



Protocole général MLPA®

Mode d'emploi

**MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* :
Amplification multiplex de sonde dépendante d'une ligature)
Protocole Général pour la détection et la quantification des séquences d'ADN.**

Ce protocole contient des informations essentielles pour obtenir des résultats MLPA fiables. Il doit être lu dans son intégralité et utilisé en association avec la fiche produit du MLPA probemix en question.

Les kits de réactifs SALSA® MLPA® et le logiciel d'analyse Coffalyser.Net sont enregistrés pour l'IVD (*In Vitro Diagnostic use* : diagnostic in vitro) dans certains pays (voir www.mrcholland.com). Dans tous les autres pays, ces produits sont RUO (*Research Use Only* : pour la recherche uniquement). Lors de l'utilisation d'un probemix enregistré pour les IVD à des fins de diagnostic, il est essentiel de le combiner aux kit de réactifs SALSA® MLPA® et au logiciel d'analyse Coffalyser.Net. Vous trouverez des informations spécifiques à chaque pays sur le statut IVD des probemix dans la fiche produit du MLPA probemix en question et à l'adresse www.mrcholland.com.

Un protocole distinct existe pour la détection du nombre de copies ADN en combinaison avec le statut de méthylation (MS-MLPA®). Ce protocole est disponible à l'adresse www.mrcholland.com.



Fabricant : MRC Holland B.V., Willem Schoutenstraat 1, 1057 DL Amsterdam, Pays-Bas

Site Web : www.mrcholland.com ; Téléphone : +31 888 657 200

E-mail : info@mrcholland.com (informations et questions techniques), order@mrcholland.com (commandes)

Table des matières

1.	INTRODUCTION.....	2
1.1.	COMPOSANTS DE DOSAGE SALSA MLPA ET CONDITIONS DE CONSERVATION.....	2
1.1.1.	NUMÉROS D'ARTICLES DU KIT DE RÉACTIFS.....	2
1.1.2.	COMPOSANTS DU KIT DE RÉACTIFS.....	3
1.1.3.	MLPA PROBEMIX SPÉCIFIQUE À UNE APPLICATION.....	3
1.1.4.	CONSERVATION ET DURÉE DE VIE.....	3
1.1.5.	ÉTIQUETTES D'EMBALLAGE.....	3
1.2.	PRINCIPE DE DOSAGE MLPA.....	3
2.	INSTRUCTIONS DE CONFIGURATION DE L'ESSAI.....	4
2.1.	MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI.....	4
2.2.	TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS ET CONSERVATION.....	5
2.3.	SÉLECTION DES ÉCHANTILLONS TÉMOINS ET AUTRES ÉCHANTILLONS DE CONTRÔLE.....	5
3.	REMARQUES À LIRE AVANT DE COMMENCER.....	6
4.	POINTS CRITIQUES POUR OBTENIR DE BONS RÉSULTATS MLPA.....	6
5.	PROTOCOLE MLPA - EN BREF.....	6
6.	PROTOCOLE MLPA.....	7
6.1.	PROGRAMME DU THERMOCYCLEUR POUR LA RÉACTION MLPA.....	7
6.2.	DÉNATURATION DE L'ADN (JOUR 1).....	7
6.3.	RÉACTION D'HYBRIDATION (JOUR 1).....	7
6.4.	RÉACTION DE LA LIGATURE (JOUR 2).....	7
6.5.	RÉACTION PCR (JOUR 2).....	8
7.	SÉPARATION DES FRAGMENTS PAR ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE.....	8
7.1.	REMARQUES À LIRE AVANT DE COMMENCER.....	8
7.2.	SPÉCIFICATIONS LIÉES À L'ÉLECTROPHORÈSE.....	8
8.	CONTRÔLE DE LA QUALITÉ MLPA ET DÉPANNAGE.....	9
8.1.	FRAGMENTS DE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ MLPA.....	9
8.2.	CONTRÔLE SANS ADN.....	10
8.3.	ÉVAPORATION.....	10
8.4.	ORGANIGRAMME DU CONTRÔLE DE QUALITÉ.....	11
9.	ANALYSE DE DONNÉES.....	12
10.	INTERPRÉTATION ET CONFIRMATION.....	12
11.	PRÉCAUTIONS ET MISES EN GARDE.....	12
12.	LIMITES DE LA PROCÉDURE.....	13

1. INTRODUCTION

Les variations du nombre de copies (anglais: *Copy Number Variations, CNV*) sont une source importante de variation génétique dans l'ADN humain et jouent un rôle dans un grand nombre de troubles. La *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®)* est une technique semi-quantitative non automatisée, basée sur une PCR multiplex, qui est utilisée pour déterminer le nombre de copies relatives allant jusqu'à 60 séquences ADN dans une seule réaction.

1.1. COMPOSANTS DE DOSAGE SALSA MLPA ET CONDITIONS DE CONSERVATION

1.1.1. NUMÉRO DE CATALOGUE DES KIT DE RÉACTIFS

No cat.	Description	Nombre de réactions	Fluorochrome pour l'amorce PCR
EK1-FAM ou EK1-Cy5	Kit de réactifs SALSA MLPA EK1	100	FAM ou Cy5
EK5-FAM ou EK5-Cy5	Kit de réactifs SALSA MLPA EK5	500	FAM ou Cy5
EK20-FAM	Kit de réactifs SALSA MLPA EK20	2 000	FAM

1.1.2.COMPOSANTS DU KIT DE RÉACTIFS

Composants du kit de réactifs	Volumes			Principes actifs ¹
	EK1	EK5	EK20	
SALSA MLPA Buffer (tampon) (capuchon jaune)	180 µl	5 × 180 µl	5 × 700 µl	KCl, Tris-HCl, EDTA, PEG-6000, DTT, oligonucléotides
SALSA Ligase-65 (capuchon vert)	115 µl	5 × 115 µl	5 × 460 µl	Glycérol, EDTA, DTT, KCl, Tris-HCl, détergent non ionique, enzyme Ligase-65 (origine bactérienne)
SALSA Ligase Buffer A (capuchon transparent)	360 µl	5 × 360 µl	5 × 1 420 µl	Coenzyme NAD (origine bactérienne)
SALSA Ligase Buffer B (capuchon blanc)	360 µl	5 × 360 µl	5 × 1 420 µl	Tris-HCl, MgCl ₂ , détergent non ionique
SALSA PCR Primer Mix (mélange d'amorce PCR) (capuchon marron)	240 µl	5 × 240 µl	5 × 940 µl	Oligonucléotides synthétiques avec fluorochrome (FAM ou Cy5), dNTP, Tris-HCl, KCl, EDTA, détergent non ionique
SALSA Polymerase (capuchon orange)	65 µl	5 × 65 µl	5 × 240 µl	Glycérol, détergents non ioniques, EDTA, DTT, KCl, Tris-HCl, enzyme polymérase (origine bactérienne)

1.1.3.RÉACTIFS MLPA DÉPENDANT DE L'APPLICATION

Reactifs spécifique à une application	Volumes disponibles (R = nombre de réactions)	Principes actifs
Probemix* (capuchon noir)	40 µl (25 R), 80 µl (50 R), 160 µl (100 R)	Oligonucléotides synthétiques, oligonucléotides purifiés à partir de bactéries, Tris-HCl, EDTA
Sample DNA# (SD : échantillon ADN) (capuchon bleu)	30 µl ou 100 µl	Tris-HCl, EDTA, ADN plasmide synthétique/témoin, ADN génomique humain féminin, ADN de lignée cellulaire









*Les probemix sont conçus pour être utilisés uniquement en association avec les kits de réactifs SALSA MLPA.

#Un flacon de SD (ADN pour la sélection des de références, ADN de *binning* ou ADN de duplication artificielle) est fourni ou peut être commandé séparément pour certains MLPA probemix. Les volumes et principes actifs dépendent du type de SD

1.1.4. STOCKAGE ET STABILITÉ

Tous les composants doivent être stockés directement à l'arrivée et après utilisation entre -25 et -15 °C, à l'abri de la lumière et dans l'emballage d'origine. Lorsqu'ils sont conservés dans les conditions recommandées, la durée de vie jusqu'à la date de péremption est garantie, même après ouverture. Pour connaître la date de péremption exacte, voir les étiquettes sur chaque flacon. Les produits ne doivent pas être exposés à plus de 25 cycles de congélation/décongélation..

1.1.5.ÉTIQUETTES D'EMBALLAGE

	Fabricant		Conserver à
	Code du lot		Tenir à l'écart de la chaleur ou de la lumière directe du soleil
	Utiliser jusque		Numéro de catalogue
	Nombre de réactions		Consultez les instructions d'utilisation
IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro	RUO	Pour la recherche uniquement

1.2. PRINCIPE DE DOSAGE MLPA

Le principe de la MLPA se base sur l'amplification d'un maximum de 60 sondes qui détectent chacune une séquence ADN spécifique d'environ 60 nt de longueur (Figure 1)². La réaction MLPA aboutit à un ensemble d'amplicons PCR uniques d'une longueur de 64 à 500 nt, séparés par électrophorèse capillaire. Après la dénaturation initiale de l'ADN de

¹ Aucun des principes actifs n'est issu de l'homme, des animaux ou de bactéries pathogènes. Selon les concentrations présentes, aucun des principes actifs n'est dangereux, conformément à la Norme de communication des risques. **Une Safety Data Sheet (SDS : fiche signalétique) n'est pas requise pour ces produits** : aucune des préparations ne contient des substances dangereuses (conformément au Règlement n°1272/2008[EU-GHS/CLP] et à ses amendements) à des concentrations nécessitant la distribution d'une SDS (conformément aux Règlements n°1272/2008[EU-GHS/CLP] et 1907/2006[REACH] et à ses amendements). En cas de déversements, nettoyer à l'eau et suivre les procédures appropriées du site.

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

l'échantillon, un mélange de sondes MLPA (*MLPA probemix*) est ajouté à l'échantillon. En général, chaque sonde MLPA se compose de deux oligonucléotides qui doivent hybrider aux séquences cibles directement adjacentes afin d'être ligaturés pour former une seule sonde (Figure 1). Lors de la réaction PCR suivante, toutes les sondes ligaturées sont amplifiées simultanément à l'aide de la même paire d'amorces PCR, ce qui donne un ensemble d'amplicons PCR uniques. Une amorce est marquée avec un fluorochrome, ce qui permet de visualiser les produits d'amplification lors de la séparation de fragments sur un système d'électrophorèse capillaire. La séparation des fragments conduit à un électrophérogramme spécifique à l'échantillon: le modèle de pic de l'échantillon (Figure 2, en haut).

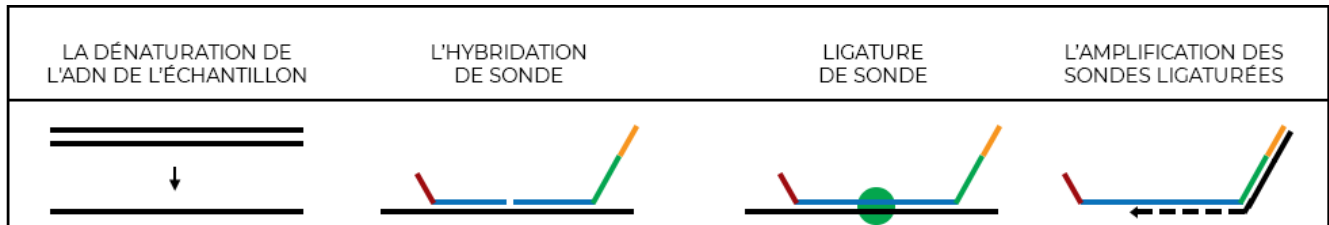


Figure 1. Réaction MLPA.

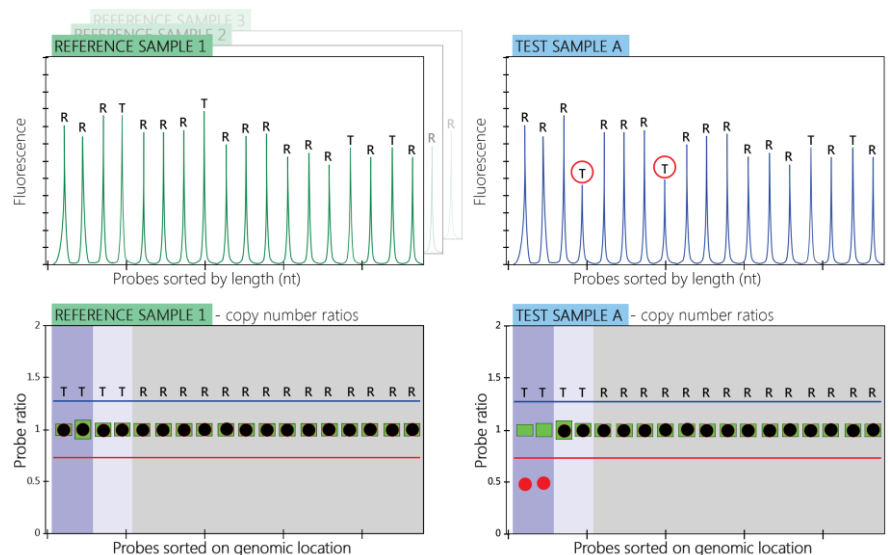
La MLPA est une technique relative : ce n'est qu'en comparant les modèles de pics de MLPA entre les échantillons que des différences relatives peuvent être détectées. La hauteur relative de chaque pic de sonde comparée à la hauteur relative de cet pic de sonde dans les échantillons de référence, reflète le *nombre de copies relatives* de la séquence cible correspondante dans l'échantillon à analyser. L'inclusion d'échantillons de référence dans la même expérience est donc essentielle.

La délétion d'un ou de plusieurs séquences cibles se voit comme une diminution relative de la hauteur du pic (Figure 2, en bas), alors qu'une augmentation relative de la hauteur de pic reflète une augmentation du nombre de copies.

Figure 2. Comparaison de profil des données MLPA.

En haut : l'électrophérogramme de l'échantillon à analyser A (*Test Sample A*, à droite) est comparé à celui des échantillons de référence (*Reference Samples*, à gauche). Une diminution relative du signal de deux sondes est observée dans l'échantillon à analyser A (encadré en rouge).

En bas : les rapports de sonde calculés de l'échantillon à analyser A (à droite) normalisés par rapport aux échantillons de référence (à gauche), comme indiqué par le logiciel Coffalyser.Net. Le tri des sondes par leur emplacement chromosomique révèle une délétion hétérozygote, rapport de sonde de 0,5, dans l'échantillon A (points rouges).



T : sondes cibles (*Target probes*), R : sondes de référence (*Reference probes*).

2. INSTRUCTIONS DE CONFIGURATION DE L'ESSAI

2.1. MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Eau ultrapure
- TE_{0.1} (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM EDTA)
- Thermocycleur calibré avec couvercle chauffant (99-105° C) et équipement de laboratoire standard
- Tubes, bandes ou plaques PCR 0,2 ml
- Système d'électrophorèse capillaire³ avec logiciel d'analyse de fragments

³ Les systèmes d'électrophorèse capillaire qui n'utilisent pas de conditions de dénaturation, tels que QIAGEN QIAxcel ou Agilent Fragment Analyzer, ne peuvent pas être utilisés en association avec la MLPA.

- Applied Biosystems : Standard Foundation Data Collection Software (Biosystèmes appliqués : logiciel standard de collecte de données Foundation)
- SCIEX : GeXP Software Package
- Formamide de haute qualité (par exemple, Hi-Di Formamide, Applied Biosystems)
- Taille étiquetée selon la norme
 - Applied Biosystems : GeneScan™ 500 LIZ®/ROX™ (préféré ; utilisation obligatoire avec les probemix enregistrés sous IVD), GeneScan™ 600 LIZ®, GeneScan™ 500 TAMRA™
 - SCIEX : CEQ™ DNA Size Standard Kit - 600
- Polymères
 - Applied Biosystems : POP-4 ou POP-7 préférés. POP-6 n'est pas recommandé en raison de sa haute résolution. SeqStudio : POP-1 est intégré à la cartouche et convient.
 - SCIEX : gel dénaturant GenomeLab™ Linear Polyacrylamide (LPA) denaturing gel
- Logiciel d'analyse Coffalyser.Net (téléchargeable gratuitement sur www.mrcholland.com)

2.2. TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS ET CONSERVATION

- Utiliser une quantité totale de 50 à 250 ng d'ADN humain (50-100 ng est optimal; sauf indication contraire dans la description du produit spécifique au probemix) dans un volume de 5 µl⁴ pour chaque réaction MLPA⁵. Si nécessaire, les échantillons d'ADN peuvent être concentrés par précipitation à l'éthanol, avec l'aide de glycogène (Roche 901393). Pour en savoir plus, consulter www.mrcholland.com.
- Les préparations d'ADN doivent contenir du tampon Tris 5-10 mM avec un pH de 8,0 à 8,5 pour empêcher la dépurination au cours de l'étape de dénaturation initiale à 98 °C. Par exemple, dissoudre et diluer l'ADN de l'échantillon dans du **TE** 0,1 (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM EDTA). Si on ne sait pas si une capacité de tampon suffisante est présente, ajouter Tris-HCl : 4 µl de l'ADN + 1 µl de Tris-HCl 50 mM, pH 8,5.
- Les contaminants restants après l'extraction de l'ADN, notamment NaCl ou KCl (> 40 mM) et d'autres sels, phénols, éthanol, héparines, EDTA (> 1,5 mM) et Fe, peuvent affecter les performances de la MLPA. La MLPA est plus sensible aux impuretés que les essais PCR monoplexes. Ne pas concentrer l'ADN par évaporation ou SpeedVac; cela provoque des concentrations élevées en EDTA et en sel.
- S'assurer que la méthode d'extraction, le type de tissu, la concentration en ADN et le traitement sont aussi similaires que possible dans les échantillons à analyser et les échantillons de référence.
- Les méthodes d'extraction ne doivent pas laisser une concentration élevée en contaminants. Ne pas utiliser les systèmes QIAGEN M6, M48 et M96, car ils laissent trop de sel. Pour QIAGEN EZ1, utiliser le *QIAGEN Supplementary Protocol: Purification of genomic DNA from whole blood, optimized for use in MRC-Holland MLPA® assays, using EZ1® DNA Blood Kits (Protocole additionnel QIAGEN : purification de l'ADN génomique de sang total, optimisé pour une utilisation dans des essais MRC-Holland MLPA®, en utilisant les kits de sang d'ADN EZ1®)*; voir www.mrcholland.com. MRC Holland a testé et peut recommander les méthodes d'extraction suivantes :
 - QIAGEN Autopure LS (automatisé) et QIAamp DNA mini/midi/maxi kit (manuel)
 - Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (manuel)
 - Assèchement (manuel)
- Le sang hépariné ne peut être utilisé que si l'échantillon a été soumis à une méthode de purification pour éliminer la contamination en héparine (Nucleospin gDNA Clean-up XS, par exemple).
- Un traitement à l'RNase n'est essentiel que pour l'examen de gènes hautement exprimés dans le tissu de l'échantillon étudié. Par exemple, *HBA* et *HBB* dans des échantillons dérivés du sang ; les gènes de l'ARN ribosomal (mitochondrial) (tous les tissus).
- Dans certains cas, la SALSA Sample Stabilising Solution (S4 ; numéro de catalogue SMR04, SMR45) (RUO) peut améliorer la qualité de la réaction MLPA. Voir la fiche produit sur www.mrcholland.com pour obtenir plus d'informations.
- L'ADN provenant de réactions d'amplification du génome entier (anglais : WGA) ne convient pas à la MLPA en raison du biais d'amplification.
- Aliquoter les échantillons et les conserver à -20 °C. La contamination par des microorganismes peut détériorer les échantillons stockés à 4 °C pendant une période prolongée.

2.3. SÉLECTION DES ÉCHANTILLONS DE RÉFÉRENCE ET AUTRES ÉCHANTILLONS DE CONTRÔLE

- SÉLECTION DES ÉCHANTILLONS DE RÉFÉRENCE. Les échantillons de référence sont des échantillons d'ADN obtenus d'individus sains avec un nombre normal de copies pour les séquences détectées par les sondes cible et de référence. Ils doivent être aussi similaires que possible aux échantillons à analyser sous tous les aspects, y

⁴ Ne jamais utiliser plus de 5 µl de l'ADN d'échantillon par réaction. L'utilisation de plus de 5 µl d'ADN réduit la concentration en sonde et en sel. Cela réduit la vitesse d'hybridation et la stabilité de la liaison des sondes MLPA à l'ADN de l'échantillon.

⁵ Les mesures de densité optique (260 nm) surestiment souvent la concentration en ADN, par exemple en raison d'une contamination par ARN. Il est possible d'estimer si la quantité d'ADN est suffisante selon les Q-fragments, comme expliqué dans 8.1.

compris la méthode d'extraction et la source de l'échantillon. Veuillez noter que tous les probemix ne conviennent pas à l'utilisation avec de l'ADN de toutes les sources (par exemple, un tissu fixé au formol et inclus dans la paraffine). Toujours consulter la fiche produit du MLPA probemix en question pour connaître les sources d'ADN appropriées.

- ÉCHANTILLONS DE RÉFÉRENCE. Au moins trois échantillons de référence doivent être inclus dans chaque expérience MLPA. Lors du test de > 21 échantillons, inclure un échantillon de référence supplémentaire pour chaque sept échantillons de test supplémentaires. Répartir les échantillons de référence de manière aléatoire au cours de l'expérience afin de minimiser les variations. **Plusieurs échantillons de référence** sont nécessaires pour estimer la reproductibilité de chaque sonde au cours de chaque analyse MLPA.
- ADN COMMERCIAL. En cas de doute sur la qualité de l'échantillon, inclure un ou plusieurs échantillons d'ADN commercial à des fins de comparaison. Nous recommandons les ADN Promega no cat. G1471 mâle et G1521 femelle. L'ADN commercial ne doit être utilisé que comme contrôle pour vérifier la qualité de l'échantillon et ne peut pas être utilisé comme échantillon de référence.
- CONTRÔLE SANS ADN. Il est recommandé d'inclure un contrôle sans ADN dans chaque analyse MLPA. Remplacer 5 µl d'ADN par TE_{0.1} (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 + EDTA 0,1 mM) pour vérifier la contamination des réactifs TE, MLPA, des réactifs d'électrophorèse ou des capillaires.
- ÉCHANTILLONS DE CONTRÔLE POSITIF. L'inclusion d'échantillons de contrôle positifs est recommandée lorsque disponible. MRC Holland ne fournit pas d'échantillons positifs, mais une liste d'échantillons positifs disponibles dans le commerce est disponible sur www.mrcholland.com. Lors de l'utilisation d'ADN de lignée cellulaire, notez que les lignées cellulaires peuvent avoir subi des modifications supplémentaires du nombre de copies, notamment des gains ou des pertes de chromosomes complets.

3. REMARQUES À LIRE AVANT DE COMMENCER

- Toujours vortexer les tampons décongelés et le probemix, puis faites une brève centrifugation. Tous les tubes de réactif enzymatique doivent être centrifugés brièvement. Le MLPA buffer est généralement congelé à -20 °C, mais peut rester liquide en raison de sa forte concentration en sel.
- Avant utilisation, réchauffer les flacons d'enzymes (Ligase-65 et polymérase) pendant 10 secondes dans votre main pour réduire la viscosité.
- Les solutions enzymatiques contiennent 50 % de glycérol et restent liquides à -20 °C. Les *master mix* (mélange de réactifs) contenant des enzymes doivent être bien mélangés en pipettant doucement de haut en bas. Un mélange insuffisant peut entraîner des résultats peu fiables. Lors de la préparation des *master mix*, toujours ajouter les enzymes en dernier. **Ne jamais vortexer des solutions contenant des enzymes**, car l'inactivation des enzymes peut se produire.
- Pour minimiser les variations dans les échantillons, préparer des volumes suffisamment importants de solutions de *master mix* (excès de volume de 5 à 10 %).
- Préparer des *master mix* (Ligase-65 et polymérase) à température ambiante (TA) juste avant utilisation. Lorsque préparé >1 heure avant utilisation, conserver les *master mix* sur de la glace ou à 4 °C. Les *master mix* doivent être chauffés à température ambiante avant ajout aux réactions MLPA. Des pics non spécifiques peuvent se former lors de la réaction sans ADN lorsqu'on ajoute un *master mix* de ligase-65 très froid.
- Utiliser des pipettes multicanaux pour éviter une évaporation excessive.
- Une vidéo sur la façon de réaliser une réaction MLPA dans un laboratoire est disponible sur www.mrcholland.com/education.

4. POINTS CRITIQUES POUR OBTENIR DE BONS RÉSULTATS MLPA

- S'assurer que tous les échantillons d'ADN contiennent du Tris-HCl 5-10 mM, pH 8-8,5. (Section 2.2)
- Inclure au moins trois échantillons de référence, issus du même type de tissu et traités de la même manière que les échantillons à analyser, dans chaque expérience MLPA. (Section 2.3)
- Un pipetage précis des réactifs est essentiel pour obtenir des résultats fiables. Ceci est particulièrement critique pour les 3 µl de *master mix* d'hybridation. (Section 6)
- Utiliser Coffalyser.Net pour l'analyse des données. (Section 9)
- Vérifier les fragments de qualité. La dénaturation complète de l'ADN d'échantillon est essentielle. (Section 8)
- Effectuer une maintenance régulière du système d'électrophorèse capillaire, en remplaçant les capillaires et le polymère, selon les recommandations du fabricant. (Section 7)

5. PROTOCOLE MLPA - EN BREF

1. DÉNATURATION DE L'ADN
 - Chauffer un échantillon d'ADN de 5 µl pendant 5 minutes à 98 °C
2. HYBRIDATION DE SONDES SUR L'ADN D'ÉCHANTILLON
 - Refroidir à température ambiante, ouvrir les tubes
 - Ajouter 3 µl de *master mix* d'hybridation*

- Incuber 1 minute à 95° C et hybrider pendant 16 heures à 60° C
- 3. LIGATION DE SONDAS HYBRIDES
 - Réduire la température du thermocycleur à 54 °C, ouvrir les tubes
 - Ajouter 32 µl de *master mix* de Ligase-65 *, incuber 15 minutes à 54° C
 - Inactivation thermique de l'enzyme ligase : 5 minutes à 98° C
- 4. AMPLIFICATION PAR PCR DE SONDAS LIGATURÉES
 - Refroidir à température ambiante, ouvrir les tubes
 - Ajouter 10 µl de polymérase *master mix** à température ambiante
 - Lancer la PCR (35 x {95 °C 30 secondes, 60 °C 30 secondes, 72 °C 60 secondes}, 72 °C 20 minutes, pause à 15 °C)
- 5. SÉPARATION DES FRAGMENTS PAR ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE
- 6. ANALYSE DES RÉSULTATS AVEC COFFALYSER.NET

**Master mix* (mélanges de réactifs) :

- Hybridation : 1,5 µl de probemix SALSA + 1,5 µl de MLPA buffer, par réaction
- Ligase-65 : 3 µl de ligase buffer A + 3 µl de ligase buffer B + 25 µl d'eau ultrapure + 1 µl de Ligase-65, par réaction
- Polymérase : 7,5 µl d'eau ultrapure + 2 µl de PCR primer mix + 0,5 µl de SALSA polymérase, par réaction

6. PROTOCOLE MLPA

6.1. PROGRAMME DU THERMOCYCLEUR POUR LA RÉACTION MLPA

Dénaturation de l'ADN		
1.	98 °C	5 minutes
2.	25 °C	pause
Réaction d'hybridation		
3.	95 °C	1 minute
4.	60 °C	16 à 20 heures
Réaction de la ligature		
5.	54 °C	pause
6.	54 °C	15 minutes
7.	98 °C	5 minutes
8.	20 °C	pause
Réaction PCR		
9.	35 cycles :	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C 30 secondes • 60 °C 30 secondes • 72 °C 60 secondes
10.	72 °C	20 minutes
11.	15 °C	pause

Remarque : ce programme de thermocycleur doit être suivi, sauf indication contraire dans la fiche produit du MLPA probemix en question..

6.2. DÉNATURATION DE L'ADN (JOUR 1)

- Étiqueter les tubes , les bandes ou les plaques de 0,2 ml.
- Ajouter 5 µl d'échantillon d'ADN (50-250 ng ; 50-100 ng est optimal) ou TE (contrôle non-ADN) dans chaque tube.
- Placer les tubes dans le thermocycleur ; démarrer les étapes 1 et 2 du programme de thermocycleur MLPA (voir section 6.1).
- S'assurer que les échantillons sont à 25 °C avant de retirer les tubes du thermocycleur.

6.3. RÉACTION D'HYBRIDATION (JOUR 1)

- Préparer le *master mix* d'hybridation. Pour chaque réaction, mélanger : 1,5 µl de MLPA buffer (capuchon jaune) + 1,5 µl de probemix (capuchon noir). Bien mélanger par pipetage ou vortex.
- Après dénaturation de l'ADN, ajouter 3 µl de *master mix* d'hybridation à chaque réaction. Un pipetage précis est essentiel. Bien mélanger doucement de haut en bas par pipetage.
- Continuer le programme de thermocycleur avec les étapes 3 et 4.

6.4. RÉACTION DE LA LIGATURE (JOUR 2)

- Préparer le *master mix* Ligase-65. Pour chaque réaction, mélanger : 25 µl d'eau ultrapure + 3 µl de ligase buffer A (capuchon transparent) + 3 µl de ligase buffer B (capuchon blanc), puis ajouter 1 µl d'enzyme Ligase-65 (capuchon vert). Bien mélanger doucement de haut en bas par pipetage.

- Continuer le programme de thermocycleur avec l'étape 5.
- Lorsque le thermocycleur est à 54 °C et **que les échantillons sont DANS le thermocycleur**, ajouter 32 µl de *master mix* Ligase-65 à chaque réaction MLPA. Bien mélanger doucement de haut en bas par pipetage.
- Continuer le programme de thermocycleur avec les étapes 6 et 8.

6.5. RÉACTION PCR (JOUR 2)

- Préparer le polymérase *master mix*. Pour chaque réaction, mélanger : 7,5 µl d'eau ultrapure + 2 µl de SALSA PCR primer mix (capuchon marron), puis ajouter 0,5 µl de SALSA polymérase (capuchon orange). Bien mélanger doucement de haut en bas par pipetage.
- **À température ambiante**, ajouter 10 µl de polymérase *master mix* à chaque réaction MLPA. Bien mélanger doucement de haut en bas par pipetage. Placer **immédiatement** les tubes dans le thermocycleur et poursuivre le programme de thermocycleur en suivant les étapes 9 à 11.
- Après la réaction PCR, ne pas ouvrir les tubes dans la même pièce que le thermocycleur. Pour éviter toute contamination, utiliser différentes micropipettes pour effectuer les réactions MLPA et manipuler les produits de PCR MLPA.
- Le produit de PCR peut être conservé à l'abri de la lumière à 4 °C pendant 1 semaine. Pour des périodes plus longues, conserver entre -25 °C et -15 °C.

7. SÉPARATION DES FRAGMENTS PAR ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

7.1. REMARQUES À LIRE AVANT DE COMMENCER

- Le choix du marqueur de taille (*size standard*), des conditions d'analyse, du polymère, du fluorochrome et du volume de la réaction PCR MLPA dépendent du type de système d'électrophorèse capillaire. Utiliser les paramètres d'analyse des fragments par défaut de votre système d'électrophorèse capillaire applicables à l'application, au polymère et à la longueur du capillaire. Les paramètres de l'instrument peuvent nécessiter une optimisation pour assurer la séparation correcte des fragments.
- Remplacer les capillaires et le polymère régulièrement, en suivant les recommandations du fabricant. Le polymère se détériore rapidement après une exposition prolongée à >25 °C. Si les pics de marqueur de taille sont constamment bas et larges, les capillaires ou le polymère se sont peut-être détériorés.
- Utiliser du formamide de haute qualité et le conserver en aliquotes à -20 °C. Le formamide peut devenir acide, entraînant une dépurination et une fragmentation de l'ADN lors du chauffage.

7.2. SPÉCIFICATIONS LIÉES À L'ÉLECTROPHORÈSE

Instrument	Colorant de l'amorce	Capillaires	Mélange d'injection
CEQ-2000 CEQ-8000 CEQ-8800 SCIEX GeXP	Cy5	33 cm	1 µl de réaction PCR ^a 0,5 µl de CEQ DNA Size Standard 600 ^b 28,5 µl de formamide Hi-Di/Beckman SLS Ajouter une goutte d'huile minérale de haute qualité.
ABI-Prism 3100 (Avant) ABI-3130 (XL) ABI-3500 ^c (xL) ABI-3730 (xL)	FAM	36, 50 cm	0,7 µl de réaction PCR ^a 0,3 µl de ROX ou 0,2 µl de LIZ GeneScan 500 Size Standard 9 µl de formamide Hi-Di Sceller la plaque d'injection. Chauffer 3 min à 86 °C, refroidir pendant 2 min à 4° C ^d .
ABI-SeqStudio	FAM	28 cm	0,8 µl de réaction PCR ^a 0,3 µl de ROX /LIZ GeneScan 500 Size Standard 12 µl de formamide Hi-Di Sceller la plaque d'injection. Chauffer 3 min à 86 °C, refroidir pendant 2 min à 4° C ^d .

^a Le volume de produit de PCR ajouté ne doit jamais dépasser 10 % du mélange de chargement total.

^b Réduire le volume de marqueur de taille si nécessaire.

^c Pour ABI-3500 : régler la *run voltage* sur 15 kV et s'assurer que le temps d'exécution est suffisant.

^d Il est recommandé de chauffer brièvement le mélange de chargement avant de commencer l'électrophorèse capillaire.

Le tableau ci-dessous contient les portées optimales, minimales et maximales de signaux pour les systèmes d'électrophorèse capillaire. Si les signaux tombent en dehors de ces valeurs, des résultats faux peuvent être obtenus. L'optimisation des paramètres d'analyse des fragments peut être nécessaire.

Instrument	Portée optimale du signal (en RFU)	Signal minimal (en RFU)	Signal maximal (en RFU)
SCIEX CEQ/GeXP	9 375 à 136 000	5 000	170 000
Séries ABI 310, 3100 et 3130	375 à 6 000	200	7 500

Séries ABI 3500, 3730 et SeqStudio	375 à 24 800	300	31 000
------------------------------------	--------------	-----	--------

8. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ MLPA ET DÉPANNAGE

8.1. FRAGMENTS DE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ MLPA

Coffalyser.Net doit être utilisé pour l'analyse de données MLPA, car il effectue automatiquement des vérifications des fragments de contrôle pour garantir le respect des exigences de qualité minimales. Les MLPA probemix contiennent des fragments de contrôle de la qualité qui signalent s'il y a des problèmes qui peuvent affecter les résultats de la MLPA. Évaluer la qualité de la réaction MLPA, y compris des fragments de contrôle de la qualité, en utilisant l'organigramme de contrôle de la qualité (section 8.4). Seules les données répondant aux exigences de qualité conviennent à l'interprétation des résultats MLPA. Pour faciliter l'évaluation de la qualité, des modules d'apprentissage en ligne sur les fragments de contrôle de la qualité MLPA et un assistant de dépannage MLPA sont disponibles en ligne à www.mrcholland.com/education.

Presque tous les MLPA probemix SALSA contiennent neuf fragments de contrôle, comme décrit ci-dessous :

Nom	Longueur (nt)	Interprétation
Fragment de Référence (Benchmark Fragment)	92	Indice de référence auquel comparer d'autres fragments de contrôle de la qualité.
Fragments de Quantité (Q-fragments)	64, 70, 76, 82	Élevé lorsque la quantité d'ADN est trop faible ou que la ligature a échoué. Médian des signaux Q-fragment $\geq 33\%$ des fragments de référence 92 nt \rightarrow quantité insuffisante d'ADN ou la ligature a échoué. Voir Figure 3.
Fragments de Dénaturation (D-fragments)	88, 96	Faible en cas de faible dénaturation de l'ADN de l'échantillon. Signal de $\leq 50\%$ du fragment de référence 92 nt \rightarrow Dénaturation de l'ADN insuffisante. Voir Figure 4.
Fragments X et Y	100, 105	Contrôle pour l'échange accidentelle d'échantillons ⁶ .

Q-FRAGMENTS

Les quatre Q-fragments (64, 70, 76 et 82 nt) vérifient si l'addition d'ADN est suffisante et si la ligature est réussie. Les Q-fragments n'ont pas besoin de s'hybrider à l'ADN ou d'être ligaturés pour être amplifiés au cours de la PCR. La taille des Q-fragments diminue lorsque l'on utilise plus d'échantillon d'ADN (Figure 3).

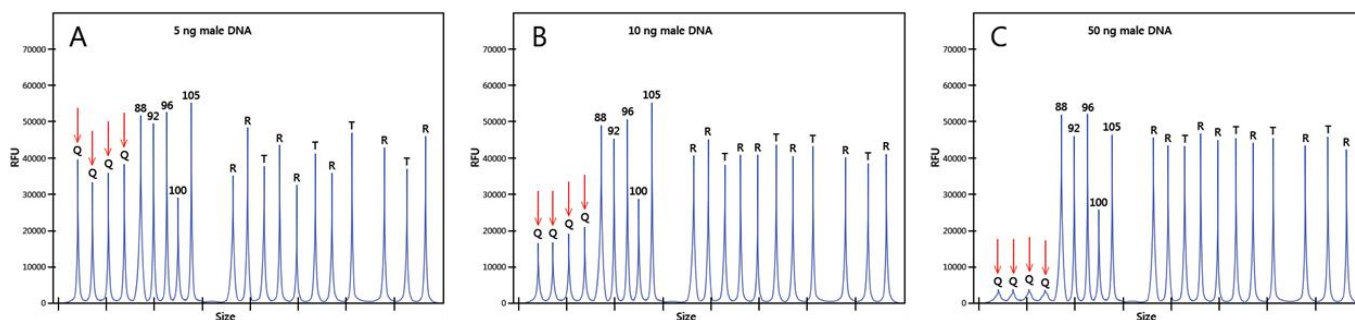


Figure 3. Effet de la quantité d'ADN sur les Q-fragments. Plus on utilise d'ADN, plus les pics du fragment Q sont faibles. Résultats MLPA avec **A.** 5 ng, **B.** 10 ng, **C.** 50 ng d'ADN. Les échantillons **A.** et **B.** ne contiennent pas suffisamment d'ADN.

D-FRAGMENTS

Les deux D-fragments (88 et 96 nt) détectent des séquences dans des îlots CpG exceptionnellement puissants. Les îlots CpG ont un contenu élevé en GC et sont difficiles à dénaturer. Lorsque les D-fragments de 88 et 96 nt sont faibles ($\leq 50\%$ du fragment de référence 92 nt), cela indique que l'ADN de l'échantillon n'a pas été suffisamment dénaturé. Une faible dénaturation peut être due à la présence de sel > 40 mM dans un échantillon d'ADN. La dénaturation incomplète de l'ADN d'un échantillon peut entraîner des résultats erronés.

REMARQUE : lors de l'utilisation du polymère ABI POP7, un fragment non spécifique de 80 à 90 nt est généralement présent et peut coïncider avec les fragments de contrôle.

⁶ On connaît des cas d'hommes n'ayant pas cette séquence spécifique du chromosome Y et de femmes portant cette séquence du chromosome Y sur un chromosome X

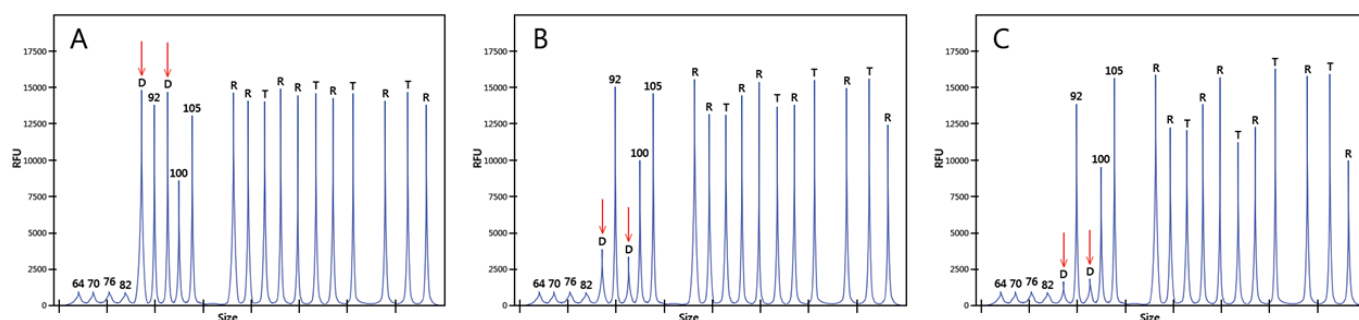


Figure 4. Effet d'une faible dénaturation sur les D-fragments. Les D-fragments sont faibles lorsque la dénaturation de l'ADN de l'échantillon est incomplète (induite ici par l'ajout de sel à l'échantillon). Résultats MLPA sur des échantillons d'ADN contenant **A.** TE, **B.** TE + 40 mM NaCl, **C.** TE + 100 mM NaCl. Les échantillons **B.** et **C.** montrent une dénaturation insuffisante.

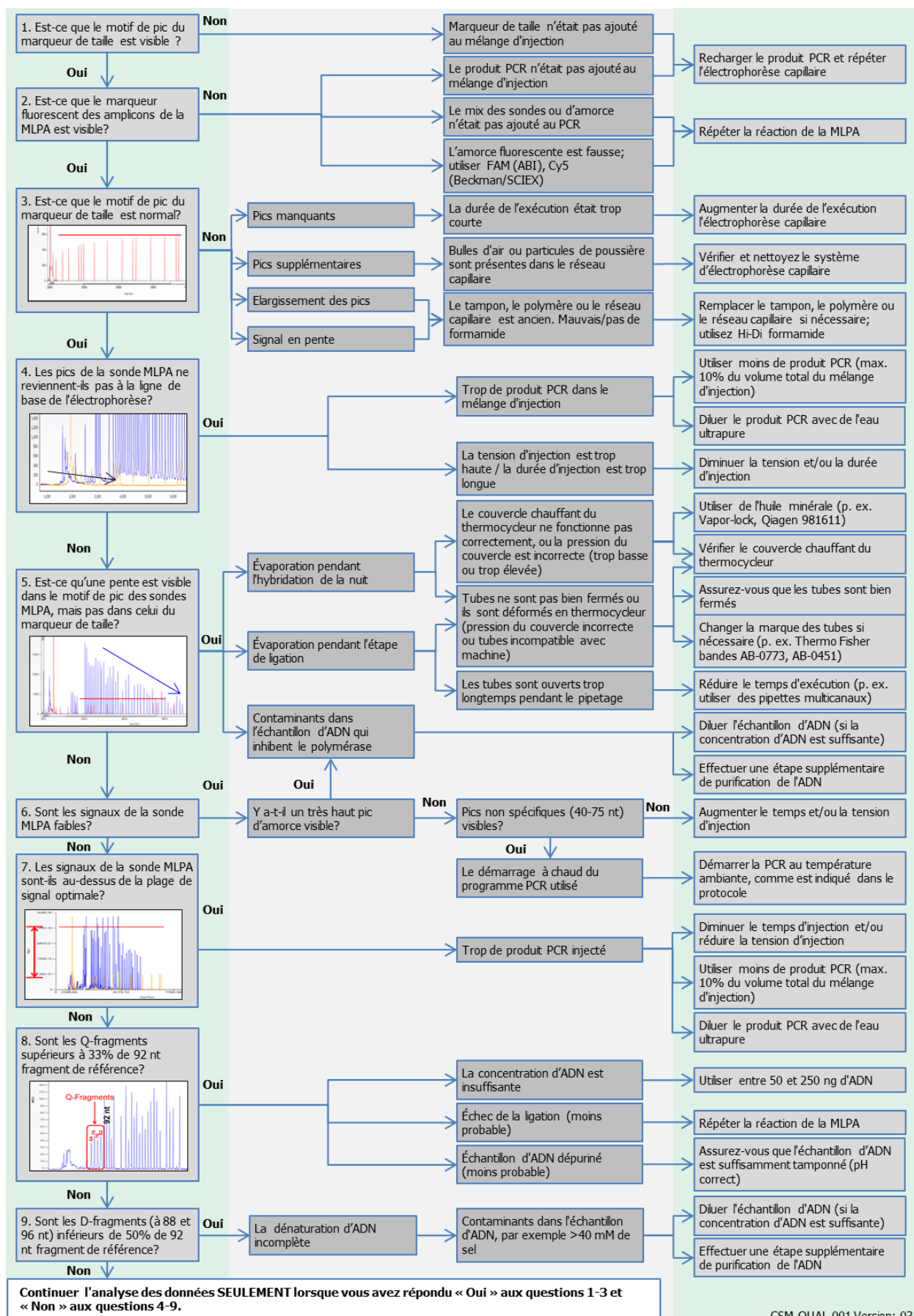
8.2. CONTRÔLE SANS ADN (BLANC)

Dans un contrôle sans ADN typique, seuls les quatre Q-fragments sont visibles. Dans certains probemix, quelques pics de plus de 100 nt peuvent être visibles dans les contrôles sans ADN. Ces pics non-spécifiques n'influenceront pas les résultats de la MLPA si une quantité suffisante d'ADN est utilisée, car ils sont dépassés par l'amplification exponentielle des sondes MLPA. Avertir MRC Holland si un pic non-spécifique dans le contrôle sans ADN est reproductiblement supérieur à 50 % de la hauteur médiane des Q-fragments.

8.3. ÉVAPORATION

L'évaporation peut se produire pendant (A) le pipetage de la réaction de ligature à 54 °C ou (B) l'hybridation au cours de la nuit, et entraîne une augmentation de la concentration en sel. Cela peut entraîner une forte formation de la structure secondaire de l'ADN de l'échantillon et peut empêcher certaines sondes de se lier à leurs séquences cibles. En général, les plaques sont plus sujettes à l'évaporation que les bandes. En cas de soupçons d'une évaporation, incuber 8 µL d'H₂O pendant la nuit à 60 °C ; le matin, il doit rester > 5 µl d'H₂O. Pour obtenir des suggestions sur la façon d'éliminer l'évaporation, voir l'étape 5 de la section 8.4. Lors de l'utilisation d'huile minérale, en ajouter juste assez pour couvrir la surface. Il n'est pas nécessaire de retirer l'huile. Après l'ajout du probemix et du polymérase *master mix*, centrifuger brièvement les tubes. Après avoir ajouté le *master mix* de ligase-65, pipetter de haut en bas sous la couche d'huile.

8.4. ORGANIGRAMME DU CONTRÔLE DE QUALITÉ



CSM.QUAL-001 Version: 03

9. ANALYSE DE DONNÉES

Le logiciel Coffalyser.Net, associé à la *Coffalyser data sheet* (feuille Coffalyser) spécifique au lot approprié du MLPA probemix, doit être utilisé pour l'analyse des données MLPA. Pour les deux, la dernière version doit être utilisée. Le *Coffalyser.Net Reference Manual* (Manuel de Référence Coffalyser.Net) fournit des instructions étape par étape relatives à l'analyse des données MLPA. Le logiciel et le manuel sont téléchargeables gratuitement sur www.mrcholland.com.

La fluorescence absolue mesurée par électrophorèse capillaire pour chaque sonde est affectée par de nombreuses variables et ne peut pas être utilisée directement. La fluorescence de chaque sonde doit d'abord être normalisée *au sein* d'une réaction MLPA. Cette normalisation utilise des sondes de référence, qui devraient avoir un nombre de copies normal dans tous les échantillons. Deuxièmement, les signaux de sonde relatifs de chaque échantillon sont comparés à ceux obtenus dans les échantillons de référence. Les échantillons de référence doivent avoir un nombre de copie normal pour toutes les sondes de référence et de cibles. Cette comparaison permet ensuite de déterminer le nombre de copies relatif des séquences cibles dans un échantillon.

Coffalyser.Net sélectionne la meilleure méthode d'analyse pour chaque MLPA probemix et offre un contrôle de qualité approfondi⁷. Pour obtenir plus d'informations sur la manière de réaliser l'analyse des données, voir le *Coffalyser.Net Reference Manual*. **Coffalyser.Net est obligatoire pour les applications MLPA enregistrées par IVD. L'utilisation d'un autre logiciel peut conduire à des résultats peu concluants ou erronés.**

10. INTERPRÉTATION ET CONFIRMATION

- Dans les mesure de possible, les anomalies détectées par la MLPA doivent être confirmées par un MLPA probemix de confirmation ou par une technique indépendante. Les anomalies du nombre de copies détectées par une seule sonde nécessitent toujours une confirmation. Le séquençage des séquences cibles de la sonde peut indiquer qu'un signal de sonde réduit est provoqué par une mutation/un polymorphisme. La découverte de deux séquences hétérozygotes indique généralement que l'ADN de l'échantillon contient deux allèles différents. Veuillez noter que la recherche d'un seul allèle rare par séquençage ne signifie pas qu'un allèle est délété, car deux copies de l'allèle rare peuvent être présentes. Un SNP homozygote peut entraîner une réduction partielle du signal qui ressemble à une délétion hétérozygote.
- Toutes les délétions et duplications détectées par la MLPA ne sont pas pathogènes. Les variations du nombre de copies germinales signalées chez des individus sains se trouvent à <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>. MRC Holland ne peut pas indiquer si la délétion ou la duplication d'un exon spécifique entraînera une maladie.
- Certaines aberrations du nombre de copies peuvent être dues à des modifications somatiques, des délétions et duplications de chromosomes entiers inclus.
- En cas de délétion homozygote apparente, l'électrophérogramme doit être inspecté visuellement pour déterminer si le signal est vraiment absent. Les signaux de sonde manquants peuvent être dus à des problèmes de *binning* (classement des signaux ; voir le *Coffalyser.Net Reference Manual*) ou à des signaux faibles.
- Les anomalies du nombre de copies détectées par des sondes de référence ou des sondes détectant les régions adjacentes sont peu susceptibles d'être liées à la condition testée. L'identité des sondes de référence est disponible sur demande.

11. PRÉCAUTIONS ET MISES EN GARDE

- Pour usage professionnel uniquement. La performance des essais dépend de la compétence de l'opérateur et du respect des instructions de procédure. L'essai doit être effectué par des professionnels formés aux techniques moléculaires. La personne responsable de l'interprétation des résultats doit être informée des dernières connaissances scientifiques sur l'application en question et de toute limitation de la procédure MLPA pouvant entraîner des résultats incorrects.
- La validation interne de chaque application MLPA est essentielle, en particulier lors de la première utilisation de MLPA ou lors du changement de procédure de traitement des échantillons, de méthode d'extraction d'ADN ou d'instruments utilisés. Inclure au moins 16 échantillons d'ADN normaux. La validation doit indiquer un écart type de $\leq 0,10$ pour chaque sonde (sauf indication contraire dans la fiche produit du MLPA probemix en question). Les échantillons utilisés pour la validation doivent être représentatifs des échantillons utilisés dans la pratique quotidienne.

⁷ Coffalyser.Net commence par l'analyse des données brutes (correction de la ligne de base, identification des pics) et fournit un contrôle qualité approfondi (par exemple la quantité d'ADN utilisée, la dénaturation complète de l'ADN, la correction de la pente).

12. LIMITES DE LA PROCÉDURE

- Pour la plupart des applications MLPA, la cause principale des défauts génétiques est constituée de petites mutations (ponctuelles), dont la plupart ne seront pas détectées par les MLPA probemix.
- La MLPA ne peut détecter aucune délétion ou duplication se trouvant en dehors de la séquence cible des sondes et ne détectera pas les inversions ou translocations neutres du nombre de copies.
- De petits changements dans ou près de la séquence cible de la sonde (par exemple des SNP, des mutations ponctuelles, des petites insertions-délétions) peuvent provoquer des résultats faux positifs⁸.
- La contamination d'échantillons d'ADN avec des amplicons d'ADNc ou de PCR des exons individuels peut conduire à une augmentation du signal de sonde⁹. L'analyse d'un deuxième échantillon d'ADN isolé et recueilli indépendamment peut exclure ces artefacts de contamination.
- En cas de faible dénaturation de l'ADN de l'échantillon, des délétions apparentes, même de plusieurs sondes reconnaissant des cibles génomiques adjacentes, peuvent être un résultat faux positif. Les régions chromosomiques extrêmement riches en GC ne sont pas dénaturées à 98 °C lorsque plus de 40 mM de NaCl ou de KCl sont présents.
- Les tests MLPA fournissent le nombre moyen de copies des séquences cibles dans les cellules à partir desquelles l'échantillon d'ADN a été extrait. Si plusieurs sondes ciblant des séquences adjacentes ont une valeur inhabituelle, mais n'atteignent pas les valeurs de seuil habituelles pour une délétion/duplication, le mosaïcisme est une cause possible.
- Des différences mineures dans l'exécution expérimentale peuvent affecter le modèle de pic MLPA. N'inclure dans l'analyse que des échantillons qui a) ont été inclus dans la même expérience MLPA et b) ont été testés avec le même lot de probemix.
- Des changements subtils, tels que ceux observés dans les cas de mosaïque, ne peuvent être distingués que lorsque les signaux de sondes sont triés en fonction de leur emplacement chromosomique (utilisez Coffalyser.Net).
- Dans certains cas, une analyse des échantillons parentaux peut être nécessaire pour une interprétation correcte des résultats.
- Lors de l'utilisation de produits MLPA, le protocole d'électrophorèse capillaire peut nécessiter une optimisation. Des résultats erronés peuvent être obtenus si un ou plusieurs pics sont hors échelle. Par exemple, une duplication d'un ou plusieurs exons peut être masquée lorsque les pics sont hors échelle, ce qui donne un résultat faux négatif. Le risque sur les pics hors échelle est plus élevé lorsque le probemix utilisé contenant un nombre relativement faible de sondes. Le logiciel Coffalyser.Net vous avertit des pics hors échelle, contrairement aux autres logiciels. Si un ou plusieurs pics sont hors échelle, relancez les produits de PCR en utilisant soit des réglages de tension/temps d'injection inférieurs, soit une quantité réduite d'échantillon en diluant les produits PCR.

Protocole général MLPA – Historique du document

Version-007-FR1 (01 mars 2019)

- Les versions précédentes du document sont disponibles seulement en Anglais.
- Le protocole a été restructuré et certaines sections ont été réécrites. Aucune modification n'a été apportée à la méthode d'exécution de la MLPA.
- Le DTT a remplacé le bêta-mercaptoéthanol dans le MLPA SALSA Buffer et SALSA Ligase-65.
- Nouvelle limite de la procédure ajoutée en ce qui concerne les pics hors échelle.

Version-006 (23 mars 2018)

- Nouvelle figure 2 ajoutée.
- Paramètres initiaux et ABI-310 supprimés du tableau des spécifications de l'électrophorèse.
- ABI-SeqStudio ajouté au tableau des spécifications de l'électrophorèse.
- Tableau ajouté avec les plages de signaux pour les instruments d'électrophorèse capillaire.
- Organigramme du contrôle de la qualité ajouté.
- Points critiques pour obtenir de bons résultats ajoutés.
- Informations dans le protocole réorganisées et réécrites.

⁸ Lors de la conception des sondes, les SNP connus sont évités autant que possible. Cependant, de nouveaux SNP sont continuellement découverts. Veuillez nous avertir lorsqu'un polymorphisme ou une mutation pathogène fréquente influence le signal d'une sonde.

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.