دکتر علیرضا اطمینان،متخصص آسیب شناسی تشریحی و بالینی
از دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تکنیک MLPA

روش MLPA در واقع یک نوع Multiplex PCR است. در این روش با استفاده از یک جفت پرایمر، می توان چند نوع DNA مختلف را تکثیر کرد.MLPA راهی نوین برای آنالیز موتاسیون های ژن ها پیشنهاد می کند. توالی یابی (Sequencing) کل ژن با استفاده از کیت MLPA که با طراحی یکسری پروب کل ژن را پوشش می دهد و تنها با گذاشتن یک Multiplex PCR به طورهمزمان کل موتاسیون های ژن مورد نظر - اعم از انواع Deletion، Duplication و Insertion ها -را مورد بررسی قرار می دهد.

مزایای MLPA

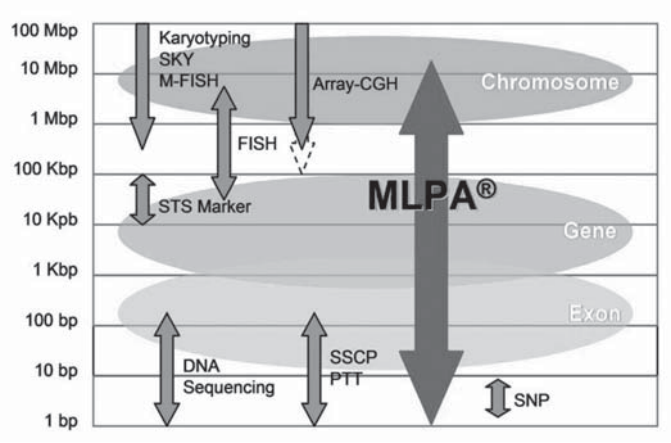
• روش MLPA موارد استفاده ی زیادی دارد ، به طوری که تنها تفاوت بین بررسی های مختلف در کیت ها Prob mix به کار رفته است.

• MLPA یک روش Multiplex است به نحوی که در یک واکنش، اطلاعاتی جهت حداقل آنالیز ٤٥ بخش از کروموزوم های هدف را فراهم می کند. در بیشتر نمونه ها استفاده از این واکنش برای پاسخگویی به پرسش های اختصاصی متخصصان بالینی کافی است.

• MLPA روشی است کمابیش ارزان (در مقایسه با Full genome sequencing).

• MLPA به آسانی انجام می شود، و دارای تکرارپذیری خوبی است، و همزمان نمونه های فراوانی را می توان بررسی کرد.

شکل(۱)



• MLPAروش حساسی است: تنها ۲۰ نانو گرم از DNA انسان مورد نیاز است و نتایج به اندازه DNA مصرف شده بستگی ندارد.

• MLPA قادر به شناسایی توالی های ژنی است که در یک نوکلیوتید با هم تفاوت دارند و می تواند اختلاف بین شمار کپی های کوچک را شناسایی کند .

• این روش توانایی شناسایی توالی هایی که تنها از حدود ٦٠ نوکلیوتید تشکیل شده است دارد و در نتیجه می تواند برای شناسایی Deletion و Duplicationهای یک اگزون منفرد به کار رود.

• تنها وسایل لازم جهت انجام این روش یک ترموسیکلر و تجهیزات الکتروفورز تعیین توالیDNA (۳۱۳۰) ABI و کیت MLPA است و البته جهت تفسیر نتایج از نرم افزارهای مختص خود کیت استفاده می شود.

شکل(۱)- مقایسه محدوده تشخیصی روش MLPA با سایر روش های تشخیص ژنتیکی است.

MLPA می تواند محدوده وسیعی از تغییرات ژنومیک از جهش های نقطه ای منفرد (single point mutations) تا حذف و اضافه های بزرگ کروموزومی را تشخیص دهد.

MLPA یک روش پیشرفته برای مشخص کردن شمار رونویسی های توالی های ژنومیک DNA (حداکثر ۵۰ کپی) در یک واکنش Single Multiple PCR است. واکنش MLPA منجر به تولید مخلوطی از قطعات تقویت شده DNA(بین ۱۰۰-۵۰۰ نوکلیوتید - nt) می شود که میتوان با الکتروفورز مویینه (capilary electrophoresis) آنها را از هم جدا کرده و اندازه گیری نمود. در هر دوره کاری(RUN) این روش می توان تا ۹٦ نمونه را به گونه

همزمان ارزیابی کرد و نتایج را در عرض بیست ساعت به دست آورد.

اساس تکنیک MLPA تکثیر نمونه DNA در واکنش PCR نیست، بلکه این پروب های MLPA هستند که با نمونه DNA هیبرید می شوند. هر پروب MLPA شامل دو پروب الیگونوکلیوتید است که باید با DNA ی هدف متناظر(adjacent) خود برای اتصال (Ligation) موفقیت آمیز هیبرید شود. در این روش تنها پروب های لیگاند شده توسط PCR تکثیر می شوند. به وارون PCR مولتی پلکس استاندارد در این روش تنها یک جفت پرایمر PCR به کار می رود، به دقت بیشتر سیستم می انجامد. اندازه نسبی هر کدام از فرآورده های پروب های تکثیر شده بستگی به اندازه نسبی توالی های هر پروب در نمونه DNA دارد، و شمار رونویسیهای Aberrant را میتوان با سنجیدن نمونه های بیمار با نمونه های مرجع ردیابی کرد.

کوتاه می توان گفت که در این روش تنها پروب ها تکثیر می شوند. پروب ها هنگامی تکثیر پذیرخواهند بود که دو بخش آن با هم به خوبی پیوند شده باشند و دو قسمت پروب موقعی به هم پیوند می شوند، که هر قسمت آن روی تکه ی متناظر خود در رشته DNA بخوبی نشسته باشد و به اصطلاح Adjuct شده باشد. اگر در تکه مورد نظر از ژن زیر بررسی دارای جهش Deletion باشد، بسته به اینکه این جهش در یک یا هر دو آلل آن ژن باشد، اندازه ی فرآورده ی بدست آمده می تواند صفر یا بخشی از میزان فرآورده بدست آمده از نمونه مرجع خواهد بود. در صورتی که جهش از نوع Duplication باشد هم باز با توجه به هوموزیگوت یا هتروزیگوت بودن جهش ژنتیکی میزان محصول بدست آمده نسبت به نمونه مرجع بیشتر خواهد بود که در بخش تفسیر نتایج به خواهیم پرداخت.

درشکل(۲)بعد از اینکه پروب ها به ناحیه مکمل خود در رشته DNA چسبیدند، توسط آنزیم لیگاز این پروب ها به هم پیوسته شده و سپس پروب ها با واکنش زنجیره ای پلی مراز PCR تکثیر می شوند.

نتیجه های MLPA به عوامل مختلفی بستگی دارد که شامل:

- ورزیدگی در آماده سازی نمونه های بیمار و مرجع (experimental setup)
- خلوص نمونه (setup purity)
- تنظیمات دستگاه و روش نرمالیزاسیون انتخابی

نمونه های مرجع نمونه هایی هستند که در آنها توالی های هدف به نظر می رسد که حاوی یک کپی طبیعی است.بیشتر، نمونه هایی از DNA است که از افراد طبیعی بدست آمده است. بهتر است که نمونه های مرجع از بافت مشابه برداشته شود، و با روش مشابهی DNA آن استخراج شود. نیاز به نمونه های مرجع چندگانه ای برای برآورد تکرار پذیری هر پروب MLPA در هر RUN کاری است.

برای بهره وری از این روش جهت تکثیر پروب DNA نمونه باید :

- نمونه های آزمایش (test) و مرجع(reference) را انتخاب کنیم.
- دست کم از۳ نمونه ی مرجع در هر RUN کاری MLPA باید استفاده شود.این نمونه ها ی مرجع باید به صورت تصادفی(randomly) در plate های نمونه قرار داده شود، تا تغییرات (variation) به حداقل برسد.به ازای هر ۷ نمونه ی آزمایش بهتر است که یک نمونه ی مرجع هم قرار دهیم.
- یک کنترل منفی (No DNA control) را هم باید در واکنش شرکت دهیم. این نمونه کنترل منفی شامل واکنش MLPA روی dH۲O یا TE (۱۰ mM Tris-HCL , pH ۸,۲ + ۰,۱ mM EDTA) به جای DNA است که می تواند آلودگی احتمالی dH۲O و TE و رآژنت های MLPA یا معرف های الکتروفورز یا مویینه ها را با DNA آشکار سازد.
- گرچه بایسته نیست ولی در توان بهتر است که نمونه های کنترل مثبت را هم در دستگاه قرار دهیم .

فرایند انجام کار

- آماده سازی نمونه ها (Sample treatment)

پدیدآوران روش MLPA سفارش می کنند که ۵۰ الی ۱۰۰ نانوگرم از DNA کروموزوم انسان در ۵ میکرو

لیتر برای هــر واکنش MLPA به کار رود. شیوه ی بدســت آوردن DNA (روش اســخراج و ذخیــره آن) می توانــد روی نتایــج MLPA تاثیر بگذارد. از آنجا که تاثیر آلوده کننده ها ثابت و تکرار پذیر است، اگر نمونه ها به روش مشــخص و دقیقی به دســت آیــد، این اثر ناهنجــار ازمیان خواهد رفت. افزون برآن ســفارش می شــود که غلظت های همسانی از DNA در نمونه های آزمایش/ مرجع به کار رود تــا تغییراتی که ناشــی از آلودگی های احتمالی است به حداقل برسد.

• تکنیک MLPA نیاز به روش یا کیت اختصاصی برای استخراج DNA ندارد. با وجود این مهم است که روش اســتخراج مورد اســتفاده اندازه های بالایــی از آلوده کننده ها مانند نمک را بر جا نگذارد. استفاده از خون هپارینه سفارش نمی شــود. اندازه های اندک هپارین به سختی از نمونه های DNA آماده شده جدا می شود و بدین روی مایــه ی نارســایی در واکنش PCR-MLPA می شــود. برای نمونه هایی کــه از بافــت پارافینــه (paraffin-embedded) جدا می شوند سفارش می شود که برای نمونه های مرجع نیز از همان بافت استفاده شود.

• DNA را در TE حل می کنیم. pH نمونه DNA، برای پیشگیری از پورین زدایی (depurination)، در هنگامه ی حرارت دیدن نخستین (۹۸ درجه سانتی گراد) باید بین ۸ الی ۸/۵ باشد.

• نمونه های مرجع/ کنترل را باید به انــدازه های کوچک بخش کنیم و DNA بدست آمده را در ۲۰ - درجه ســانتیگراد نگه داریــم. گرچه DNA خیلی پایدار است، زمانی که در TE حل می شود نگهداری و ذخیره در ٤ درجه ســانتی گراد برای چندین سال بایســته نیست. آلودگی با میکروارگانیســم ها و mould ها مــی تواند مایه ی تباهی نمونه ها شود.

• اگر لازم بود DNA در TE رقیق می شود تا ذخیره (working stock) بــه میزان ۲۰-۱۰ نانوگرم / میکرولیتر به دســت آید. کاهش انــدازه نمونه DNA ، مــی تواند باعث کاهش میــزان ناخالصی ها واثربخشی خوبی روی نتایج MLPA داشته باشد.

• هــر گاه غلظــت DNA کمتر از ٤ نانوگرم / میکرولیتر باشــد، ته نشــین کــردن (precipitation) با اتانول ســفارش می شــود. گلیکوژن می تواند به عنوان یک حامل در رسوب (precipitation) اتانول اســتفاده شود. تغلیظ نمونه ها با تبخیر، برای نمونه ، با استفاده از Speed vac ممکن است منجر به غلظت بالای EDTA شود که نتایج MLPA را تحت تاثیر می گذارد.

واکنش MLPA DNA detection / quantification

برای این واکنش نیاز به یک ترموســایکلر با دمای در محدوده ی ۱۰۵-۹۹ درجه سانتی گراد است. لوله های ۰/۲ mlPCR برای این کار شایسته است.

• واسرشت سازی DNA (DNA denaturation)- روز اول

• لولــه های ۰/۲ mlیا strip ها یــا plateها را علامت(lable) گذاری می کنیم.

• ۵µl از اســتوک DNA working stock را بــه هــر لولــه می افزاییم. بــرای واکنــش No DNA control از TE/ dH۲O استفاده می کنیم

• لولــه هــا را در یک ترموســایکلر قــرار داده و برنامه MLPA program را start می کنیــم. نمونــه DNA در عرض ۵ دقیقه در دمای ۹۸ درجه سانتی گراد واسرشت میشود. و سپس نمونه ها پیش از باز کردن درپوش ترموسایکلر تا ۲۵ درجه سانتی گراد سرد می شوند.

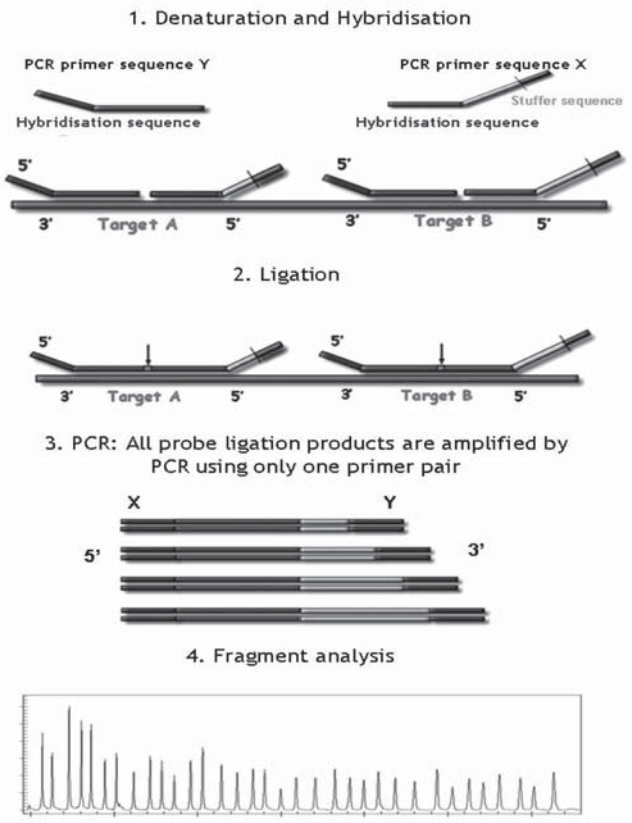
واکنش هیبریدیزاسیون - روز اول

• بــرای هر واکنش باید یــک hybridization master mix که شــامل ۱/۵ µlبافر MLPA که دارای درپوش زرد است به اضافه ۱/۵ µlprobmix(با درپوش ســیاه) اســت تهیه می کنیم و آنها را با پیپت کردن و ورتکس (vortex) خوب مخلوط می کنیم.

• وقتی که ترموســایکلر به ۲۵ درجه ســانتی گراد رســید ۳ µl از hybridization master mix را بــه هر لوله نمونه اضافه کرده و آن ها را با پیپت کردن به خوبی با هم مخلوط می کنیم.

• برنامه ی ترموسایکلر را ادامه می دهیم: یک دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد و سپس ۲۰-۱٦ ساعت در ٦۰ درجه سانتی گراد انکوبه می کنیم.

شکل۲)



واکنش پیوستن(Ligation reaction) - روز دوم

• ابتدا یـک Ligase master mix تهیه مـی کنیم که برای هر واکنش شامل: ۳ µl از بافر ligase-۶۵ A (با درپوش ترانسپارنت) + ۳ µl از بافـر Bligase-۶۵ (درپوش سـفید) +۲۵µl از dH۲O است.با پیپت کردن یا ورتکس آنها را با هم مخلوط می کنیم.

• ۱ µlازligase-۶۵ (درپوش سـبز) برای هر واکنش به Ligase master mix اضافه می شـود و به آرامی با پیپت کردن آنها را با هم مخلوط می کنیم.(محلول آنزیمی را هرگز نباید ورتکس کنیم)

• برنامه ترموسـایکلر را ادامه می دهیم: در ۵۴ درجه سانتی گراد آن را متوقف می کنیم.

• وقتی نمونه ها به ۵۴ درجه سانتی گراد رسیدن ۳۲µl از Ligase master mix را به هر لوله ی واکنش اضافه می کنیم. با پیپت کردن به آرامی آنها را با هم مخلوط می کنیم.

• برنامه ترموسـایکلر را ادامه می دهیـم : ۱۵ دقیقه در ۵۴ درجه سـانتی گراد فرایند پیوسـتن - Ligation reaction- و به‌دنبال آن ۵ دقیقـه در ۹۸ درجـه سـانتی گراد برای غیر فعال سـازی آنزیم ligase -۶۵ توسـط حـرارت آن را انکوبه می کنیم و سـپس در ۱۵ درجه سانتی گراد ترموسایکلر را متوقف می کنیم.

واکنش PCR- روز دوم

• لولـه هـای تازه بـرای واکنش PCR برگزیـده و آن هـا را نشـان می کنیم.

• بافـر مخلـوط PCR را تهیـه می کنیـم که برای هر واکنش شـامل: ٤µl از بافـر SALSA PCR همراه بـا ۲٦µl از dH۲O اسـت.آنها را اندکـی بـا ورتکـس بـا هـم در می آمیزیم(مخلوط می کنیم).

• ۳۰ µl از بافر درآمیخته (مخلوط) PCR را به هر لوله می افزاییم.

• در دمای اتـاق ۱۰ µl از محلول Ligation را به لوله ی PCR وابسته منتقل می کنیم.

• یـک Polymerase master mix را به صـورت زیر تهیه برای هر واکنش می کنیم:

۲µl از پرایمرهای PCRSALSA (درپوش قهـوه ای) + ۲µl بافر رقیق کننـده آنزیم SALSA (درپوش آبی) + ۵/۵ µl از dH۲O + ۰,۵µl از پلی مـراز SALSA (درپـوش نارنجی). آنهـا را با پیپت کردن به آرامی مخلوط می کنیم و تا زمان اسـتفاده آنها را در یخچال نگهداری می کنیم.

• برنامـه ی ترموسـایکلر را ادامه می دهیم. ترموسایکلر را در ٦۰ درجه سـانتی گراد متوقف کرده و لوله های PCR را داخـل ترموسـایکلر قـرار می دهیم.

• هنگامـی که ایـن لوله ها در ٦۰ درجه سـانتی گراد داخل ترموسایکلر هسـتند ۱۰ µl از مخلوط پلیمراز را به هر لوله اضافه می کنیم و به آرامی آن ها را بـا پیپتاژ کردن مخلـوط می نماییم. و بلافاصله برنامه ترموسـایکلر را به صورت زیر ادامه می دهیم:

۳۵ سیکل شامل:
۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد
۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی گراد
۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد
و سپس بعد از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در ۷۲ درجه سانتی گراد به برنامه خاتمه داده و در ۱۵ درجه سانتی گراد آنرا متوقف می کنیم.شکل(۳).

جداسازی قطعات (Fragment separation)

اندازه واکنش MLPA PCR،وضعیت RUN دستگاه، و نشان های فلورسنت که برای آنالیز لازم است تماما بستگی به نوع دستگاه الکتروفورز مویینه یا دستگاه ژل الکتروفورز به کار رفته دارد.برای این که جداسازی قطعات به خوبی انجام شود اغلب لازم است که تنظیمات اولیه دستگاه در وضعیت مطلوبی قرار داده شود.

تجهیزات مورد نیاز :

- دستگاه الکتروفورز مویینه(کاپیلری) با نرم افزار fragment analysis software
- فرمامایدبا کیفیت بالا (به عنوان مثال Hi-Di formamide)
- Labeled size standard مثل Rox-۵۰۰
- پلیمرها: ترجیحا POP-۴ یا POP-۷ یا POP-۶ و یا ژل Beckman

ارزیابی الگوهای بدست آمده Peak pattern evaluation

بعد از اینکه روند تکثیر پروب ها خاتمه یافت نوبت به ارزیابی محصولات واکنش می رسد . در این مرحله ما از یک Capillary Sequencer استفاده می کنیم .

با توجه به این که جهش هایی که در ژن TP۵۳ باعث غیر فعال کردن آن می شود، از نوع حذف(Deletion) و یا دوپلیکاسیون (Duplication) است و این جهش ها اگر در هر یک از نمونه های DNA آزمایش شود، مایه کم شدن (در هنگام حذف ژنی) و یا دو یا چند برابر شدن (در زمان دوپلیکاسیون) محصول Amplification خواهد شد؛ بنابراین هرگاه ما هر یک از نمونه ها را با نمونه مرجع بسنجیم، با توجه به این که میزان بازتابش فلورسانس از هر نمونه در دستگاه Sequencer پیرواندازه فراورده است، پس اگر میزان فلورسانس نمونه ای نسبت به میزان فلورسانس مرجع کمتر بود، نشان دهنده حذف و اگر میزان آن بیشتر از میزان فلورسانس نمونه مرجع ردیابی شد، نشاندهنده دوپلیکاسیون ژنی خواهد بود. اگر حذف به صورت هوموزیگوت در هر دو رشته DNA انجام شده باشد هیچ محصولی از آن اگزون تکثیر نخواهد شد. در نتیجه Peak آن مساوی با صفر خواهد بود. ولی اگر حذف تنها در یک رشته DNA وجود داشته باشد، محصول تکثیر آن Peak حدود ۰/۵ را نشان خواهد داد. اگر میزان تکثیر بر پایه ی واکاوی نتایج در محدودهی ۰/۷۵-۱/۳ باشد طبیعی خوانده می شود .چنانچه میزان تکثیر از ۱/۷۵ تا ۲ باشد به عنوان Duplication هتروزیگوت، و هرآینه ،بالاتر از ۲ باشد تکثیر افزایشی هوموزیگوت تفسیر می شود.

این کار به گونه ی خودکار با بهره گیری از نرم افزار Coffalyser و یا Gene Marker انجام می شود. افزون بر آن خود ما هم باید با نگرش به صفحه ی نمایش، Sequencer آن را کنترل کنیم، و الگوهای peak برآمده از فلورسانس فرآورده ی PCR را چشمی بررسی کنیم، تا از نتایج مثبت کاذب جلوگیری شود. برای نمونه دقت کنیم که در No DNA Reaction، نباید peak فلورسانس بلندتر از ۱۰۰ nt باشد، یا signal sloping بیش از اندازه و الگوهای نامنظم نداشته باشیم.

واکاوی داده ها (Data Analysis)

اندازه مطلق شدت فلورسنتی که ردیابی می شود، به چندین عامل وابسته است، همانند: بیرنگ کردن (bleaching) نشان های فلورسنت و تغییرات میان مویینه ها و دقت در پیپت کردن. استاندارد سازی میان نمونه ای (intra sample normalisation) در نتایج الکتروفورز که روی شدت نسبی فلورسانس برای هر peak تأثیر می گذارد که برای به دست آوردن اطلاعات دقیق MLPA لازم است. همچنان که درپیش گفته شد، برای واکاوی داده های MLPA، شایسته است که از نرم افزار Coffalyser استفاده شود .

استاندارد سازی داده ها (Data Normalisation)

چندین روش برای نرمالیزاسیون داده های MLPA وجود

شکل۳)
مراحل انجام روش
MLPA

1) DNA denaturation				
1.	98 °C	*5 minutes*		
2.	25 °C	*pause*		
2) Hybridisation reaction				
3.	95 °C	*1 minute*		
4.	60 °C	*pause*		
3) Ligation reaction				
5.	54 °C	*pause*		
6.	54 °C	*15 minutes*		
7.	98 °C	*5 minutes*		
8.	15 °C	*pause*		
4) PCR reaction				
9.	60 °C	*pause*		
	35 cycles:	•	95 °C	*30 seconds*
		•	60 °C	*30 seconds*
		•	72 °C	*60 seconds*
10.	72 °C	*20 minutes*		
11.	15 °C	*pause*		

دارد. البتــه امــکان اینکــه یــک روش یک ســان را بــرای همه ی probmix هــا بــه کار بگیریــم نیســت. هــر یــک از کیــت های SALSA MLPA که خریداری می شــود ، در برگه ی آن توســط ســایت MRC-Holand، بهترین روش برای نرمالیزه کردن داده ها درج شده است.

- **Intra sample Normalisation** : بــا تقســیم کــردن حداکثر ســیگنال فلورســنت که ناشــی از یک محصول تکثیر پروب هســت، بر همه حداکثر ســیگنال های (total peak area) پروب هــای مرجع که به اصطلاح به آن normalisationblock گفته می شود، یا با تقسیم بر ترکیبی از حداکثر سیگنال های تمامی پروب ها
- **Inter sample normalisation** :این نســبت با تقســیم کــردن Intra- normalised probe های هــر نمونه بر میانگین نســبت Intra- normalised probe های کل نمونه های مرجع بدســت می آید . این کار برای هر نمونه یک probe ratio فراهم می کند .

تفسیر نتایج Result interpretation

چیدن پروب ها بر اساس محل کروموزوم ها، باعث تسهیل تفسیر نتایج MLPA می شــود و ممکن است باعث حذف تغییرات خفیفی بشود، مثل تغییراتی که در نمونه های موزاییک دیده می شود.

تغییرات توالی (SNP و جهش نقطه ای) در توالی هدف بوسیله یــک پروبی که مــی تواند به نتایج مثبــت کاذب MLPA بیانجامد ، ردیابی می شود و جهش ها/ SNP هایی را که در نزدیکی محل پیوند Ligation site به فاصله ی ۵ – ۱ نوکلیوتید اســت می تواند کاهش دهد و یا از سیگنال پروب به وسیله ی جلوگیری از پیوند دو پروب نوکلیوتید جلوگیری کند.

جهش ها / SNP های در فاصله بیشتر (دست کم ۲۰ نوکلیوتید دورتر از محل اتصال پروب) می تواند باعث سیگنال کمتر پروب توسط عدم پایداری اتصال نوکلیوتید های پروب به DNA ی نمونه شود.

بیشــتر پروب هــای MLPA ، یک توالی بــه دازای ۵۵ الی ۷۶ نوکلیوتید را شناسایی می کنند.

دگرگونی در شــمار رونویسی ها، تنها بــا یک پــروب تنهــا ردیابی می شــود. بنابراین همیشــه نیاز به تایید با روش های دیگرهست.

توالــی یابــی Sequencing بیشتربرای تعیین این که آیا یک جهش یا پلی مورفیسم در توالی هدف پروب حضور دارد یا خیــر، به کار می رود. Long range PCR یــا qPCR اغلــب بــرای تایید حــذف های تک اگزونی (single exon deletion) به کار مــی رود.فراوانــی حذف های تک اگزونــی در ژن هــای بــزرگ بــا اینترون های بزرگ ، نسبت به ژن های کوچکــی با اینتــرون هــای کوچک، شایع تر است.

همه حذف ها یا دوپلیکاسیون هایی که با MLPA شناســایی می شــوند، بیماری زا نیســتند. یک دوپلیکاسیون نســبی در یک ژن می تواند مایه بهم ریختن آن ژن شود و به بیماری بیانجامد و حال آنکه شاید دوپلیکاسیون یک ژن در یک محل کروموزوم دیگر بیماریزا نباشد.

در بسیاری از نمونه ها، علت اصلی نقایص ژنتیکی مــی تواند جهش های نقطه ای کوچک باشــد که بیشــتر آنها توســط کیت های SALSA MLPA تشــخیص داده نمــی شــود. روش MLPA ،برای شناسایی بیشتر وارونه شــدنی ها (inversion)، جابجایی ها (Translocation) و دگرگونــی شــمار رونویســی هــا کــه فراتــراز محدودهی توالــی ردیابی پروب های SALSA MLPA باشــد، توانمنــد نیست.