

SALSA® MLPA® probemix P378-D1 MUTYH

Účel použití

Salsa MLPA kit P378 MUTYH je test pro *in vitro* diagnostiku (IVD)¹ nebo pouze pro výzkumné účely (RUO) a slouží pro detekci delecí nebo duplikací lidských genů MUTYH a GREM1 a ve specifických oblastech genu SCG5. Dále obsahuje dvě sondy, které mohou detekovat přítomnost bodové mutace p.Y179C a p.G396D v genu MUTYH. Výrobek je určen k potvrzení potenciální příčiny a klinické diagnózy MUTYH-asociované polypózy (MAP) a dědičného syndromu smíšené polypózy (HMPS1). Tento produkt může být použit pro genetické testování členů/jednotlivců v rizikové rodině.

Tento test je určen pro použití s lidskou DNA izolovanou z periferní krve. Delece nebo duplikace detekované kitem P378 MUTYH musí být ověřeny jinou metodou. Zejména delece nebo duplikace detekované pouze jedinou sondou, vždy vyžadují ověření jiným způsobem. Většina defektů v MUTYH genu jsou bodové mutace a většina z nich nebude detekována metodou MLPA. Doporučuje se proto používat tento kit v kombinaci se sekvenční analýzou MUTYH genu. Tento test není určen k použití jako samostatný test pro klinické rozhodování. Výsledky tohoto testu musí být interpretovány molekulárním genetikem nebo ekvivalentním odborníkem.

Tento kit může být použit na nádorovém materiálu k detekci delecí a duplikací ve výzkumu.

¹*Berte prosím na vědomí, že tento kit je pro in vitro diagnostické použití (IVD) v zemích uvedených v Osvědčení o analýze, které je k dispozici na www.mlpa.com. Ve všech ostatních zemích je výrobek určen pouze pro výzkumné účely (RUO).*

Klinické pozadí

Gen MUTYH (mutY homolog, E. coli) kóduje DNA glykosylázu, která se účastní oprav oxidačního poškození DNA. Mutace v tomto genu mají za následek dědičnou predispozici k rakovině tlustého střeva, konkrétně **MUTYH asociované polypóze (MAP)**. MAP je autosomální recesivní znak. Jedna defektní kopie genu MUTYH může vést k žádnému nebo jen malému zvýšení rizika pro kolorektální nádor. V případě bialelického MUTYH defektu, riziko pro kolorektální nádor je 43 % až téměř 100 % bez včasného sledování podle [NCBI GeneReview pro MAP](#).

Dvě nejčastější mutace MUTYH spojené s dědičným kolorektálním nádorem jsou p.Y179C(c.536A> G) v exonu 7 a p.G396D (c.1187G> A) v exonu 13. Tyto dvě mutace pokryjí přibližně 80% změn

zárodečné linie u pacientů evropského původu. Ve východoasijských populacích tyto hotspot mutace nejsou prevalentní. Pacienti s homozygotní p.G396D nebo heterozygotní p.G396D / p.Y179C mutací vykazují mírnější fenotyp a pozdější věk nástupu choroby ve srovnání s homozygotními nosiči mutace pY179C (NCBI GeneReview for MAP). Třetí běžná mutace je p.E410Gfs * 43(c.1227_1228dupGG) mutace (Guarinos et al., 2014, Morak et al., 2014). Bialelický MUTYH-spojený kolorektální nádor se v jedné třetině případů vyskytuje bez polypů. Další informace naleznete v Clinical Utility Gene Card pro MUTYH (<http://www.nature.com/ejhg/journal/v21/n1/full/ejhg2012163a.html>).

Duplikace 40 kb upstream od genu GREM1 a 3 'konce SCG5 je spojena se zvýšeným rizikem vzniku kolorektálního nádoru. Tento syndrom je známý jako **dědičný syndrom smíšené polypózy** (HMPS1). Tato duplikace vede ke zvýšení exprese specifické alely GREM1 v epitelu tenkého střeva. Zvýšená exprese GREM1 zřejmě snižuje aktivitu dráhy kostního morfogenetického proteinu (BMP), mechanismus, který je také podkladem tumorigeneze u juvenilní polypózy tenkého střeva (Jaeger et al. 2012). Další duplikace ~ 16 kb v této oblasti byla popsána nedávno u členů rodiny s atypickým FAP (Rohlin et al., 2016). Sedm sond je zahrnuto do kitu P378 k detekci 40 kb duplikace (další informace viz Tabulka 1 a Tabulka 2b). Změny v počtu kopií zjištěné pouze jednou sondou specifickou pro gen SCG5 pravděpodobně nebudou mít vztah k testovanému stavu. Další informace o HMPS1 naleznete na adrese <http://omim.org/entry/601228>.

Struktura genu

MUTYH gen je umístěný na chromozomu 1p34, pokrývá ~ 11 kb genomové DNA a obsahuje 16 exonů. Sekvence LRG je sekvence LRG_220 a je totožná se sekvencí NCBI NG_008189.1. Gen SCG5 je umístěný na chromozomu 15q13, pokrývá ~ 55 kb genomové DNA a obsahuje 6 exonů. NCBI NG sekvence pro gen SCG5 je NG_051230.1. K dispozici není žádná LRG sekvence. GREM1 gen, který se také nachází na chromozomu 15q13, pokrývá ~ 17 kb genomové DNA a obsahuje 2 exony. NCBI NS sekvence pro GREM1 gen je NG_033791.1. K dispozici není žádná LRG sekvence.

Transkripční varianty

Sekvence NM_001128425.1, viz https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001128425.1, představuje transkripční variantu alpha5 genu MUTYH. Tato sekvence je referenčním standardem v NCBI RefSeqGene projektu. Translační počátek ATG se nachází v exonu 1 (217-219) a stop kodon je umístěný v exonu 16 (1864-1866).

[Transkript NM_001048172.1](#) představuje variantu gamma2 genu MUTYH s alternativním počátečním kodonem ve srovnání s variantou transkriptu alpha5, nacházející se v intronu 1 transkriptu varianty alpha5. Translační počátek ATG je umístěn na 147-149 v NM_001048172.1.

[Transkript NM_001048174.1](#) představuje variantu beta3 genu MUTYH a má také alternativní startovací kodon v intronu 1 varianty transkriptu alpha5. Translační počátek ATG je umístěn v rozmezí 66-68 v NM_001048174.1.

[Sekvence NM_001144757.2](#) představuje transkripční variantu 1 genu SCG5. Tato sekvence je referenčním standardem v NCBI RefSeqGene projektu. Translační počátek ATG je lokalizován v exonu 2 (174-176) a stop kodon je umístěn v exonu 6 (810-812).

[Sekvence NM_013372.6](#) představuje transkripční variantu 1 genu GREM1. Tato sekvence je referenčním standardem v NCBI RefSeqGene projektu. Translační počátek ATG je lokalizován v exonu 2 (160-162) a stop kodon je umístěn v exonu 2 (712-714).

Číslování exonů

Číslování exonů použité v tomto popisu kitu P378-D1 a v analýze listu P378-D1 Coffalyser.Net je číslování exonů podle výše uvedených sekvencí LRG a NCBI NG sekvencí. Číslování exonů a použité sekvence NM jsou od 01/2018, ale může být změněna (např. NCBI) po vydání popisu produktu.

Číslování exonů MUTYH se změnilo. Od června 2014 jsme přijali NCBI číslování exonů, které je přítomno v sekvenci NG_008189.1 pro tento gen, které je podobné LRG číslování exonů (LRG_220). Toto číslování exonů se může lišit od literatury! Číslování exonů použité v předchozí verzi tohoto popisu produktu naleznete v závorkách v Tabulce 2a. Číslování exonů je od 01/2018, ale může být změněno (např. NCBI) po vydání tohoto popisu produktu.

Obsah P378-D1 kitu

Kit P378-D1 MUTYH obsahuje 47 MLPA sond s amplifikačními produkty mezi 116 a 471 nt. Obsahuje sondy pro geny MUTYH, SCG5 a GREM1. Pro gen MUTYH, kit obsahuje 18 sond pro počet kopií a dvě sondy specifické pro mutace, pro SCG5 a GREM1 je zahrnuto šest sond pro počet kopií. Navíc kit obsahuje 15 referenčních sond. Identita genů detekovaných referenčními sondami je [dostupná online](#) a v Tabulce 2c.

Tento kit obsahuje devět kontrolních fragmentů, které generují amplifikační produkty mezi 64 a 105 nt: čtyři DNA kvantitativní fragmenty (Q-fragmenty), dva DNA denaturační fragmenty (D-fragmenty),

jeden benchmark fragment, a jeden chromozóm X a jeden chromozóm Y-specifický fragment (tabulka níže). Více informací o tom, jak interpretovat výsledky z těchto kontrolních fragmentů, můžete nalézt v MLPA obecném protokolu.

Length (nt)	Name
64-70-76-82	Q-fragments (Only visible with <100 ng sample DNA)
88-96	D-fragments (Low signal of 88 or 96 fragment indicates incomplete denaturation)
92	Benchmark fragment
100	X-fragment (X chromosome specific)
105	Y-fragment (Y chromosome specific)

MLPA metoda

Principy MLPA metody (Schouten et al 2002) jsou popsány v MLPA obecném [protokolu](#).

Validace MLPA metody

Interní validace MLPA metody na 16 vzorcích DNA ze zdravých jedinců je nezbytná, a to zejména při prvním použití MLPA, nebo při změně zpracování vzorků, metodě extrakce DNA nebo používaného přístroje. Tato validace by měla vykazovat standardní odchylku <0,10 pro všechny sondy v experimentu.

Požadavky na vzorky

Izolovaná DNA z periferní krve bez nečistot, které ovlivňují MLPA reakci. Více informací naleznete v části o zpracování DNA vzorku v MLPA obecném protokolu.

Referenční vzorky

Referenční vzorky DNA by měly být odvozeny ze stejného typu tkáně, zpracovány za použití stejného postupu a připraveny za použití stejného způsobu, jako jsou DNA vzorky z pacienta. Referenční vzorky by měly být odvozeny od zdravých jedinců. Další informace týkající se výběru a použití referenčních vzorků lze nalézt v MLPA obecném protokolu.

Pozitivní kontrolní DNA vzorky

MRC-Holland nemůže poskytnout pozitivní vzorky DNA. Zahrnutí pozitivního vzorku v každém experimentu je doporučeno. Institut Coriell (<https://catalog.coriell.org>) a DSMZ (<https://www.dsmz.de/home.html>) mají různorodou sbírku biologických zdrojů, které mohou být použity jako pozitivní kontrolní DNA vzorek ve vašich MLPA experimentech. Vzorky s identifikačním číslem HG00097, HG01095, HG01500, HG01685, NA19789 a NA20522 od Institutu Coriell byly

testovány v MRC-Holland a mohou být použity jako pozitivní kontrolní vzorek (y) k detekci heterozygotní mutace MUTYH p.G396D. Kvalita buněčných linií se může měnit, proto by měly být vzorky validovány před použitím. Pro určení mutační zátěže mutací p.Y179C a p.G396D by měl být použit pozitivní vzorek stejné kvality.

SALSA SD022 Binning DNA

SD022 Binning DNA dodávaná s tímto kitem může být použita jako Binning DNA vzorek pro binování dvou mutace-specifických sond (sonda MUTYH 18416-SP0654-L23441 pro mutaci pY179C a sonda MUTYH 18417-SP0655-L23442 pro mutaci p.G396D). SD022 Binning DNA je směs genomové DNA od zdravých jedinců a syntetické DNA, která obsahuje cílové sekvence detekované výše uvedenými sondami. Zahrnutí jedné reakce s 5 ul SDO22 Binning DNA v počátečních experimentech MLPA je zásadní, protože může být použito pro sdružování dat profilu píků pomocí Software Coffalyser.Net. Navíc Binning DNA by měla být zařazena do experimentu vždy, když byly aplikovány změny v nastavení přístroje kapilární elektroforézy (například když byly kapiláry obnoveny). Binning DNA by nikdy neměla být použita jako referenční vzorek v analýze dat MLPA, ani pro kvantifikaci mutačního signálu (signálů), protože pro tento účel slouží skutečné pozitivní vzorky od pacientů s mutací nebo z buněčné linie. Důrazně doporučujeme použít vzorek DNA a referenční vzorky DNA extrahované stejnou metodou a odvozené ze stejného zdroje tkáně. Pro další informace prosím nahlédněte do popisu produktu SD022 Binning DNA. **Tento výrobek je určen pouze pro výzkumné účely (RUO), s výjimkou případů, kdy je používán v kombinaci s kitem pro diagnostické účely in vitro (IVD), jak je uvedeno na konci tohoto popisu produktu.**

Charakteristika výkonu testu

Clinical Utility Gene Card pro MUTYH uvádí, že delece nebo duplikace pro MUTYH jsou vzácné události, ale dvě běžné MUTYH mutace se však vyskytují u 80 % všech hlášených mutantních alel u jedinců severozápadní Evropy. Penetrance u bíalelických nosičů mutací je až 100 %. Analytická citlivost a specificita pro MAP je téměř 100 %, pokud je použito sekvenování všech 16 exonů v kombinaci s MLPA.

Na rozdíl od MAP je HMPS1 děděn dominantním způsobem. Bylo prokázáno, že HMPS1 je způsoben duplikacemi 3 'konce genu SCG5 a upstream oblasti GREM1 lokusu (Jaeger et al.2012, Rohlin a kol. 2015). Tento kit obsahuje sedm sond zaměřených na tuto oblast, viz Tabulka 1 a Tabulka 2b pro více informací.

Analytická výkonnost může být ohrožena: SNP nebo dalšími polymorfismy (např. indels) v cílové sekvenci DNA, nečistotami ve vzorku DNA, neúplnou DNA denaturací, použitím nedostatečného nebo příliš velkého množství vzorku DNA, použitím nedostatečných nebo nevhodných referenčních vzorků, problémy s kapilární elektroforézou nebo špatným postupem normalizace dat a dalšími technickými chybami. MLPA obecný protokol obsahuje technické pokyny a informace o hodnocení/normalizaci dat.

Analýza dat

Coffalyser.Net software musí být použit pro analýzu dat v kombinaci s listem pro specifickou šarži - MLPA Coffalyser list. Nejnovější verze by měla být použita a je volně ke stažení na www.mlpa.com. Použití jiného ne-proprietárního softwaru může vést k neprůkazným nebo falešným výsledkům. Pro více informací o MLPA kontrole kvality a analýze dat, viz Coffalyser.Net Manual.

Interpretace výsledků

Očekávané výsledky pro detekci MUTYH, SCG5 a GREM1 sond jsou počty kopií alel 2 (normální), 1 (heterozygotní delece) nebo 3 (heterozygotní duplikace). Počet kopií 4 (heterozygotní triplicace/homozygotní duplikace) nebo 0 (homozygotní delece) se mohou vyskytovat, ale jsou velmi vzácné.

Standardní odchylka všech sond v referenčních vzorcích by měla být $<0,10$ a kvocient dávky (DQ) referenčních sond ve vzorcích pacientů by měl být mezi 0,80 a 1,20. Pokud jsou tato kritéria splněna, následující mezní hodnoty pro DQ sond mohou být použity k interpretaci výsledků MLPA pro autozomální a pseudo-autozomální chromozomy:

Copy Number status	Dosage quotient
Normal	$0.80 < DQ < 1.20$
Homozygous deletion	$DQ = 0$
Heterozygous deletion	$0.40 < DQ < 0.65$
Heterozygous duplication	$1.30 < DQ < 1.65$
Heterozygous triplication/ Homozygous duplication	$1.75 < DQ < 2.15$
Ambiguous copy number	All other values

- Uspořádání sond podle chromozomální polohy usnadňuje interpretaci výsledků a může odhalit menší změny, jako jsou změny pozorované v případech mozaiky. Analýza rodičovských vzorků může být nezbytná pro správnou interpretaci komplexních výsledků.

Falešně pozitivní výsledky

Veďte prosím na vědomí, že abnormality zjištěné jedinou sondou (nebo více po sobě jdoucích sond) mají stále značnou šanci být falešně pozitivní výsledek. Neúplná DNA denaturace (například z důvodu kontaminace solí) může vést ke snížení signálu sondy, zejména u sond umístěných v CpG ostrově nebo v blízkosti genů MUTYH, SCG5 a GREM1. Použití dalšího kroku čištění nebo alternativní metody extrakce DNA může takové případy vyřešit. Navíc, kontaminace DNA vzorků cDNA nebo PCR amplikony z jednotlivých exonů mohou vést k falešně pozitivním duplikacím (Varga et al., 2012). Analýza nezávisle odebraného vzorku sekundární DNA může vyloučit tento typ artefaktů.

- Normální počty kopií variant u zdravých jedinců jsou popsány [v databázi genomových variant](#). Uživatelé by měli vždy konzultovat nejnovější aktualizaci databáze a vědecké poznatky při interpretaci jejich výsledků.

- Ne všechny odchylky zjištěné MLPA jsou patogenní. V některých genech, intragenové delece jsou známy a vedou k velmi mírné nebo žádné chorobě (Schwartz et al., 2007). Pro mnoho genů, existuje více než jedna transkripční varianta. Změny v počtu kopií exonů, které nejsou přítomny ve všech transkripčních variantách, nemusí mít klinický význam. Duplikace, které zahrnují první nebo poslední exon genu (například exony 1-3), mohou v některých případech mít za následek inaktivaci této kopie genu.

- Změny v počtu kopií detekované referenčními sondami nebudou mít pravděpodobně žádný vztah k testovanému onemocnění.

- Stanovení mutačního zátěže: jako referenci pro mutace p.Y179C a p.G396D použijte pozitivní vzorky stejné kvality jako má vzorek.

Limitace metody

- Ve většině populací jsou hlavní příčinou genetických defektů v MUTYH genu malé (bodové) mutace, z nichž většina nebude detekována pomocí MLPA kitu P378 MUTYH.

- MLPA nemůže zjistit žádné změny, které leží mimo cílovou sekvenci sond a nezjistí počet kopií neutrální inverze nebo translokace. I když MLPA nedetekuje žádné aberace, zůstává možnost, že existují biologické změny v tomto genu nebo chromozomální oblasti, ale zůstávají nedetekované.
- Změny sekvence (např. SNP, bodové mutace, malé indels) v cílové sekvenci sondy mohou způsobit falešně pozitivní výsledky. Mutace / SNP (i když > 20 nt od ligačního místa sondy) může snižovat signál sondy tím, že brání ligaci oligonukleotidové sondy nebo destabilizuje vazbu sondy na DNA.
- Při použití na vzorcích nádorů (pouze pro výzkum): Analýza MLPA na vzorcích nádorů poskytuje informace o průměrné situaci v buňkách, ze kterých byl purifikován vzorek DNA. **Zisky nebo ztráty genomických oblastí nebo genů nemusí být zjištěny výše uvedeným DQ, pokud je procento nádorových buněk nízké a pokud je zde možnost subklonality.** Navíc existuje vždy možnost, že jedna nebo více referenčních sond ukazuje počet změn kopií ve vzorku pacienta. Diagnostické použití P378 s DNA extrahovanou z nádorové tkáně nebylo validováno.

Potvrzení výsledků

Změny v počtu kopií detekované pouze jedinou sondou vždy vyžadují ověření jinou metodou. Zřejmě delece detekovaná jedinou sondou může být způsobena např. mutací / polymorfismem, který zabraňuje ligaci nebo destabilizuje vazbu sondy na DNA. Sekvenační analýza může stanovit, zda mutace nebo polymorfismy jsou přítomny v cílové sekvenci sondy. Nalezení heterozygotní mutace nebo polymorfismu poukazuje na to, že dvě odlišné alely jsou přítomné ve vzorku DNA a falešně pozitivní výsledek MPLA lze získat.

Změny v počtu kopií detekované jednou nebo více než jednou po sobě jdoucích sond by měly být potvrzeny jinou nezávislou metodou, jako je long-range PCR, qPCR, array CGH nebo Southern blotting, kdykoli je to možné. Delece / duplikace delší než 50 kb mohou být často potvrzeny FISH.

Databáze mutací MUTYH: Důrazně doporučujeme uživatelům ukládat pozitivní výsledky do [MUTYH LOVD](#). Doporučení pro nomenklaturu popisující delece / duplikace jednoho nebo více exonů lze nalézt na adrese <http://varnomen.hgvs.org/>.

Prosím, oznamte změny v počtu kopií detekované referenčními sondami, falešně pozitivní výsledky kvůli SNP a neobvyklé výsledky (například duplikace MUTYH exonů 6 a 8, ale ne exonu 7) do [MRC-Holland](#).

Table 1. SALSA MLPA Probemix P378-D1 MUTYH

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position (hg18) ^(a)			
		Reference	MUTYH	GREM1	SCG5
64-105	Control fragments – see table in probemix content section for more information				
116 *	Reference probe 50472-L30486	6p12			
123 *	Reference probe 21531-L30487	6p22			
130 *	Reference probe 16316-L18705	3q21			
136 « Δ ∞	GREM1 probe 18483-L23305			Exon 1	
148 †	MUTYH probe 15777-L29704		Exon 3		
152 †	Reference probe 14199-L25033	2q13			
157 † ‡	SCG5 probe 18309-L30392				Exon 6
161 « Δ ∞	GREM1 probe 18350-L23692			Exon 1	
166	MUTYH probe 15780-L17837		Exon 6		
172	MUTYH probe 15781-L17838		Exon 4		
184 §	MUTYH probe 18416-SP0654-L23441		Y179C=c.536A>G		
190	MUTYH probe 15783-L18347		Exon 14		
196 *	MUTYH probe 21351-L29755		Exon 11		
202 ‡	SCG5 probe 18310-L14109				Exon 3
208 *	Reference probe 21495-L16542	10q26			
214	MUTYH probe 20514-L28229		Exon 10		
220 ‡	SCG5 probe 18352-L23306				Exon 4
226 * ‡	SCG5 probe 21353-L29757				Downstream
232	MUTYH probe 15788-L17845		Exon 5		
238 ∅	MUTYH probe 15789-L17846		Intron 1 (Alt. first exon in NM_001048172.1)		
244	MUTYH probe 15787-L18348		Exon 15		
250	SCG5 probe 18353-L23307				Exon 2
258 ∞	MUTYH probe 18417-SP0655-L23442		G396D=c.1187G>A		
267 *	Reference probe 21354-L29758	2p13			
274 †	MUTYH probe 15791-L30765		Exon 1		
283	MUTYH probe 15792-L17849		Exon 2		
292 *	MUTYH probe 21355-L29759		Exon 12		
301	Reference probe 02266-L01752	3p25			
310 « ‡	GREM1 probe 18354-L23308				Upstream
318 *	MUTYH probe 21356-L29760		Exon 8		
328	MUTYH probe 18355-L23309		Exon 13		
337 *	Reference probe 07367-L07014	2q24			
345 « ‡	GREM1 probe 18356-L23310				Upstream
351 *	Reference probe 16520-L23853	11p12			
363	GREM1 probe 18358-L23312			Exon 2	
372 *	Reference probe 05953-L28763	2p22			
382	GREM1 probe 18360-L23314			Exon 2	
391 * ‡	SCG5 probe 21357-L29761				Exon 5
400	MUTYH probe 18420-L23445		Exon 9		
409 *	Reference probe 17462-L21218	12p13			
418 *	MUTYH probe 21358-L30391		Exon 16		
427 ∅	MUTYH probe 18422-L23447		Intron 1 (Alt. first exon in NM_001048174.1)		
432 *	MUTYH probe 21359-L29763		Exon 8		
445 *	Reference probe 16571-L19062	11q13			
452 *	Reference probe 19636-L26295	10p11			
463 *	Reference probe 14955-L16688	6q22			
471 *	Reference probe 21532-L27372	11p15			

(a) Číslování exonů použité v tomto popisu kitu P378 MUTYH a v analýze listu P378 MUTYH a v Coffalyser.Net je identické s číslováním ve výše uvedených LRG sekvencí a NCBI NG sekvencí.

* Nové ve verzi D1 (od šarže D1-1217 dále).

¥ Změněno ve verzi D1 (od šarže D1-1217 dále). Malá změna v délce, žádná změna v detekované sekvenci.

§ Sonda specifická pro mutaci. Tato sonda generuje pouze signál, pokud je přítomna mutace p.Y179C. Tato sonda se skládá ze tří částí a má dvě ligační místa. Nízký signál této sondy může být způsoben depurinací vzorku DNA, např. v důsledku nedostatečné puřovací kapacity nebo prodloužené doby denaturace.

∞ Sonda specifická pro mutaci. Tato sonda generuje signál pouze tehdy, je-li přítomna mutace p.G396D. Všimněte si toho, že sonda nemusí generovat signál, pokud je mutace p.G396D přítomna na stejné alele jako patogenní p.E410Gfs * 43 mutace. Signál této sondy může být rovněž snížen v přítomnosti depurinace vzorku DNA, např. kvůli nedostatečné puřovací kapacitě nebo prodloužené době denaturace.

"Sonda se nachází v regionu bohatém na GC nebo v jeho blízkosti. Nízký signál může být způsoben kontaminací solí ve vzorku DNA, což vede k neúplné denaturaci DNA, zvláště u oblastí bohatých na GC.

Δ Více variabilní. Tato sonda může být citlivá na určité experimentální změny. Aberantní výsledky by měly být hodnoceny pozorně.

∅ Intronová sonda. Tato sonda je zaměřena na alternativní variantu transkriptu s použitím alternativního startovacího kodonu. Význam delecí nebo duplikací pro tyto sondy není jasný.

⦿ Význam pouze delece exonu 1 není jasný, protože tento exon je nekódující.

∫ Sondy v rámci 40kb duplikace 3'-konce SCG5 a upstream oblasti GREM1, která může způsobit HMPS1 (Jaeger a kol., 2012).

Poznámka: Číslování exonů MUTYH se změnilo. Od června 2014 jsme přijali NCBI číslování exonů, které je přítomno v sekvenci NG_008189.1 pro tento gen, které je podobné LRG číslování exonů (LRG_220). Toto číslování exonů se může lišit od literatury! Číslování exonů použité v předchozí verzi tohoto popisu produktu naleznete v závorkách v Tabulce 2a. Číslování exonů je od 01/2018, ale může být změněno (např. NCBI) po vydání tohoto popisu produktu.

Table 2. P378 probes arranged according to chromosomal locationTable 2a. *MUTYH*

Length (nt)	SALSA MLPA probe	MUTYH exon ^(a) / mutation	Ligation site ^(b) NM_001128425.1	Partial sequence ^(c) (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
		<i>start codon</i>	<i>217-219 (ex 1)</i>		
274	15791-L30765	Exon 1	50-51	CTCGTGGCTAGT-TCAGGCGGAAGG	0.4 kb
238 ∅	15789-L17846j	Intron 1 (ex 2)	NM_001048172.1 alt. ex1; 48-49	GCTAATTGCCTA-TTGGCCTGTGCT	0.1 kb
427 ∅	18422-L23447	Intron 1 (ex 3)	NM_001048174.1 alt. ex 1; 30-31	GGGCCTCCGTGT-TCTGCTGTCTTC	5.5 kb
283	15792-L17849	Exon 2 (4)	352-353	ACAACAGTCAGG-CCAAGCCTTCTG	0.9 kb
148	15777-L29704	Exon 3 (5d)	487-488	TCAGAGACGTAG-CTGAAGTCACAG	0.2 kb
172	15781-L17838	Exon 4 (6)	9 nt after exon 4	CTGGTCAGTACA-TCTCCTGAGAGC	0.1 kb
232	15788-L17845	Exon 5 (7)	635-636	GCTGCAGCAGAC-CCAGGTTGCCAC	0.2 kb
166	15780-L17837	Exon 6 (8)	3 nt before exon 6	TGCCTGTGGCTA-TAGAAGTGGCCT	0.2 kb
184 §	18416-SP0654-L23441	p.Y179C =c.536A>G	752-751 and 724-723 reverse	CACGAGAATAGC-28 nt spanning oligo-CTCCTGTGGGTA	0.1 kb
318	21356-L29760	Exon 8 (10)	37nt before exon 8 reverse	TATAAGACACCC-AAGACTCCTGGG	0.1 kb
432	21359-L29763	Exon 8 (10)	836-837	TACAGCAGAGAC-CCTGCAGCAGCT	0.2 kb
400	18420-L23445	Exon 9 (11)	971-972	CATTGGTGCTGA-TCCCAGCAGCAC	0.2 kb
214	20514-L28229	Exon 10 (12)	1069-1070	CAGCCATGGAGC-TAGGGGCCACAG	0.2 kb
196	21351-L29755	Exon 11 (13)	1158-1157 reverse	AAGAGCTGTTCC-TGCTCCACCTGA	0.3 kb
292	21355-L29759	Exon 12 (14)	1283-1282 reverse	TGGGGAAGTTGA-CCACTCCAGGG	0.3 kb
258 ∞	18417-SP0655-L23442	p.G396D =c.1187G>A	1403-1404 and 1438-1439	CTCCCTCTCAGA-35 nt spanning oligo-CCTGGGAGCCCT	0.1 kb
328	18355-L23309	Exon 13 (15)	1535-1534 reverse	CACTTACCTCCC-CAAGGTGCCGGA	0.1 kb
190	15783-L18347	Exon 14 (16)	1569-1570	CACATCAAGCTG-ACATATCAAGTA	0.7 kb
244	15787-L18348	Exon 15 (17)	Intron 14-1693	CTTCTTGCTAG-GTTTTCCGTGTG	1.3 kb
418	21358-L30391	Exon 16 (18)	1874-1873 reverse	ATGGGGGCTTTC-AGAGGTGCTACT	
		<i>stop codon</i>	<i>1864-1866 (ex 16)</i>		

(a) Číslování exonů použité v tomto popisu produktu P378-D1 a v analytických listech Coffalyser.Net je totožné s číslováním exonů v sekvenci LRG_220 a sekvenci NCBI NG_008189.1.

(b) Ligační místa sond P378 MUTYH MLPA jsou indikována podle sekvence Refseq NM_001128425.1, obsahující 16 exonů. Pouze intronové sondy 238 a 427 nt jsou označeny podle sekvence NM_001048172.1 a sekvence NM_001048174.1. Použité sekvence NM jsou od 01/2018, ale mohou být změněny (např. NCBI) po zveřejnění tohoto popisu produktu.

c) Pouze část sekvence sond je uvedena. Kompletní sekvence sond jsou k dispozici na [stránce](#).

Prosím, dejte nám vědět, pokud najdete nějaké chyby.

§ Sonda specifická pro mutaci. Tato sonda generuje pouze signál, pokud je přítomna mutace p.Y179C. Tato sonda se skládá ze tří částí a má dvě ligační místa. Nízký signál této sondy může být způsoben depurinací vzorku DNA, např. v důsledku nedostatečné puřovací kapacity nebo prodloužené doby denaturace.

∞ Sonda specifická pro mutaci. Tato sonda generuje signál pouze tehdy, je-li přítomna mutace p.G396D. Všimněte si toho, že sonda nemusí generovat signál, pokud je mutace p.G396D přítomna na stejné alele jako patogenní p.E410Gfs * 43 mutace. Signál této sondy může být rovněž snížen v přítomnosti depurinace vzorku DNA, např. kvůli nedostatečné puřovací kapacitě nebo prodloužené době denaturace.

Ø Intronová sonda. Tato sonda je zaměřena na alternativní variantu transkriptu s použitím alternativního startovacího kodonu. Význam delecí nebo duplikací pro tyto sondy není jasný.

Poznámka: Číslování exonů MUTYH se změnilo. Od června 2014 jsme přijali NCBI číslování exonů, které je přítomno v sekvenci NG_008189.1 pro tento gen, které je podobné LRG číslování exonů (LRG_220). Toto číslování exonů se může lišit od literatury! Číslování exonů použité v předchozí verzi tohoto popisu produktu naleznete v závorkách v Tabulce 2a. Číslování exonů je od 01/2018, ale může být změněno (např. NCBI) po vydání tohoto popisu produktu.

Table 2b. *SCG5* and *GREM1*

Length (nt)	SALSA MLPA probe	SCG5 exon ^(a)	Ligation site ^(b) NM_001144757.2	Partial sequence ^(c) (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
		<i>start codon</i>	<i>174-176 (ex 2)</i>		
250	18353-L23307	Exon 2	194-195	AGGATGGTCTCT-ACCATGCTATCT	36.2 kb
202 f	18310-L14109	Exon 3	477-478	TGACTGGAGACA-ACATTCCTAAGG	4.7 kb
220 f	18352-L23306	Exon 4	581-582	AACACCCTGAC-ACTGCAGAGTTC	7.2 kb
391 f	21357-L29761	Exon 5	715-716	ACGAAAGCGGAG-GGTAACACGTGC	4.9 kb
157 f	18309-L30392	Exon 6	865-866	TCAGCATGGCTT-ATGTGCACGTGT	4.3 kb
226 f	21353-L29757	Downstream	3918 nt after exon 6 reverse	AGGTAATCCAC-CTTCCCTCTGT	8.6 kb
		<i>stop codon</i>	<i>810-812 (ex 6)</i>		
Length (nt)	SALSA MLPA probe	GREM1 exon ^(a)	Ligation site ^(b) NM_013372.6	Partial sequence ^(c) (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
		<i>start codon</i>	<i>160-162 (ex 2)</i>		
345 « f	18356-L23310	Upstream	8423 nt before exon 1	AGAAACAAACAC-TGCAGGCAAGGT	2.9 kb
310 « f	18354-L23308	Upstream	5570 nt before exon 1	ACAGGTTACCCT-GTCTGCAGACAA	5.6 kb
136 «Δ»	18483-L23305	Exon 1	4-5	TGCCTGGCACTC-GGTGCGCCTTCC	0.1 kb
161 «Δ»	18350-L23692	Exon 1	153-154	ACCCGCCGCACT-GACAGGTGAGCG	12.7 kb
363	18358-L23312	Exon 2	292-293	ACAATGACTCAG-AGCAGACTCAGT	0.3 kb
382	18360-L23314	Exon 2	592-593	GCTCCTTCTGCA-AGCCCAAGAAAT	
		<i>stop codon</i>	<i>712-714 (ex 2)</i>		

(a) Číslování exonů použité v tomto popisu produktu P378-D1 a v analytických listech Coffalyser.Net je totožné s číslováním exonů v NCBI NG_051230.1 sekvenci pro SCG5 a v NCBI NG_033791.1 sekvenci pro GREM1.

(b) Ligační místa sond P378 MUTYH MLPA jsou indikována podle sekvence NM_001144757.2 pro SCG5, obsahující 6 exonů, a NM_013372.6 pro GREM1, obsahující 2 exony. Použité sekvence NM jsou od 01/2018, ale mohou být změněny (např. NCBI) po zveřejnění tohoto popisu produktu.

c) Pouze část sekvence sond je uvedena. Kompletní sekvence sond jsou k dispozici na [stránce](#).

Prosím, dejte nám vědět, pokud najdete nějaké chyby.

"Sonda se nachází v regionu bohatém na GC nebo v jeho blízkosti. Nízký signál může být způsoben kontaminací solí ve vzorku DNA, což vede k neúplné denaturaci DNA, zvláště u oblastí bohatých na GC.

Δ Více variabilní. Tato sonda může být citlivá na určité experimentální změny. Aberantní výsledky by měly být hodnoceny pozorně.

• Význam pouze delece exonu 1 není jasný, protože tento exon je nekódující.

∫ Sondy v rámci 40 kb duplikace 3'-konce SCG5 a upstream oblasti GREM1, která může způsobit HMPS1 (Jaeger a kol., 2012).

Table 2c. Reference probes

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Gene	Location	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Location (hg18)
372	05953-L28763	SPAST	2p22	GCAAGTTGTGCT-AGTTCTTTTGG	02-032.222
267	21354-L29758	DYSF	2p13	GAACCAAAGTCA-TCAAGAACAGCG	02-071.562
152	14199-L25033	EDAR	2q13	GAGAGTTCTGTG-GGTGGAGAGAAG	02-108.894
337	07367-L07014	SCN1A	2q24	GCAACAGGAGGC-AGCTCAGGTAAG	02-166.611
301	02266-L01752	GHRL	3p25	GGCTTTTCGCTT-GCTTCTGCAGCA	03-010.302
130	16316-L18705	RAB7A	3q21	CACAATAGGAGC-TGACTTCTGAC	03-130.000
123	21531-L30487	KIAA0319	6p22	GAGGAGGAACAA-GTGGGACGGCGA	06-024.754
116	S0472-L30486	PKHD1	6p12	GTAACCATCTCA-GGTCTCTGATGA	06-052.018
463	14955-L16688	LAMA2	6q22	CATGTCAATGTA-ATGGACACAGCA	06-129.691
452	19636-L26295	PARD3	10p11	CCTGCAGCAAAT-AAAGAGCAGTAT	10-034.712
208	21495-L16542	UROS	10q26	AGTGTATGTGGT-TGGAAATGCTAC	10-127.491
471	21532-L27372	SMPD1	11p15	CTGCTGAAGATA-GCACCACCTGCC	11-006.369
351	16520-L23853	RAG2	11p12	GTTTAGCGGCAA-AGATTTCAGAGAG	11-036.576
445	16571-L19062	SHANK2	11q13	TCGAGGTACGAT-GCGAAGGCAGAA	11-070.014
409	17462-L21218	GRIN2B	12p13	CTGTCTGGCAA-GCCTGGCATGGT	12-013.611

Colorectal cancer (CRC) related SALSA MLPA probemixes

COLORECTAL CANCER (CRC) PROBEMIXES	Condition		Gene	Probemix
	Lynch Syndrome (HNPCC)		MLH1	P003, ME011, P248 (Confirmation of P003), ME042
			MSH2	P003, ME011, P248 (Confirmation of P003)
			MSH6	P072, ME011
			PMS2	P008, ME011
			EPCAM	P003, P072
	Polyposis Syndrome		MAP	MUTYH P378, P043, P072
			AFAP	APC P043
FAP			APC P043	

Reference

Jaeger E et al. (2012). Hereditary mixed polyposis syndrome is caused by a 40-kb upstream duplication that leads to increased and ectopic expression of the BMP antagonist GREM1. *Nat Genet.* 44:699-703.

Rohlin A et al. (2016). GREM1 and POLE variants in hereditary colorectal cancer syndromes. *Genes Chromosomes Cancer.* 55:95-106.

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

Schwartz M et al. (2007). Deletion of exon 16 of the dystrophin gene is not associated with disease. *Hum Mutat.* 28:205.

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.

Vybrané publikace používající kit SALSA MLPA P378 MUTYH

Aimé A et al. (2015). Somatic c. 34G>T KRAS mutation: a new prescreening test for MUTYH-associated polyposis? *Canc Genet.* 7:390-395.

Castillejo A et al. (2014). Prevalence of germline MUTYH mutations among Lynch-like syndrome patients. *Eur J Cancer.* 50:2241-2250.

Guarinos C et al. (2014). Prevalence and characteristics of MUTYH-associated polyposis in patients with multiple adenomatous and serrated polyps. *Clin Cancer Res.* 20:1158-1168.

Morak M et al. (2014). Biallelic MUTYH mutations can mimic Lynch syndrome. *Eur J Hum Genet.* 22:1334-1337.

Rohlin A et al. (2016). GREM1 and POLE variants in hereditary colorectal cancer syndromes. *Genes Chromosomes Cancer.* 55:95-106.

Taki K et al. (2016). Mutation analysis of MUTYH in Japanese colorectal adenomatous polyposis patients. *Fam Cancer.* 15:261-265.

Historie produktu P378

P378 Product history	
<i>Version</i>	<i>Modification</i>
D1	One new reference probe has been added and 11 have been replaced; <i>MUTYH</i> exon 8, 11, 12, and exon 16 probes have been replaced, <i>MUTYH</i> exon 8 probe has been added, and <i>MUTYH</i> exon 7 probe has been removed; <i>SCG5</i> exon 5 probe has been replaced and <i>SCG5</i> downstream probe (enhancer probe upstream <i>GREM1</i>) has been added; and several probes have a small change in length.
C1	A target probe for <i>MUTYH</i> exon 10 has been included.
B1	Seven target probes have been replaced and 12 new target probes have been added (<i>MUTYH</i> , <i>GREM1</i> and <i>SCG5</i>), including mutation specific probes for <i>MUTYH</i> Y179C and G396D; all reference probes have been replaced.
A2	The 88 and 96 nt control fragments have been replaced (QDX2); the 258 nt probe has a small change in length.
A1	First release.

Implemented changes in the product description
<p><i>Version D1-01 – 23 February 2018 (04)</i></p> <ul style="list-style-type: none">- Product description restructured and adapted to a new template.- Product description adapted to a new product version (version number changed, changes in Table 1 and Table 2).- Various minor textual changes. <p><i>Version 14 – 30 October 2017 (T08)</i></p> <ul style="list-style-type: none">- Warning added in Table 1 and 2, 135 nt probe 18483-L23305, 160 nt probe 18350-L23692, and 310 nt probe 18354-L23308. <p><i>Version 13 – 23 November 2016 (T08)</i></p> <ul style="list-style-type: none">- Product description adapted to a new lot (lot number added, small changes in Table 1 and Table 2, new picture included).

- Two new references added on page 2.
- Ligation sites of probes for SCG5 gene updated due to changing to another transcript as a reference sequence (from NM_001144757.1 to NM_001144757.2).
- Various minor textual changes.

Version 12 – 15 January 2015 (T07)

- Product description adapted to a new product version (version number changed, lot number added, small changes in Table 1 and Table 2, new pictures included).
- Various minor textual changes and corrections throughout the document.
- Updated link for "Database of Genomic Variants".

Version 11 – 16 September 2014 (T06)

- Various minor textual changes on page 1.
- New related probemix ME043 added on page 2.
- New reference added on page 2.
- Table 2b adjusted to contain information on which probes are expected to be duplicated in case of 40kb upstream duplication of GREM1.

Version 10 – 13 June 2014 (T06)

- Exon numbering of the MUTYH gene has been updated in Table 1 and 2a due to changing to the new NG exon numbering (NG_008189.1).
- New references added on page 2.

Version 09 – 02 October 2013 (T03)

- Adjusted SD text on page 1 & 2.


Version 08 – 16 August 2013 (T03)

- Adjusted SD text on page 2.

Version 07 – 02 July 2013 (T03)

- Product description is adapted to a new product version (version number changed, lot number added, tables 1 and 2 adapted and new pictures included).
- Various textual changes and information on the GREM1 and SGC5 gene added on page 1.
- Information about Sample DNA is added on page 2.
- Analysis method has been adapted for use on tumour DNA on page 2.
- Warning added on page 2 about consequences of low tumour cell percentage for MLPA analysis.

More information: www.mlpa.com; www.mlpa.eu

	MRC-Holland bv; Willem Schoutenstraat 1 1057 DL, Amsterdam, The Netherlands
E-mail	info@mlpa.com (information & technical questions); order@mlpa.com (orders)
Phone	+31 888 657 200

	EUROPE* 
	ALL OTHER COUNTRIES

*comprising EU (candidate) member states and members of the European Free Trade Association (EFTA).
The product is for RUO is all other European countries.