



Protocollo generale MLPA®

Istruzioni per l'uso

MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) Protocollo generale per l'individuazione e la quantificazione di sequenze di DNA.

Questo protocollo contiene informazioni essenziali per ottenere risultati MLPA affidabili. Deve essere letto nella sua interezza e utilizzato insieme alla descrizione del prodotto Probemix specifico per MLPA.

I kit di reagenti SALSA® MLPA® ed il software per l'analisi Coffalyser.Net sono registrati per uso diagnostico in vitro (in vitro diagnostic use, IVD) in paesi specifici (consultare www.mrcholland.com). In tutti gli altri paesi, questi prodotti sono solo per uso di ricerca (research use only, RUO). Quando si utilizza una probemix registrata per IVD per scopi diagnostici, è essenziale combinarla con i kit di reagenti SALSA® MLPA® ed il software di analisi Coffalyser.Net. Informazioni specifiche sui Paesi in cui le probemix sono registrate come IVD si trovano nella descrizione del prodotto specifico (probemix) e su www.mrcholland.com.

Esiste un protocollo separato per il rilevamento del numero di copie del DNA e dello stato di metilazione (MS-MLPA®). Questo protocollo è disponibile su www.mrcholland.com.



Produttore: MRC Holland BV Willem Schoutenstraat 1, 1057 DL Amsterdam, Paesi Bassi
Sito Web: www.mrcholland.com; Telefono: +31 888 657 200
E-mail: info@mrcholland.com (informazioni e domande tecniche), order@mrcholland.com (ordini)

Indice

1.	INTRODUZIONE.....	2
1.1.	COMPONENTI DEL TEST SALSA MLPA E CONDIZIONI DI STOCCAGGIO.....	2
1.1.1.	NUMERI DEGLI ARTICOLI PRESENTI NEL KIT DI REAGENTI Error! Bookmark not defined.	
1.1.2.	COMPONENTI KIT DEI REAGENTI	3
1.1.3.	MLPA PROBEMIX SPECIFICHE PER APPLICAZIONE..... Error! Bookmark not defined.	
1.1.4.	CONSERVAZIONE E DURATA.....	3
1.1.5.	ETICHETTE DI IMBALLAGGIO	3
1.2.	PRINCIPIO TEST MLPA.....	3
2.	ISTRUZIONI PER LA CONFIGURAZIONE DEL TEST.....	4
2.1.	MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI.....	4
2.2.	TRATTAMENTO DEL CAMPIONE E CONSERVAZIONE.....	5
2.3.	SELEZIONE DI CAMPIONI DI RIFERIMENTO E ALTRI CAMPIONI DI CONTROLLO.....	5
3.	NOTE DA LEGGERE PRIMA DI INIZIARE.....	6
4.	PUNTI CRITICI PER OTTENERE BUONI RISULTATI MLPA.....	6
5.	PROTOCOLLO MLPA - IN BREVE.....	6
6.	PROTOCOLLO MLPA.....	7
6.1.	PROGRAMMA TERMOCICLATORE PER LA REAZIONE MLPA.....	7
6.2.	DENATURAZIONE DEL DNA (GIORNO 1).....	7
6.3.	REAZIONE DI IBRIDAZIONE (GIORNO 1).....	7
6.4.	REAZIONE DI IBRIDAZIONE (GIORNO 2).....	7
6.5.	REAZIONE PCR (GIORNO 2).....	7
7.	SEPARAZIONE DEI FRAMMENTI MEDIANTE ELETTROFORESI CAPILLARE.....	8
7.1.	NOTE DA LEGGERE PRIMA DI INIZIARE.....	8
7.2.	SPECIFICHE DELL'ELETTROFORESI	8
8.	CONTROLLO QUALITÀ MLPA E RISOLUZIONE DEI PROBLEMI.....	8
8.1.	FRAMMENTI DI CONTROLLO QUALITÀ MLPA.....	8
8.2.	CONTROLLO SENZA DNA.....	10
8.3.	EVAPORAZIONE	10
8.4.	DIAGRAMMA DI FLUSSO DEL CONTROLLO QUALITÀ.....	11
9.	ANALISI DEI DATI.....	12
10.	INTERPRETAZIONE E CONFERMA.....	12
11.	PRECAUZIONI E AVVERTENZE	12
12.	LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA	12

1. INTRODUZIONE

Le variazioni del numero di copie (copy number variations, CNV) sono una fonte importante di variazione genetica nel DNA umano e svolgono un ruolo cruciale in un gran numero di malattie. La Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®) è una tecnica semi-quantitativa non automatizzata che viene utilizzata per determinare il numero di copie fino a un massimo di 60 sequenze di DNA in una singola reazione basata sulla PCR multiplex.

1.1. COMPONENTI DEL TEST SALSA MLPA E CONDIZIONI DI STOCCAGGIO

1.1.1. NUMERI DEGLI ARTICOLI PRESENTI NEL KIT DI REAGENTI

Codice	Descrizione	Numero di reazioni	Primer fluorescenti per PCR
EK1-FAM o EK1-Cy5	Kit di reagenti SALSA MLPA EK1	100	FAM o Cy5
EK5-FAM o EK5-Cy5	Kit di reagenti SALSA MLPA EK5	500	FAM o Cy5
EK20-FAM	Kit di reagenti SALSA MLPA EK20	2000	FAM

1.1.2. COMPONENTI KIT DEI REAGENTI

Componente del kit reagenti	Volumi			Ingredienti ¹
	EK1	EK5	EK20	
SALSA MLPA Buffer (tappo giallo)	180 µl	5 × 180 µl	5 × 700 µl	KCl, Tris-HCl, EDTA, PEG-6000, DTT, oligonucleotidi
SALSA Ligase-65 (tappo verde)	115 µl	5 × 115 µl	5 × 460 µl	Glicerolo, EDTA, DTT, KCl, Tris-HCl, detergente non ionico, enzima Ligase-65 (origine batterica)
SALSA Ligase Buffer A (tappo trasparente)	360 µl	5 × 360 µl	5 × 1420 µl	Coenzima NAD (origine batterica)
SALSA Ligase Buffer B (tappo bianco)	360 µl	5 × 360 µl	5 × 1420 µl	Tris-HCl, MgCl ₂ , detergente non ionico
SALSA PCR Primer Mix (tappo marrone)	240 µl	5 × 240 µl	5 × 940 µl	Oligonucleotidi sintetici con colorante fluorescente (FAM o Cy5), dNTPs, Tris-HCl, KCl, EDTA, detergente non ionico
SALSA Polymerase (tappo arancione)	65 µl	5 × 65 µl	5 × 240 µl	Glicerolo, detergenti non ionici, EDTA, DTT, KCl, Tris-HCl, enzima polimerasi (origine batterica)

1.1.3. MLPA PROBEMIX SPECIFICHE PER APPLICAZIONE

MLPA Probemix specifico per le applicazioni	Volumi disponibili (R = numero di reazioni)	Ingredienti
Probemix* (tappo nero)	40 µl (25R), 80 µl (50R), 160 µl (100R)	Oligonucleotidi sintetici, oligonucleotidi purificati da batteri, Tris-HCl, EDTA
Sample DNA [#] (SD) (tappo blu)	30 µl o 100 µl	Tris-HCl, EDTA, DNA plasmide di controllo/sintetica, DNA femminile genomico umano, DNA di linee cellulari









* Le probemix sono progettate unicamente per l'uso in combinazione con i kit di reagenti SALSA MLPA.

[#] Viene fornita una fiala di SD (riferimento (selezione), binning o duplicazione artificiale del DNA) o può essere ordinata separatamente per determinate probemix MLPA. I volumi e i componenti dipendono dal tipo di SD.

1.1.4. CONSERVAZIONE E DURATA

Tutti i componenti devono essere stoccati direttamente al loro arrivo e, dopo l'uso, tra -25°C e -15°C, al riparo dalla luce e nella confezione originale. Se conservati nelle condizioni raccomandate, si garantisce una durata fino alla data di scadenza, anche dopo l'apertura. Per la data di scadenza esatta, consultare le etichette su ciascuna fiala. I prodotti non devono essere esposti a più di 25 cicli di congelamento-scongelo.

1.1.5. ETICHETTE DI IMBALLAGGIO

	Produttore		Conservare a
	Numero di lotto		Tenere lontano da fonti di calore o luce solare diretta
	Utilizzare per		Numero di catalogo
	Numero di test		Leggere le istruzioni prima dell'uso
IVD	In Vitro Diagnostic	RUO	Research Use Only

1.2. PRINCIPIO DEL TEST MLPA

Il principio della MLPA si basa sull'amplificazione fino a 60 sonde che rilevano ciascuna una sequenza specifica di DNA di circa 60 nt di lunghezza (Figura 1)². La reazione MLPA si traduce in un insieme di ampliconi di PCR unici tra 64-500 nt di lunghezza separati tramite elettroforesi capillare. Dopo la denaturazione iniziale del DNA del campione, al campione

¹ Nessuno dei componenti è di origine umana, animale o deriva da batteri patogeni. Secondo la definizione dello Standard per la comunicazione dei pericoli (Hazard Communication Standard) in base alle concentrazioni presenti, nessuno dei componenti è considerato pericoloso. Per questi prodotti non è richiesta una Scheda di Sicurezza (Safety Data Sheet SDS): nessuno dei preparati contiene sostanze pericolose (come da Regolamento (CE) n. 1272/2008 [EU-GHS/CLP] e successive modifiche) a concentrazioni che richiedono la divulgazione di una SDS (come da regolamento (CE) n. 1272/2008 [EU-GHS/CLP] e 1907/2006 [REACH] e successive modifiche). In caso di fuoriuscite, pulire con acqua e seguire le opportune procedure in loco.

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

viene aggiunta una miscela di sonde MLPA. In generale, ciascuna sonda MLPA consiste di due oligonucleotidi che devono ibridarsi a sequenze target direttamente adiacenti, per essere ligati in una singola sonda (Figura 1). Durante la successiva reazione PCR, tutte le sonde ligate vengono amplificate simultaneamente utilizzando la stessa coppia di primer per PCR, ottenendo un unico insieme di ampliconi per PCR. Un primer per PCR è marcato in modo fluorescente, consentendo la visualizzazione dei prodotti di amplificazione durante la separazione dei frammenti su uno strumento per elettroforesi capillare. La separazione dei frammenti produce un elettroferogramma specifico del campione: il modello di picco del campione (Figura 2, in alto).

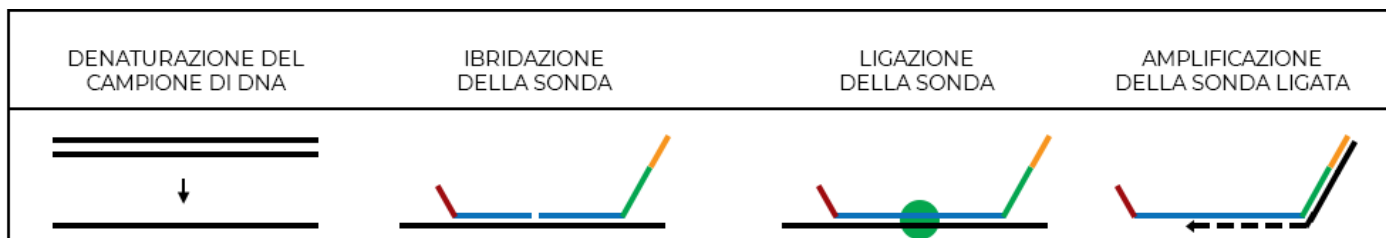


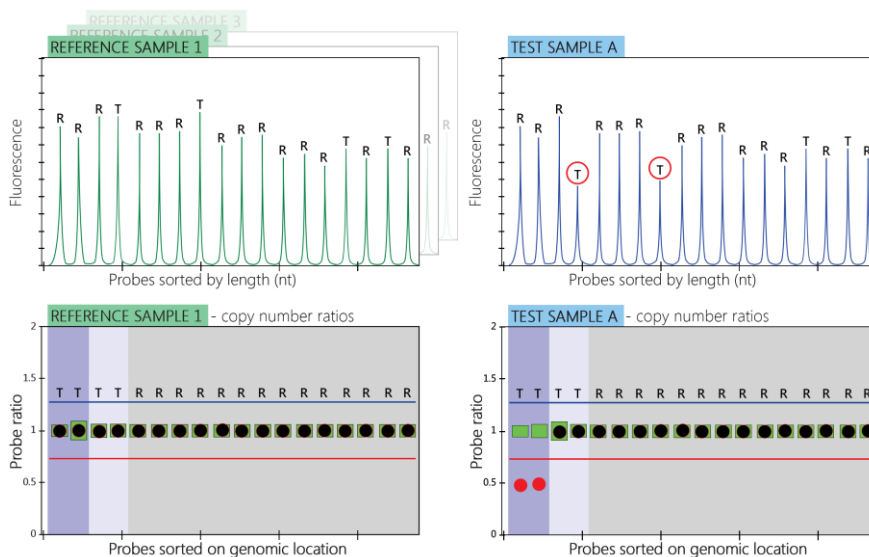
Figura 1. Reazione MLPA.

La MLPA è una tecnica relativa: solo le differenze relative possono essere rilevate confrontando i modelli di picco MLPA dei campioni di DNA. L'altezza relativa di ogni singolo picco della sonda, confrontata con le altezze relative del picco della sonda in vari campioni di DNA di riferimento, riflette il numero di copie relativo della sequenza bersaglio corrispondente in un campione. Includere campioni di riferimento nella stessa sessione è quindi essenziale. La delezione di una o più sequenze bersaglio è visibile come una diminuzione relativa dell'altezza del picco (Figura 2, in basso), mentre un aumento dell'altezza relativa del picco riflette un aumento del numero di copie.

Figura 2. Confronto profilo dei dati MLPA.

In alto: l'elettroferogramma del campione di prova A (a destra) viene confrontato con quelli dei campioni di riferimento (a sinistra). Nel campione di prova A (cerchiato in rosso) è visibile una diminuzione relativa di due sonde.

In basso: abbondanze relative del campione di prova A (a destra) normalizzate rispetto ai campioni di riferimento (a sinistra), visualizzati dal software Coffalyser.Net. La disposizione delle sonde in base alla posizione cromosomica rivela una delezione eterozigote, rapporto sonda 0,5, nel campione di prova (punti rossi).



T: sonde bersaglio, R: sonde di riferimento.

2. ISTRUZIONI PER LA CONFIGURAZIONE DEL TEST

2.1. MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Acqua ultrapura
- TE_{0.1} (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM EDTA)
- Termociclatore calibrato con coperchio riscaldato (99-105°C) e attrezzatura di laboratorio standard
- Provette per PCR da 0,2 ml, strip o piastre per PCR
- Strumento per elettroforesi capillare³ con software di analisi dei frammenti
 - Applied Biosystems: Standard Foundation Data Collection Software
 - SCIEX: GeXP Software Package
- Formammide di alta qualità (ad es. Hi-Di Formamide, Applied Biosystems)
- Size Standard marcatore

³ Gli strumenti per elettroforesi capillare che non utilizzano condizioni di denaturazione, come QIAGEN QIAxcel o Agilent Fragment Analyzer, non possono essere utilizzati in combinazione con la MLPA.

- Applied Biosystems: GeneScan™ 500 LIZ®/ROX™ (preferito, obbligatorio per l'uso con probemix registrati IVD), GeneScan™ 600 LIZ®, GeneScan™ 500 TAMRA™
- SCIEX: CEQ™ DNA Size Standard Kit - 600
- Polimeri
 - Applied Biosystems: si preferiscono POP-4 o POP-7. POP-6 non è raccomandato a causa della sua alta risoluzione. SeqStudio: POP-1 è integrato nella cartuccia ed è adatto.
 - SCIEX: gel denaturante GenomeLab™ Linear Polyacrylamide (LPA)
- Software di analisi Coffalyser.Net (scaricabile gratuitamente da www.mrcholland.com)

2.2. TRATTAMENTO DEL CAMPIONE E CONSERVAZIONE

- Utilizzare una quantità totale di 50-250 ng di DNA umano (50-100 ng è ottimale, salvo diversa indicazione nella descrizione specifica del probemix del prodotto) in un volume di 5 µl⁴ per ciascuna reazione ⁵MLPA. Se necessario, i campioni di DNA possono essere concentrati mediante precipitazione di etanolo, e il glicogeno (Roche 901393) può essere utilizzato come vettore. Per maggiori informazioni consultare www.mrcholland.com.
- I preparati di DNA devono contenere 5-10 mM di Tris buffer con un pH di 8,0-8,5, per prevenire la depurinazione durante la fase iniziale di denaturazione a 98°C. Ad esempio, sciogliere e diluire il DNA campione in **TE_{0,1}** (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM EDTA). Se non è noto se sia presente una capacità tampone sufficiente, aggiungere Tris-HCl: 4 µl di DNA campione + 1 µl 50 mM Tris-HCl pH 8,5.
- I contaminanti rimasti dopo l'estrazione del DNA, compresi NaCl o KCl (>40 mM) e altri sali, fenolo, etanolo, eparina, EDTA (>1,5 mM) e Fe, possono influenzare le prestazioni della MLPA. La MLPA è più sensibile alle impurità rispetto ai test singleplex della PCR. Non concentrare il DNA per evaporazione o SpeedVac; ciò comporta alte concentrazioni di EDTA e sale.
- Assicurarsi che il metodo di estrazione, il tipo di tessuto, la concentrazione di DNA e il trattamento siano i più simili possibili nei campioni di prova e di riferimento.
- I metodi di estrazione non devono lasciare un'alta concentrazione di contaminanti. Non utilizzare i sistemi QIAGEN M6, M48 e M96 poiché lasciano troppo sale. Per il sistema QIAGEN EZ1, utilizzare il *Protocollo aggiuntiva QIAGEN: Purification of genomic DNA from whole blood, optimized for use in MRC-Holland MLPA® assays, using EZ1® DNA Blood Kits* (consultare www.mrcholland.com). MRC Holland ha testato e può raccomandare i seguenti metodi di estrazione:
 - Kit QIAGEN Autopure LS (automatizzato) e QIAamp DNA mini/midi/maxi (manuale)
 - Kit Promega Wizard Genomic DNA Purification (manuale)
 - Salting out (manuale)
- Il sangue eparinizzato può essere utilizzato solo quando il campione è stato sottoposto a un metodo di purificazione per rimuovere la contaminazione da eparina (es. Nucleospin gDNA Clean-up XS).
- È essenziale un trattamento con RNAsi quando si esaminano geni altamente espressi nel tessuto del campione studiato. Ad esempio *HBA* e *HBB* in campioni ematici; geni di RNA ribosomiale (mitocondriale- tutti i tessuti).
- In alcuni casi, la SALSA Sample Stabilising Solution (S4; Cat No SMR04, SMR45) (RUO) può migliorare la qualità della reazione MLPA. Consultare la descrizione del prodotto su www.mrcholland.com per ulteriori informazioni.
- Il DNA proveniente da reazioni di amplificazione dell'intero genoma (whole genome amplification, WGA) non è adatto per la MLPA a causa di possibili bias dell'amplificazione.
- Aliquotare i campioni e conservare a -20°C. La contaminazione con microrganismi può deteriorare i campioni che vengono conservati a 4°C per un periodo prolungato.

2.3. SELEZIONE DI CAMPIONI DI RIFERIMENTO E ALTRI CAMPIONI DI CONTROLLO

- SELEZIONE DI CAMPIONI DI RIFERIMENTO. I campioni di riferimento sono campioni di DNA ottenuti da individui sani con un numero di copie normale per le sequenze rilevate dalle sonde bersaglio e di riferimento. Dovrebbero essere il più possibile simili ai campioni da testare in tutti gli altri aspetti, inclusi il metodo di estrazione e la fonte del campione. Si noti che non tutte le probemix sono adatte ad essere utilizzate con DNA da qualsiasi fonte (ad es. tessuto incluso in paraffina e fissato in formalina (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE)). Controllare sempre le descrizioni del prodotto probemix per le fonti di DNA appropriate.
- CAMPIONI DI RIFERIMENTO. Almeno tre campioni di riferimento devono essere inclusi in ogni esperimento MLPA. Quando si testa un numero maggiore di 21 campioni, includere un campione di riferimento aggiuntivo per sette campioni di prova aggiuntivi. Distribuire casualmente i campioni di riferimento sull'esperimento per ridurre al minimo la variazione. Sono necessari **più campioni di riferimento** per stimare la riproducibilità di ciascuna sonda all'interno di ogni analisi MLPA.

⁴ Non utilizzare mai più di 5 µl di DNA campione per reazione. Usare più di 5 µl di DNA riduce la concentrazione di sonda e di sale. In questo modo si riduce la velocità di ibridazione e la stabilità del legame delle sonde MLPA al DNA del campione.

⁵ Le misurazioni della densità ottica (260 nm) spesso sovrastimano la concentrazione di DNA, ad es. a causa della contaminazione da RNA. Una quantità di DNA sufficiente può essere stimata sulla base dei Q-fragments, come spiegato al punto 8.1.

- DNA COMMERCIALE. In caso di dubbi sulla qualità del campione, includere uno o più campioni commerciali di DNA per il confronto. Raccomandiamo Promega Cat No G1471 maschile e G1521 DNA femminile. Il DNA commerciale deve essere usato solo come controllo, per verificare la qualità del campione, e non può essere utilizzato come campione di riferimento.
- CONTROLLO SENZA DNA. Si raccomanda di includere un controllo senza DNA in ogni analisi MLPA. Sostituire 5 µl di DNA con TE_{0.1} (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM EDTA) per verificare la contaminazione di TE, di reagenti MLPA, di reagenti per elettroforesi o di capillari.
- CAMPIONI DI CONTROLLO POSITIVI. L'aggiunta di campioni di controllo positivi, quando disponibili, è raccomandata. MRC Holland non fornisce campioni positivi, ma un elenco di campioni positivi disponibili in commercio è disponibile su www.mrcholland.com. Quando si utilizza il DNA da linee cellulari, si noti che le linee cellulari potrebbero aver acquisito ulteriori cambiamenti del numero di copie, inclusi incrementi o perdite di cromosomi completi.

3. NOTE DA LEGGERE PRIMA DI INIZIARE

- Mescolare sempre i buffer e probemix scongelati con vortex, ed in seguito effettuare una breve centrifugazione. Tutte le provette dei reagenti enzimatici devono essere centrifugate per poco tempo. Il buffer MLPA è generalmente congelato a -20°C ma può rimanere liquido a causa della sua elevata concentrazione di sale.
- Prima dell'uso, riscaldare le fiale degli enzimi (Ligase-65 e polimerasi) per 10 secondi in mano per ridurre la viscosità.
- Le soluzioni enzimatiche contengono il 50% di glicerolo e rimangono liquide a -20°C. Le master mix contenenti enzimi devono essere mescolate accuratamente pipettando delicatamente su e giù. Una miscelazione insufficiente può portare a risultati inaffidabili. Quando si preparano le master mix, aggiungere sempre gli enzimi per ultimi. **Mai mescolare con vortex soluzioni contenenti enzimi** in quanto può verificarsi l'inattivazione enzimatica.
- Per ridurre al minimo la variazione dei campioni, preparare volumi sufficientemente grandi di soluzioni di master mix (5-10% di surplus di volume).
- Preparare le master mix (Ligase-65 e polimerasi) a temperatura ambiente (TA) immediatamente prima dell'uso. Se preparate >1 ora prima dell'uso, conservare le master mix su ghiaccio o a 4°C. Le master mix devono essere riscaldate a temperatura ambiente prima di essere aggiunte alle reazioni MLPA. Picchi non specifici possono formarsi nella reazione senza DNA quando viene aggiunta una master mix di ligasi molto fredda.
- Utilizzare pipette multicanale per evitare un'evaporazione eccessiva.
- Un video su come eseguire una reazione MLPA in laboratorio si può trovare su www.mrcholland.com.

4. PUNTI CRITICI PER OTTENERE BUONI RISULTATI MLPA

- Assicurarsi che tutti i campioni di DNA contengano 5-10 mM di Tris-HCl pH 8-8,5. (Sezione 2.2)
- Includere almeno tre campioni di riferimento, derivati dallo stesso tipo di tessuto e trattati allo stesso modo dei campioni di prova, in ogni esperimento MLPA. (Sezione 2.3)
- Il pipettaggio accurato dei reagenti è fondamentale per ottenere risultati affidabili. È particolarmente importante per i 3 µl della master mix di ibridazione. (Sezione 6)
- Utilizzare Coffalyser.Net per l'analisi dei dati. (Sezione 9)
- Controllare la qualità dei frammenti. La denaturazione completa del DNA del campione è fondamentale. (Sezione 8)
- Eseguire regolarmente la manutenzione del dispositivo elettroforesi capillare (capillary electrophoresis, CE), sostituendo i capillari e il polimero come raccomandato dal produttore. (Sezione 7)

5. PROTOCOLLO MLPA - IN BREVE

1. DENATURAZIONE DEL DNA
 - Riscaldare un campione di 5 µl di DNA per 5 minuti a 98°C
2. IBRIDAZIONE DI SONDE PER IL CAMPIONE DI DNA
 - Raffreddare a temperatura ambiente, aprire le provette
 - Aggiungere 3 µl di master mix di ibridazione*
 - Incubare 1 minuto a 95°C e ibridare per 16 ore a 60°C
3. LIGAZIONE DI SONDE IBRIDATE
 - Abbassare la temperatura del termociclatore a 54°C, aprire le provette
 - Aggiungere 32 µl di master mix Ligase-65*, incubare 15 minuti a 54°C
 - Inattivare l'enzima ligasi con il calore: 5 minuti a 98°C
4. AMPLIFICAZIONE PCR DI SONDE LIGATE
 - Portare a temperatura ambiente, aprire le provette
 - Aggiungere 10 µl di master mix della polimerasi* a temperatura ambiente
 - Avviare PCR (35 x {95°C 30 secondi, 60°C 30 secondi, 72°C 60 secondi}, 72°C 20 minuti, 15°C di pausa)
5. SEPARAZIONE DEL FRAMMENTO MEDIANTE ELETTROFORESI CAPILLARE

6. ANALIZZARE I RISULTATI CON COFFALYSER.NET

* Master mix:

- Ibridazione: 1,5 µl di SALSA probemix + 1,5 µl di buffer MLPA per reazione
- Ligase-65: 3 µl di ligase buffer A + 3 µl di ligase buffer B + 25 µl di acqua ultrapura + 1 µl di Ligasi-65, per reazione
- Polimerasi: 7,5 µl di acqua ultrapura + 2 µl di miscela di primer PCR + 0,5 µl di polimerasi di SALSA, per reazione

6. PROTOCOLLO MLPA

6.1. PROGRAMMA TERMOCICLATORE PER LA REAZIONE MLPA

Denaturazione del DNA			
1.	98°C		5 minuti
2.	25°C		pausa
Reazione di ibridazione			
3.	95°C		1 minuto
4.	60°C		16-20 ore
Reazione di ligazione			
5.	54°C		pausa
6.	54°C		15 minuti
7.	98°C		5 minuti
8.	20°C		pausa
Reazione di PCR			
9.	35 cicli:	<ul style="list-style-type: none"> • 95°C • 60°C • 72°C 	30 secondi 30 secondi 60 secondi
10.	72°C		20 minuti
11.	15°C		pausa

Nota: e' necessario seguire questo programma del termociclatore salvo diversamente specificato nella descrizione del prodotto specifico della probemix.

6.2. DENATURAZIONE DEL DNA (GIORNO 1)

- Etichettare le provette da 0,2 ml, strip o piastre.
- Aggiungere 5 µl di campione di DNA (50-250 ng, 50-100 ng è ottimale) o TE (controllo senza DNA) in ogni provetta.
- Posizionare le provette nel termociclatore; avviare i passaggi 1-2 del programma termociclatore MLPA (consultare la sezione 6.1).
- Assicurarsi che i campioni siano a 25°C prima di rimuovere le provette dal termociclatore.

6.3. REAZIONE DI IBRIDAZIONE (GIORNO 1)

- Preparare la master mix di ibridazione. Per ciascuna reazione, miscelare: 1,5 µl di buffer MLPA (tappo giallo) + 1,5 µl di probemix (tappo nero). Mescolare bene pipettando o mescolare con vortex.
- Dopo la denaturazione del DNA, aggiungere 3 µl di master mix di ibridazione a ciascuna reazione. Un pipettaggio accurato è fondamentale. Mescolare bene pipettando delicatamente su e giù.
- Continuare il programma del termociclatore con i passaggi 3-4.

6.4. REAZIONE DI IBRIDAZIONE (GIORNO 2)

- Preparare una master mix Ligase-65. Per ciascuna reazione, miscelare: 25 µl di acqua ultrapura + 3 µl di ligase buffer A (tappo trasparente) + 3 µl di ligase buffer B (tappo bianco), quindi aggiungere 1 µl di enzima Ligase-65 (tappo verde). Mescolare bene pipettando delicatamente su e giù.
- Continuare il programma del termociclatore con il passaggio 5.
- Quando il termociclatore è a 54°C e **mentre i campioni sono NEL termociclatore**, aggiungere 32 µl di master mix Ligase-65 a ciascuna reazione MLPA. Mescolare bene pipettando delicatamente su e giù.
- Continuare il programma del termociclatore con i passaggi 6-8.

6.5. REAZIONE PCR (GIORNO 2)

- Preparare la master mix di polimerasi. Per ciascuna reazione, miscelare: 7,5 µl di acqua ultrapura + 2 µl di SALSA PCR primer mix (tappo marrone), quindi aggiungere 0,5 µl di SALSA Polymerase (tappo arancione). Mescolare bene pipettando delicatamente su e giù.

- **A temperatura ambiente**, aggiungere 10 µl di master mix polymerase a ciascuna reazione MLPA. Mescolare bene pipettando delicatamente su e giù. **Collocare immediatamente** le provette nel termociclatore e continuare il programma del termociclatore con i passaggi 9-11.
- Dopo la reazione PCR, non aprire le provette nella stessa stanza del termociclatore. Per evitare la contaminazione, utilizzare diverse micropipette per eseguire reazioni MLPA e maneggiare i prodotti PCR MLPA.
- Il prodotto PCR può essere conservato al riparo dalla luce a 4°C per 1 settimana. Per periodi più lunghi, conservare tra -25°C e -15°C.

7. SEPARAZIONE DEI FRAMMENTI MEDIANTE ELETTROFORESI CAPILLARE

7.1. NOTE DA LEGGERE PRIMA DI INIZIARE

- Le dimensioni standard, le condizioni di esecuzione, il polimero, il marcatore fluorescente e il volume della reazione PCPA MLPA dipendono dal tipo di strumento per elettroforesi capillare. Utilizzare le impostazioni di analisi dei frammenti predefinite sullo strumento di elettroforesi capillare idoneo per l'applicazione, la lunghezza del polimero e del capillare. Le impostazioni dello strumento potrebbero richiedere un'ottimizzazione per una corretta separazione dei frammenti.
- Sostituire regolarmente i capillari e il polimero seguendo le raccomandazioni del produttore. Il polimero si deteriora rapidamente dopo un'esposizione prolungata a > 25°C. Se i picchi di dimensioni standard sono ripetutamente bassi e ampi, i capillari o il polimero potrebbero essersi deteriorati.
- Utilizzare formammide di alta qualità e conservarla in aliquote a -20°C. La formammide può diventare acida, causando la depurinazione e la frammentazione del DNA durante il riscaldamento.

7.2. SPECIFICHE DELL'ELETTROFORESI

Strumento	Colorante primer	Capillari	Miscela di iniezione
SCIEX CEQ-2000 CEQ-8000 CEQ-8800 GeXP	Cy5	33 cm	1 µl di reazione ^a PCR 0,5 µl CEQ - dimensioni standard 600 ^b 28,5 µl di formammide di HiDi / Beckman SLS Aggiungere una goccia di olio minerale di alta qualità.
ABI-Prism 3100 (Avant) ABI-3130 (xL) ABI-3500c (xL) ABI-3730 (xL)	FAM	36, 50 cm	0,7 µl di reazione ^a PCR 0,3 µl standard per dimensioni ROX o 0,2 µl LIZ GS 500 9 µl di formammide di HiDi Sigillare la piastra di iniezione. Scaldare 3 minuti a 86°C, raffreddare per 2 minuti a 4°C ^d .
ABI-SeqStudio	FAM	28 cm	0,8 µl di reazione ^a PCR 0,3 µl standard per dimensioni ROX/LIZ GS500 12 µl di formammide di HiDi Sigillare la piastra di iniezione. Scaldare 3 minuti a 86°C, raffreddare per 2 minuti a 4°C ^d .

^a Il volume del prodotto di PCR aggiunto non deve mai superare il 10% della miscela di iniezione totale.

^b Ridurre il volume marcatore di dimensione se necessario.

^c Per ABI-3500: impostare la tensione di funzionamento su 15 kV e assicurare un tempo di esecuzione sufficiente.

^d Scaldare per un breve periodo di tempo la miscela di iniezione prima di procedere all'elettroforesi capillare.

La tabella seguente contiene gli intervalli di segnale ottimale, minimo e massimo per gli strumenti di elettroforesi capillare. Se i segnali non rientrano in questi valori, è possibile ottenere risultati falsati. Potrebbe essere necessaria l'ottimizzazione delle impostazioni di analisi dei frammenti.

Strumento	Intervallo di segnale ottimale (in RFU)	Segnale minimo (in RFU)	Segnale massimo (in RFU)
SCIEX CEQ/GeXP	9375 - 136000	5000	170000
Serie ABI 310, 3100 e 3130	375 - 6000	200	7500
Serie ABI 3500, 3730 e SeqStudio	375 - 24 800	300	31000

8. CONTROLLO QUALITÀ MLPA E RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

8.1. FRAMMENTI DI CONTROLLO QUALITÀ MLPA

Coffalyser.Net deve essere utilizzato per l'analisi dei dati MLPA in quanto esegue automaticamente il controllo dei frammenti di controllo per garantire il rispetto dei requisiti minimi di qualità! Le probemix MLPA contengono frammenti di controllo di qualità che segnalano problemi che potrebbero compromettere i risultati MLPA. Valutare la qualità della reazione MLPA, inclusi i frammenti di controllo di qualità, usando il diagramma di flusso del controllo di qualità (sezione 8.4). Solo i dati che soddisfano i requisiti di qualità sono adatti per l'interpretazione dei risultati MLPA. Per facilitare la valutazione della qualità, i moduli di e-learning MLPA, i frammenti di controllo qualità e la procedura guidata per la risoluzione dei problemi MLPA sono disponibili online su www.mrcholland.com.

Quasi tutte le probemix SALSA MLPA contengono nove frammenti di controllo, come descritto di seguito:

Nome	Lunghezza (nt)	Interpretazione
Frammento di riferimento	92	Riferimento da confrontare con gli altri frammenti di controllo di qualità.
Frammenti di quantità (Q-fragments)	64, 70, 76, 82	Alto quando la quantità di DNA è troppo bassa o la ligazione non riesce. Mediana dei segnali Q-fragment $\geq 33\%$ rispetto al frammento di riferimento 92 nt \rightarrow Quantità di DNA insufficiente o ligazione non riuscita. Vedi Figura 3.
Frammenti di denaturazione (D-fragments)	88, 96	Basso in caso di scarsa denaturazione del DNA del campione. Segnale $\leq 50\%$ rispetto al frammento di riferimento 92 nt \rightarrow Denaturazione del DNA insufficiente. Vedi Figura 4.
Frammenti X & Y	100, 105	Controllo per la miscelazione del campione ⁶ .

Q-FRAGMENTS

I quattro Q-fragments (64, 70, 76 e 82 nt) forniscono un controllo per una sufficiente aggiunta di DNA e una buona ligazione. I Q-fragments non hanno bisogno di ibridarsi al DNA o essere ligati per essere amplificati durante la PCR. I Q-fragments diminuiscono in altezza all'aumentare della quantità di DNA di campione che viene aggiunto ad una reazione (Figura 3).

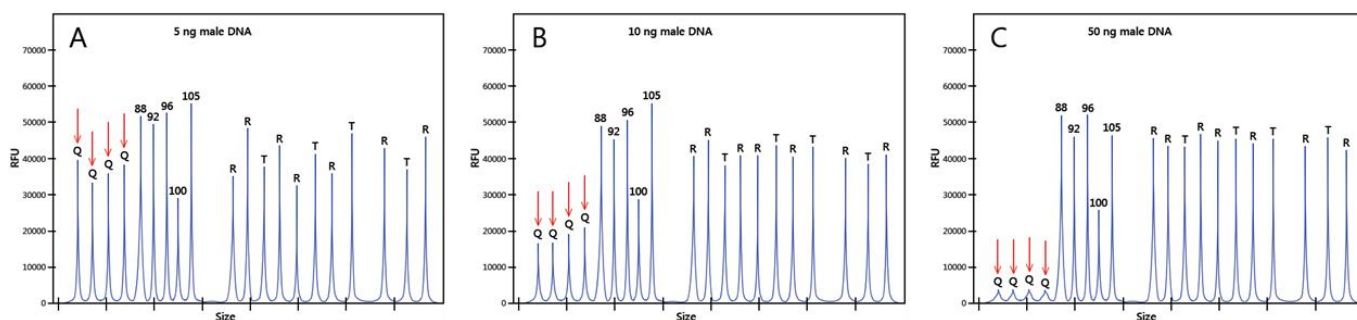


Figura 3. Effetto della quantità di DNA sui Q-fragments. Più DNA viene utilizzato, più bassi sono i Q-fragments. Risultati MLPA con **A.** 5 ng, **B.** 10 ng, **C.** 50 ng di DNA. I campioni **A** e **B**, contengono DNA insufficiente.

D-FRAGMENTS

I due D-fragments (88 e 96 nt) rilevano le sequenze in isole CpG eccezionalmente forti. Le isole CpG hanno un alto contenuto di GC e sono difficili da denaturare. Quando i D-fragments da 88 e 96 nt sono bassi ($\leq 50\%$ del frammento di riferimento di 92 nt) ciò indica che il DNA del campione non è stato denaturato in modo sufficiente. Una scarsa denaturazione può essere dovuta alla presenza di sale >40 mM in un campione di DNA. La denaturazione incompleta del DNA può dare risultati falsati!

NOTA: quando si utilizza il polimero ABI POP7, è solitamente presente un frammento non specifico di 80-90 nt che potrebbe coincidere con i frammenti di controllo!

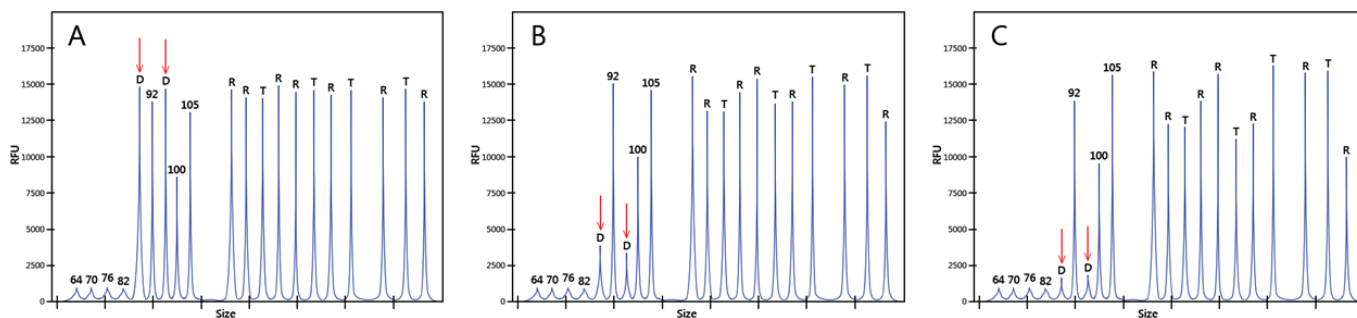


Figura 4. Effetto di scarsa denaturazione sui D-fragments. I D-fragments sono bassi quando la denaturazione del DNA del campione è incompleta (qui indotta aggiungendo sale al campione). Risultati MLPA su campioni di DNA contenenti in **A.** TE, **B.** TE + 40 mM NaCl, **C.** TE + 100 mM NaCl. I campioni **B.** e **C.** mostrano una denaturazione insufficiente.

⁶ Sono noti casi di maschi privi di questa sequenza specifica Y e di femmine che presentano questa sequenza Y su un cromosoma X.

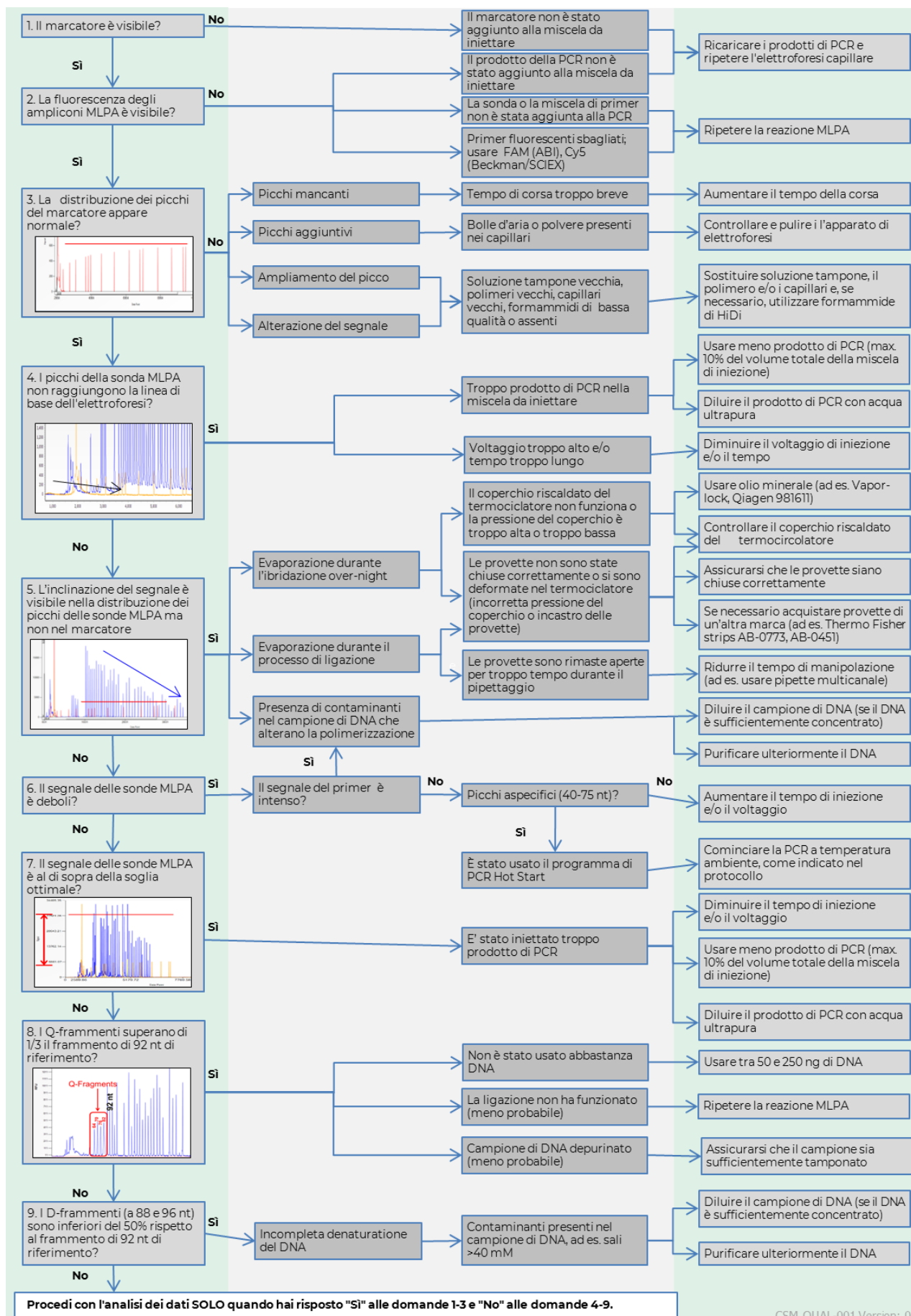
8.2. CONTROLLO SENZA DNA

In un tipico controllo senza DNA, sono visibili solo i quattro Q-fragments. In alcune probemix, alcuni picchi più lunghi di 100 nt potrebbero essere visibili nei controlli senza DNA. Questi picchi non specifici non influenzeranno i risultati MLPA quando viene utilizzato un campione di DNA sufficiente, poiché vengono eliminati dall'amplificazione esponenziale delle sonde MLPA. Avisare MRC Holland nel caso in cui un picco non specifico nel controllo senza DNA sia riproducibilmente superiore al 50% dell'altezza mediana dei Q-fragments.

8.3. EVAPORAZIONE

L'evaporazione può verificarsi durante (A) il pipettamento della reazione di ligazione a 54°C o (B) durante l'ibridazione over-night, e causa una maggiore concentrazione di sale. Ciò può portare alla formazione di una forte struttura secondaria del DNA del campione e può inibire il legame di alcune sonde alle loro sequenze bersaglio. In generale, le piastre sono più soggette all'evaporazione rispetto alle strip. Nel caso in cui si sospetti l'evaporazione, incubare 8 µl di H₂O per una notte a 60°C; al mattino dovrebbero rimanere >5 µl di H₂O. Per suggerimenti su come eliminare l'evaporazione, consultare la sezione 8.4 passaggio 5. Quando si utilizza olio minerale, aggiungerne quanto basta per coprire la superficie. Non è necessario rimuovere l'olio. Dopo l'aggiunta della master mix di probemix e polimerasi, centrifugare le provette per un breve periodo di tempo. Dopo l'aggiunta della master mix di ligasi, pipettare su e giù sotto lo strato di olio.

8.4. DIAGRAMMA DI FLUSSO DEL CONTROLLO QUALITÀ



CSM.QUAL-001 Version: 03

9. ANALISI DEI DATI

Il software Coffalyser.Net deve essere utilizzato per l'analisi dei dati MLPA in combinazione con la scheda Coffalyser specifica per lotto. Per entrambi, deve essere utilizzata l'ultima versione. Il Manuale di consultazione di Coffalyser.Net fornisce istruzioni dettagliate sull'analisi dei dati MLPA. Sia il software che il manuale sono scaricabili gratuitamente su www.mrcholland.com.

La fluorescenza assoluta misurata mediante elettroforesi capillare per ciascuna sonda è influenzata da molte variabili e non può essere utilizzata direttamente. La fluorescenza di ciascuna sonda deve prima essere normalizzata all'interno di una reazione MLPA. Questa normalizzazione utilizza sonde di riferimento che dovrebbero avere un numero di copie normale in tutti i campioni. I segnali relativi alla sonda di ciascun campione sono confrontati con quelli ottenuti dai campioni di riferimento. I campioni di riferimento devono avere un numero di copie normale per tutte le sonde di riferimento e per le sonde bersaglio. Questo confronto consente quindi la determinazione del numero di copie relative delle sequenze bersaglio in un campione.

Coffalyser.Net seleziona il miglior metodo di analisi per ciascuna probemix MLPA e offre un esteso controllo di qualità⁷. Per ulteriori informazioni su come viene eseguita l'analisi dei dati, consultare il Manuale di consultazione di Coffalyser.Net. **Per le applicazioni MLPA registrate come IVD, è necessario utilizzare Coffalyser.Net! L'utilizzo di altri software può portare a risultati inconcludenti o falsi!**

10. INTERPRETAZIONE E CONFERMA

- Le anomalie rilevate dalla MLPA devono essere confermate da un probemix MLPA di conferma o da una tecnica indipendente ogni volta che è possibile. Le modifiche al numero di copie rilevate da una singola sonda richiedono sempre la conferma. Il sequenziamento delle sequenze bersaglio della sonda può mostrare che un segnale ridotto della sonda è causato da una mutazione/polimorfismo. Il riscontro di due sequenze eterozigote indica in genere che il DNA del campione contiene due alleli diversi. Si noti che la ricerca di un singolo allele raro mediante sequenziamento non implica che un allele venga eliminato, poiché potrebbero essere presenti due copie dell'allele raro. Un SNP omozigote può portare a una parziale riduzione del segnale che assomiglia a una delezione eterozigote.
- Non tutte le delezioni e le duplicazioni rilevate dalla MLPA sono patogene. Le varianti del numero di copie di Germline registrate in individui sani si possono trovare su <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>. MRC Holland non può fornire informazioni se la delezione o la duplicazione di un esone specifico possa provocare una malattia.
- Alcune aberrazioni del numero di copie possono essere dovute ad alterazioni somatiche, incluse ampie delezioni e duplicazioni di interi cromosomi.
- Nel caso di un'apparente delezione omozigote, l'elettroferogramma deve essere controllato visivamente per determinare se il segnale è veramente assente. L'assenza del segnale della sonda può essere dovuto a problemi di binning o a segnali bassi.
- È improbabile che le modifiche al numero di copie rilevate dalle sonde di riferimento o dalle sonde fiancheggianti siano correlate alla condizione testata. L'identità delle sonde di riferimento è disponibile su richiesta.

11. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- Solo per uso professionale. Le prestazioni del test dipendono dalla competenza dell'operatore e dal rispetto delle istruzioni procedurali. Il test deve essere eseguito da professionisti formati in tecniche molecolari. La persona responsabile dell'interpretazione dei risultati deve essere a conoscenza delle più recenti conoscenze scientifiche dell'applicazione in questione e di eventuali limitazioni della procedura MLPA che potrebbero portare a risultati errati.
- La convalida interna di ciascuna applicazione MLPA è fondamentale, in particolare quando si utilizza la MLPA per la prima volta o quando si modifica la procedura di manipolazione del campione, il metodo di estrazione del DNA o gli strumenti utilizzati; includere almeno 16 campioni di DNA normali. La convalida deve mostrare una deviazione standard $\leq 0,10$ per ogni sonda (a meno che la descrizione del prodotto specifico probemix non indichi diversamente). I campioni usati per la convalida devono essere rappresentativi dei campioni utilizzati nella pratica quotidiana.

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- Per la maggior parte delle applicazioni MLPA, la principale causa di difetti genetici sono le piccole mutazioni (puntiformi), la maggior parte delle quali non saranno rilevate dai probemix MLPA.

⁷ Coffalyser.Net inizia con l'analisi dei dati grezzi (correzione della baseline, identificazione dei picchi) e fornisce un esteso controllo di qualità (ad es. quantità di DNA utilizzata, completa denaturazione del DNA, correzione della pendenza).

- La MLPA non può rilevare alcuna delezione o duplicazione che si trova al di fuori della sequenza bersaglio delle sonde e non rileverà inversioni o traslocazioni neutre del numero di copie.
- I cambiamenti di sequenza (ad es. SNPs, mutazioni puntiformi, piccole indels) all'interno o in prossimità della sequenza bersaglio rilevata da una sonda possono provocare falsi risultati positivi⁸.
- La contaminazione di campioni di DNA con ampliconi di cDNA o PCR di singoli esoni può portare ad un aumento del segnale della sonda⁹. L'analisi di un secondo campione di DNA raccolto e isolato in modo indipendente può escludere questi artefatti di contaminazione.
- In caso di scarsa denaturazione del DNA del campione, le delezioni apparenti, anche di più sonde che riconoscono bersagli genomici adiacenti, possono essere un risultato falso positivo! Le regioni cromosomiche estremamente ricche di GC non vengono denaturate a 98°C quando sono presenti più di 40 mM di NaCl o KCl.
- I test MLPA forniscono il numero medio di copie delle sequenze bersaglio nelle cellule da cui è stato estratto il campione di DNA. Nel caso in cui più sonde destinate a sequenze adiacenti abbiano un valore insolito, ma non raggiungano i soliti valori di soglia per una delezione/duplicazione, il mosaicismo è una possibile causa.
- Piccole differenze nell'esecuzione sperimentale possono influenzare il pattern di picco MLPA. Includere solo campioni in un'analisi che erano: a) inclusi nello stesso esperimento MLPA e b) testati con lo stesso lotto probemix.
- Variazioni minime, come quelle osservate nei casi a mosaico, possono essere distinte solo quando le sonde sono disposte secondo la posizione cromosomica.
- In alcuni casi, potrebbe essere necessaria l'analisi dei campioni parentali per una corretta interpretazione dei risultati.
- Quando si corrono i prodotti MLPA, potrebbe essere necessario ottimizzare il protocollo di elettroforesi capillare. Si possono ottenere risultati errati se uno o più picchi sono fuori scala. Ad esempio, una duplicazione di uno o più esoni può essere oscurata quando i picchi sono fuori scala, determinando un risultato falso negativo. Il rischio sui picchi fuori scala è maggiore quando vengono utilizzate probemix che contengono un numero relativamente basso di sonde. Il software Coffalyser.Net avvisa per i picchi fuori scala mentre altri software no. Se uno o più picchi sono fuori scala, correre nuovamente i prodotti di PCR utilizzando: tensione di iniezione inferiore/impostazioni del tempo di iniezione o una quantità ridotta di campione diluendo i prodotti di PCR.

Protocollo Generale MLPA - Modifiche al documento

Versione-007-IT1 (1 marzo 2019)

- Le versioni precedenti sono disponibili solamente in inglese.
- Il protocollo è stato ristrutturato e alcune sezioni sono state riscritte. Non ci sono modifiche al metodo con cui viene eseguita la MLPA.
- DTT ha sostituito il beta-mercaptoetanolo in SALSA MLPA Buffer e SALSA Ligase-65.
- Nuova limitazione della procedura aggiunta per i picchi fuori scala.

Versione-006 (23 marzo 2018)

- Nuova figura 2 aggiunta.
- Impostazioni iniziali e ABI-310 rimossi dalla tabella delle specifiche di elettroforesi.
- ABI-SeqStudio aggiunto alla tabella delle specifiche di elettroforesi.
- Aggiunta una tabella con intervalli di segnale per strumenti per elettroforesi capillare.
- Aggiunto il diagramma di flusso del controllo di qualità.
- Aggiunti punti critici per ottenere buoni risultati.
- Informazioni nel protocollo ristrutturate e riscritte.

⁸ Quando si progettano le sonde, gli SNP noti vengono evitati quando possibile. Tuttavia, vengono continuamente scoperti nuovi SNP. Si prega di avvisare quando un polimorfismo o una frequente mutazione patogena influenza un segnale della 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.