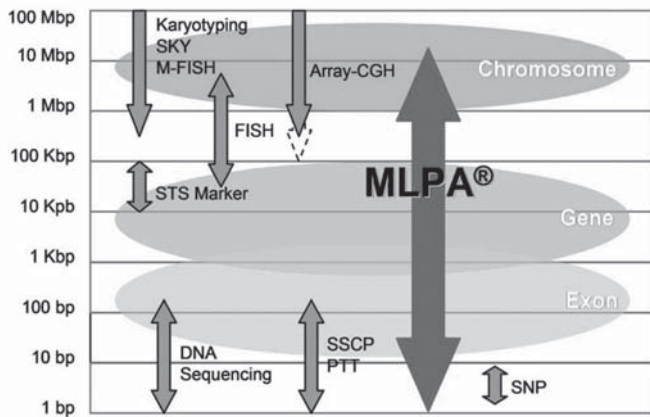


تکنیک MLPA



شکل ۱)

• MLPA روش 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 نوکلئوتید 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 ۶۰ نوکلئوتید تشکیل شده است دارد و در نتیجه می تواند برای شناسایی Deletion و Duplication های یک اگزون منفرد به کار رود .

• تنها وسایل لازم جهت انجام این روش یک ترموسیکلر و تجهیزات الکتروفورز تعیین توالی DNA (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 نوکلئوتید - nt) می شود که میتوان با الکتروفورز موئینه (capillary electrophoresis) آنها را از هم جدا کرده و اندازه گیری نمود. در هر دوره کاری (RUN) این روش می توان تا ۹۶ نمونه را به گونه

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 طور همزمان 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 ۴۵ 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.

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 پذیر خواهند 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.

در شکل (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 مرز 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 از ۳ نمونه ی مرجع در هر RUN کاری MLPA باید استفاده شود. این نمونه های 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 dH_2O یا TE (۱۰ ، mM Tris-HCL ، pH ۸٫۲ + ۰٫۱ mM EDTA) به جای DNA است که می تواند آلودگی احتمالی dH_2O و TE و رآزنت های MLPA یا معرف های الکتروفورز یا موینه 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 هر واکنش MLPA به کار رود. شیوه ی بدست آوردن DNA (روش استخراج و ذخیره آن) می تواند روی نتایج MLPA تاثیر بگذارد. از آنجا که تاثیر آلوده کننده ها ثابت و تکرار پذیر است، اگر نمونه ها به روش مشخص و دقیقی به دست آید، این اثر ناهنجار از میان خواهد رفت. افزون بر آن سفارش می شود که غلظت های همسانی از DNA در نمونه های آزمایش / مرجع به کار رود تا تغییراتی که ناشی 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 استخراج مورد استفاده اندازه های بالایی از آلوده کننده ها مانند نمک را بر جا نگذارد. استفاده از خون هپارینه سفارش نمی شود. اندازه های اندک هپارین به سختی از نمونه های DNA آماده شده جدا می شود و بدین روی مایه ی نارسایی در واکنش-PCR MLPA می شود. برای نمونه هایی که از بافت پارافینه (-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 اندازه های کوچک بخش کنیم و DNA بدست آمده را در ۲۰-درجه سانتیگراد نگه داریم. گرچه DNA

خیلی پایدار است، زمانی که در TE حل می شود نگهداری و ذخیره در ۴ درجه سانتی گراد برای چندین سال بایسته نیست. آلودگی با میکروارگانسیم ها و mould ها می تواند مایه ی تباهی نمونه ها شود.

• اگر لازم بود DNA در TE رقیق می شود تا ذخیره (working stock) به میزان ۲۰-۱۰ نانوگرم / میکرولیتر به دست آید. کاهش اندازه نمونه DNA، می تواند باعث کاهش میزان ناخالصی ها و اثر بخشی خوبی روی نتایج MLPA داشته باشد.

• هر گاه غلظت DNA کمتر از ۴ نانوگرم / میکرولیتر باشد، ته نشین کردن (precipitation) با اتانول سفارش می شود. گلیکوژن می تواند به عنوان یک حامل در رسوب (precipitation) اتانول استفاده 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 detection / quantification DNA

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

• واسرشت سازی (DNA denaturation) - روز اول
• لوله های ۰/۲ ml یا strip ها یا plate را علامت (label) گذاری می کنیم.

• ۵ μl از استوک DNA working stock را به هر لوله می افزاییم. برای واکنش No DNA control از TE/ dH₂O استفاده می کنیم

• لوله ها را در یک ترموسایکلر قرار داده و برنامه MLPA program را start می کنیم. نمونه 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

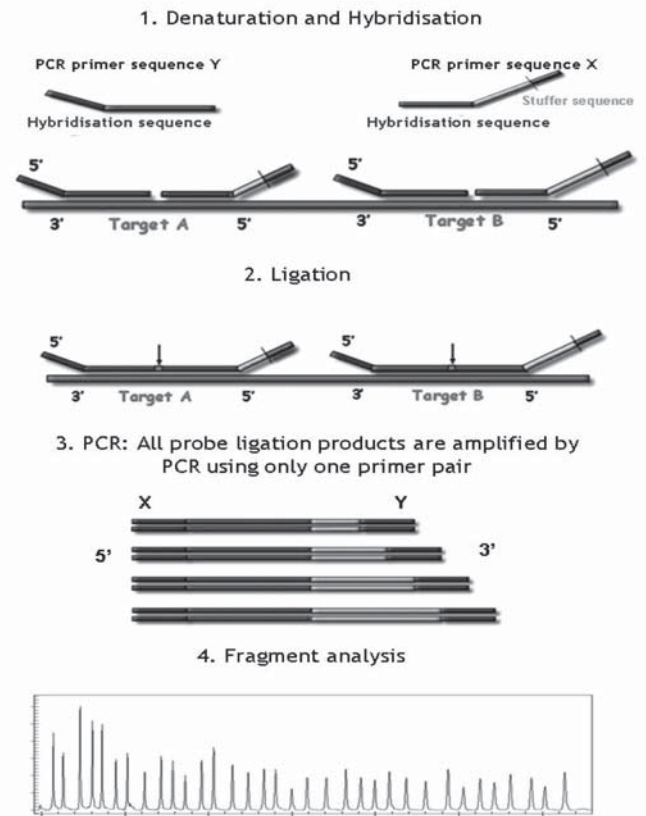
• برای هر واکنش باید یک hybridization master mix که شامل ۱/۵ μl بافر MLPA که دارای درپوش زرد است به اضافه ۱/۵ μl probmix (با درپوش سیاه) است تهیه می کنیم و آنها را با پیپت کردن و ورتکس (vortex) خوب مخلوط می کنیم.

• وقتی که ترموسایکلر به ۲۵ درجه سانتی گراد رسید ۳ μl از hybridization master mix را به 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 ۲۰-۱۶ ساعت در ۶۰ درجه سانتی گراد انکوبه می کنیم.

واکنش PCR - روز دوم

(شکل ۲)



- لوله های تازه برای واکنش PCR برگزیده و آن ها را نشان می کنیم.

- بافر مخلوط PCR را تهیه می کنیم که برای هر واکنش شامل: $4 \mu\text{l}$ بافر SALS PCR همراه با $26 \mu\text{l}$ از dH_2O است. آنها را اندکی با ورتکس با هم در می آمیزیم (مخلوط می کنیم).

- $30 \mu\text{l}$ از بافر درآمیخته (مخلوط) PCR را به هر لوله می افزاییم.

- در دمای اتاق $10 \mu\text{l}$ از محلول Ligation را به لوله ی PCR وابسته منتقل می کنیم.

- یک Polymerase master mix را به صورت زیر تهیه برای هر واکنش می کنیم:

- $2 \mu\text{l}$ از پرایمرهای PCRSALS (درپوش قهوه ای) + $2 \mu\text{l}$ بافر رقیق کننده آنزیم SALS (درپوش آبی) + $5/5 \mu\text{l}$ از dH_2O + $0,5 \mu\text{l}$ از پلی مرز SALS (درپوش نارنجی). آنها را با پیپت کردن به آرامی مخلوط می کنیم و تا زمان استفاده آنها را در یخچال نگهداری می کنیم.

- برنامه ی ترموسایکلر را ادامه می دهیم. ترموسایکلر را در 60°C درجه سانتی گراد متوقف کرده و لوله های PCR را داخل ترموسایکلر قرار می دهیم.

- هنگامی که این لوله ها در 60°C درجه سانتی گراد داخل ترموسایکلر هستند $10 \mu\text{l}$ از مخلوط پلیمرز را به هر لوله اضافه می کنیم و به آرامی آن ها را با پیپتاژ کردن مخلوط می نماییم. و بلافاصله برنامه ترموسایکلر را به صورت زیر ادامه می دهیم:

واکنش پیوستن (Ligation reaction) - روز دوم

- ابتدا یک Ligase master mix تهیه می کنیم که برای هر واکنش شامل: $3 \mu\text{l}$ از بافر 65-ligase (با درپوش ترانسپارنت) + $3 \mu\text{l}$ از بافر 65-Bligase (درپوش سفید) + $25 \mu\text{l}$ از dH_2O است. با پیپت کردن یا ورتکس آنها را با هم مخلوط می کنیم.
- $1 \mu\text{l}$ از 65-ligase (درپوش سبز) برای هر واکنش به Ligase master mix اضافه می شود و به آرامی با پیپت کردن آنها را با هم مخلوط می کنیم. (محلول آنزیمی را هرگز نباید ورتکس کنیم)
- برنامه ترموسایکلر را ادامه می دهیم: در 54°C درجه سانتی گراد آن را متوقف می کنیم.

- وقتی نمونه ها به 54°C درجه سانتی گراد رسیدن $32 \mu\text{l}$ 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 ترموسایکلر را ادامه می دهیم: 15 دقیقه در 54°C درجه سانتی گراد فرایند پیوستن - Ligation reaction - و به دنبال آن 5 دقیقه در 98°C درجه سانتی گراد برای غیر فعال سازی آنزیم 65-ligase توسط حرارت آن را انکوبه می کنیم و سپس در 15°C درجه سانتی گراد ترموسایکلر را متوقف می کنیم.



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
- فرماماید با کیفیت بالا (به عنوان
مثال Hi-Di formamide)
- Labeled size standard
- مثل ۵۰۰-Rox

• پلیمرها: ترجیحا POP-4
یا POP-7 یا POP-6 و یا ژل
Beckman

ارزیابی الگوهای بدست آمده

Peak pattern evaluation

بعد از اینکه روند تکثیر
پروپ 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 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 آگزون 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
محدوده ی 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 پیت 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 در پیش 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

شکل ۳
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	

نوکلئوتید را شناسایی می کنند.
دگرگونی در شمار رونویسی ها،
تنها با یک پروب تنها ردیابی می
شود. بنابراین همیشه نیاز به تایید با
روش های دیگر هست.

توالی یابی Sequencing
بیشتر برای تعیین این که آیا یک جهش
یا پلی مورفسم در توالی هدف پروب
حضور دارد یا خیر، به کار می رود.
Long range PCR یا qPCR
اغلب برای تایید حذف های تک
اگزونی (single exon deletion)
به کار می رود. فراوانی حذف های
تک اگزونی در ژن های بزرگ با
ایترون های بزرگ، نسبت به ژن های
کوچکی با ایترون های کوچک،
شایع تر است.

همه حذف ها یا دوپلیکاسیون هایی
که با MLPA شناسایی می شوند،
بیماری زا نیستند. یک دوپلیکاسیون
نسبی 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 می تواند جهش های
نقطه ای کوچک باشد که بیشتر آنها
توسط کیت های SALSA MLPA
تشخیص داده نمی شود. روش
MLPA، برای شناسایی بیشتر وارونه
شدنی ها (inversion)، جابجایی ها
(Translocation) و دگرگونی
شمار رونویسی ها که فراتراز
محدوده توالی ردیابی پروب های
SALSA MLPA باشد، توانمند
نیست.

دارد. البته امکان اینکه یک روش یک سان را برای همه ی
probmix ها به کار بگیریم نیست. هر یک از کیت های
SALSA MLPA که خریداری می شود، در برگه ی آن توسط
سایت MRC-Holand، بهترین روش برای نرمالیزه کردن داده ها
درج شده است.

• Intra sample Normalisation : با تقسیم کردن
حداکثر سیگنال فلورسنت که ناشی از یک محصول تکثیر پروب
هست، بر همه حداکثر سیگنال های (total peak area) پروب
های 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 نسبت با تقسیم
کردن Intra-normalised probe های هر نمونه بر میانگین
نسبت Intra-normalised probe های کل نمونه های مرجع
بدست 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 شود 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
یک پروبی که می تواند به نتایج مثبت کاذب MLPA بیانجامد،
ردیابی می شود و جهش ها / SNP هایی را که در نزدیکی محل پیوند
Ligation site به فاصله ی ۵ - ۱ نوکلئوتید است می تواند کاهش
دهد و یا از سیگنال پروب به وسیله ی جلوگیری از پیوند دو پروب
نوکلئوتید جلوگیری کند.

جهش ها / SNP های در فاصله بیشتر (دست کم ۲۰ نوکلئوتید
دورتر از محل اتصال پروب) می تواند باعث سیگنال کمتر پروب توسط
عدم پایداری اتصال نوکلئوتید های پروب به DNA ی نمونه شود.
بیشتر پروب های MLPA، یک توالی به دازای ۵۵ الی ۷۶