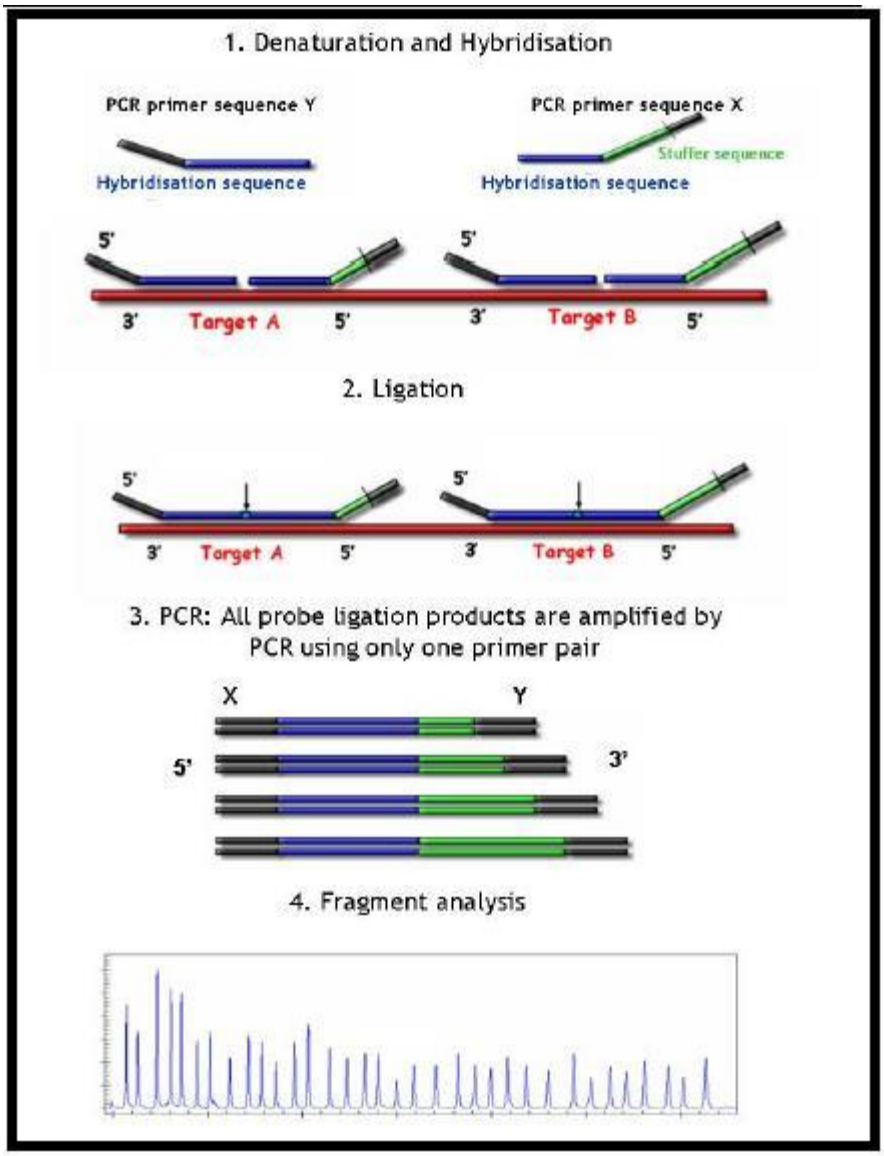
روش تکثیر پروب وابسته به الحاق چندتایی (MLPA)

تحولی شگرف در تشخیص دقیق و سریع بیماریهای ژنتیکی

روش MLPA یکی از جدیدترین و کارآمدترین روش های مولکولی برای تشخیص سریع و دقیق تعداد نسخه ژنی (deletion, duplication) و حتی جهش های نقطه ای در طیف وسیعی از بیماری های ژنتیکی انسانی می باشد. این روش قادر به سنجش کمی DNA و بررسی تعداد نسخه ژنی gene dosage در 50 تا 60 محل مختلف در یک واکنش ساده PCR می باشد. در این روش با طراحی مجموعه ای از پروب ها که هر کدام مکمل ناحیه مشخصی از ژنوم می باشند، تعداد نسخه ژنی (deletion,duplication)در یک منطقه را می توان مشخص نمود. اساس این روش بر پایه هیبرید شدن هر جفت پروب با توالی مشخصی در ژنوم به صورت اختصاصی می باشد. به طوری که حتی تغییر یک نوکلئوتید در محل اتصال 2 پروب قابل شناسایی است و از این خصوصیت می توان برای طراحی پروب های اختصاصی جهت بررسی جهش های نقطه ای شناخته شده نیز استفاده نمود. حسن روش MLPA در آن است که می توان تعداد نسخه ژنی (deletion,duplication) با محدوده نامشخص را به راحتی و سریع مشخص کرد، در صورتیکه در روش Real-Time می بایست محل حذف و یا اضافه شدگی ها مشخص باشد.

مراحل انجام MLPA



کاربرد روش MLPA

1. بررسی del/dup در ژنوم به ویژه:

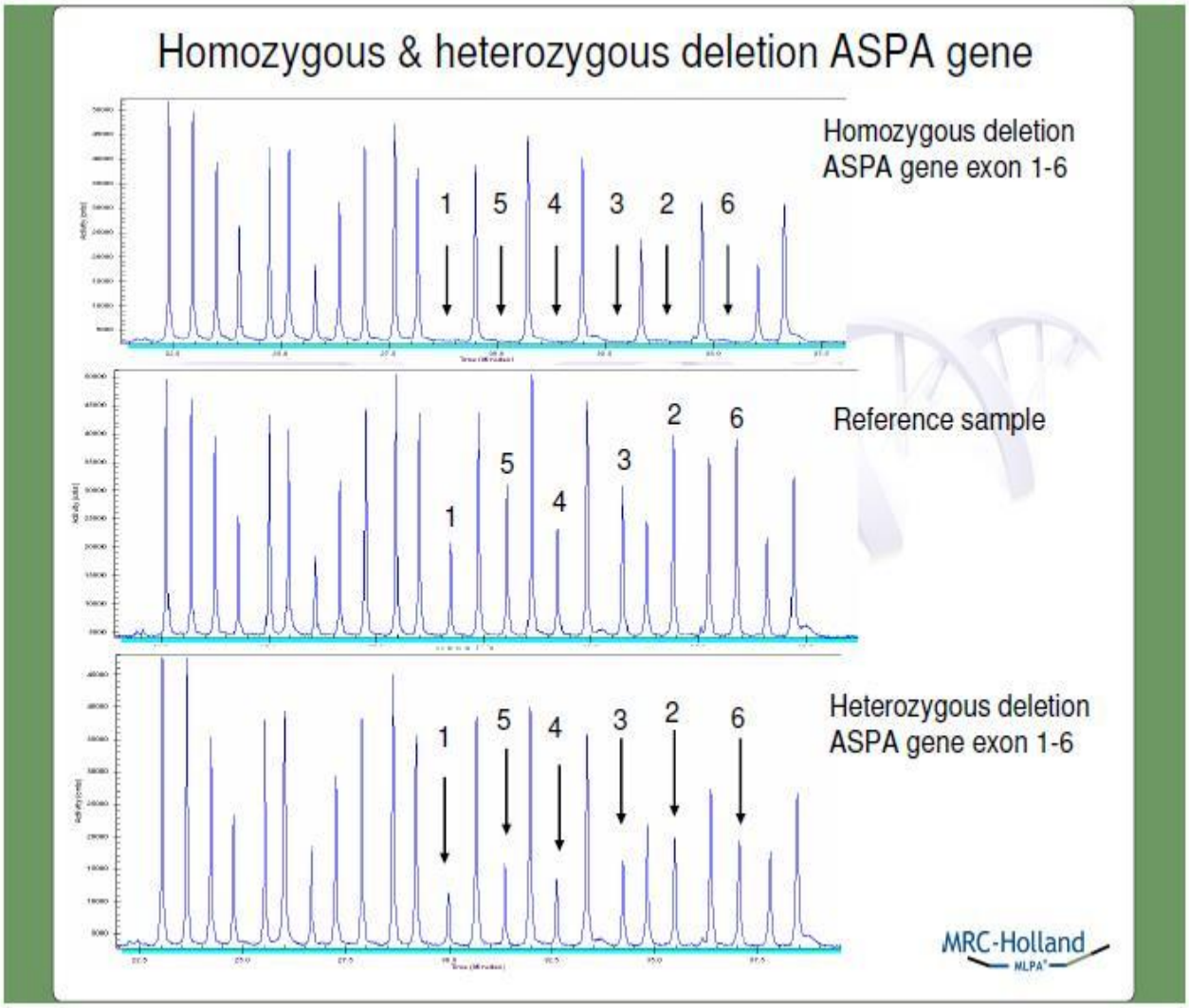
del/dup بزرگ با محدوده نامشخص

del/dup در برگیرنده اگزونهای متعدد مانند بررسی ژن دیستروفین در افراد مشکوک به دیستروفی عضلانی دوشن (با این روش علاوه بر تشخیص بیماران، به سادگی می توان ناقلین را شناسایی کرد).

بررسی تعداد نسخه ژنی در محل های خاصی در کروموزوم های مختلف جهت screening ژنهای مختلف.

2. بررسی جهش های نقطه ای و پلی مورفیسم های (SNP's) شناخته شده

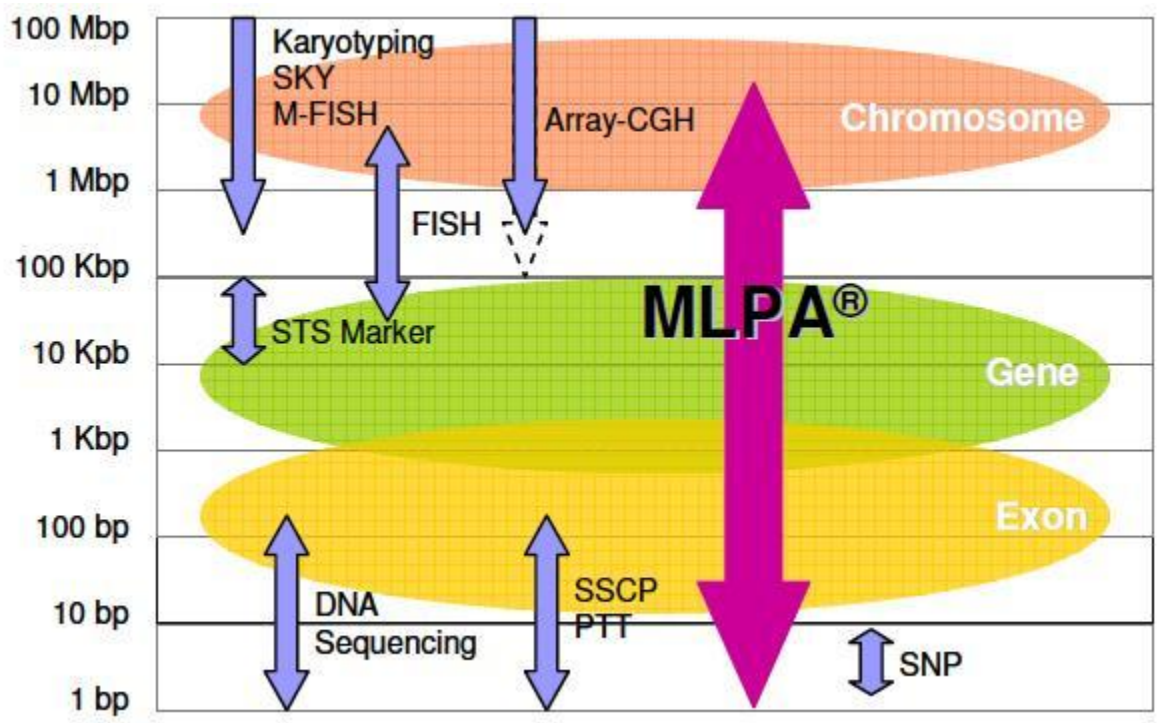
3. بررسی کمی mRNA
4. بررسی وضعیت متیلاسیون مناطق پروموتری و یا imprinted
5. بررسی DNA استخراج شده از بافت (paraffin imbedded یا formalin treated)



روش MLPA در مقایسه با سایر روشها:

1. روش هایی مثل تعیین توالی، SSCP ، DHPLC و ... که برای تشخیص جهش های نقطه ای مورد استفاده قرار می گیرند قادر به شناسایی تغییرات تعداد نسخه ژنی در محدوده وسیع در حد یک اگزون کامل نیستند.
2. روش FISH قادر به تشخیص جهش های کوچک نمی باشد.

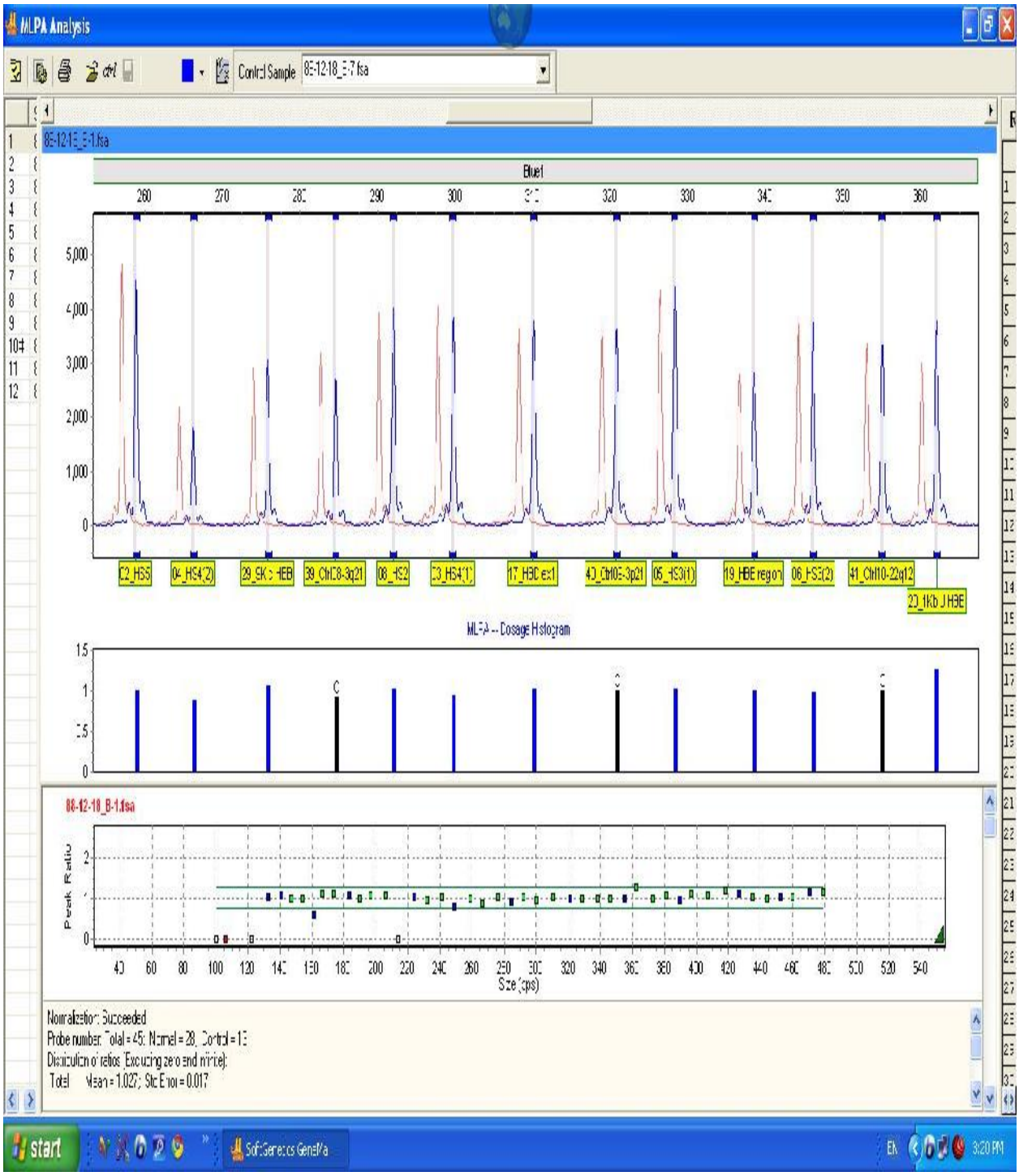
3. Southern blots قادر به شناسایی حذف های تا چند کیلو باز می باشد ولی :
نیازمند به مقدار DNA بسیار زیاد و با کیفیت خوب می باشد.
نیاز به استفاده از پروب های رادیو اکتیو است.
بسیار زمان بر و دشوار و پر هزینه می باشد.
4. Real-time PCR دارای حساسیت کم برای تغییرات کوچک در تعداد نسخه ژنی است و یک روش مولتی پلکس نمی باشد. محدوده عمل آن بسیار محدود است.



مزایای استفاده از MLPA :

1. امکان بررسی همزمان 40 تا 50 محل مختلف ژنومی در یک واکنش PCR
2. نیاز به میزان کم DNA
3. برای انجام این آزمایش نیاز به یک دستگاه ترموسایکلر و سیستم الکتروفورز کاپیلری (sequence type) می باشد. در صورت در دسترس نبودن سیستم الکتروفورز کاپیلری، محصول نهایی PCR را می توان در دمای 4 درجه نگهداری و به مراکز دیگر ارسال نمود.
4. سرعت جوابدهی با توجه به حجم اطلاعات به دست آمده، بالا می باشد. به طوری که می توان طی 24 ساعت کلیه مراحل تا تفسیر را انجام داد.

5. هزینه هر واکنش با توجه به حجم اطلاعات به دست آمده، بسیار مناسب می باشد.
6. این روش از دقت و قدرت (robustness) بالایی برخوردار است. زیرا فقط از یک جفت پرایمر برای انجام تکثیر استفاده می شود و مشاهده سیگنال در هر محل، حاصل هیبرید شدن 2 پروب مستقل با ویژگی بالا در حد یک نوکلئوتید می باشد.
7. روش کار یکسان برای کاربرد های گوناگون
8. تمامی مواد لازم در یک کیت موجود می باشد.


MLPA Analysis
Control Sample
Blue1
MLPA -- Dosage Histogram
Peak Ratio
Size (cps)
Normalization: Succeeded
start

کاربرد روزافزون

با توجه به مزایای این روش، کاربرد آن در زمینه بررسی مولکولی بیماری های مختلف در حال گسترش می باشد. اکنون MLPA در زمینه شناسایی ناقلین و تشخیص افراد مبتلا به بیماری های ژنتیک مختلف، به خصوص بیماری های ناشی از جهش های حذفی بزرگ و با محدوده ژنی متنوع مثل آلفا تالاسمی، بتا تالاسمی و دیستروفی عضلانی دوشن و... به کار می رود. در حال حاضر بیش از 300 کیت مختلف برای تشخیص بیماری های گوناگون و با اهداف تحقیقاتی در گروه های زیر موجود می باشد که لیست کامل آنها در سایت www.mrc-holland.com در دسترس می باشد. همچنین بر اساس نیاز و سفارش مشتریان امکان طراحی پروب برای مناطق دیگر ژنومی نیز وجود دارد.

1-prenatal & postnatal
2-neurogenetics & mental retardation
3-hereditary cancer
4-tumour characteisation
5-methylation analysis
6-pharmacogenetics
7-various genetic disorders
8-mRNA analysis
9-basic research

استفاده از MLPA در تعیین ناقلین و تشخیص قبل از تولد برای انواع بیماریهای زیر در این آزمایشگاه:

1. DMD
2. Spinal Muscular Dystrophy
3. Alpha Thalassemia
4. Beta Thalassemia
5. Mental Retardation
- Broad subtelomere screening
- Microdeletion syndromes
6. Prader-Willi/Angelman
7. CFTR
8. Hemophilia
9. Cancer
- Breast cancer
- Colon cancer, hereditary non-polyposis (HNPCC)
10. PKU
11. Deafness
12. aneuploidy
13. Others

منبع : برگرفته ازسایت آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی