



MLPA® Allgemeines Protokoll

Gebrauchsanweisung

MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) Allgemeines Protokoll zum Nachweis und zur Quantifizierung von DNA-Sequenzen.

Dieses Protokoll enthält Informationen, die für das Erzielen zuverlässiger MLPA-Ergebnisse unerlässlich sind. Es muss vollständig gelesen und in Verbindung mit der entsprechenden Produktbeschreibung speziell für den MLPA Probemix verwendet werden.

SALSA® MLPA® Reagenzkits und die Coffalyser.Net Analysesoftware sind in bestimmten Ländern als In-vitro-Diagnostikum (IVD) zugelassen (siehe www.mrcholland.com). In allen anderen Ländern sind diese Produkte nur für Forschungszwecke bestimmt (RUO). Bei der Verwendung eines IVD-registrierten Probemix für Diagnosezwecke ist es unbedingt erforderlich, ihn mit SALSA® MLPA®-Reagenzkits und der Analysesoftware Coffalyser.Net zu kombinieren. Länderspezifische Informationen zum IVD-Status von Probemixen können in der entsprechenden Probemix-spezifischen Produktbeschreibung sowie auf www.mrcholland.com gefunden werden.

Für den Nachweis der DNA-Kopienzahl und des Methylierungsstatus (MS-MLPA®) existiert ein separates Protokoll. Das Protokoll ist auf www.mrcholland.com erhältlich.



Hersteller: MRC Holland B.V. Willem Schoutenstraat 1, 1057 DL Amsterdam, Niederlande

Website: www.mrcholland.com; Telefon: +31 888 657 200

E-Mail: info@mrcholland.com (Informationen & technische Fragen), order@mrcholland.com (Bestellungen)

Inhaltsverzeichnis

1.	EINFÜHRUNG.....	2
1.1.	SALSA MLPA-ASSAY-KOMPONENTEN & LAGERBEDINGUNGEN	2
1.1.1.	REAGENZKIT-ARTIKELNUMMERN.....	2
1.1.2.	REAGENZKIT KOMPONENTEN.....	3
1.1.3.	ANWENDUNGSSPEZIFISCHER MLPA-PROBEMIX.....	3
1.1.4.	LAGERUNG UND HALTBARKEIT.....	3
1.1.5.	VERPACKUNGSETIKETTEN	3
1.2.	MLPA-ASSAY-PRINZIP.....	3
2.	ANLEITUNG ZUR ASSAY-EINRICHTUNG.....	4
2.1.	ERFORDERLICHE MATERIALIEN, ABER NICHT MITGELIEFERT.....	4
2.2.	PROBENBEHANDLUNG UND LAGERUNG.....	5
2.3.	AUSWAHL VON REFERENZ- UND ANDEREN KONTROLLPROBEN.....	5
3.	WICHTIGE HINWEISE, BEVOR SIE BEGINNEN.....	6
4.	KRITISCHE PUNKTE FÜR GUTE MLPA-ERGEBNISSE.....	6
5.	MLPA-PROTOKOLL - IN KÜRZE.....	6
6.	MLPA-PROTOKOLL.....	7
6.1.	THERMOCYCLER-PROGRAMM FÜR DIE MLPA-REAKTION	7
6.2.	DNA-DENATURATION (TAG 1).....	7
6.3.	HYBRIDISIERUNG (TAG 1)	7
6.4.	LIGATION (TAG 2).....	7
6.5.	PCR (TAG 2).....	8
7.	FRAGMENTSEPARATION DURCH KAPILLARELEKTROPHORESE.....	8
7.1.	HINWEISE VOR DEM START.....	8
7.2.	ELEKTROPHORESE-SPEZIFIKATIONEN.....	8
8.	MLPA-QUALITÄTSKONTROLLE UND FEHLERSUCHE.....	9
8.1.	MLPA-QUALITÄTSKONTROLLEFRAGMENTE.....	9
8.2.	DNA-FREIE-KONTROLLE.....	10
8.3.	VERDUNSTUNG.....	10
8.4.	FLUSSDIAGRAMM FÜR DIE QUALITÄTSKONTROLLE.....	11
9.	DATENANALYSE.....	12
10.	INTERPRETATION UND BESTÄTIGUNG	12
11.	VORSICHTSMAßNAHMEN UND WARNHINWEISE.....	12
12.	EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS.....	13

1. EINFÜHRUNG

Kopienzahlvariationen (engl. copy number variations, CNVs) sind eine wichtige Quelle für genetische Variationen in der menschlichen DNA und spielen bei einer Vielzahl von Erkrankungen eine Rolle. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®) ist eine halbquantitative, nicht-automatisierte Technik, mit der die relative Kopienzahl von bis zu 60 DNA-Sequenzen in einer einzelnen Multiplex-Reaktion auf PCR-Basis ermittelt wird.

1.1. SALSA MLPA-ASSAY-KOMPONENTEN & LAGERBEDINGUNGEN

1.1.1. REAGENZKIT-ARTIKELNUMMERN

Bestellnummer	Beschreibung	Anzahl der Reaktionen	PCR-Primer mit fluoreszierender Markierung
EK1-FAM oder EK1-Cy5	SALSA MLPA EK1 Reagenzkit	100	FAM oder Cy5
EK5-FAM oder EK5-Cy5	SALSA MLPA EK5 Reagenzkit	500	FAM oder Cy5
EK20-FAM	SALSA MLPA EK20 Reagenzkit	2000	FAM

1.1.2. REAGENZKIT KOMPONENTEN

Reagenzkit-Komponente	Volumen			Inhaltstoffe ¹
	EK1	EK5	EK20	
SALSA MLPA Puffer (gelbe Kappe)	180 µl	5×180 µl	5×700 µl	KCl, Tris-HCl, EDTA, PEG-6000, DTT, Oligonukleotide
SALSA Ligase-65 (grüne Kappe)	115 µl	5×115 µl	5×460 µl	Glycerin, EDTA, DTT, KCl, Tris-HCl, nichtionisches Detergens, Ligase-65 Enzym (bakterieller Ursprung)
SALSA Ligase Puffer A (transparente Kappe)	360 µl	5×360 µl	5×1420 µl	Coenzym NAD (bakterieller Ursprung)
SALSA Ligase Puffer B (weiße Kappe)	360 µl	5×360 µl	5×1420 µl	Tris-HCl, MgCl ₂ , nichtionisches Detergens
SALSA PCR Primer Mix (braune Kappe)	240 µl	5×240 µl	5×940 µl	Synthetische Oligonukleotide mit Fluoreszenzfarbstoff (FAM oder Cy5), dNTPs, Tris-HCl, KCl, EDTA, nichtionisches Detergens
SALSA Polymerase (orange Kappe)	65 µl	5×65 µl	5×240 µl	Glycerin, nichtionisches Detergens, EDTA, DTT, KCl, Tris-HCl, Polymerase-Enzym(bakterieller Ursprung)

1.1.3. ANWENDUNGSSPEZIFISCHER MLPA-PROBEMIX

Anwendungsspezifischer MLPA-Probemix	Verfügbare Volumen (R=Anzahl an Reaktionen)	Inhaltstoffe
Probemix* (schwarze Kappe)	40 µl (25R), 80 µl (50R), 160 µl (100R)	Synthetische Oligonukleotide, aus Bakterien gereinigte Oligonukleotide, Tris-HCl, EDTA
Beispiel-DNA [#] (engl. sample DNA, SD) (blaue Kappe)	30 µl oder 100 µl	Tris-HCl, EDTA, synthetische/Kontrollplasmid-DNA, menschliche genomische weibliche DNA, Zelllinien-DNA









* Probemixe sind nur zur Verwendung mit SALSA MLPA-Reagenzkits bestimmt.

[#] Ein Reaktionsgefäß mit SD (Referenz (Auswahl), Klasseneinteilungs- oder künstliche Vervielfältigungs-DNA) wird mit bestimmten MLPA-Probemixen geliefert oder kann separat bestellt werden. Mengen und Zusammensetzung sind abhängig vom SD-Typ.

1.1.4. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Alle Komponenten müssen direkt bei der Ankunft und nach Gebrauch zwischen -25 °C und -15 °C, lichtgeschützt und in der Originalverpackung gelagert werden. Bei Lagerung unter den empfohlenen Bedingungen - ebenso nach dem Öffnen - ist eine Haltbarkeit bis zum Verfallsdatum garantiert. Das genaue Verfallsdatum finden Sie auf den Etiketten der einzelnen Gefäße. Produkte sollten nicht mehr als 25 Frost-Tau-Zyklen ausgesetzt werden.

1.1.5. VERPACKUNGSETIKETTEN

	Hersteller		Lagerungstemperatur
	Chargenbezeichnung		Von Hitze und direktem Sonnenlicht fernhalten
	Verwendbar bis		Bestellnummer
	Testanzahl		Gebrauchsanweisung beachten
IVD	In-vitro-Diagnostikum	RUO	Nur für Forschungszwecke

1.2. MLPA-ASSAY-PRINZIP

Das Prinzip von MLPA beruht auf der Amplifikation von bis zu 60 MLPA-Sonden, die jeweils eine spezifische DNA-Proben-Sequenz von etwa 60 nt Länge nachweisen (Abbildung 1)². Die MLPA-Reaktion führt zu einer Reihe einzigartiger PCR-Amplifikaten mit Längen zwischen 64 und 500 nt, die durch Kapillarelektrophorese getrennt werden. Nach der

¹ Keiner der Inhaltsstoffe stammt von Menschen, Tieren oder pathogenen Bakterien. Aufgrund der vorhandenen Konzentrationen ist keiner der Inhaltsstoffe gefährlich im Sinne des Hazard Communication Standards. Ein Sicherheitsdatenblatt (SDB) ist für diese Produkte nicht erforderlich: Keine der Zubereitungen enthält gefährliche Stoffe (gemäß Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 [EU-GHS/CLP] und Änderungen) in Konzentrationen, die den Vertrieb eines SDB erfordern (gemäß Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 [EU-GHS/CLP] und 1907/2006 [REACH] und Änderungen). Wenn Verschüttungen auftreten, reinigen Sie diese mit Wasser und befolgen Sie die entsprechenden Anweisungen vor Ort.

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

anfänglichen Denaturierung der DNA-Probe wird dieser eine Mischung von MLPA-Sonden zugefügt. Im Allgemeinen besteht jede MLPA-Sonde aus zwei Oligonukleotiden, die mit direkt benachbarten Zielsequenzen hybridisieren müssen, um in eine einzelne MLPA-Sonde ligiert zu werden (Abbildung 1). Während der nachfolgenden PCR-Reaktion werden alle ligierte Sonden gleichzeitig unter Verwendung des gleichen PCR-Primerpaares amplifiziert. So erhält man eine Reihe von einzigartig PCR-Amplifikaten. Einer der PCR-Primer ist fluoreszenzmarkiert, sodass die Amplifikationsprodukte während der Fragmentauftrennung durch ein Kapillarelektrophoresegerät sichtbar gemacht werden können. Die Fragmentseparation ergibt ein probenspezifisches Elektropherogramm: das Sonden-Peakmuster (Abbildung 2, oben).

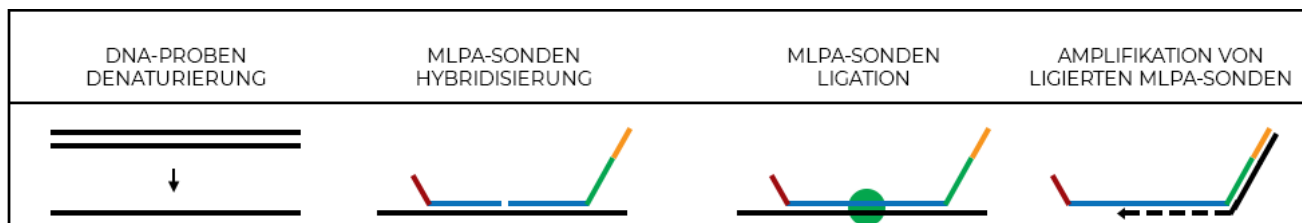


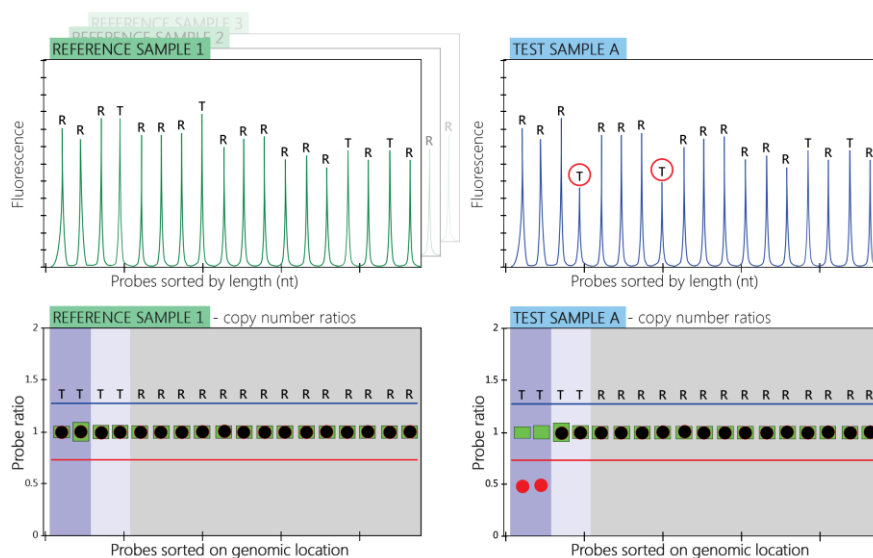
Abbildung 1. MLPA-Reaktion.

MLPA ist eine relative Technik: Durch Vergleich der MLPA-Sonden-Peakmuster von DNA-Proben können nur relative Unterschiede nachgewiesen werden. Im relativen Vergleich der Sondenpeakhöhen mit verschiedenen Referenz-DNA-Proben wird die relative Kopienzahl der entsprechenden Zielsequenz in einer DNA-Probe widerspiegelt. Die Einbeziehung von Referenzproben im gleichen Durchlauf ist daher unerlässlich. Die Deletion einer oder mehrerer Zielsequenzen wird als relative Abnahme der Peakhöhe sichtbar (Abbildung 2, unten), während eine Zunahme eine Erhöhung der Kopienzahl darstellt.

Abbildung 2. Profilvergleich von MLPA-Daten.

Oben: Das Elektropherogramm der Testprobe A (rechts) wird mit dem der Referenz-DNA-Probe (links) verglichen. Eine relative Signalabnahme ist bei zwei MLPA-Sonden (rot eingekreist) in Testprobe A zu sehen.

Unten: Berechnete Sondenverhältnisse der Testprobe A (rechts), normiert auf die Referenz-DNA-Probe (links), wie von der Coffalyser.Net-Software angezeigt. Die Anordnung der MLPA-Sonden nach chromosomaler Lage offenbart eine heterozygote Deletion (Probenverhältnis 0,5) in der Testprobe A (rote Punkte).



T: Ziel-MLPA-Sonde, R: Referenz-MLPA-Sonde

2. ANLEITUNG ZUR ASSAY-EINRICHTUNG

2.1. ERFORDERLICHE MATERIALIEN, ABER NICHT MITGELIEFERT

- Ultra-Reinstwasser
- TE_{0.1} (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM EDTA)
- Kalibrierter Thermocycler mit beheiztem Deckel (99-105 °C) und Standardlaborausrüstung
- 0,2 ml PCR-Röhrchen, Streifen oder Platten
- Kapillarelektrophoresegerät³ mit Fragmentanalyse-Software
 - Applied Biosystems: Standard Foundation Data Collection Software

³ Kapillarelektrophoresegeräte, die keine denaturierenden Bedingungen verwenden, wie QIAGEN QIAxcel oder Agilent Fragment Analyzer, können nicht in Kombination mit MLPA verwendet werden.

- SCIEX: GeXP Software Package
- Hochwertiges Formamid (z. B. Hi-Di Formamid, Applied Biosystems)
- Markierter Komigrationsstandard
 - Applied Biosystems: GeneScan™ 500 LIZ®/ROX™ (bevorzugt; obligatorisch für die Verwendung mit IVD-registrierten Probemixen), GeneScan™ 600 LIZ®, GeneScan™ 500 TAMRA™
 - SCIEX: CEQ™ DNA Size Standard Kit - 600
- Polymere
 - Applied Biosystems: POP-4 oder POP-7 werden bevorzugt. POP-6 wird aufgrund seiner hohen Auflösung nicht empfohlen. SeqStudio: POP-1 ist in die Kartusche integriert und geeignet.
 - SCIEX: GenomeLab™ Lineares Polyacrylamid (LPA) Denaturierungsgel
- Coffalyser.Net Analysesoftware (kostenlos erhältlich auf www.mrcholland.com)

2.2. PROBENBEHANDLUNG UND LAGERUNG

- Verwenden Sie eine Gesamtmenge von 50-250 ng humaner DNA (50-100 ng sind optimal; sofern in der Probemix-spezifischen Produktbeschreibung nicht anders angegeben) in 5 µl⁴ Volumen für jede MLPA-Reaktion⁵. Bei Bedarf können DNA-Proben via Ethanol-fällung konzentriert werden. Glykogen (Roche 901393) kann als Träger verwendet werden. Weitere Informationen finden Sie unter www.mrcholland.com.
- DNA-Präparationen sollten 5-10 mM Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 8,0 bis 8,5 enthalten, um eine Depurinierung während des anfänglichen Denaturierungsschritts bei 98 °C zu verhindern. Lösen und verdünnen Sie zum Beispiel Proben-DNA in **TE_{0.1}** (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM EDTA). Wenn nicht bekannt ist, ob eine ausreichende Pufferkapazität vorhanden ist, fügen Sie Tris-HCl (4 µl Proben-DNA + 1 µl 50 mM Tris-HCl pH 8,5) hinzu.
- Verunreinigungen, die nach der DNA-Extraktion zurückbleiben, einschließlich NaCl oder KCl (> 40 mM) und andere Salze, Phenol, Ethanol, Heparin, EDTA (> 1,5 mM) und Eisen, können die MLPA-Testleistung beeinträchtigen. MLPA ist empfindlicher gegenüber Verunreinigungen als Monoplex-PCR-Assays. Konzentrieren Sie die DNA nicht durch Verdampfen oder SpeedVac, da dies zu hohen EDTA- und Salzkonzentrationen führt.
- Stellen Sie sicher, dass Extraktionsmethode, Gewebetyp, DNA-Konzentration und Behandlung in Test- und Referenzproben so ähnlich wie möglich sind.
- Extraktionsmethoden sollten keine hohen Schadstoffkonzentrationen hinterlassen. Verwenden Sie keine QIAGEN M6, M48 und M96 Systeme, da diese zu viel Salz hinterlassen. Für QIAGEN EZI verwenden Sie das *QIAGEN Ergänzungsprotokoll: Reinigung von genomischer DNA aus Vollblut, optimiert für die Verwendung in MRC-Holland MLPA®-Assays, unter Verwendung von EZI® DNA Blut-Kits* (siehe www.mrcholland.com). MRC Holland hat die folgenden Extraktionsmethoden getestet und kann sie empfehlen:
 - QIAGEN Autopure LS (automatisiert) und QIAamp DNA mini/midi/maxi kit (manuell)
 - Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (manuell)
 - Aussalzen (manuell)
- Heparinisiertes Blut kann nur verwendet werden, wenn die Probe einem Reinigungsverfahren unterzogen wurde, um die Heparin-Kontamination zu entfernen (z. B. Nucleospin gDNA Clean-up XS).
- Eine RNase-Behandlung ist wichtig bei der Untersuchung von Genen, die in dem untersuchten Probengewebe stark exprimiert werden z. B. *HBA* und *HBB* in Blutproben oder (mitochondriale) ribosomale RNA-Gene (alle Gewebe).
- In bestimmten Fällen kann die SALSA Sample Stabilising Solution (S4; Bestellnummer SMR04, SMR45) (RUO) die Qualität der MLPA-Reaktion verbessern. Weitere Informationen finden Sie in der Produktbeschreibung unter www.mrcholland.com.
- DNA aus Amplifikationsreaktionen des gesamten Genoms (engl. whole genom amplification, WGA) ist aufgrund von Amplifikationsvoreingenommenheit nicht für MLPA geeignet.
- Aliquotieren Sie Proben und lagern Sie diese bei -20 °C. Kontaminationen mit Mikroorganismen können Proben beschädigen, wenn diese längere Zeit bei 4 °C gelagert werden.

2.3. AUSWAHL VON REFERENZ- UND ANDEREN KONTROLLPROBEN

- AUSWAHL VON REFERENZ-DNA-PROBEN. Referenz-DNA-Proben sind DNA-Proben, die von gesunden Individuen mit einer normalen Kopienzahl (für die von den Ziel- und Referenz-MLPA-Sonden erfassten Sequenzen) erhalten wurden. Sie sollten in allen anderen Aspekten einschließlich Extraktionsverfahren und Probenquelle den Testproben so ähnlich wie möglich sein. Beachten Sie, dass nicht alle Probemixe für die

⁴ Verwenden Sie niemals mehr als 5 µl Proben-DNA pro Reaktion. Die Verwendung von mehr als 5 µl DNA verringert die Sonden- und Salzkonzentration. Dies verringert die Hybridisierungsgeschwindigkeit und die Stabilität der Bindung von MLPA-Sonden an die Proben-DNA.

⁵ Messungen der optischen Dichte (260 nm) überschätzen häufig die DNA-Konzentration z. B. aufgrund von Kontamination mit RNA. Eine ausreichende DNA-Menge lässt sich anhand der Q-Fragmente in der Ergebnisanalyse abschätzen, wie es in 8.1 erläutert wird.

Verwendung mit DNA aus allen Quellen geeignet sind (z. B. mit Formalin fixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe). Überprüfen Sie immer die Produktbeschreibungen des Probemix auf geeignete DNA-Quellen.

- REFERENZ-DNA-PROBEN. In jedem MLPA-Experiment sollten mindestens drei Referenz-DNA-Proben enthalten sein. Wenn Sie mehr als 21 Proben testen, fügen Sie jeweils eine zusätzliche Referenz-DNA-Probe pro sieben zusätzlichen Testproben hinzu. Verteilen Sie Referenz-DNA-Proben zufällig im Experiment, um Variationen zu minimieren. Es werden **mehrere Referenz-DNA-Proben** benötigt, um die Reproduzierbarkeit jeder Sonde in jedem MLPA-Lauf abzuschätzen.
- KOMMERZIELLE DNA. Bei Zweifeln an der Probenqualität beziehen Sie eine oder mehrere kommerzielle DNA-Proben zum Vergleich ein. Wir empfehlen Promega Bestellnummer G1471 männliche & G1521 weibliche DNA. Die kommerzielle DNA sollte nur als Kontrolle zur Überprüfung der Probenqualität verwendet werden und nicht als Referenz-DNA-Probe verwendet werden.
- DNA-FREIE-KONTROLLE. Es wird empfohlen, in jeden MLPA-Test eine DNA-Freie-Kontrolle einzubauen. Ersetzen Sie 5 µl DNA durch TE_{0.1} (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 + 0,1 mM EDTA), um die Verunreinigung von TE, MLPA-Reagenzien, Elektrophorese-Reagenzien oder Kapillaren zu überprüfen.
- POSITIVE KONTROLLPROBEN. Die Aufnahme positiver Kontrollproben wird empfohlen, sofern verfügbar. MRC Holland stellt keine positiven Proben zur Verfügung, eine Liste kommerziell erhältlicher positiver Proben ist jedoch auf www.mrcholland.com verfügbar. Beachten Sie bei der Verwendung von Zelllinien-DNA, dass Zelllinien möglicherweise zusätzliche Änderungen der Kopienzahl erlangt haben, einschließlich Zunahmen oder Verlusten von kompletten Chromosomen.

3. WICHTIGE HINWEISE, BEVOR SIE BEGINNEN

- Vortexen Sie aufgetaute Puffer und Probemixe immer und zentrifugieren Sie diese danach kurz. Alle Enzymreagenzröhrchen sollten kurz zentrifugiert werden. Der MLPA Puffer friert typischerweise bei -20 °C ein, kann jedoch aufgrund seiner hohen Salzkonzentration flüssig bleiben.
- Erwärmen Sie die Enzymröhrchen (Ligase-65 und Polymerase) 10 Sekunden lang in der Hand, um die Viskosität zu verringern.
- Enzymlösungen enthalten 50 % Glycerin und bleiben bei -20 °C flüssig. Mastermixe, die Enzyme enthalten, sollten durch sanftes Pipettieren nach oben und unten gründlich gemischt werden. Unzureichendes Mischen kann zu unzuverlässigen Ergebnissen führen. Fügen Sie bei der Zubereitung von Mastermixen Enzyme immer als letztes hinzu. **Vortexen Sie niemals** Lösungen, die **Enzyme** enthalten, da dies zu einer Inaktivierung des Enzyms führen kann.
- Bereiten Sie ausreichend große Mengen an Mastermix-Lösungen (5-10 % Volumenüberschuss) vor, um die Probenvariation zu minimieren.
- Bereiten Sie die Mastermixe (Ligase-65 und Polymerase) unmittelbar vor Gebrauch bei Raumtemperatur (engl. room temperature, RT) vor. Lagern Sie Mastermixe auf Eis oder bei 4 °C, wenn sie länger als eine Stunde vor Verwendung vorbereiten werden. Mastermixe sollten vor der Zugabe zu MLPA-Reaktionen auf Raumtemperatur erwärmt werden. Bei der DNA-Freie-Kontrolle Reaktion können sich unspezifische Peaks bilden, wenn ein sehr kalter Ligase-Mastermix zugegeben wird.
- Verwenden Sie Mehrkanalpipetten, um eine übermäßige Verdunstung zu vermeiden.
- Ein Video zur Durchführung einer MLPA-Reaktion im Labor finden Sie unter www.mrcholland.com.

4. KRITISCHE PUNKTE FÜR GUTE MLPA-ERGEBNISSE

- Stellen Sie sicher, dass alle DNA-Proben 5-10 mM Tris-HCl pH 8-8.5 enthalten. (Abschnitt 2.2)
- Fügen Sie in jedem MLPA-Experiment mindestens drei Referenz-DNA-Proben hinzu, die von demselben Gewebetyp stammen und auf dieselbe Weise wie Testproben behandelt werden. (Abschnitt 2.3)
- Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, ist ein genaues Pipettieren der Reagenzien unerlässlich. Das ist besonders belangreich im Falle der 3 µl an Hybridisierungs-Mastermix. (Abschnitt 6)
- Verwenden Sie Coffalyser.Net zur Datenanalyse. (Abschnitt 9)
- Überprüfen Sie die Qualitätsfragmente. Eine vollständige Denaturierung der DNA-Probe ist unerlässlich. (Abschnitt 8)
- Führen Sie eine regelmäßige Wartung des Kapillarelektrophoresegerätes durch, und ersetzen Sie die Kapillaren und das Polymer gemäß den Empfehlungen des Herstellers. (Abschnitt 7)

5. MLPA-PROTOKOLL - IN KÜRZE

1. DNA DENATURATION
 - Erhitzen Sie eine 5 µl DNA-Probe 5 Minuten bei 98 °C.
2. HYBRIDISIERUNG VON MLPA-SONDEN AN DNA-PROBE
 - Lassen Sie die Röhrchen auf Raumtemperatur abkühlen und öffnen Sie sie dann.
 - Fügen Sie 3 µl Hybridisierungs-Mastermix* hinzu
 - Inkubieren Sie die Röhrchen 1 Minute lang bei 95 °C und hybridisieren Sie für 16 Stunden bei 60 °C.

3. LIGATION VON HYBRIDISIERTEN MLPA-Sonden
 - Senken Sie die Temperatur des Thermocyclers auf 54 °C ab und öffnen Sie die Röhrchen.
 - Fügen Sie 32 µl Ligase-65-Mastermix* hinzu und inkubieren Sie für 15 Minuten bei 54 °C.
 - Hitze-inaktivieren Sie das Ligaseenzym für 5 Minuten bei 98 °C.
4. PCR-AMPLIFIKATION VON LIGIERTEN MLPA-SONDEN
 - Lassen Sie die Röhrchen auf Raumtemperatur abkühlen und öffnen Sie sie dann.
 - Fügen Sie 10 µl Polymerase-Mastermix* bei Raumtemperatur zu.
 - Starten Sie die PCR-Reaktion (35 x {95 °C 30 Sekunden, 60 °C 30 Sekunden, 72 °C 60 Sekunden}, 72 °C 20 Minuten, 15 °C Pause).
5. FRAGMENTSEPARATION DURCH KAPILLARELEKTROPHORESE
6. ANALYSE DER ERGEBNISSE MIT COFFALYSER.NET

* Mastermixe pro Reaktion:

- Hybridisierung: 1,5 µl SALSA Probemix + 1,5 µl MLPA Puffer
- Ligase-65: 3 µl Ligase Puffer A + 3 µl Ligase Puffer B + 25 µl Ultra-Reinstwasser + 1 µl Ligase-65
- Polymerase: 7,5 µl Ultra-Reinstwasser + 2 µl PCR Primer-Mix + 0,5 µl SALSA Polymerase

6. MLPA-PROTOKOLL

6.1. THERMOCYCLER-PROGRAMM FÜR DIE MLPA-REAKTION

DNA-Denaturierung			
1.	98 °C	5 Minuten	
2.	25 °C	Pause	
Hybridisierung			
3.	95 °C	1 Minute	
4.	60 °C	16-20 Stunden	
Ligation			
5.	54 °C	Pause	
6.	54 °C	15 Minuten	
7.	98 °C	5 Minuten	
8.	20 °C	Pause	
PCR			
9.	35 Zyklen:	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C 30 Sekunden • 60 °C 30 Sekunden • 72 °C 60 Sekunden 	
10.	72 °C	20 Minuten	
11.	15 °C	Pause	

Hinweis: Dieses Thermocycler-Programm sollte befolgt werden, sofern in der Probemix-spezifischen Produktbeschreibung nichts anderes angegeben ist.

6.2. DNA-DENATURATION (TAG 1)

- Beschriften Sie 0,2 ml- PCR-Röhrchen, Streifen oder Platten.
- Fügen Sie 5 µl DNA-Probe (50-250 ng; 50-100 ng ist optimal) oder TE (DNA-Freie-Kontrolle) in jedes Röhrchen hinzu.
- Stellen Sie die Röhrchen in den Thermocycler. Starten Sie die MLPA-Thermocycler-Programmschritte 1-2 (siehe Abschnitt 6.1).
- Stellen Sie sicher, dass die Proben eine Temperatur von 25 °C besitzen, bevor Sie die Röhrchen aus dem Thermocycler entnehmen.

6.3. HYBRIDISIERUNG (TAG 1)

- Bereiten Sie den Hybridisierungs-Mastermix zu. Mischen Sie für jede Reaktion 1,5 µl MLPA Puffer (gelbe Kappe) und 1,5 µl Probemix (schwarze Kappe). Mischen Sie gut durch Pipettieren oder Vortexen.
- Fügen Sie nach der DNA-Denaturierung 3 µl Hybridisierungs-Mastermix zu jeder Reaktion hinzu. Genaues Pipettieren ist von entscheidender Bedeutung. Vermischen Sie gut, indem Sie sanft auf und ab pipettieren.
- Setzen Sie das Thermocycler-Programm mit den Schritten 3-4 fort.

6.4. LIGATION (TAG 2)

- Bereiten Sie einen Ligase-65-Mastermix zu. Mischen Sie für jede Reaktion 25 µl Ultra-Reinstwasser, 3 µl Ligase Puffer A (transparente Kappe) und 3 µl Ligase Puffer B (weiße Kappe), dann geben Sie 1 µl Ligase-65-Enzym (grüne Kappe) hinzu. Vermischen Sie gut, indem Sie sanft auf und ab pipettieren.
- Fahren Sie mit dem Thermocycler-Programm mit Schritt 5 fort.

- Wenn der Thermocycler eine Temperatur von 54 °C besitzt und **während die Proben sich IN dem Thermocycler befinden**, fügen Sie jeder MLPA-Reaktion 32 µl Ligase-65-Mastermix hinzu. Vermischen Sie gut, indem Sie sanft auf und ab pipettieren.
- Fahren Sie mit dem Thermocycler-Programm mit den Schritten 6-8 fort.

6.5. PCR (TAG 2)

- Bereiten Sie den Polymerase-Mastermix zu. Mischen Sie für jede Reaktion 7,5 µl Ultra-Reinstwasser und 2 µl SALSA PCR Primer-Mix (braune Kappe), fügen Sie dann 0,5 µl SALSA Polymerase hinzu (orange Kappe). Vermischen Sie gut, indem Sie sanft auf und ab pipettieren.
- **Bei Raumtemperatur** fügen Sie zu jeder MLPA-Reaktion 10 µl Polymerase-Mastermix zu. Vermischen Sie gut, indem Sie sanft auf und ab pipettieren. Geben Sie die Röhrchen **sofort** in den Thermocycler und setzen Sie das Thermocycler-Programm mit den Schritten 9-11 fort.
- Öffnen Sie nach der PCR-Reaktion keine Röhrchen im selben Raum wie der Thermocycler. Verwenden Sie verschiedene Mikropipetten zur Durchführung von MLPA-Reaktionen und zur Handhabung von MLPA-PCR-Produkten, um Kontaminationen zu vermeiden.
- Das PCR-Produkt kann eine Woche lang bei 4 °C vor Licht geschützt gelagert werden. Lagern Sie es für längere Zeiträume zwischen -25 °C und -15 °C.

7. FRAGMENTSEPARATION DURCH KAPILLARELEKTROPHORESE

7.1. HINWEISE VOR DEM START

- Komigrationsstandard, Laufbedingungen, Polymer, Fluoreszenzfarbstoff und Volumen der MLPA-PCR-Reaktion hängen vom Gerätetyp der Kapillarelektrophorese ab. Verwenden Sie die Standardeinstellungen für die Fragmentanalyse auf Ihrem Kapillarelektrophoresegerät, die für die Anwendung, Polymer- und Kapillarlänge gültig sind. Die Geräteeinstellungen erfordern möglicherweise eine Optimierung für die ordnungsgemäße Fragmentauftrennung.
- Ersetzen Sie die Kapillaren und das Polymer regelmäßig gemäß den Herstellerempfehlungen. Wenn das Polymer über einen längeren Zeitraum einer Temperatur von >25 °C ausgesetzt ist, zerfällt es recht schnell. Wenn die Peakhöhe des Komigrationsstandard wiederholt niedrig und breit sind, können sich die Kapillaren oder das Polymer verschlechtern haben.
- Verwenden Sie hochwertiges Formamid und lagern Sie es aliquotiert bei -20 °C. Formamid kann säurehaltig werden und beim Erhitzen Depurinierung und Fragmentierung der DNA verursachen.

7.2. ELEKTROPHORESE-SPEZIFIKATIONEN

Instrument	Fluoreszenzfarbstoff	Kapillaren	Injektionsmischung
SCIEX CEQ-2000 CEQ-8000 CEQ-8800 GeXP	Cy5	33 cm	1 µl PCR-Reaktion ^a 0,5 µl CEQ - Komigrationsstandard 600 ^b 28,5 µl HiDi Formamid / Beckman SLS Fügen Sie einen Tropfen hochwertiges Mineralöl hinzu.
ABI-Prism 3100 (Avant) ABI-3130 (xL) ABI-3500 ^c (xL) ABI-3730 (xL)	FAM	36, 50 cm	0,7 µl PCR Reaktion ^a 0,3 µl ROX oder 0,2 µl LIZ GS 500 Komigrationsstandard 9 µl HiDi Formamid Verschließen Sie die Injektionsplatte. Erhitzen Sie es 3 Minuten lang bei 86 °C und kühlen Sie es danach für 2 Minuten bei 4 °C ^d .
ABI-SeqStudio	FAM	28 cm	0,8 µl PCR Reaktion ^a 0,3 µl ROX/LIZ GS500 Komigrationsstandard 12 µl HiDi Formamid Verschließen Sie die Injektionsplatte. Erhitzen Sie es 3 Minuten lang bei 86 °C und kühlen Sie es danach für 2 Minuten bei 4 °C ^d .

^a Das Volumen des zugesetzten PCR-Produkts sollte niemals 10 % der gesamten Injektionsmischung überschreiten.

^b Reduzieren Sie bei Bedarf das Volumen des Komigrationsstandards.

^c Für ABI-3500: Stellen Sie die Betriebsspannung auf 15 kV ein und stellen Sie eine ausreichende Betriebsdauer sicher.

^d Es wird empfohlen, die Injektionsmischung vor der Kapillarelektrophorese kurz zu erwärmen.

Die folgende Tabelle enthält die optimalen, minimalen und maximalen Signalbereiche für Kapillarelektrophoresegeräte. Wenn Signale außerhalb dieser Werte liegen, können falsche Ergebnisse erzielt werden. Möglicherweise ist eine Optimierung der Fragmentanalyseeinstellungen erforderlich.

Instrument	Optimaler Signalbereich (in RFU)	Minimales Signal (in RFU)	Maximales Signal (in RFU)
SCIEX CEQ/GeXP	9.375 - 136.000	5.000	170.000
ABI 310-, 3100- & 3130-Serie	375 - 6.000	200	7.500
ABI 3500-, 3730-Serie & SeqStudio	375 - 24.800	300	31.000

8. MLPA-QUALITÄTSKONTROLLE UND FEHLERSUCHE

8.1. MLPA-QUALITÄTSKONTROLLEFRAGMENTE

Coffalyser.Net sollte für die Analyse von MLPA-Daten verwendet werden, da es automatisch Kontrollfragmentprüfungen durchführt, um sicherzustellen, dass minimale Qualitätsanforderungen erfüllt werden!

MLPA-Probemixe enthalten Qualitätskontrollfragmente, die auf Probleme hinweisen, welche Auswirkungen auf die MLPA-Ergebnisse haben können. Beurteilen Sie die Qualität der MLPA-Reaktion einschließlich der Qualitätskontrollfragmente anhand des Flussdiagramms zur Qualitätskontrolle (Abschnitt 8.4). Nur Daten, die die Qualitätsanforderungen erfüllen, sind für die Interpretation von MLPA-Ergebnissen geeignet. Zur Unterstützung der Qualitätsbewertung sind die E-Learning-Module 'MLPA quality control fragments' und 'MLPA troubleshooting wizard' online unter www.mrcholland.com verfügbar.

Fast alle SALSA-MLPA-Probemixe enthalten neun Kontrollfragmente, wie nachstehend beschrieben:

Name	Länge (nt)	Signalinterpretation
Benchmark-Fragment	92	Benchmark zum Vergleich mit anderen Qualitätskontrollfragmenten.
Quantitäts-Fragmente (Q-Fragmente)	64, 70, 76, 82	Ein hohes Signal weist daraufhin, dass die DNA-Menge zu niedrig oder die Ligation fehlgeschlagen ist. Median der Q-Fragment-Signale $\geq 33\%$ des 92 nt Benchmark-Fragments \rightarrow DNA-Menge unzureichend oder Ligation nicht erfolgreich (Abbildung 3).
Denaturierungs-Fragmente (D-Fragmente)	88, 96	Ein niedriges Signal weist daraufhin, dass eine unzureichende Denaturierung der Probe-DNA vorliegen kann. Signal $\leq 50\%$ des 92 nt Benchmark-Fragments \rightarrow DNA-Denaturierung unzureichend (Abbildung 4).
X- und Y-Fragmente	100, 105	Kontrolle für Probenverwechslung ⁶ .

Q-FRAGMENTE

Die vier Q-Fragmente (64, 70, 76 und 82 nt) bieten eine Kontrolle für eine ausreichende Proben-DNA-Zugabe und eine erfolgreiche Ligation. Die Q-Fragmente werden unabhängig von der übrigen Proben-DNA-Hybridisierung und Ligation während der PCR amplifiziert. Wenn die Höhe ($\geq 33\%$ des 92 nt Benchmark-Fragmente) der Q-Fragment-Signale abnimmt, spiegelt dies eine Zunahme der eingesetzten Proben-DNA wieder (Abbildung 3).

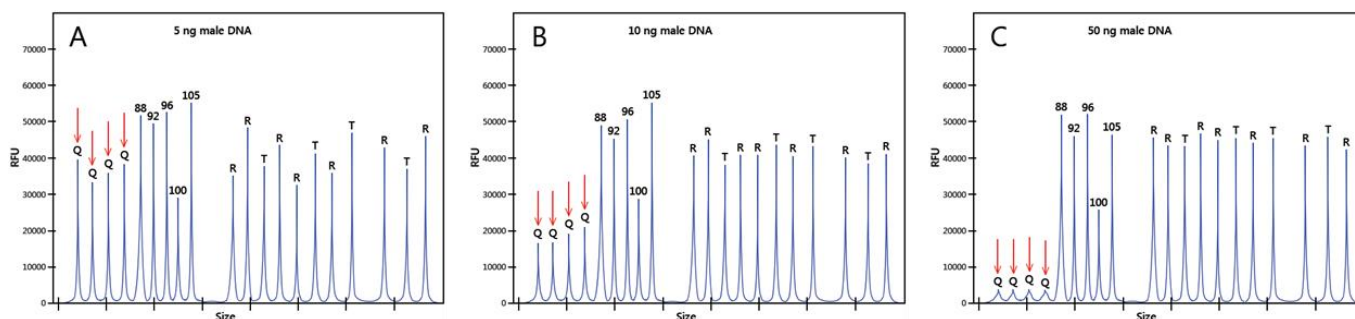


Abbildung 3. Auswirkung der DNA-Menge auf Q-Fragmente. Je größer die eingesetzte Proben-DNA-Menge ist, je niedriger ist das Q-Fragment-Signal. MLPA-Ergebnisse mit **A.** 5 ng, **B.** 10 ng, **C.** 50 ng DNA. Proben **A** und **B** enthalten nicht genug DNA.

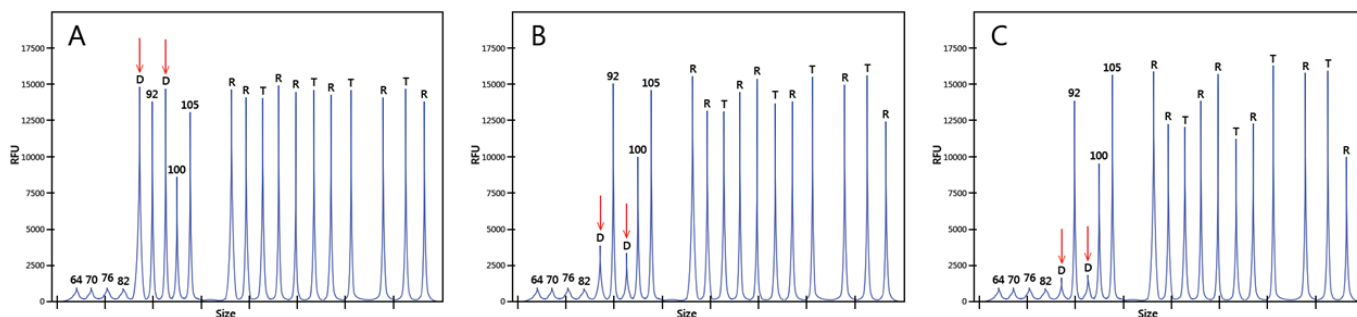
D-FRAGMENTE

Die beiden D-Fragmente (88 und 96 nt) ermitteln Sequenzen in außergewöhnlich starken CpG-Inseln. CpG-Inseln haben einen hohen GC-Gehalt und sind schwer zu denaturieren. Wenn das 88 und 96 nt D-Fragment-Signal ($\leq 50\%$

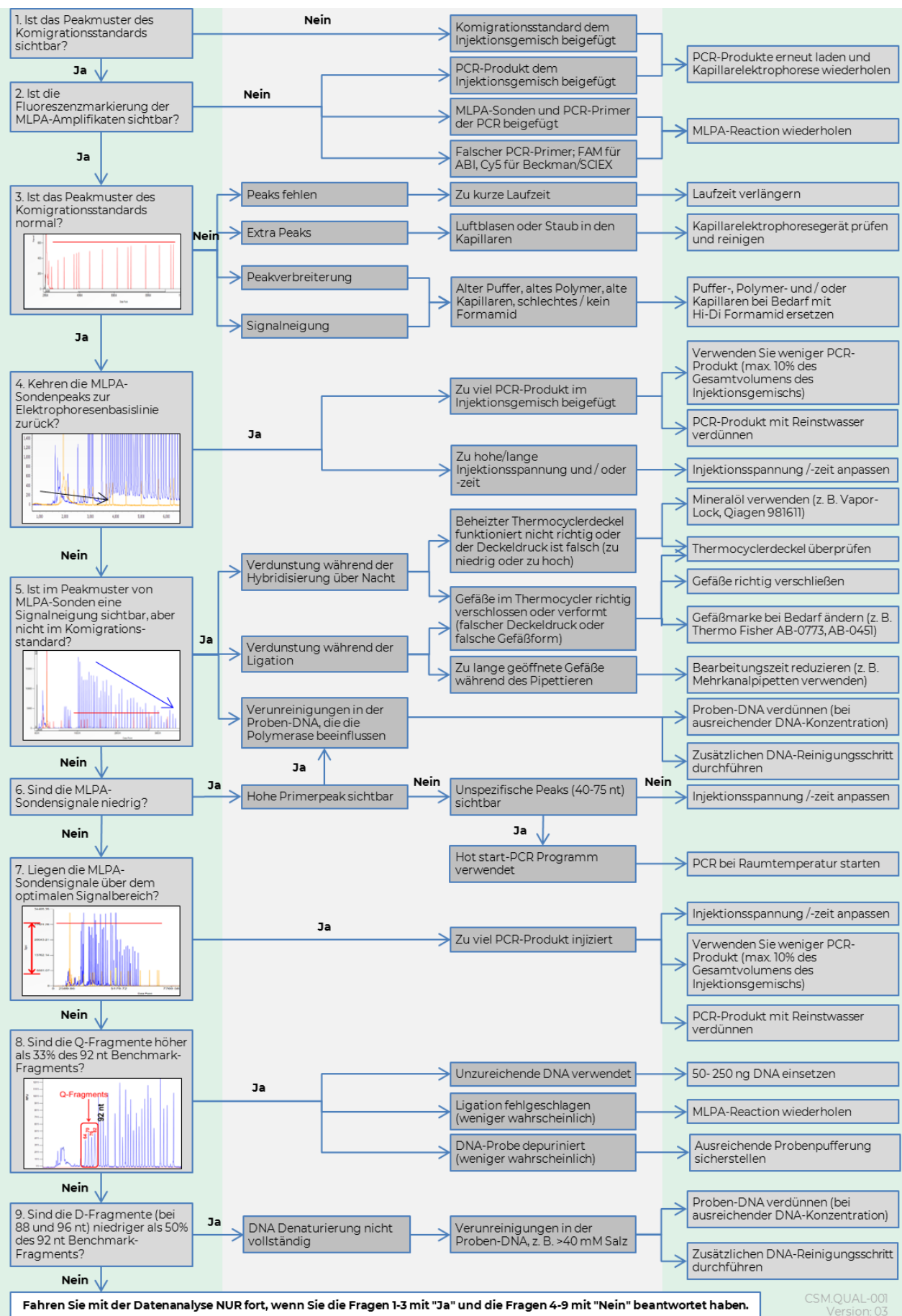
⁶ Es sind Fälle von Männern bekannt, bei denen diese Y-spezifische Sequenz fehlt, sowie von Frauen, die diese Y-Sequenz auf einem X-Chromosom tragen.

des 92 nt Benchmark-Fragment-Signals) niedrig ist, deutet dies darauf hin, dass die Proben-DNA nicht ausreichend denaturiert wurde (Abbildung 4). Eine unzureichende Denaturierung kann auf eine zu hohe Salzkonzentration (>40 mM) in einer DNA-Probe zurückzuführen sein. Eine unvollständige Denaturierung der Probe-DNA kann zu falschen Ergebnissen führen!

HINWEIS: Bei Verwendung eines ABI-POP7-Polymers liegt gewöhnlich ein unspezifisches Fragment von 80-90 nt vor, das mit den Kontrollfragmenten zusammenfallen kann!



8.4. FLUSSDIAGRAMM FÜR DIE QUALITÄTSKONTROLLE



9. DATENANALYSE

Für die Analyse der MLPA-Daten sollte die Software Coffalyser.Net in Kombination mit dem entsprechenden chargenspezifischen Coffalyser-Datenblatt verwendet werden. Von beiden sollte die neueste Version verwendet werden. Das Coffalyser.Net Referenzhandbuch enthält schrittweise Anweisungen zur MLPA-Datenanalyse. Sowohl Software als auch Handbuch sind auf www.mrcholland.com frei verfügbar.

Die durch Kapillarelektrophorese für jede MLPA-Sonde gemessene absolute Fluoreszenz wird von vielen Variablen beeinflusst. Die Fluoreszenz jeder MLPA-Sonde kann nicht direkt verwendet werden und muss zuerst innerhalb einer MLPA-Reaktion normalisiert werden. Diese Normalisierung verwendet Referenz-MLPA-Sonden, von denen erwartet wird, dass in allen DNA-Proben eine normale Kopienzahl vorhanden ist. Relative Sondensignale von jeder DNA-Probe werden mit denen, die durch Referenz-DNA-Proben erhalten werden, verglichen. Von Referenz-DNA-Proben wird erwartet, dass sie für alle Referenz- und Ziel-MLPA-Sonden eine normale Kopienzahl besitzen. Dieser Vergleich ermöglicht dann die Bestimmung der relativen Kopienzahl der Zielsequenzen in einer DNA-Probe.

Coffalyser.Net wählt für jeden MLPA-Probemix die beste Analysemethode aus und bietet eine umfassende Qualitätskontrolle⁷. Weitere Informationen zur Durchführung der Datenanalyse finden Sie im Coffalyser.Net-Referenzhandbuch. **Für IVD-registrierte MLPA-Anwendungen muss Coffalyser.Net verwendet werden! Die Verwendung anderer Software kann zu unschlüssigen oder falschen Ergebnissen führen!**

10. INTERPRETATION UND BESTÄTIGUNG

- Über MLPA festgestellte Unregelmäßigkeiten sollten, sofern möglich, durch einen MLPA-Bestätigungs-Probemix oder eine unabhängige Methode bestätigt werden. Änderungen der Kopienzahl, die von einer einzelnen MLPA-Sonde erkannt werden, müssen immer bestätigt werden. Die Sequenzierung von Probenzielsequenzen kann darauf hinweisen, dass ein niedriges Probensignal durch eine Mutation oder einen Polymorphismus verursacht wird. Das Auffinden von zwei heterozygoten Sequenzen zeigt typischerweise an, dass die Proben-DNA zwei verschiedene Allele enthält. Das Auffinden eines einzelnen seltenen Allels durch Sequenzierung bedeutet nicht, dass ein Allel nicht vorhanden ist. Denn es können möglicherweise zwei Kopien des seltenen Allels bestehen. Ein homozygoter Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. single-nucleotide polymorphism, SNP) kann zu einer partiellen Signalreduktion führen, die einer heterozygoten Deletion ähnelt.
- Nicht alle von MLPA entdeckten Deletionen und Duplikate sind krankheitsauslösend. Die bei gesunden Personen gemeldeten Keimbahn-Kopienzahlschwankungen finden Sie unter <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>. MRC Holland kann keine Angaben dazu machen, ob eine Deletion oder Duplikation eines bestimmten Exons zu einer Erkrankung führt.
- Bestimmte Abweichungen der Kopienzahl können auf somatische Veränderungen, einschließlich großer Deletionen und Duplikationen ganzer Chromosomen, zurückgeführt werden.
- Im Falle einer scheinbaren homozygoten Deletion sollte das Elektropherogramm visuell untersucht werden, um festzustellen, ob das Signal tatsächlich fehlt. Fehlende Sondensignale können auf Probleme bei der Klasseneinteilung oder auf zu niedrige Signale zurückzuführen sein.
- Von Referenz-MLPA-Sonden oder flankierenden MLPA-Sonden ermittelte Änderungen der Kopienzahl stehen wahrscheinlich nicht in Zusammenhang mit der getesteten Anwendung. Weitere Informationen zu Referenz-MLPA-Sonden sind auf Anfrage erhältlich.

11. VORSICHTSMAßNAHMEN UND WARNHINWEISE

- MLPA ist nur zur professionellen Anwendung. Die Test-Leistung ist von der Kenntnis des Nutzers und der Einhaltung der Verfahrensanweisungen abhängig. Der Assay sollte von Fachleuten durchgeführt werden, die in molekularen Techniken geschult sind. Die für die Interpretation der Ergebnisse verantwortliche Person sollte über die neuesten wissenschaftlichen Erkenntnisse der jeweiligen Anwendung und über jegliche Einschränkungen des MLPA-Verfahrens informiert sein, die zu falschen Ergebnissen führen können.
- Die interne Validierung jeder MLPA-Anwendung ist unerlässlich. Dies gilt insbesondere, wenn MLPA zum ersten Mal verwendet wird oder wenn das Probenhandhabungsverfahren, das DNA-Extraktionsverfahren oder die verwendeten Instrumente geändert werden. In diesen Fällen sollten Sie mindestens 16 normale DNA-Proben hinzufügen/testen. Die Validierung sollte für jede Probe eine Standardabweichung von $\leq 0,10$ aufweisen (wenn nicht in der jeweiligen Probemix-spezifischen Produktbeschreibung anderes angegeben). Die für die Validierung verwendeten Proben sollten repräsentativ für die in der täglichen Praxis verwendeten Proben sein.

⁷ Coffalyser.Net beginnt mit einer Rohdatenanalyse (Basislinienkorrektur, Peakidentifizierung) und bietet eine umfassende Qualitätskontrolle (z. B. verwendete DNA-Menge, vollständige DNA-Denaturierung, Steilheitskorrektur).

12. EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

- Für die meisten MLPA-Anwendungen gilt, dass kleine (Punkt-)Mutationen die Hauptursache für genetische Defekte sind und diese von MLPA-Probemixen nicht erkannt werden.
- MLPA kann keine Deletionen oder Duplikationen erkennen, die außerhalb der Zielsequenz der MLPA-Sonden liegen. Zusätzlich werden keine Kopienzahl neutralen Inversionen oder Translokationen erkannt.
- Sequenzänderungen (z. B. SNPs, Punktmutationen, kleine Indels) in oder nahe der Zielsequenz, die durch eine MLPA-Sonde erfasst werden, können falsch positive Ergebnisse verursachen⁸.
- Die Kontamination von DNA-Proben mit cDNA oder PCR-Amplifikaten einzelner Exons kann zu einem erhöhten Probensignal führen⁹. Die Analyse einer zweiten unabhängig voneinander gesammelten und isolierten DNA-Probe kann diese Kontaminationsartefakte ausschließen.
- Im Falle einer unzureichenden Denaturierung der Proben-DNA können scheinbare Deletionen und selbst das Erkennen benachbarter genomischer Ziele durch mehrere MLPA-Sonden ein falsch positives Ergebnis darstellen! Extrem GC-reiche Chromosomenregionen werden bei 98 °C nicht denaturiert, wenn höhere Salzkonzentrationen von 40 mM NaCl oder KCl vorhanden sind. MLPA-Tests liefern die durchschnittliche Kopienzahl der Zielsequenzen in den Zellen, aus denen die DNA-Probe extrahiert wurde. Wenn mehrere, an benachbarte Sequenzen bindende MLPA-Sonden ungewöhnliche Werte aufweisen, die übliche Schwellenwerte für eine Deletion/Duplikation jedoch nicht erreichen, ist Mosaizismus eine mögliche Ursache.
- Geringe Unterschiede in der experimentellen Ausführung können das MLPA-Peakmuster beeinflussen. Nehmen Sie nur DNA-Proben in eine Analyse auf, die im gleichen MLPA-Experiment enthalten waren und mit derselben Probemix-Charge getestet wurden.
- Subtile Veränderungen, wie sie bei Mosaikfällen beobachtet werden, können nur dann erkannt werden, wenn die MLPA-Sonden entsprechend der Chromosomenposition angeordnet sind.
- In bestimmten Fällen kann eine Analyse von Proben der Eltern für eine korrekte Interpretation der Ergebnisse erforderlich sein.
- Bei der Ausführung von MLPA-Anwendungen muss das Protokoll der Kapillarelektrophorese möglicherweise optimiert werden. Es können falsche Ergebnisse erhalten werden, wenn ein oder mehrere Peaks außerhalb des Detektierungsbereichs liegen. Zum Beispiel kann eine Verdoppelung eines oder mehrerer Exons verdeckt werden, wenn Peaks außerhalb der Skala liegen, was zu einem falsch negativen Ergebnis führt. Das Risiko für außerhalb der Skala liegende Peaks ist höher, wenn Probemixe verwendet werden, die eine relativ geringe Anzahl von MLPA-Sonden enthalten. Die Coffalyser.Net-Software warnt vor Spitzenabweichungen, während andere Software dies nicht tut. Wenn ein oder mehrere Peaks außerhalb der Skala liegen, führen Sie die Kapillarelektrophorese mit den PCR-Produkten erneut aus. Verwenden Sie dabei Einstellungen für niedrigere Injektionsspannung/Injektionszeit oder eine reduzierte Probenmenge durch Verdünnen der PCR-Produkte.

MLPA Allgemeines Protokoll – Dokumentenhistorie

Version-007-DE1 (1 März 2019)

- Vorige Versionen sind in englischer Sprache verfasst.
- Das Protokoll wurde umstrukturiert und einige Abschnitte wurden umgeschrieben. Es gibt keine Änderungen an der Methode, mit der MLPA ausgeführt wird.
- DTT hat Beta-Mercaptoethanol im SALSA-MLPA Puffer und in der SALSA-Ligase-65 ersetzt.
- Neue Einschränkung des Verfahrens hinsichtlich der außerhalb der Skala liegenden Peaks hinzugefügt.

Version-006 (23. März 2018)

- Neue Abbildung 2 hinzugefügt.
- Die anfänglichen Einstellungen und ABI-310 wurden aus der Elektrophorese-Spezifikationstabelle entfernt.
- ABI-SeqStudio wurde zur Elektrophorese-Spezifikationstabelle hinzugefügt.
- Tabelle mit Signalbereichen für Kapillarelektrophoresegeräte hinzugefügt.
- Flussdiagramm zur Qualitätskontrolle hinzugefügt.
- Kritische Punkte für das Erzielen guter Ergebnisse hinzugefügt.
- Informationen im Protokoll reorganisiert und umgeschrieben.

⁸ Beim Design von Proben werden bekannte SNPs nach Möglichkeit vermieden. Es werden jedoch ständig neue SNPs entdeckt. Bitte benachrichtigen Sie uns, wenn ein Polymorphismus oder eine häufige pathogene Mutation ein Probensignal beeinflusst.

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.