

# Popis produktu

## SALSA® MLPA® Probemix P055-D1 PAH

Pro použití s Obecným protokolem MLPA.

### Verze D1

Úplnou historii produktu naleznete na straně 9.

### Katalogová čísla:

- **P055-025R:** SALSA MLPA Probemix P055 PAH, 25 reakcí.
- **P055-050R:** SALSA MLPA Probemix P055 PAH, 50 reakcí.
- **P055-100R:** SALSA MLPA Probemix P055 PAH, 100 reakcí.

Pro použití v kombinaci s reagenčním kitem SALSA MLPA a softwarem Coffalyser.Net pro analýzu dat. Reagenční kity MLPA jsou dodávány s PCR primerem označeným fluorescenční barvičkou FAM, nebo Cy5.0, vhodné pro kapilární sekvenátory značky Applied Biosystems a Beckman/SCIEX (viz [www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com)).

### Osvědčení o analýze

Informace o podmínkách skladování, testech kvality a vzorového elektroferogramu aktuální prodejní šarže naleznete na [www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com).

### Bezpečnostní opatření a varování

Určeno pouze k profesionálnímu použití. Před použitím se vždy seznamte s nejnovějším produktovým popisem a obecným protokolem MLPA: [www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com). Je odpovědností uživatele, aby se před vyvozením závěrů založených na výsledcích tohoto testu seznámil s nejnovějšími vědeckými poznatky souvisejícími s použitím tohoto produktu.

### Zamýšlené použití

SALSA MLPA Probemix P055 PAH představuje in vitro diagnostický (IVD)<sup>1</sup> nebo výhradně k výzkumu určený (RUO) semikvantitativní test<sup>2</sup> sloužící k detekci delecí nebo duplikací v genu *PAH* v genomické DNA izolované ze vzorků lidské periferní plné krve a DNA z buněk získaných bukalními stěry. P055 PAH je určen pro potvrzení možné příčiny a klinické diagnózy deficitu fenylalaninhydroxylázy u pacientů s diagnostikovanou fenylketonurií (PKU) a pro molekulárně genetické testování ohrožených členů rodiny.

Variabilita počtu kopií (CNV) detekovaná pomocí P055 PAH by měla být potvrzena jinou technikou. Zejména v situaci, kdy je CNV detekována pouze jednou sondou, je nutné ověření jinou metodou. Většinu defektů v genu *PAH* představují bodové mutace, které MLPA nedetekuje. Doporučuje se proto používat tento test v kombinaci se sekvenční analýzou.

Výsledky testu jsou určeny k použití ve spojení s dalšími klinickými a diagnostickými nálezy, v souladu s profesionálními standardy praxe, včetně potvrzení pomocí alternativních metod, vyšetření rodičů, klinického genetického vyšetření či konzultací. Výsledky tohoto testu by měly být interpretovány klinickým molekulárním genetikem nebo pracovníkem s odpovídajícím vzděláním.

Tento produkt není určen pro počáteční diagnostiku PKU, samostatné diagnostické účely, preimplantační nebo prenatalní testování, populační screening, nebo pro detekci, nebo screening získaných nebo somatických genetických aberací.

<sup>1</sup>Berte prosím na vědomí, že tento probemix je určen pro in vitro diagnostické použití (IVD) v zemích uvedených na konci tohoto dokumentu. Ve všech ostatních zemích je tento produkt určen výhradně pro výzkumné účely (RUO).

<sup>2</sup> Pro použití v kombinaci s reagenčním kitem SALSA MLPA a softwarem Coffalyser.Net.

### Klinické pozadí

Fenylketonurie (PKU), podobně jako méně závažné formy tohoto onemocnění (někdy označované jako variantní PKU nebo non-fenylketonurická hyperfenylalanemie), představuje autosomálně recesivně onemocnění vedoucí k metabolickému defektu charakterizovaného hyperfenylalaninemií způsobenou deficitem fenylalaninhydroxylázy (98% případů) nebo nesprávnou syntézou nebo recyklací

tetrahydrobiopterinu (2% případů) (Scriver and Kaufman 2001). Neléčená PKU může vést k mikrocefalii, epilepsii, těžké mentální retardaci či behaviorálním potížím. Více informací o PKU naleznete na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1504/>.

Většina případů PKU je způsobena defekty genu *PAH*. Mezi tyto defekty patří delece a duplikace celých exonů, které standardní sekvenční analýza obvykle opomíjí. Technika MLPA umožňuje detekovat většinu těchto delecí a duplikací, čímž doplňuje sekvenční analýzu genu *PAH*. Očekávaný počet chromozomálních přestaveb *PAH*, který lze detekovat pomocí tohoto MLPA probemixu, je mezi 1 a 5% všech případů PKU ve většině populací (viz publikace o probemixu P055 PAH níže).

### Struktura genu

Gen *PAH* zahrnuje ~ 121 kilobází (kb) na chromozomu 12q23.2 a obsahuje 13 exonů. V tuto chvíli není pro *PAH* k dispozici žádná sekvenční LRG. Sekvence chromozomální DNA GenBank je NG\_008690.2.

### Transkripční varianty

Byly definovány dvě transkripční varianty *PAH*. Transkripční varianta 1 (NM\_000277.3, 3759 nukleotidů (nt), kódující sekvenční 115-1473) představuje referenční standard v projektu NCBI RefSeqGene [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5053](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5053).

### Číslování exonů

Číslování *PAH* exonů použité v tomto P055-D1 PAH dokumentu je číslování exonů ze sekvenční NG\_008690.2. Vzhledem k tomu, že po vydání tohoto dokumentu může dojít ke změnám v databázích, sekvenční NG\_ a NM\_ a číslování exonů nemusí být aktuální.

### Obsah probemixu

Tento SALSA MLPA Probemix P055-D1 PAH obsahuje 38 MLPA sond s produkty amplifikace mezi 128 a 427 nt. Konkrétně pak 22 sond pro gen *PAH* a jednu sondu upstream a downstream genu *PAH*. Navíc je součástí 14 referenčních sond, které detekují autozomální chromozomální lokusy. Kompletní sekvenční sondy a popis genů detekovaných referenčními sondami jsou k dispozici online ([www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com)).

Několik částečně konzervovaných a potenciálně regulačních elementů je umístěno upstream od *PAH* exonu 1. Tyto DNÁzaly hypersenzitivní místa byly popsány Bristeau et al. (2001). V těchto upstream sekvencích byly umístěny dvě sondy (418 nt HSS3 a 154 nt HSS2).

Tento probemix obsahuje devět fragmentů kontroly kvality, které generují produkty amplifikace 64 až 105 nt: čtyři fragmenty kvantity DNA (tzv. Q-fragmenty), dva fragmenty denaturace DNA (tzv. D-fragmenty), jeden benchmarkový fragment, jeden chromozom X a jeden chromozom Y-specifický fragment (viz tabulka níže). Další informace ohledně interpretace těchto kontrolních fragmentů lze nalézt v Obecném protokolu MLPA a online na adrese [www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com).

Délka (nt)	Název
64-70-76-82	Q-fragmenty (viditelné pouze u DNA vzorků s <100 ng)
88-96	D-fragmenty (nízký signál indikuje neúplnou denaturaci)
92	Benchmarkový fragment
100	X-fragment (specifický pro chromozom X)
105	Y-fragment (specifický pro chromozom Y)

### Technika MLPA

Principy techniky MLPA (Schouten et al. 2002) jsou popsány v Obecném protokolu MLPA ([www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com)).

### Validace techniky MLPA

Vyžaduje se interní validace techniky MLPA pomocí 16 vzorků DNA od zdravých jedinců, zejména při prvním použití MLPA nebo při změně postupu manipulace se vzorkem, při změně metody extrakce DNA nebo při

změně použitých přístrojů. Výsledkem tohoto validačního experimentu by měla být standardní odchylka  $\leq 0,10$  pro všechny sondy v průběhu experimentu.

### Požadované vzorky

Extrahovaná DNA z lidské periferní krve nebo z buňkových stěrů, prostá kontaminantů, o nichž je známo, že ovlivňují MLPA reakce. Další informace naleznete v části o zpracování vzorků DNA v Obecném protokolu MLPA.

### Referenční vzorky

Do každého experimentu MLPA by měl být zahrnut dostatečný počet ( $\geq 3$ ) referenčních vzorků, a to za účelem normalizace dat. Všechny testované vzorky, včetně referenčních vzorků DNA, by měly pocházet ze stejného typu tkáně, mělo by se s nimi zacházet stejným postupem a měly by být připraveny stejnou metodou extrakce DNA, pokud je to možné. Referenční vzorky by měly být získány od různých nepříbuzných jedinců pocházejících z rodin, v jejichž anamnéze se (varianta) PKU nevyskytuje. Více informací o výběru a použití referenčních vzorků lze nalézt ve Obecném protokolu MLPA ([www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com)).

### Pozitivní kontrolní DNA vzorky

MRC Holland nedodává pozitivní vzorky. Je však doporučeno do každého experimentu pozitivní vzorek zahrnout. Coriell Institute (<https://catalog.coriell.org>) a Leibniz Institute DSMZ (<https://www.dsmz.de/>) nabízí rozmanité sbírky biologických zdrojů, které lze využít jako pozitivní kontrolu v rámci vašich MLPA experimentů. Kvalita buněčných linií může být proměnlivá, proto je vhodné vzorky před použitím validovat.

### Výkonové charakteristiky

Očekávané procento chromozomálních přestaveb *PAH*, který lze detekovat pomocí tohoto MLPA probemixu, je mezi 1 a 5% všech případů PKU ve většině populací (viz publikace o probemixu P055 *PAH* níže). Analytická citlivost a specifita pro detekci delecí/duplikací v genu *PAH* je velmi vysoká a lze ji stanovit jako  $>95\%$ .

Analytický výkon může být ohrožen: SNV nebo jinými polymorfismy v cílové sekvenci DNA, nečistotami ve vzorku DNA, neúplnou denaturací DNA, použitím nedostatečného nebo příliš velkého množství vzorku DNA, použitím nedostatečných nebo nevhodných referenčních vzorků, problémy s kapilární elektroforézou, špatným postupem normalizace dat či jinými chybami technického rázu. Instrukce a informace ohledně vyhodnocení/normalizace dat jsou uvedeny v Obecném protokolu MLPA.

### Analýza dat

K analýze dat by měl být používán software Coffalyser.Net, a to v kombinaci s příslušným MLPA Coffalyser listem specifickým pro danou šarži. V obou případech by měla být použita nejnovější verze. Software Coffalyser.Net je volně ke stažení na [www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com). Použití jiného softwaru může vést k neprůkazným nebo falešným výsledkům. Další podrobnosti ohledně kontroly kvality a analýzy dat, včetně jejich normalizace, naleznete v příručce Coffalyser.Net Reference Manual.

### Interpretace výsledků

Očekávané výsledky u sond MLPA specifických pro oblast *PAH* jsou počet kopií alel 2 (normální), 1 (heterozygotní delece), 0 (homozygotní delece), 3 (heterozygotní duplikace) nebo příležitostně 4 (homozygotní duplikace nebo heterozygotní triplicace).

Standardní odchylka každé jednotlivé sondy napříč všemi referenčními vzorky by měla být  $\leq 0,10$  a konečný poměr (FR) každé jednotlivé referenční sondy v patientských vzorcích by měl být mezi 0,80 a 1,20. Pokud jsou tato kritéria splněna, lze pro interpretaci výsledků MLPA v případě autozomálních chromozomů nebo pseudoautozomálních oblastí použít následující mezní hodnoty FR sond:

Status dle počtu kopií	Konečný poměr (FR)
Normální	$0,80 < FR < 1,20$
Homozygotní delece	FR = 0
Heterozygotní delece	$0,40 < FR < 0,65$
Heterozygotní duplikace	$1,30 < FR < 1,65$

Status dle počtu kopií	Konečný poměr (FR)
Heterozygotní triplikace nebo homozygotní duplikace	1,75 < FR < 2,15
Nejednoznačný počet kopií	Všechny ostatní hodnoty

Poznámka: Termín „dávkový kvocient“, používaný ve starších verzích dokumentů, byl nahrazen termínem „konečný poměr“, aby byl v souladu s terminologií softwaru Coffalyser.Net. (Výpočty, mezní hodnoty a interpretace zůstávají nezměněny.) Vezměte prosím na vědomí, že software Coffalyser.Net také zobrazuje libovolné hranice jako součást statistické analýzy výsledků získaných v experimentu. Jako takové jsou libovolné hranice odlišné z konečných mezních hodnot poměru uvedených výše.

- Uspořádání sond dle chromozomálního umístění usnadňuje interpretaci výsledků a může pomoci odhalit drobné změny, jako jsou změny pozorované u případů s mozaicismem. V případě komplexních výsledků může být pro správnou interpretaci výsledků nezbytná analýza rodičovských vzorků.
- Falešně pozitivní výsledky: Mějte na paměti, že u abnormalit detekovaných jednou sondou (nebo více po sobě jdoucími sondami) stále existuje nemalá šance, že jde o falešně pozitivní výsledek. Sekvenční změny (např. SNV, bodové mutace) v cílové sekvenci detekované sondou mohou být jednou z příčin. Neúplná denaturace DNA (např. z důvodu kontaminace solí) může také vést ke sníženému signálu sondy, zejména u sond umístěných uvnitř nebo v blízkosti oblasti bohaté na GC páry nebo uvnitř či v blízkosti genu *PAH*. V takových případech může pomoci dodatečný purifikační krok nebo alternativní metoda extrakce DNA. Kontaminace DNA vzorků cDNA nebo PCR amplicony jednotlivých exonů může způsobit zvýšení signálu sondy (Varga et al. 2012). Analýza druhého, nezávisle odebraného vzorku DNA může tyto kontaminanty vyloučit.
- Normální variabilita počtu kopií u zdravých jedinců je popsána v databázi genomických variant: <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>. Při interpretaci svých zjištění by uživatelé měli vždy konzultovat nejnovější aktualizaci databáze a vědeckou literaturu.
- Ne všechny abnormality detekované MLPA jsou patogenní. U některých genů byly zjištěny intragenní delece, které mají za následek velmi mírné nebo žádné onemocnění (jak je popsáno v případě *DMD* ve Schwartz et al. 2007). U mnoha genů existuje více než jedna transkripční varianta. Změny počtu kopií exonů, které nejsou přítomny ve všech transkripčních variantách, nemusí být klinicky významné. Duplikace, které zahrnují první nebo poslední exon genu (např. exony 1-3), nemusí vést k inaktivaci této kopie genu.
- Změny počtu kopií detekované referenčními sondami nebo ohraničujícími (flanking) sondami pravděpodobně nesouvisí s onemocněním, na které je zkouška prováděna.
- Pokud se jeden nebo více píků nachází mimo měřítko, může docházet k falešně pozitivním výsledkům. Například duplikace jednoho nebo více exonů může být skryta, pokud jsou píky mimo měřítko, což vede k falešně negativním výsledkům. Riziko píků nacházejících se mimo měřítko je vyšší, pokud jsou použity probemixy, které obsahují relativně nízký počet sond. Na rozdíl od jiných programů softwaru Coffalyser.Net varuje před píky přesahujícími měřítko, zatímco jiný software ne. Pokud je jeden nebo více píků mimo měřítko, opakujte kapilární elektroforézu, a to buď při nižším injektážním napětí, nebo při nižší době nástřiku, nebo při sníženém množství vzorku zředěním PCR produktů.

Specifické poznámky pro P055:

- PKU je způsobena defekty v genu *PAH* a představuje autozomálně recesivní onemocnění. Předpokládá se, že k PKU vede inaktivace obou kopií genu *PAH*. U přenašečů je obvykle pozorována inaktivace pouze jedné kopie genu *PAH*.
- Delece jednoho nebo více exonů obvykle způsobuje inaktivaci dané kopie genu. V případě delece jediného exonu však existuje významné riziko falešně pozitivního výsledku. U hyperfenylalaninemického pacienta (Chen et al. 2002) byla nalezena delece 3,7 kb v 5'-ohraničující oblasti genu *PAH*, včetně hypersenzitivních míst DNázyI (oblast HSS2 a HSS3, popsáno Bristeau et al. (2001)).
- Duplikace vnitřní části genu obvykle způsobuje defektní kopii, protože duplikovaná sekvence je obvykle umístěna přímo v blízkosti původní sekvence, což vede k defektní transkripci. V případě duplikace kompletního genu *PAH* se však neočekává, že povede k onemocnění.

- U delece nebo duplikace ohraničujících sond pro *ASCL1* a *IGF1* se nepředpokládá, že jsou příčinami PKU. Tyto sondy jsou použity pouze k vymezení rozsahu velkých delecí a duplikací.

#### Omezení postupu

- U většiny populací jsou hlavní příčinou genetických defektů genu *PAH* malé (bodové) mutace, z nichž většinu nelze pomocí SALSA MLPA Probemixu P055 *PAH* detekovat.
- MLPA nedetekuje žádné změny, které leží mimo cílovou sekvenci sond, a nezjistí počet kopií neutrální inverze nebo translokace. I když MLPA neodhalí žádné aberace, je možné, že se biologické změny v daném genu nebo chromozomální oblasti *nachází*, jen nebyly detekovány.
- Změny (např. SNV, bodové mutace) v cílové sekvenci detekované sondou mohou způsobit falešně pozitivní výsledky. Mutace/SNV (i >20 nt od místa ligace sondy) mohou redukovat signál sondy tím, že brání ligaci oligonukleotidů sondy nebo destabilizují vázání oligonukleotidů sondy ke vzorku DNA.

#### Potvrzení výsledků

Pokud jsou změny počtu kopií detekovány pouze jednou sondou, vždy proveďte ověření další metodou. Zjevná delece detekovaná jedinou sondou může být způsobena např. mutacemi/polymorfismy, které zabraňují ligaci nebo destabilizují vázání oligonukleotidů na vzorek DNA. Sekvenční analýza může pomoci určit, zda jsou v cílové sekvenci pro danou sondu přítomny mutace či polymorfismy. Zjištění heterozygotní mutace nebo polymorfismu naznačuje, že se ve vzorku DNA *nachází* dvě různé alely sekvence a že se jedná o falešně pozitivní výsledek MLPA.

Změny počtu kopií detekované více po sobě následujícími sondami by měly být potvrzeny další nezávislou metodou, např. long-range PCR, qPCR, array CGH či Southern blotting, kdykoli je to možné. Delece/duplikace delší než 50 kb je obvykle možné potvrdit pomocí metody FISH.

#### Databáze mutací *PAH*

<http://www.biopku.org/home/pah.asp>. Uživatelům důrazně doporučujeme ukládat pozitivní výsledky do databáze Phenylalanine Hydroxylase Gene Locus-Specific Database. Doporučení ohledně označování delecí/duplikací jednoho nebo více exonů lze nalézt na adrese <http://varnomen.hgvs.org/>.

Hlaste prosím změny počtu kopií detekované referenčními sondami, falešně pozitivní výsledky způsobené SNV a neobvyklé výsledky (např. duplikace *PAH* exonů 6 a 8, ale ne exonu 7) MRC Holland, a to na: [info@mrcholland.com](mailto:info@mrcholland.com).

**Tabulka 1. SALSA MLPA Probemix P055-D1 PAH**

Délka (nt)	SALSA MLPA sonda	Chromozomální pozice (hg18) <sup>a</sup>	
		Reference	PAH
64-105	Kontrolní fragmenty – pro více informací viz tabulka v části věnované obsahu probemixu		
128	Referenční sonda 00797-L00093	5q	
136	Referenční sonda 07292-L06929	6q	
142	<b>PAH</b> sonda 02326-L01823		<b>Exon 7</b>
149 « ~	<b>ASCL1</b> sonda 02327-L01835		<b>Exon 2</b>
154	<b>HSS2</b> sonda 12251-L14053		upstream
161	<b>PAH</b> sonda 02328-L11413		<b>Exon 8</b>
168	<b>PAH</b> sonda 16487-L23233		<b>Exon 1</b>
174	Referenční sonda 01823-L23229	16p	
180	<b>PAH</b> sonda 16488-L23230		<b>Exon 2</b>
187	<b>PAH</b> sonda 02331-L23231		<b>Exon 9</b>
194	Referenční sonda 05703-L06959	3q	
201 ±	<b>PAH</b> sonda 16489-L18945		<b>Exon 3</b>
211	<b>PAH</b> sonda 02333-L01826		<b>Exon 10</b>
220	Referenční sonda 01782-L01346	13q	
227	<b>PAH</b> sonda 17737-L21083		<b>Exon 6</b>
235	<b>PAH</b> sonda 02334-L23232		<b>Exon 4</b>
242	<b>PAH</b> sonda 02335-L14055		<b>Exon 11</b>
247	Referenční sonda 07695-L07419	21q	
256	<b>PAH</b> sonda 02336-L01821		<b>Exon 5</b>
265	<b>PAH</b> sonda 02337-L02469		<b>Exon 12</b>
274	Referenční sonda 15473-L17313	1p	
283	<b>PAH</b> sonda 16491-L18947		<b>Exon 6</b>
292	<b>PAH</b> sonda 02339-L01829		<b>Exon 13</b>
300	Referenční sonda 01575-L01147	22q	
310 ~	<b>IGF1</b> sonda 02340-L01834		<b>Exon 2</b>
319	Referenční sonda 06440-L05966	3p	
337	<b>PAH</b> sonda 12254-L14056		<b>Exon 1</b>
346	<b>PAH</b> sonda 16492-L18948		<b>Exon 5</b>
352	<b>PAH</b> sonda 12256-L14058		<b>Exon 7</b>
359 Ж	Referenční sonda 13731-SP0136-L15212	15q	
365 Ж ±	<b>PAH</b> sonda 16493-SP0373-L18949		<b>Exon 3</b>
373	<b>PAH</b> sonda 16494-L18950		<b>Exon 2</b>
382	Referenční sonda 13974-L15543	7q	
391	Referenční sonda 12522-L13572	18q	
400	<b>PAH</b> sonda 12260-L14061		<b>Exon 4</b>
409	Referenční sonda 10063-L10487	8q	
418	<b>HSS3</b> sonda 12261-L13203		upstream
427	Referenční sonda 05915-L17921	14q	

<sup>a</sup> Další informace viz část Číslování exonů na straně 2.

± SNP rs192439649 může ovlivňovat signál 365 nt sondy a SNP rs542737289 může ovlivňovat 201 nt sondu. V případě zjevných delecí je doporučeno sekvenovat oblast, na kterou tato sonda cílí.

« Sonda umístěná uvnitř nebo blízko oblasti bohaté na GC. Nízký signál může být způsoben vzorkem DNA kontaminovaným solí, což způsobuje neúplnou denaturaci DNA, zejména oblastí bohatých na GC.

Ж 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 pufrční kapacity či delší doby denaturace. Když k tomu dojde u referenčních vzorků, může to vypadat jako zvýšený signál v testovacích vzorcích.

- Ohraničující sonda. Zahrnuta za účelem určení rozsahu delece/duplikace. Je nepravděpodobné, že by změny počtu kopií ohraničujících nebo referenčních sond souvisely s onemocněním, na které je zkouška prováděna.

SNV lokalizované v cílové sekvenci sondy mohou ovlivnit hybridizaci sondy a/nebo ligaci sondy. Mějte na vědomí: ne všechny známé SNV jsou uvedeny v tabulkách výše. Aberace jedné sondy musí být potvrzeny jinou metodou.

**Tabulka 2. PAH sondy uspořádané podle chromozomální pozice**

Délka (nt)	SALSA MLPA sonda	Exon genu <sup>a</sup>	Místo ligace NM_000277.3	Částečná sekvence <sup>b</sup> (24 nt, sousedící s ligačním místem)	Vzdálenost k další sondě
149 « ~	02327-L01835	Gen <i>ASCL1</i>		ACCTGCATCTTT-AGTGCTTTCTTG	38,9 kb
418	12261-L13203	Oblast HSS3	3238 nt před exonem 1	CAATGGTTGGGT-AATCTTCAACTT	2,0 kb
154	12251-L14053	Oblast HSS2	1280 nt před exonem 1	GTGGTAGAACCA-AGAGTTAAACCA	1,0 kb
		<i>PAH start kodon</i>	115-117 (Exon 1)		
337	12254-L14056	PAH exon 1	291 nt před exonem 1	GGCTTAGTCCAA-TTGCGAGAACT	0,4 kb
168	16487-L23233	PAH exon 1	72-73	CTGCCTGTACCT-GAGGCCATAAAA	4,1 kb
373	16494-L18950	PAH exon 2	191 nt před exonem 2	GTAGCATCATTG-ATCATTAAATTG	0,4 kb
180	16488-L23230	PAH exon 2	73 nt po exonu 2	AGTTAGATGCAA-TGAAAAGAACAC	17,6 kb
365 Ж ±	16493-SP0373-L18949	PAH exon 3	235 and 201 nt před exonem 3	ATTTTCATGTGA-34 nt spanning oligo-CCTGCCACTTAG	0,4 kb
201 ±	16489-L18945	PAH exon 3	33 nt po exonu 3	CAACATAAGTAA-CTCCACACTGTC	17,2 kb
235	02334-L23232	PAH exon 4	484-485	GGTTCCAAGAA-CCATTCAAGAGC	0,1 kb
400	12260-L14061	PAH exon 4	3 nt po exonu 4	GACCACCCTGTG-AGTCCATGGCCC	10,7 kb
346	16492-L18948	PAH exon 5	104 nt před exonem 5	CCAAGGGAAGGA-GACATGCACTGT	0,2 kb
256	02336-L01821	PAH exon 5	613-614	ACATTGCCTACA-ACTACCGCCAGT	11,2 kb
283	16491-L18947	PAH exon 6	106 nt před exonem 6 reverse	TGAGCTGCCATC-ACTTGCTACAGT	0,1 kb
227	17737-L21083	PAH exon 6	665-664 reverse	CCCATGTTTCT-TTTCTTCTCCA	2,4 kb
142	02326-L01823	PAH exon 7	877-878	CTCGGGATTCT-TGGGTGGCCTGG	0,1 kb
352	12256-L14058	PAH exon 7	37 nt po exonu 7	TTGCCAGGCACA-ATGAGCGCCATC	1,1 kb
161	02328-L11413	PAH exon 8	986-987	GTTGGGACATGT-GCCCTGTTTTTC	4,8 kb
187	02331-L23231	PAH exon 9	1067-1066 reverse	CGAGCTTTTCAA-TGTATTCATCAG	2,5 kb
211	02333-L01826	PAH exon 10	1142-1143	CATAAAGGCATA-TGGTGCTGGGCT	0,6 kb
242	02335-L14055	PAH exon 11	1230-1231	CTGGAGAAGACA-GCCATCCAAAAT	3,3 kb
265	02337-L02469	PAH exon 12	1385-1386	GATTGAGGTCTT-GGACAATACCCA	1,3 kb
292	02339-L01829	PAH exon 13	1471-1472	AGAAAATAAAGT-AAAGCCATGGAC	363,4 kb
		<i>PAH stop kodon</i>	1471-1473 (Exon 13)		
310 ~	02340-L01834	Gen <i>IGF1</i>		AGGTAGAAGAGA-TGCGAGGAGGAC	

<sup>a</sup> Další informace viz část Číslování exonů na straně 2.

<sup>b</sup> Zobrazeny jsou pouze částečné sekvence sond. Kompletní sekvence sond jsou k dispozici na [www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com). Prosím upozorněte nás na jakékoli případné chyby: [info@mrcholland.com](mailto:info@mrcholland.com).

± SNP rs192439649 může ovlivňovat signál 365 nt sondy a SNP rs542737289 může ovlivňovat 201 nt sondu. V případě zjevných delecí je doporučeno sekvenovat oblast, na kterou tato sonda cílí.

« Sonda umístěná uvnitř nebo blízko oblasti bohaté na GC. Nízký signál může být způsoben vzorkem DNA kontaminovaným solí, což způsobuje neúplnou denaturaci DNA, zejména oblastí bohatých na GC.

Ж 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 pufrční kapacity či delší doby denaturace. Když k tomu dojde u referenčních vzorků, může to vypadat jako zvýšený signál v testovacích vzorcích.

~ Ohraničující sonda. Zahrnuta za účelem určení rozsahu delece/duplikace. Je nepravděpodobné, že by změny počtu kopií ohraničujících nebo referenčních sond souvisely s onemocněním, na které je zkouška prováděna.

SNV lokalizované v cílové sekvenci sondy mohou ovlivnit hybridizaci sondy a/nebo ligaci sondy. Mějte na vědomí: ne všechny známé SNV jsou uvedeny v tabulkách výše. Aberace jedné sondy musí být potvrzeny jinou metodou.

## Související SALSA MLPA probemixy

P076 ACADVL-SLC22A5 Obsahuje sondy pro gen *ACADVL*, který se podílí na deficitu acylkoenzymu A dehydrogenasy s velmi dlouhým řetězcem (VLCAD).

## Literatura

- Bristeau A et al. (2001). Conserved as well as divergent regulatory elements account for expression of the human and rodent phenylalanine hydroxylase genes. *Gene*. 274:283-291.
- Chen KJ et al. (2002). Identification and characterization of a novel liver-specific enhancer of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Human genetics*. 110:235-243.
- Schouten JP et al. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research*. 30:e57.
- Schwartz M et al. (2007). Deletion of exon 16 of the dystrophin gene is not associated with disease. *Human mutation*. 28:205.
- Scriver CR et al. (2001) Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly SW, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8 ed. New York, NY: McGraw-Hill. pp. 1667-1724.
- Varga RE et al. (2012). MLPA-based evidence for sequence gain: pitfalls in confirmation and necessity for exclusion of false positives. *Analytical biochemistry*. 421:799-801.

## Vybrané publikace využívající SALSA MLPA Probemix P055 PAH




- Birk Moller L et al. (2007). Low proportion of whole exon deletions causing phenylketonuria in Denmark and Germany. *Human mutation*. 28:207.
- Cali F et al. (2010). Exon deletions of the phenylalanine hydroxylase gene in Italian hyperphenylalaninemics. *Experimental & molecular medicine*. 42:81-86.
- Desviat LR et al. (2006). Identification of exonic deletions in the PAH gene causing phenylketonuria by MLPA analysis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 373:164-167.
- Gemperle-Britschgi C et al. (2016). A novel common large genomic deletion and two new missense mutations identified in the Romanian phenylketonuria population. *Gene*. 576:182-188.
- Groselj U et al. (2012). Five novel mutations and two large deletions in a population analysis of the phenylalanine hydroxylase gene. *Molecular genetics and metabolism*. 106:142-148.
- Ji CY et al. (2011). [The research of combining high resolution melting with multiplex ligation-dependent probe amplification technology in the mutation scanning for PAH gene]. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi = Chinese journal of medical genetics*. 28:649-653.
- Kozak L et al. (2006). Identification and characterization of large deletions in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene by MLPA: evidence for both homologous and non-homologous mechanisms of rearrangement. *Molecular genetics and metabolism*. 89:300-309.
- Lee YW et al. (2008). Mutation analysis of PAH gene and characterization of a recurrent deletion mutation in Korean patients with phenylketonuria. *Experimental & molecular medicine*. 40:533-540.
- Lu CX et al. (2011). [Mutation analysis of phenylalanine hydroxylase gene in 55 patients with phenylketonuria from Hebei province]. *Zhonghua yi xue za zhi*. 91:2971-2976.
- Maruo Y et al. (2015). A novel large deletion (exons 12, 13) and a missense mutation (p.G46R) in the PAH in a Japanese patient with phenylketonuria. *World journal of pediatrics: WJP*. 11:181-184.
- Okano Y et al. (2011). Molecular characterization of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency in Japan. *Journal of human genetics*. 56:306-312.
- Polak E et al. (2013). Phenylalanine hydroxylase deficiency in the Slovak population: genotype-phenotype correlations and genotype-based predictions of BH4-responsiveness. *Gene*. 526:347-355.
- Tao Y et al. (2021). Spectrum of PAH gene mutations and genotype-phenotype correlation in patients with phenylalanine hydroxylase deficiency from Shanxi province. *Brain Dev*. 43:220-229.
- Yan YS et al. (2016). [Analysis of large deletion of phenylalanine hydroxylase gene in Chinese patients with phenylketonuria]. *Zhonghua yi xue za zhi*. 96:1097-1102.



Historie produktu P055	
Verze	Změny
D1	Byla přidána jedna sonda pro PAH exon 6, jedna sonda pro PAH exon 12 (wild-type sekvence u mutace R408W). Jedna referenční sonda byla nahrazena.
C1	Nahrazeno sedm PAH sond a osm referenčních sond. Nové 88 a 96nt kontrolní fragmenty (QDX2).
B1	Navýšení PAH sond, ze 13 na 22. Nové kontrolní fragmenty.
A1	První vydání.

Provedení změn v popisu produktu
<p>Verze D1-06-CS1 – 25. října 2022 (04P)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Maroko bylo odstraněno ze seznamu zemí se statusem IVD.</li> </ul> <p>Verze D1-05-CS1 – 15. října 2021 (04P)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Popis produktu byl přizpůsoben nové šabloně .</li> <li>- Různé drobné změny v textu .</li> <li>- Pod tabulkou 1 a 2 přidáno varování pro SNP (sonda 201 nt).</li> <li>- Byla provedena malá korekce na ligačních místech 187 nt sondy a 283 nt sondy v tabulce 2.</li> <li>- Vybraná sekce publikace byla aktualizována .</li> <li>- Spojené království přidáno do seznamu zemí v Evropě, které přijímají značku CE .</li> </ul> <p>Verze D1-04-CS1 - 29. června 2020 (02P)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Předchozí verze dokumentu jsou k dispozici pouze v angličtině.</li> <li>- Popis produktu byl upraven a přizpůsoben nové šabloně.</li> <li>- Izrael byl přidán jako země, kde má produkt status IVD.</li> <li>- Ligační místa sond cílících na gen PAH byla aktualizována podle nové verze referenční sekvence NM.</li> <li>- NG referenční sekvence byla aktualizována.</li> <li>- Přidána poznámka k sondě pro PAH exon 3 (365 nt) ohledně možného vlivu SNP.</li> </ul> <p>Verze D1-03 - 17. července 2018 (04)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Popis produktu byl upraven a přizpůsoben nové šabloně.</li> <li>- Použití IVD zahrnuje nově Maroko.</li> <li>- Odstraněny informace z tabulky 1 a 2 o nových a změněných sondách ve verzi D1 ve srovnání s C1.</li> </ul> <p>Verze D1-02 - 4. dubna 2017 (03)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Popis produktu byl upraven a přizpůsoben nové šabloně.</li> <li>- Přidány nové publikace, které využívají P055.</li> </ul> <p>Verze D1-01 - 18. ledna 2016 (02)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Popis produktu byl upraven a přizpůsoben nové šabloně.</li> </ul> <p>Aktualizace seznamu vybraných publikací.</p>

Více informací: <a href="http://www.mrcholland.com">www.mrcholland.com</a> ; <a href="http://www.mrcholland.eu">www.mrcholland.eu</a>	
	MRC Holland bv; Willem Schoutenstraat 1 1057 DL, Amsterdam, Nizozemsko
E-mail	<a href="mailto:info@mrcholland.com">info@mrcholland.com</a> (informace a technické dotazy) <a href="mailto:order@mrcholland.com">order@mrcholland.com</a> (objednávky)
Telefon	+31 888 657 200

	EVROPA*  0344 IZRAEL
	VŠECHNY OSTATNÍ ZEMĚ

\* včetně členských (kandidátských) států EU a členských států Evropského sdružení volného obchodu (EFTA) a UK. Ve všech ostatních evropských zemích je tento produkt určen pro RUO.