

به نام خداوند بخشنده مهربان

روشها و
پروتکل‌های
ژنتیکی



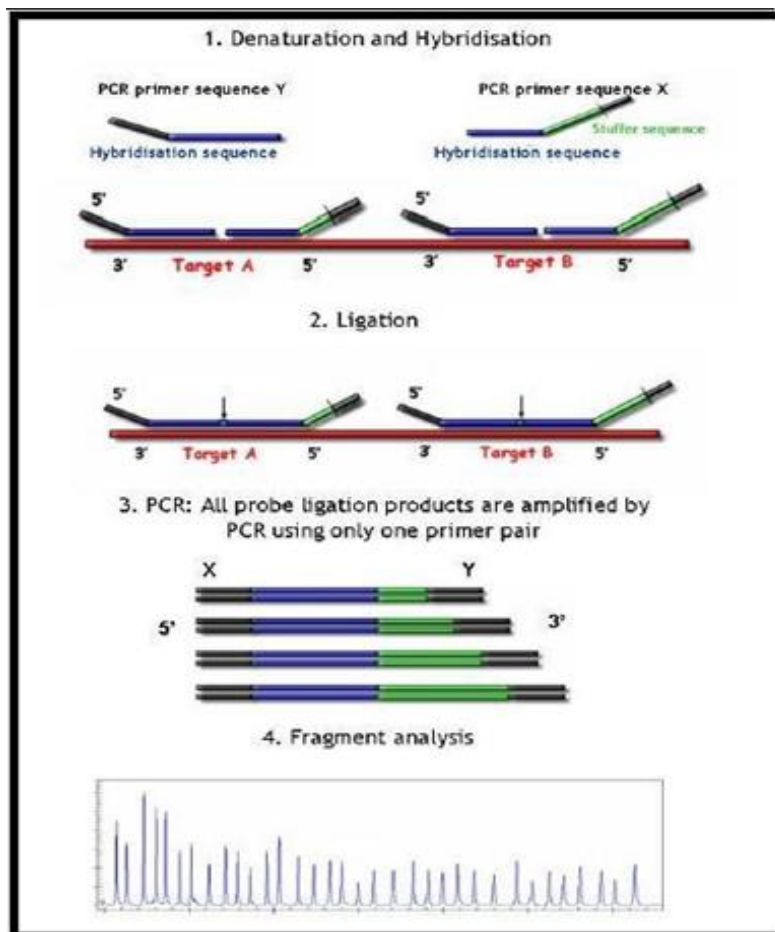
ژنتیکا

www.genetica.ir

معرفی کامل تکنیک MLPA (Multiplex Ligation-dependent probe amplification)

روش MLPA یکی از جدیدترین و کارآمدترین روش های مولکولی برای تشخیص سریع و دقیق تعداد نسخه ژنی (duplication, deletion) 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 ۵۰ تا ۶۰ 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 ۲ 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.

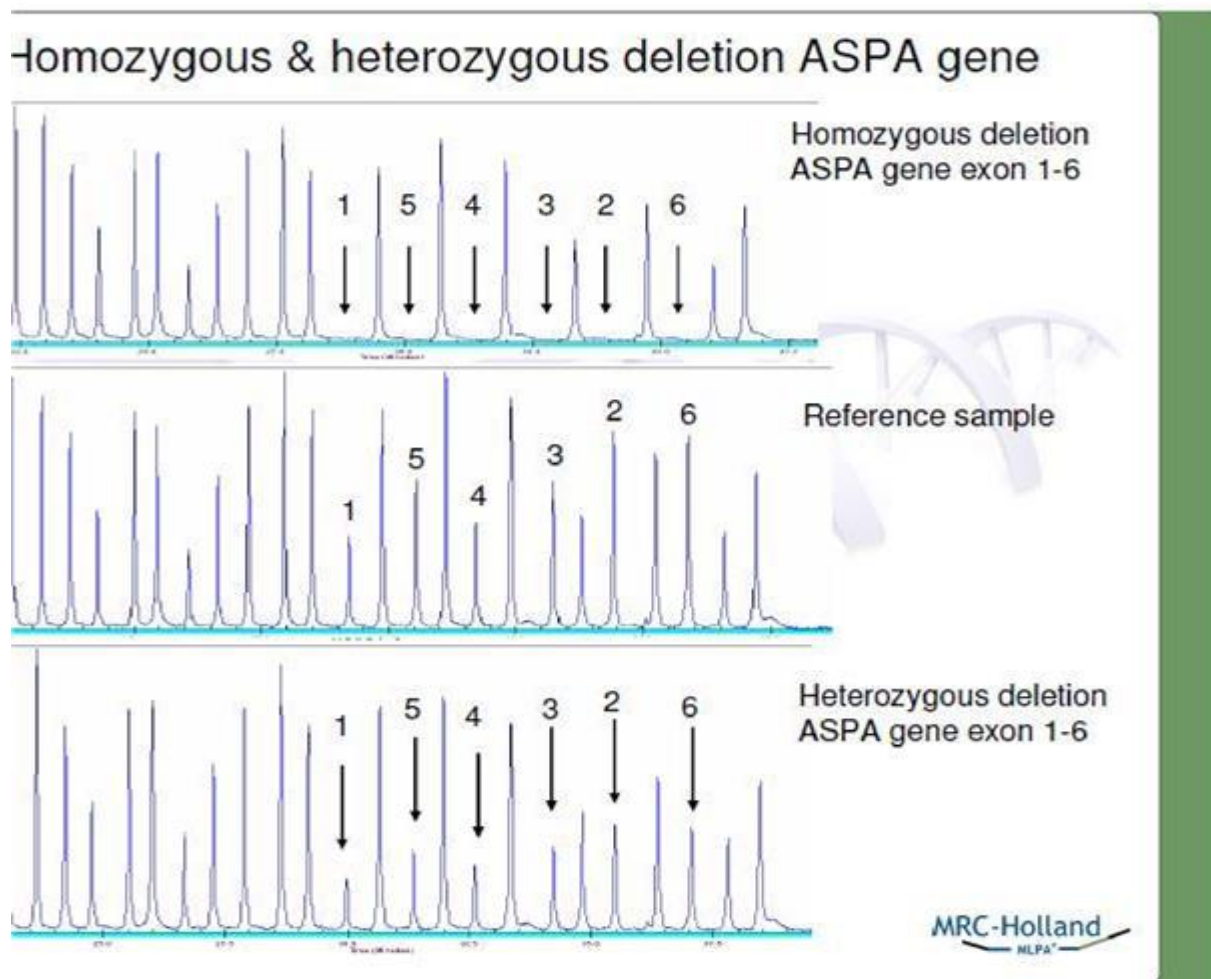
مراحل انجام MLPA



کاربرد روش MLPA

بررسی del/dup در ژنوم به ویژه:

- del/dup بزرگ با محدوده نامشخص
 - در del/dup 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.
- بررسی جهش های نقطه ای و پلی مورفیسم های (SNP's) شناخته شده بررسی کمی mRNA
بررسی وضعیت متیلاسیون مناطق پرموتری و یا imprinted بررسی DNA استخراج شده از بافت (paraffin imbedded یا formalin treated)



روش MLPA در مقایسه با سایر روشها:

روش هایی مثل تعیین توالی، DHPLC، SSCP 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.

روش FISH قادر به تشخیص جهش های کوچک نمی باشد.

Southern blots قادر به شناسایی حذف های تا چند کیلو باز می باشد ولی:

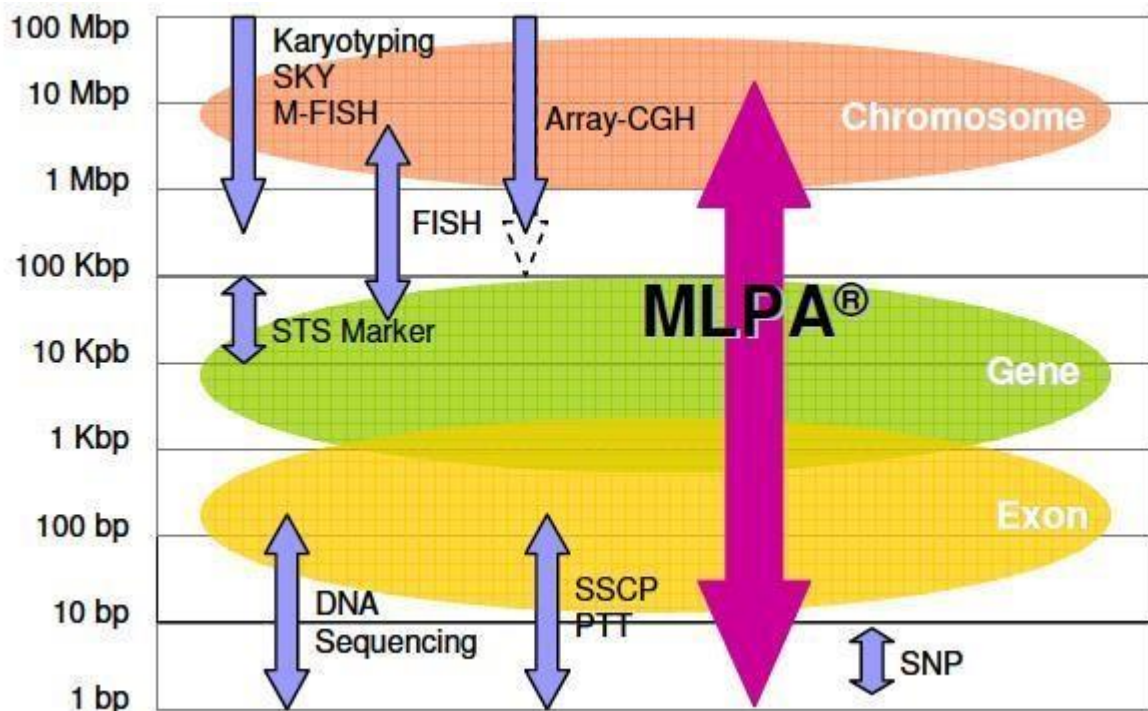
نیازمند به مقدار DNA بسیار زیاد و با کیفیت خوب می باشد.

نیاز به استفاده از پروب های رادیو اکتیو است.

بسیار زمان بر و دشوار و پرهزینه می باشد.

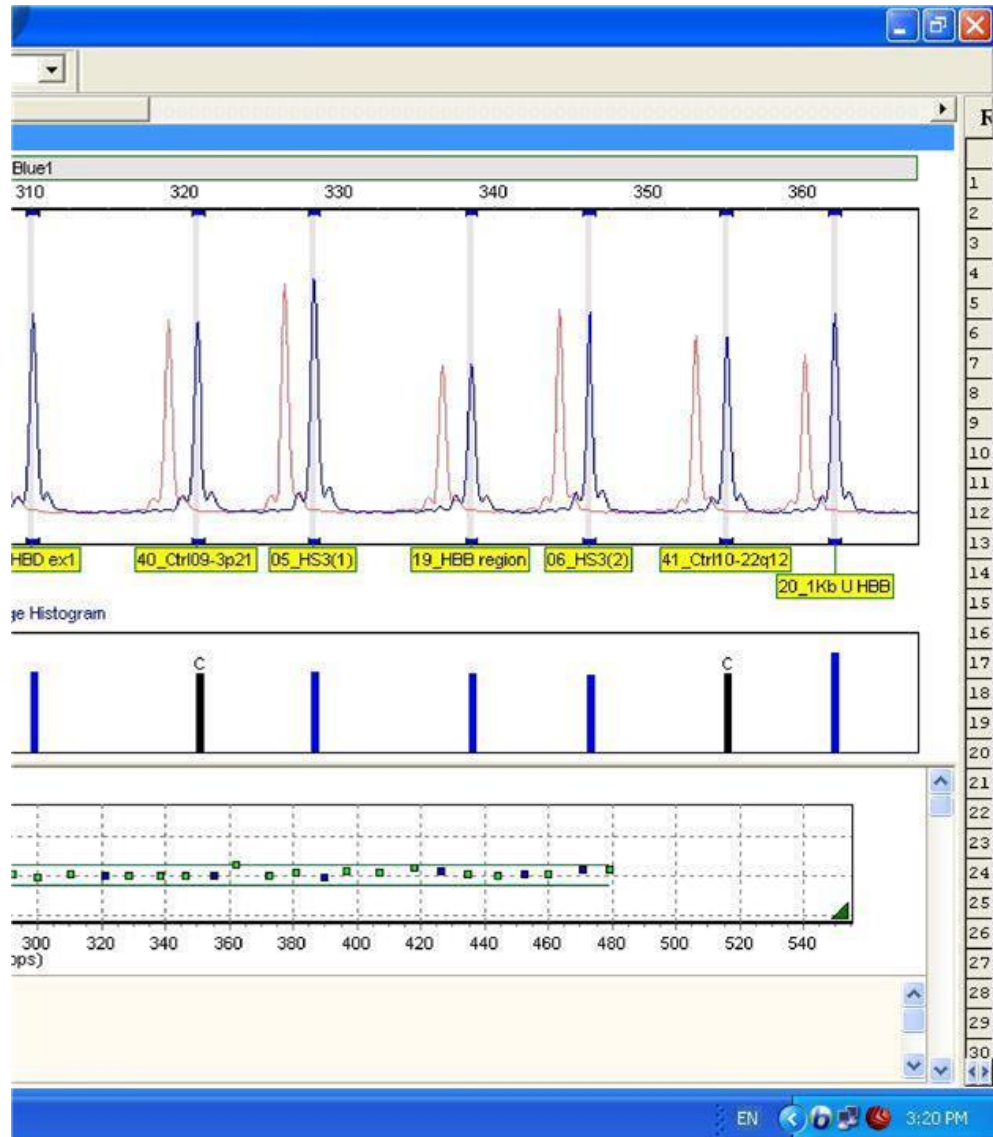
Real-time PCR دارای حساسیت کم برای تغییرات کوچک در تعداد نسخه ژنی است و یک روش مولتی پلکس نمی باشد.

محدوده عمل آن بسیار محدود است.



مزایای استفاده از : MLPA

امکان بررسی همزمان ۴۰ تا ۵۰ محل مختلف ژنومی در یک واکنش PCR نیاز به میزان کم DNA این روش از دقت و قدرت بالایی برخوردار است. زیرا فقط از یک جفت پرایمر برای انجام تکثیر استفاده می شود و مشاهده سیگنال در هر محل، حاصل هیبرید شدن ۲ پروب مستقل با ویژگی بالا در حد یک نوکلئوتید می باشد.



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 ۳۰۰ 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.

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

DMD

Spinal Muscular Dystrophy

Alpha Thalassemia

Beta Thalassemia

Mental Retardation

Broad subtelomere screening

Microdeletion syndromes

Prader-Willi/Angelman CFTR Hemophilia

Cancer

Breast cancer

Colon cancer, hereditary non-polyposis (HNPCC)

PKU Deafness aneuploidy