دکتر محمد امین طباطبائی فر، زهرا حجازی، عاطفه یداللهی
مسئول تحقیق و توسعه آزمایشگاه اریترون

تشخیص سریع و دقیق بیماری های ژنتیکی با روش جدید MLPA

خلاصه

روش MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) یکی از جدیدترین تکنیک های مولکولی است که با بررسی تعداد نسخه ژنی، حذف ها و دوتاشدگی ها (deletion & duplication) و حتی جهش های نقطه ای در تشخیص سریع و دقیق طیف وسیعی از بیماری های ژنتیکی کاربرد دارد. در این تکنیک که مبتنی بر اتصال هر جفت پروب اختصاصی به توالی مشخصی در ژنوم است، امکان بررسی همزمان ۵۰ قطعه مختلف نوکلئوتیدی در یک واکنش وجود دارد. امروزه این تکنیک برای تشخیص سریع بیماری های ژنتیکی قبل از تولد کاربرد وسیعی دارد.

تکنیک MLPA

اساس روش MLPA بر پایه هیبرید شدن به صورت اختصاصی است، به طوری که حتی تغییر یک نوکلئوتید در محل اتصال ۲پروب قابل شناسایی است. با استفاده از مجموعه ای از پروب ها که هر کدام شامل دو الیگونوکلئوتید و مکمل ناحیه مشخصی از ژنوم هستند، تعداد نسخه ژنی در۴۰تا ۵۰ محل مختلف را می توان در یک واکنش ساده PCR مشخص کرد. امروزه MLPA در زمینه های مختلفی مانند شناسایی سرطان ها، تشخیص ناقلین و افراد مبتلا به بیماری های ژنتیک، به خصوص آلفا تالاسمی، بتا تالاسمی و دیستروفی عضلانی دوشن و... به کار می رود. این تکنیک برای تشخیص سریع بیماری های ژنتیکی قبل از تولد مانند سندرم داون، تریزومی ۱۸ یا تریزومی ۱۳ و سایر ناهنجاری های کروموزومی بر روی نمونه های آمنیوسنتز و یا پرزهای جفتی (CVS) کاربرد وسیعی دارد.

در شرایطی که زمان برای ختم بارداری واقعاً محدود باشد، به وسیله تکنیک های MLPA و QF-PCR این امکان وجود دارد تا در مدت یک روز وضعیت جنین از نظر ناهنجاری های شایع کروموزومی بررسی شود.

مزایای استفاده از MLPA

۱-امکان بررسی همزمان ۵۰ محل مختلف ژنومی در یک واکنش PCR
۲- نیاز به میزان کم DNA
۳-سرعت جوابدهی بالا
٤- هزینه بسیار مناسب
۵- به علت اختصاصی بودن بالا، دارای دقت بالا
٦- استفاده از یک جفت پرایمر

کاربرد روش MLPA

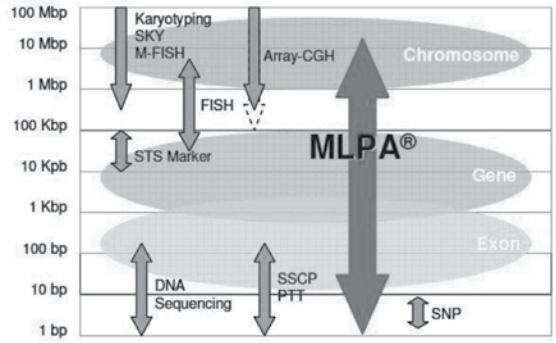
۱-بررسی del/dup در ژنوم
۲- بررسی تعداد نسخه ژنی جهت غربالگری
۳- بررسی جهش های نقطه ای و پلی مورفیسم های (SNP's)
٤- بررسی وضعیت متیلاسیون مناطق پروموتری و یا imprinted
۵- تشخیص آنیوپلوئیدی

مزیت روش MLPA نسبت به دیگر روش ها

● به وسیله این تکنیک می توان تعداد نسخه ژنی (deletion,duplication) را به راحتی و سریع مشخص کرد، در صورتیکه Real-time PCR دارای حساسیت کم برای تغییرات کوچک است و باید محل حذف و یا اضافه شدگی ها مشخص باشد.

● برای تشخیص جهش های نقطه ای از روش های تعیین توالی مانند SSCP ، DHPLCو... استفاده می شود. این تکنیک ها قادربه شناسایی تغییرات تعداد نسخه ژنی در حد یک اگزون کامل نیستند.

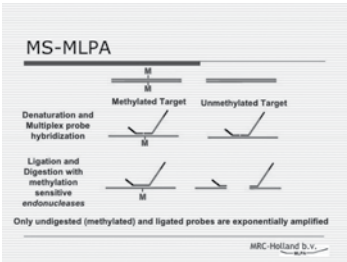
● تکنیک FISH قادر به تشخیص جهش های کوچک نیست.



● Southern blots تنها قادربه تشخیص حذف های تا چند کیلو باز است که نیازمند به مقدار DNA با غلظت و میزان بالا و پروب های رادیواکتیو که بسیار زمان بر و پر هزینه است.

(Methilation Spesific–MLPA) MS–MLPA

در این روش، تغییرات متیلاسیون علاوه بر تغییرات تعدادی در یک واکنش انجام می شود. کاربرد این روش در بیماری های با تغییرات اپی ژنتیکی و علامت گذاری ژنومی (Imprinting) است، از جمله در مواردی مانند سندروم های پرادرویلی/آنجلمن و بک ویت وایدمن/راسل سیلور استفاده می شود. در این روش در صورت متیلاسیون نقطه مورد نظر، امکان برش آنزیمی وجود ندارد و در نهایت پروب ها به یکدیگر منتقل شده و محصول PCR وجود خواهد داشت.



روش انجام MLPA

تکنیک MLPA شامل ۵ مرحله است :

۱- واسرشته کردن DNA و واکنش هیبریداسیون بین رشته های DNA و مخلوط پروب ها

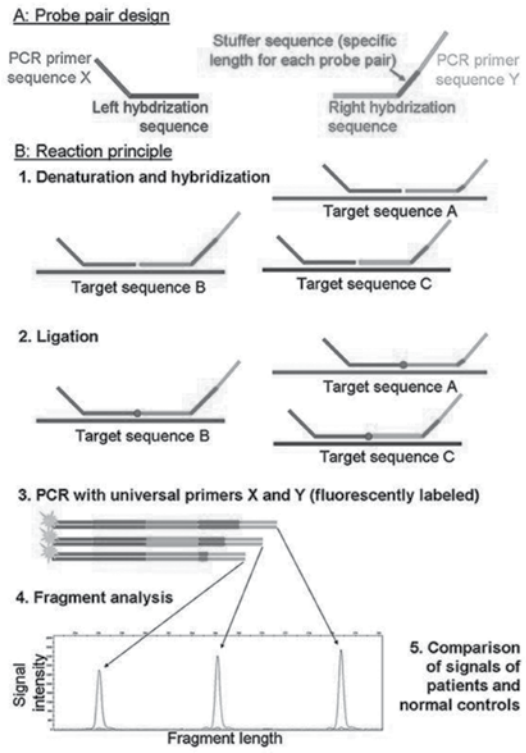
۲- واکنش چسبیدن به وسیله آنزیم لیگاز

۳- انجام واکنش PCR با پرایمرهای نشاندار

٤- جداسازی قطعات با روش الکتروفورز

۵- آنالیز یافته ها

نخست، رشته های DNA در شرایط گرمائی ازهم جدا می شود. برای هیبرید شدن پروب ها با توالی مکمل خود، مخلوط DNA و پروب ها به مدت یک شب در شرایط دمائی مناسب در روی رشته DNA قرار می گیرد. در انتهای 5'هر یک از پروب ها توالی مکمل پرایمرهای مشترک لازم برای انجام PCR اضافه شده است. این پروب ها در مرحله هیبرید در کنار هم به توالی هدف در روی الگو جفت شده و در



صورتی که الگو طبیعی و جفت شدن کامل باشد توسط آنزیم لیگاز به هم چسبانده می شود. تنها آن گروه از رشته های پروب که در کنار هم جفت شده و بهم متصل شده باشند در طی واکنش PCR، آمادگی تکثیر شدن دارند. اگر پروب ها به توالی هدف نچسبند واکنش چسباندن آنزیمی صورت نپذیرفته و در واکنش PCR، پروب مربوط به ناحیه مذکور تکثیر نخواهد شد. قطعات ناشی از تکثیر پروب های جفت متصل شده توسط تکنیک الکتروفورز در لوله های موئینه بررسی می شوند. نتیجه، منحنی هائی خواهد بود که نسبت ارتفاع و سطح زیرین منحنی ها در قیاس با منحنی های کنترل بیانگر تعداد نسخه های غیر طبیعی الگوهای تکثیر شده است.

منابع

1-Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G (2002). "Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification". Nucleic Acids Res. 30 (12): e57. doi:10.1093/nar/gnf056. PMC 117299. PMID 12060695.

2- Illanes S, Avent N, Soothill PW (2005). "Cell-free fetal DNA in maternal plasma: an important advance to link fetal genetics to obstetric ultrasound". Ultrasound Obstet. Gynecol. 25 (4): 317–322. doi:10.1002/uog.1881. PMID 15789415

3- Janssen B, Hartmann C, Scholz V, Jauch A, Zschocke J. MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls. Neurogenetics. 2005;6:29-35

4-Madrigal I, Rodriguez-Revenga L, Badenas C, Sanchez A, Martinez F, Fernandez I, et al. MLPA as first screening method for the detection of micro-duplications and micro-deletions in patients with X-linked mental retardation. Genet Med. 2007;9:117-12

5-Applications of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) method in diagnosis of cancer and genetic disorders M.R Noori Daloii PhD , F Khordadpoor-Deilamani MSc