser detetadas diferenças relativas através da comparação dos padrões de picos MLPA entre as amostras de DNA. A altura relativa do pico de uma sonda, comparada com a altura relativa dos picos da mesma sonda em várias amostras de DNA de referência, reflecte o número de cópias relativas correspondente à sequência alvo da amostra. Por conseguinte, é essencial a inclusão de amostras de referência em cada reação MLPA. A deleção de uma ou mais sequências alvo é visível devido à diminuição relativa na altura dos picos (Figura 2, fundo), enquanto um aumento na altura relativa dos picos reflecte um aumento do número de cópias.

Figura 2. Comparação de perfis de resultados MLPA.

Topo: O eletroferograma da amostra A (direita) é comparado com os eletroferogramas das amostras de referência (esquerda). Observa-se uma diminuição relativa de duas sondas na amostra A (assinalada com um círculo vermelho).

Fundo: Rácios das sondas da amostra A (direita) normalizados em relação às amostras de referência (esquerda), conforme exibidos pelo *software* Coffalyser.Net. A distribuição das sondas pela localização cromossómica revela uma deleção heterozigótica, sondas com um rácio de 0,5, na amostra em teste (círculos vermelhos).



T: sondas-alvo, R: sondas de referência.

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

2. INSTRUÇÕES PARA A PREPARAÇÃO DO ENSAIO MLPA

2.1. MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Água ultrapura
- TE_{0,1} (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM EDTA)
- Termociclador calibrado com tampa aquecida (99-105 °C) e equipamento padrão de laboratório
- Tubos, tiras ou placas de PCR de 0,2 ml
- Instrumento de eletroforese capilar³ com *software* de análise de fragmentos
 - Applied Biosystems: *Standard Foundation Data Collection Software*
 - SCIEX: *GeXP Software Package*
- Formamida de alta qualidade (p.ex., Formamida Hi-Di, Applied Biosystems)
- Marcador (em inglês *labelled size standard*)
 - Applied Biosystems: GeneScan™ 500 LIZ®/ROX™ (preferencial; obrigatório para utilização com probemixes registadas como IVD), GeneScan™ 600 LIZ®, GeneScan™ 500 TAMRA™
 - SCIEX: CEQ™ DNA Size Standard Kit – 600
- Polímeros
 - Applied Biosystems (incluindo SeqStudio Flex): São recomendados o POP-4 ou POP-7. O POP-6 não é recomendado devido à sua elevada resolução. SeqStudio: O POP-1 está integrado no cartucho e é o adequado.
 - SCIEX: *GenomeLab™ Linear Polyacrylamide (LPA) denaturing gel*
 - Promega Spectrum Compact: Spectrum Compact Polymer4
- *Software* de análise Coffalyser.Net (transferível gratuitamente a partir de www.mrcholland.com)

2.2. TRATAMENTO E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

- Use uma quantidade total de 50-250 ng de DNA humano (50-100 ng é a quantidade ótima, a menos que seja referido o contrário na descrição do produto específico à probemix) num volume de 5 µl⁴ para cada reação MLPA⁵. Caso seja necessário, as amostras de DNA podem ser concentradas por precipitação de etanol, e o glicogénio (Roche 901393) pode ser usado como agente de transporte. Para mais informações, visite www.mrcholland.com.
- As preparações de DNA devem conter 5-10 mM de solução tampão Tris com um pH de 8,0-8,5 de modo a evitar a depuração durante o passo inicial de desnaturação a 98 °C. Por exemplo, o DNA da amostra deve ser dissolvido e diluído em TE_{0,1} (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM EDTA). Se não souber se está presente uma capacidade de tampão suficiente, adicione Tris-HCl: 4 µl da amostra de DNA + 1 µl de 50 mM Tris-HCl pH 8.5.
- Os contaminantes remanescentes após a extração do DNA, incluindo NaCl ou KCl (>40 mM) e outros sais, fenol, etanol, heparina, EDTA (>1.5 mM) e ferro, podem influenciar o desempenho do ensaio MLPA. A MLPA é mais sensível às impurezas que os ensaios de PCR monoplex. Não proceda à concentração de DNA por evaporação ou SpeedVac; uma vez que estas técnicas conduzem a elevadas concentrações salinas e de EDTA.
- Garanta que o método de extração, o tipo de tecido, a concentração e o tratamento do DNA sejam tão semelhantes quanto possível nas amostras em teste e nas amostras de referência.
- Os métodos de extração não devem deixar uma concentração elevada de contaminantes. Não utilize os sistemas QIAGEN M6, M48 e M96, já que os mesmos deixam demasiados sais. Para o QIAGEN EZ1, utilize o protocolo *QIAGEN Supplementary Protocol: Purification of genomic DNA from whole blood*, otimizado para a utilização em ensaios MLPA® - MRC-Holland, usando EZ1® DNA Blood Kits (ver www.mrcholland.com). A MRC Holland testou e pode recomendar os seguintes métodos de extração:
 - QIAGEN Autopure LS (automatizado) e o kit mini/midi/maxi DNA QIAamp (manual)
 - Conjunto de purificação de DNA genómico Promega Wizard (manual)
 - Relargagem (em inglês *salting out*) (manual)
- O sangue heparinizado só pode ser usado após a amostra ter sido submetida a um método de purificação para remoção da contaminação por heparina (p.ex., Nucleospin gDNA Clean-up XS).
- O tratamento de RNase só é essencial quando os genes a serem analisados são expressos em alto grau no tecido da amostra em estudo. P.ex., os genes *HBA* and *HBB* em amostras derivadas de sangue; genes do RNA ribossómico (mitocondrial) em todos os tecidos.

³ Os instrumentos de eletroforese capilar que não usam condições de desnaturação, como o QIAGEN QIAxcel ou o Agilent Fragment Analyzer, não podem ser usados em combinação com a técnica MLPA.

⁴ Nunca use mais de 5 µl de amostra de DNA por reação. Usar mais de 5 µl de DNA reduz a concentração das sondas, e a concentração salina. Isto reduz a velocidade de hibridação e a estabilidade da ligação das sondas MLPA à amostra de DNA.

⁵ As medições da densidade ótica (260 nm) sobrestimam frequentemente a concentração de DNA, p.ex. devido à contaminação com ácido ribonucleico (em inglês *ribonucleic acid*, RNA). A partir dos Q-fragments, pode ser estimado se a quantidade de DNA usada é suficiente, como é explicado em 8.1.

- Em determinados casos, a solução tampão SALSA de estabilização de amostras (S4; N° Cat SMR04, SMR45) (RUO) pode melhorar a qualidade da reação MLPA. Para mais informações, consulte a descrição do produto em www.mrcholland.com.
- O DNA derivado de reações de amplificação do genoma total (em inglês Whole Genome Amplification, WGA) não é adequado à técnica MLPA devido a enviesamentos de amplificação.
- Distribua as amostras em alíquotas e armazene a -20 °C. A contaminação por microrganismos pode deteriorar amostras que estejam armazenadas a 4 °C durante um período prolongado.

2.3. SELEÇÃO DE AMOSTRAS DE REFERÊNCIA E DE CONTROLOS POSITIVOS

- SELEÇÃO DE AMOSTRAS DE REFERÊNCIA. Amostras de referência são amostras de DNA, de indivíduos saudáveis, com um número de cópias normal nas sequências detetadas pelas sondas-alvo e pelas sondas de referência. As amostras de referência devem ser o mais semelhante possível às amostras em teste em todos os outros aspetos, incluindo no método de extração e no tipo de tecido da amostra. Deve notar-se que nem todas as probemixes são adequadas à utilização de DNA derivado de todos os tipos de tecidos (p.ex. tecido fixado em formalina e embebido em parafina (em inglês *formalin fixed paraffin embedded*, FFPE)). Confirme sempre a descrição do produto específico à probemix para saber os tipos de tecidos de DNA adequados.
- AMOSTRAS DE REFERÊNCIA. Devem ser incluídas pelo menos três amostras de referência em cada experiência MLPA. Se testar mais de 21 amostras, inclua uma amostra de referência adicional por cada sete amostras adicionais. Distribua as amostras de referência de forma aleatória para minimizar a variabilidade. São necessárias **múltiplas amostras de referência** para estimar a reprodutibilidade de cada sonda em cada ensaio MLPA.
- DNA COMERCIAL. Em caso de dúvidas sobre a qualidade da amostra, inclua uma ou mais amostras comerciais de DNA para comparação. Recomendamos o DNA masculino G1471 e o DNA feminino G1521 do catálogo Promega. O DNA comercial só deve ser usado como controlo para confirmar a qualidade da amostra, não podendo ser usado como amostra de referência.
- BRANCO (CONTROLO SEM DNA). Recomenda-se a inclusão do branco (controlo sem DNA) em cada ensaio MLPA. Substitua 5 µl de DNA por TE_{0,1} (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM EDTA) para verificar se existe contaminação do TE, dos reagentes MLPA, dos reagentes ou capilares de eletroforese.
- AMOSTRAS DE CONTROLOS POSITIVOS. A inclusão de amostras de controlos positivos é recomendada caso estejam disponíveis. A MRC Holland não fornece amostras de controlos positivos, contudo em www.mrcholland.com existe uma lista de amostras de controlos positivos que estão disponíveis comercialmente. Ao usar DNA proveniente de culturas celulares, note que as culturas celulares podem ter adquirido alterações adicionais no número de cópias, nomeadamente ganhos ou perdas de cromossomas completos.

3. NOTAS A LER ANTES DE INICIAR O ENSAIO

- Use sempre um agitador vórtex para soluções tampão e probemixes congeladas, seguido de uma breve centrifugação. Todos os tubos de reagentes enzimáticos devem ser submetidos a uma breve centrifugação. A solução tampão MLPA fica normalmente congelada a -20 °C, mas pode permanecer líquida devido à sua elevada concentração salina.
- Antes de usar, aqueça as ampolas das enzimas (Ligase-65 e polimerase) na sua mão, durante 10 seg, para reduzir a viscosidade.
- As soluções de enzimas contêm 50% de glicerol e permanecem líquidas a -20 °C. As misturas contêm enzimas que devem ser completamente homogeneizadas, pipetando cuidadosamente para cima e para baixo. Insuficiente volume das misturas pode provocar resultados não fiáveis. Ao preparar as misturas, adicione sempre as enzimas em último lugar. **Nunca submeta soluções que contenham enzimas a agitação por vórtex** já que pode ocorrer inativação das enzimas.
- Para minimizar a variabilidade entre amostras, prepare volumes suficientemente grandes das misturas (excedente de volume 5-10%).
- Prepare as misturas (de Ligase-65 e de polimerase) à temperatura ambiente imediatamente antes da utilização. Se as misturas forem preparadas mais de 1 hora antes da utilização, conserve-as em gelo ou a 4 °C. As misturas devem ser aquecidas à temperatura ambiente antes de adicionadas às reações MLPA. Podem formar-se picos não específicos no branco (controlo sem-DNA) caso se adicione uma mistura de ligase muito fria.
- Use pipetas multicanal para evitar a evaporação excessiva.
- Está disponível em www.mrcholland.com um vídeo sobre como realizar uma reação MLPA no laboratório.

4. PONTOS CRÍTICOS PARA A OBTENÇÃO DE BONS RESULTADOS APLICANDO A TÉCNICA MLPA

- Garantir que todas as amostras de DNA contêm 5-10 mM de Tris-HCl pH 8-8,5. (Secção 2.2)

- Incluir, em cada ensaio MLPA, pelo menos três amostras de referência, derivadas do mesmo tipo de tecido e tratadas do mesmo modo que as amostras em teste. (Secção 2.3)
- A pipetagem exata dos reagentes é essencial para a obtenção de resultados fiáveis. Isto é especialmente crítico para os 3 µl da mistura de hibridação. (Secção 6)
- Usar o *software* Coffalyser.Net para a análise de dados. (Secção 9)
- Verificar os fragmentos de qualidade. A desnaturação completa da amostra de DNA é essencial. (Secção 8)
- Efetuar a manutenção regular do dispositivo de eletroforese capilar, substituindo os capilares e os polímeros da forma recomendada pelo fabricante. (Secção 7)

5. PROTOCOLO MLPA - RESUMO

1. DESNATURAÇÃO DO DNA
 - Aqueça uma amostra de DNA de 5 µl durante 5 minutos a 98 °C
2. HIBRIDAÇÃO DAS SONDAS COM AS AMOSTRAS DE DNA
 - Arrefeça até à temperatura ambiente, abra os tubos
 - Adicione 3 µl da mistura de hibridação*
 - Incubar durante 1 minuto a 95 °C e hibridar durante 16 horas a 60 °C
3. LIGAÇÃO DAS SONDAS HIBRIDADAS
 - Diminua a temperatura do termociclador para 54 °C, abra os tubos
 - Adicione 32 µl da mistura Ligase-65*, incube durante 15 minutos a 54 °C
 - Inative através de calor a enzima ligase: 5 minutos a 98 °C
4. AMPLIFICAÇÃO POR PCR DAS SONDAS LIGADAS
 - Arrefeça até à temperatura ambiente, abra os tubos
 - Adicione 10 µl da mistura de polimerase* à temperatura ambiente
 - Inicie o PCR (35 x {95 °C 30 segundos, 60 °C 30 segundos, 72 °C 60 segundos}, 72 °C 20 minutos, 15 °C pausa)
5. SEPARAÇÃO DE FRAGMENTOS POR ELETROFORESE CAPILAR
6. ANALISE OS RESULTADOS COM O SOFTWARE COFFALYSER.NET

* Misturas:

- Hibridação: 1,5 µl de SALSA probemix + 1,5 µl de MLPA solução tampão, por reação
- Ligase-65: 3 µl de solução tampão ligase A + 3 µl de solução tampão ligase B + 25 µl de água ultrapura + 1 µl de Ligase-65, por reação
- Polimerase: 7,5 µl de água ultrapura + 2 µl da mistura de SALSA *primers* para a reação de PCR + 0,5 µl de SALSA polimerase, por reação

6. PROTOCOLO MLPA

6.1. PROGRAMA PARA A REAÇÃO MLPA NO TERMOCICLADOR

Desnaturação do DNA		
1.	98 °C	5 minutos
2.	25 °C	pausa
Reação de hibridação		
3.	95 °C	1 minuto
4.	60 °C	16-20 horas
Reação de ligação		
5.	54 °C	pausa
6.	54 °C	15 minutos
7.	98 °C	5 minutos
8.	20 °C	pausa
Reação de 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 para a reação MLPA no termociclador deverá ser respeitado, a menos que seja referido o contrário na descrição do produto específico à probemix.

6.2. DESNATURAÇÃO DO DNA (1º DIA)

- Etiquete tubos, tiras ou placas de 0,2 ml.

- Adicione 5 µl da amostra de DNA (50-250 ng; 50-100 ng é a quantidade ótima), ou TE (controlo sem DNA) a cada tubo.
- Coloque os tubos no termociclador; inicie os passos 1-2 do programa para a reação MLPA no termociclador (ver secção 6.1).
- Antes de remover os tubos do termociclador, certifique-se que as amostras estão a 25 °C.

6.3. REAÇÃO DE HIBRIDAÇÃO (1º DIA)

- Prepare a mistura de hibridação. Para cada reação, misture: 1,5 µl de MLPA solução tampão (tampa amarela) + 1,5 µl de probemix (tampa preta). Misture bem através de pipetagem ou de agitação por vórtex.
- Após a desnaturação do DNA, adicione 3 µl da mistura de hibridação a cada reação. É crucial uma pipetagem rigorosa. Misture bem, pipetando cuidadosamente para cima e para baixo.
- Continue o programa do termociclador com os passos 3-4.

6.4. REAÇÃO DE LIGAÇÃO (2º DIA)

- Prepare uma mistura de Ligase-65. Para cada reação, misture: 25 µl de água ultrapura + 3 µl de solução tampão ligase A (tampa transparente) + 3 µl solução tampão ligase B (tampa branca), e a seguir adicione 1 µl de enzima Ligase-65 (tampa verde). Misture bem, pipetando cuidadosamente para cima e para baixo.
- Continue o programa do termociclador com o passo 5.
- Quando o termociclador estiver a 54 °C e **enquanto as amostras estiverem DENTRO do termociclador**, adicione 32 µl da mistura de Ligase-65 a cada reação MLPA. Misture bem, pipetando cuidadosamente para cima e para baixo.
- Continue o programa do termociclador com os passos 6-8.

6.5. REAÇÃO DE PCR (2º DIA)

- Prepare uma mistura de polimerase. Para cada reação, misture: 7,5 µl de água ultrapura + 2 µl de mistura de SALSA *primers* para a reação de PCR (tampa castanha), e a seguir adicione 0,5 µl de SALSA polimerase (tampa laranja). Misture bem, pipetando cuidadosamente para cima e para baixo.
- **À temperatura ambiente**, adicione 10 µl da mistura de polimerase a cada reação MLPA. Misture bem, pipetando cuidadosamente para cima e para baixo. Coloque os tubos **imediatamente** no termociclador e continue o programa do termociclador com os passos 9-11.
- Após a reação de PCR, não abra os tubos no mesmo compartimento que o termociclador. Para evitar contaminação, use micropipetas distintas para a realização das reações MLPA e para o manuseio dos produtos de PCR.
- O produto de PCR pode ser armazenado durante 1 semana se protegido da luz e mantido a 4 °C. Para períodos mais longos, o mesmo deve ser armazenado entre -25 °C e -15 °C.

7. SEPARAÇÃO DE FRAGMENTOS POR ELETROFORESE CAPILAR

7.1. NOTAS A LER ANTES DE INICIAR O ENSAIO

- O marcador (em inglês *size standard*), as condições da corrida de eletroforese, o polímero, o fluoróforo e o volume da reação de PCR MLPA dependem do tipo de instrumento de eletroforese capilar. Use as configurações predefinidas para a análise de fragmentos no seu instrumento de eletroforese capilar, aplicáveis à aplicação, ao polímero e ao comprimento capilar. As configurações do instrumento podem ter de ser otimizadas para assegurar a adequada separação dos fragmentos.
- Substitua regularmente os capilares e o polímero, seguindo as recomendações do fabricante. O polímero deteriora-se rapidamente após exposição prolongada a mais 25 °C. Se os picos do marcador estiverem repetidamente baixos e mais largos, isto pode significar deterioração dos capilares ou do polímero.
- Use formamida de elevada qualidade e armazene-a em alíquotas a -20 °C. A formamida pode acidificar, causando depuração e fragmentação do DNA ao aquecer.

7.2. ESPECIFICAÇÕES PARA A ELETROFORESE

Instrumento	Fluoróforo do primer	Capilares	Mistura de injeção
SCIEX CEQ-2000 CEQ-8000 CEQ-8800 GeXP	Cy5	33 cm	1 µl de reação de PCR ^a 0,5 µl de CEQ – size standard 600 (marcador) ^b 28,5 µl de formamida HiDi / Beckman SLS Adicione uma gota de óleo mineral de elevada qualidade.
ABI-Prism 3100 (Avant) ABI-3130 (xL) ABI-3500 ^c (xL) ABI-3730 (xL)	FAM	36, 50 cm	0,7 µl de reação de PCR ^a 0,3 µl de ROX ou 0,2 µl LIZ GS 500 size standard (marcador) 9 µl de formamida HiDi Sele a placa de injeção. Aqueça 3 min a 86 °C, arrefeça durante 2

ABI-SeqStudio Flex Hitachi DS3000 Promega Spectrum Compact			min a 4 °C ^d .
ABI-SeqStudio	FAM	28 cm	0,8 µl de reação de PCR ^a 0,3 µl de ROX/LIZ GS500 <i>size standard</i> (marcador) 12 µl de formamida HiDi Sele a placa de injeção. Aqueça 3 min a 86 °C, arrefeça durante 2 min a 4 °C ^d .

^a O volume do produto de PCR adicionado nunca deverá exceder os 10% da mistura total de injeção.

^b Se for necessário reduza o volume do marcador.

^c Para o instrumento ABI-3500: fixe a voltagem da corrida de eletroforese em 15 kV e garanta um tempo de corrida suficiente.

^d Recomenda-se aquecer brevemente a mistura de injeção antes da eletroforese capilar.

A tabela seguinte contém o intervalo de sinal ótimo, o sinal mínimo e o sinal máximo para os instrumentos de eletroforese capilar. Se os sinais ultrapassarem estes valores, podem ser obtidos resultados falsos. Pode ser necessário otimizar as configurações da análise de fragmentos.

Instrumento	Intervalo de sinal ótimo (em RFU)	Sinal mínimo (em RFU)	Sinal máximo (em RFU)
SCIEX CEQ/GeXP	9 375 - 136 000	3000	170 000
ABI série 310, 3100 & 3130	375 - 6 000	200	7 500
ABI série 3500, 3730 & SeqStudio, SeqStudio Flex, Hitachi DS3000, Promega Spectrum Compact	375 - 24 800	300	31 000

8. CONTROLO DE QUALIDADE DA TÉCNICA MLPA E TROUBLESHOOTING

8.1. FRAGMENTOS DE CONTROLO DE QUALIDADE DA TÉCNICA MLPA

O **software Coffalyser.Net** deve ser usado para a análise de dados obtidos com a técnica MLPA, já que este realiza verificações automáticas dos fragmentos de controlo, para assegurar que os requisitos mínimos de qualidade sejam cumpridos! As probemixes MLPA contêm fragmentos de controlo de qualidade que indicam a existência de problemas que podem afetar os resultados. Avalie a qualidade da reação MLPA, incluindo os fragmentos de controlo de qualidade, usando o fluxograma do controlo de qualidade (secção 8.4). Somente os dados que cumpram os requisitos de qualidade são adequados à interpretação dos resultados obtidos com a técnica MLPA. Para auxiliar na avaliação da qualidade, os módulos de e-learning para os fragmentos de controlo de qualidade da técnica MLPA e a secção de *troubleshooting* estão disponíveis on-line em www.mrcholland.com.

Quase todas as probemixes SALSA MLPA contêm nove fragmentos de controlo, como se descreve a seguir:

Nome	Comprimento (nt)	Interpretação
Fragmento de referência	92	Referência com a qual se comparam os outros fragmentos do controlo de qualidade.
Fragmentos de quantidade (Q-fragments)	64, 70, 76, 82	Elevados quando a quantidade de DNA é demasiado reduzida ou quando falhou a ligação. Mediana do sinal dos Q-fragments $\geq 33\%$ do que o fragmento de referência de 92 nt → quantidade insuficiente de DNA ou falha na ligação. Ver Figura 3.
Fragmentos de desnaturação (D-fragments)	88, 96	Reduzidos no caso de insuficiente desnaturação do DNA da amostra. Sinal $\leq 50\%$ do fragmento de referência de 92 nt → insuficiente desnaturação do DNA. Ver Figura 4.
Fragmentos X e Y	100, 105	Controlo para mistura ou troca de amostra ⁶ .

Q-FRAGMENTS

Os quatro Q-fragments (64, 70, 76 e 82 nt) funcionam com um controlo para a adição suficiente de DNA e para a ligação bem-sucedida. Os Q-fragments não precisam de hibridar com o DNA, ou de serem ligados para serem amplificados durante o PCR. A altura dos Q-fragments diminui à medida que é incluída mais amostra de DNA numa reação (Figura 3).

⁶ Conhecem-se casos de homens que não possuem esta sequência Y específica e de mulheres que apresentam esta sequência Y num cromossoma X.

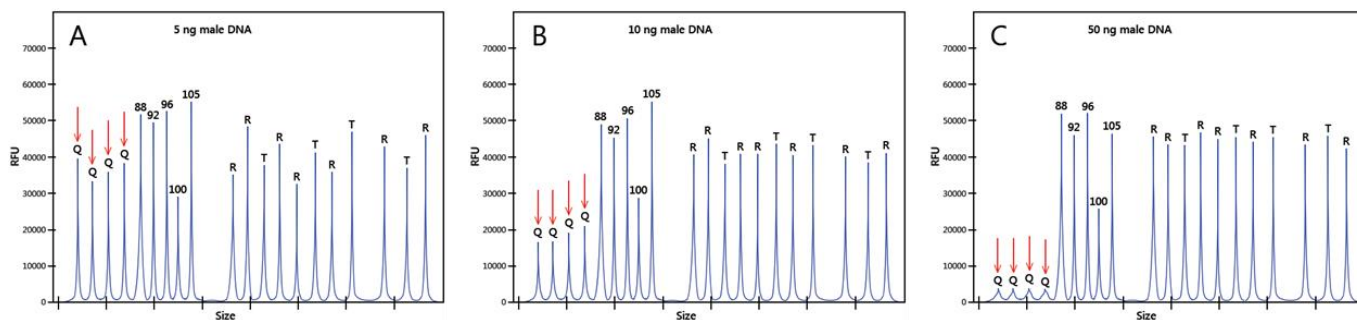


Figura 3. Efeito da quantidade de DNA sobre os Q-fragments. Quanto mais amostra de DNA for usada, menores serão os Q-fragments. Resultados da reação MLPA com **A.** 5 ng, **B.** 10 ng, **C.** 50 ng de DNA. As amostras **A.** e **B.** não contêm DNA suficiente.

D-FRAGMENTS

Os dois D-fragments (88 & 96 nt) detetam sequências em ilhas CpG excepcionalmente fortes. As ilhas CpG apresentam um elevado teor de GC e são difíceis de desnaturar. Quando os D-fragments 88 e 96 nt estão baixos ($\leq 50\%$ do fragmento de referência 92 nt) isto indica que a amostra de DNA foi insuficientemente desnaturada. A desnaturação insuficiente pode dever-se à presença de >40 mM de sal numa amostra de DNA. A desnaturação incompleta de uma amostra de DNA pode originar resultados falsos!

NOTA: Quando o polímero ABI POP7 é usado, um fragmento não específico de 80-90 nt está normalmente presente, podendo coincidir com os fragmentos de controlo de qualidade!

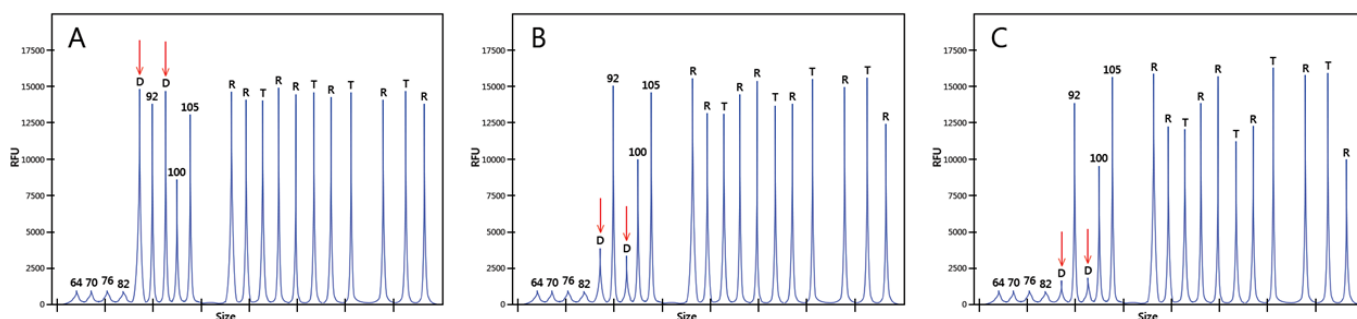


Figura 4. Efeito da desnaturação incompleta sobre os D-fragments. Os D-fragments são reduzidos quando a desnaturação da amostra de DNA é incompleta (aqui induzida pela adição de sal à amostra). Resultados da reação MLPA com a amostra de DNA em **A.** TE, **B.** TE + 40 mM NaCl, **C.** TE + 100 mM NaCl. Amostras **B.** e **C.** apresentam uma desnaturação insuficiente.

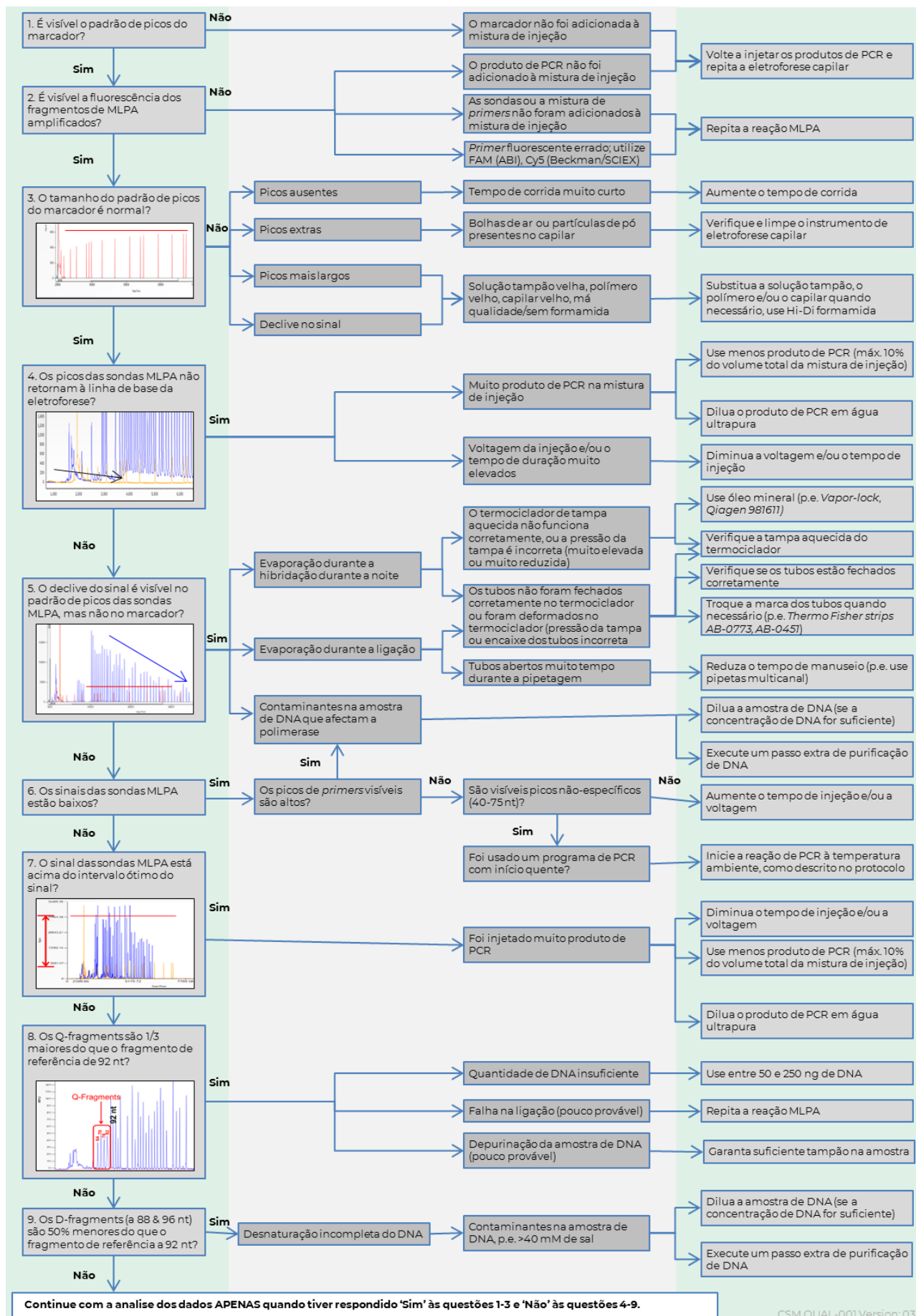
8.2. BRANCO (CONTROLO SEM DNA)

Num controlo sem DNA típico, só são visíveis os quatro Q-fragments. Em algumas probemixes, alguns picos mais longos do que 100 nt podem ser visíveis em controlos sem DNA. Estes picos não-específicos não influenciarão os resultados obtidos com a técnica MLPA caso seja usado DNA suficiente na amostra, já que são superados pela amplificação exponencial das sondas MLPA. Notifique a MRC Holland caso um pico não-específico no controlo sem DNA seja reproduzivelmente maior que 50% da altura da mediana dos Q-fragments.

8.3. EVAPORAÇÃO

Pode ocorrer evaporação durante (A) a pipetagem da reação de ligação a 54 °C, ou (B) a hibridação durante a noite, causando uma maior concentração de sal. Isto pode originar uma forte formação de estrutura secundária na amostra de DNA, podendo inibir a ligação de determinadas sondas às suas sequências alvo. Em geral, as placas são mais propensas à evaporação do que as tiras. Caso suspeite de evaporação, incuba 8 μ l de H₂O durante a noite a 60 °C; de manhã, deverão permanecer >5 μ l de H₂O. Para sugestões sobre como deve eliminar a evaporação, veja o passo 5 da secção 8.4. Se usar óleo mineral, adicione apenas o suficiente para cobrir a superfície. Não é necessário remover o óleo. Depois de adicionar a probemix e a mistura da polimerase, centrifugue brevemente os tubos. Depois de adicionar a mistura da ligase, pipete para cima e para baixo, por baixo da camada de óleo.

8.4. FLUXOGRAMA DO CONTROLO DE QUALIDADE



CSM_QUAL-001 Version: 03

9. ANÁLISE DE DADOS

O *software* Coffalyser.Net, juntamente com a *Coffalyser sheet* adequada e específica ao lote em uso, deve ser utilizada na análise de dados MLPA. Deve ser usada a versão mais recente, tanto do *software* como da *Coffalyser sheet*. O Manual de Referência do *software* Coffalyser.Net fornece instruções detalhadas para a análise de dados MLPA. Tanto o *software* como o manual podem ser transferidos gratuitamente a partir de www.mrcholland.com.

A fluorescência absoluta medida por eletroforese capilar, para cada sonda, é afetada por muitas variáveis e não pode ser usada diretamente. A fluorescência de cada sonda deve ser primeiro normalizada dentro de uma reação MLPA. Esta normalização usa sondas de referência que se esperam ter um número normal de cópias em todas as amostras. Os sinais relativos das sondas em cada amostra são comparados com os obtidos nas amostras de referência. Espera-se que as amostras de referência tenham um número normal de cópias, para todas as sondas de referência e sondas-alvo. Esta comparação permite a determinação do número relativo de cópias das sequências alvo numa amostra.

O *software* Coffalyser.Net seleciona o melhor método de análise para cada probemix MLPA e oferece um controlo extensivo da qualidade⁷. Para mais informações sobre como a análise de dados é realizada, consulte o Manual de Referência do *software* Coffalyser.Net. **Para probemixes MLPA registadas como IVD, deve usar-se o *software* Coffalyser.Net! A utilização de outro *software* pode originar resultados inconclusivos ou incorrectos!**

10. INTERPRETAÇÃO E CONFIRMAÇÃO

- Sempre que possível, as alterações genéticas detetadas com a técnica MLPA devem ser confirmadas por uma probemix MLPA de confirmação ou por uma técnica independente. As alterações no número de cópias detetadas por uma única sonda exigem sempre confirmação. A sequenciação de sequências de sondas alvo pode mostrar que um sinal de sonda reduzido pode ser causado por uma mutação/polimorfismo. A descoberta de duas sequências heterozigóticas, normalmente é uma indicação de que a amostra de DNA contém dois alelos distintos. Observe que a descoberta de um único alelo raro através de sequenciação, não implica que um alelo esteja deletado, já que podem estar presentes duas cópias do alelo raro. Um polimorfismo de nucleotídeo único (em inglês *single nucleotide polymorphism*, SNP) homozigótico pode originar uma redução parcial do sinal assemelhando-se a uma deleção heterozigótica.
- Nem todas as deleções ou duplicações detetadas pela técnica MLPA são patogénicas. Variações no número de cópias da linha germinal reportadas em indivíduos saudáveis estão disponíveis em <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>. A MRC Holland não pode fornecer informação sobre se a deleção ou duplicação de um exão específico originará uma doença.
- Certas aberrações no número de cópias podem dever-se a alterações somáticas, incluindo extensivas deleções e duplicações de cromossomas inteiros.
- Em caso de uma deleção homozigótica aparente, o eletroferograma deve ser inspecionado visualmente para identificar se o sinal está verdadeiramente ausente. Falta de sinais das sonda pode dever-se a problemas de compartimentação (em inglês *binning*) ou a sinais reduzidos.
- Não é provável que as alterações no número de cópias detetadas por sondas de referência ou por sondas de flaqueamento estejam relacionadas com a doença que está a ser testada. A identidade das sondas de referência é disponibilizada após ser solicitada.

11. PRECAUÇÕES E AVISOS

- Apenas para utilização profissional. O desempenho dos ensaios depende da proficiência do operador e do cumprimento das instruções de procedimento. O ensaio deve ser realizado por profissionais treinados em técnicas moleculares. A pessoa responsável pela interpretação dos resultados deve ser conhecedora dos mais recentes avanços científicos da aplicação em causa e de quaisquer limitações do procedimento MLPA que possam levar a resultados incorretos.
- É essencial a validação interna de cada ensaio MLPA, em especial quando se utiliza a técnica MLPA pela primeira vez, ou quando se altera o procedimento de manuseio de amostras, o método de extração de DNA ou os instrumentos usados; devem ser incluídas pelo menos 16 amostras de DNA normal. A validação deve demonstrar um desvio-padrão $\leq 0,10$ para cada sonda (exceto se a descrição do produto específico à probemix referir o contrário). As amostras usadas na validação devem ser representativas das amostras usadas na prática quotidiana.

⁷ O *software* Coffalyser.Net começa com a análise de dados não processados (correção da linha de base, identificação de picos) e permite um controlo extensivo da qualidade (p.ex. quantidade de DNA usado, desnaturação de DNA completa, correção do declive).

12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- Para a maioria das aplicações MLPA, a principal causa dos defeitos genéticos são pequenas mutações (pontuais), a maioria das quais não são detetadas por probemixes MLPA.
- A técnica MLPA não deteta deleções ou duplicações que se situem fora da sequência alvo das sondas, bem como inversões neutras ou translocações do número de cópias.
- Alterações (p.ex. devido a SNPs, mutações pontuais, indels de pequena dimensão) na sequência alvo ou perto da sequência alvo detetada por uma sonda podem causar falsos resultados positivos⁸.
- Contaminação das amostras de DNA com DNAC ou com fragmentos de exões individuais amplificados por PCR pode causar um aumento no sinal da sonda⁹. A análise de uma segunda amostra de DNA, recolhida e isolada de forma independente, pode excluir estes artefactos causados por contaminação.
- Em caso de desnaturação insuficiente da amostra de DNA, as deleções aparentes, mesmo de várias sondas que reconheçam alvos genómicos adjacentes, podem representar um resultado falso positivo! Regiões cromossómicas extremamente ricas em GC não são desnaturadas a 98 °C quando estão presentes mais de 40 mM de NaCl ou de KCl.
- Os testes MLPA fornecem o número médio de cópias das sequências alvo, nas células de onde foi extraída a amostra de DNA. Caso várias sondas de sequências adjacentes apresentem valores incomuns, mas não atinjam os valores limites habituais de uma deleção/duplicação, o mosaicismo pode ser uma possível causa.
- Pequenas diferenças na execução experimental podem afetar o padrão de picos MLPA. Inclua apenas na análise amostras que tenham sido a) incluídas na mesma experiência MLPA e b) testadas com o mesmo lote da probemix.
- As alterações subtis, como as observadas nos casos de mosaicismo, só conseguem ser distinguidas quando as sondas são organizadas segundo a localização cromossómica.
- Em determinados casos, pode ser necessário a análise de amostras parentais para a correta interpretação dos resultados.
- Na corrida de eletroforese de produtos MLPA, o protocolo de eletroforese capilar pode necessitar de otimização. Podem ser obtidos resultados falsos se um ou mais picos se encontrarem fora da escala. Por exemplo, uma duplicação de um ou mais exões pode ser ofuscada quando os picos estão fora da escala, o que origina um resultado falso negativo. O risco dos picos fora da escala é superior quando são usadas probemixes que contêm um número relativamente reduzido de sondas. O *software* Coffalyser.Net avisa para a presença de picos fora da escala, enquanto outros *softwares* não o fazem. Se um ou mais picos estiverem fora da escala, repita a corrida de eletroforese dos produtos de PCR usando: uma voltagem de injeção inferior / configurações do tempo de injeção inferiores, ou uma quantidade de amostra reduzida, através da diluição dos produtos de PCR.

Protocolo Geral MLPA - Histórico de versões

Versão-008-PTI (6 de Maio de 2022)

- As informações sobre os instrumentos de eletroforese capilar foram atualizadas nas secções 2.1 e 7.2, para estarem alinhadas com o software Coffalyser.Net.

Versão-007-PTI (1 de Março de 2019)

- As versões anteriores estão disponíveis apenas em Inglês.
- O protocolo foi reestruturado e algumas secções foram reescritas. Não houve alterações ao método de execução da técnica MLPA.
- O Beta-Mercaptoetanol foi substituído por DTT na Solução Tampão SALSA MLPA e na Solução Tampão SALSA Ligase-65.
- Foi adicionada uma nova limitação ao procedimento relativa a picos fora da escala.

Versão-006 (23 de Março de 2018)

- Foi adicionada uma nova Figura 2.
- Configurações iniciais e ABI-310 removidos da tabela de especificações de eletroforese.
- ABI-SeqStudio foi adicionado à tabela de especificações de eletroforese.
- Foi adicionada a tabela com o intervalo de sinais para instrumentos de eletroforese capilar.
- Foi adicionado o Fluxograma do Controlo de Qualidade.
- Foram adicionados pontos críticos à obtenção de bons resultados.
- A informação no protocolo foi reorganizada e reescrita.

⁸ No desenvolvimento de novas sondas, os SNP que são conhecidos são evitados sempre que possível. Contudo, estão continuamente a ser descobertos novos SNP. Pedimos que notifique a MRC Holland caso um polimorfismo ou uma mutação patogénica frequente influencie o sinal da 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.