روش تکثیر پروب وابسته به الحاق چندتایی (MLPA) و کاربردهای آن در تشخیص سرطان و بیماریهای ژنتیکی (مقاله مروری)

دکتر محمدرضا نوری دلویی [1] فرآوره خردادپور دیلمانی [2]

[1] استاد گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران [2] کارشناس ارشد ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

مجله پزشکی هرمزگان سال شانزدهم شماره سوم مرداد و شهریور ۹۱ صفحات ۲۶۳-۲۴۷

Archive of SID

چکیده

مقدمه: *بسیاری از بیماریها و نشانگانها ناشی از حذف‌ها یا دوتا شدگی‌های جزیی از یک ژن یا همه ژن و یا تغییرات توالی‌های کروموزومی ویژه‌ای می‌باشند. روشهای گوناگون بسیاری مانند دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای (CGH)، دو رگه‌سازی در جای فلئورسنت (FISH)، لکه‌گذاری ساترن، دورگه‌سازی پروب تکثیر شونده چندتایی (MAPH) جهت مطالعه این نقایص کروموزومی استفاده می‌شوند. برخی از این روشها دارای محدودیت قدرت تفکیک بوده و قادر به یافتن حذف‌ها و دوتا شدگی‌های اگزون‌های انفرادی نیستند. شماری از آنها، مانند روش FISH وقت‌گیر بوده و یا مانند لکه‌گذاری ساترن نیازمند مقدار زیادی نمونه DNA هستند. روش تکثیر پروب وابسته به الحاق چندتایی (MLPA) روشی حساس و قدرتمند بوده و به نحو گسترده در تشخیص طبی و پژوهش پیرامون شناسایی حذف‌ها و تکثیرهای ژنیِ مسبب بیماری استفاده می‌شود. در مقایسه با روش CGH که تغییرات تعداد نسخه (CNV) را در همه ژنوم تشخیص می‌دهد، روش MLPA به بررسی این تغییرات در مکانهای کوچک ژنومی می‌پردازد. در این مقاله مروری با استفاده از دهها منبع معتبر جدید و تجربه شخصی، با تشریح جزییات روش MLPA (و تأکید بر شماری از کاربردهای جدید آن مانند تشخیص جهش‌های نقطه‌ای، MS-MLPA و RT-MLPA) در ژنتیک بالینی و آزمایشگاههای پژوهشی؛ این فنِ قدرتمند با برخی از مهم‌ترین فنون مورد استفاده، مقایسه شده است. بسیاری از بیماریها و نشانگانها ناشی از حذف‌ها یا دوتاشدگی‌های جزیی از یک ژن یا همه ژن و یا تغییرات توالی‌های کروموزومی ویژه‌ای می‌باشند. روشهای گوناگون بسیاری مانند دورگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای (CGH)، دورگه‌سازی درجای فلئورسنت (FISH)، لکه‌گذاری ساترن، دورگه‌سازی پروب تکثیر شونده چندتایی (MAPH) جهت مطالعه این نقایص کروموزومی استفاده می‌شوند. برخی از این روشها دارای محدودیت قدرت تفکیک بوده و قادر به یافتن حذف‌ها و دوتاشدگی‌های اگزون‌های انفرادی نیستند. شماری از آنها، مانند روش FISH وقت‌گیر بوده و یا مانند لکه‌گذاری ساترن نیازمند مقدار زیادی نمونه DNA هستند. روش تکثیر پروب وابسته به الحاق چندتایی (MLPA) روشی حساس و قدرتمند بوده و به نحو گسترده در تشخیص طبی و پژوهش پیرامون شناسایی حذف‌ها و تکثیرهای ژنیِ مسبب بیماری استفاده می‌شود. در مقایسه با روش CGH که تغییرات تعداد نسخه (CNV) را در همه ژنوم تشخیص می‌دهد، روش MLPA به بررسی این تغییرات در مکانهای کوچک ژنومی می‌پردازد. در این مقاله مروری با استفاده از دهها منبع معتبر جدید و تجربه شخصی، با تشریح جزییات روش MLPA (و تأکید بر شماری از کاربردهای جدید آن مانند تشخیص جهش‌های نقطه‌ای، MS-MLPA و RT-MLPA) در ژنتیک بالینی و آزمایشگاههای پژوهشی؛ این فنِ قدرتمند با برخی از مهم‌ترین فنون مورد استفاده، مقایسه شده است.*

کلیدواژه‌ها: *سرطان – آنیوپلوئیدی – بیماریهای ژنتیک*

نویسنده مسئول:
دکتر محمدرضا نوری دلویی
گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
تهران – ایران
تلفن: ۸۸۹۵۲۰۰۵ ۲۱ ۹۸+
پست الکترونیکی:
nooridaloii@sina.tums.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۰/۱۰/۱۰ اصلاح نهایی:۹۱/۱/۲۵ پذیرش مقاله: ۹۱/۲/۲۳

مقدمه:

تغییرات در تعداد نسخه توالی‌های ویژه کروموزومی، علت بسیاری از بیماریها و نشانگان‌ها در انسان است. این تغییرات شامل حضور یک نسخه اضافی از یک کروموزوم کامل (برای نمونه در نشانگان داون)، حذف‌های تا چندین میلیون جفت بازی

www.SID.ir

(از جمله در نشانگان دی جرج) و حذف‌ها با دوتاشدگی‌های قطعه‌های کروموزومی کوچک‌تر مانند یک اگزون می‌باشد (۱).

برای نمونه، در بیش از ٦٠ درصد موارد دیستروفی‌های عضلانی دوشن و بکر حذف‌ها یا دوتاشدگی‌های یک یا تعداد بیشتری از اگزون‌های ژن دیستروفین رخ داده است (٤-۲). همچنین حذف‌ها یا دوتاشدگی‌های یک یا تعداد بیشتری از اگزون‌های ژن‌های BRCAI یا MLHI/MSH2 فرد حامل را مستعد ابتلا به سرطان پستان یا کولون می‌نماید (٥،٦). بنابراین نیاز به روشهایی برای شناسایی اختلالات کروموزومی کاملاً محسوس می‌باشد. همچنین آنالیز تغییرات تعداد نسخه در زمینه درمان بیماریها بسیار مهم است. برای نمونه، در بیماران مبتلا به سرطان پستان که دارای تکثیر ژنی ERBB2 هستند، می‌توان از آنتی‌بادی‌های ویژه ERBB2 به منظور درمان بیماری استفاده کرد (۳،٤،۷). روشهای متعددی برای تعیین تغییرات تعداد نسخه‌های توالی‌های کروموزومی استفاده می‌شوند (۱) که در زیر به شماری از آنها اشاره می‌شود:

نخستین روشی که امکان بررسی تغییرات کروموزم‌ها را فراهم نموده، تهیه کاریوتایپ بود. این روش در دهه ۱۹٥۰ معرفی شد. به کمک این روش بسیاری از ناهنجاریهای تعدادی و نیز ارتباط تغییرات تعداد کروموزومها با برخی بیماریها شناسایی شدند (۱۱-۸). پس از آن ابداع روشهای نواربندی کروموزومی، افزون بر تغییرات تعدادی، امکان مطالعه بسیاری از تغییرات ساختاری کروموزومها نیز فراهم آمد. اگرچه که نیاز به سلولهای تقسیم شونده و قدرت تفکیک پایین و عدم شناسایی بسیاری از تغییرات کوچک ساختار کروموزومها از عمده ضعف‌های این روش بود (٤،۸،۱۲). بنابراین روشهای سیتوژنتیک گوناگونی از جمله نواربندی با تفکیک بالا ابداع شدند (۸،۱۳،۱٤). همچنین روش دورگه‌سازی فلئورسنت درجا (Fluorescent in Situ Hybridization= FISH) در سال ۱۹۸۰ معرفی شد که آغازی برای سیتوژنتیک مولکولی بود (۸،۱٥). از روش FISH برای مشخص کردن توالی‌های ویژه کروموزم‌های دست نخورده توسط دورگه سازی با پروب‌های اسید نوکلئیکی مکمل که از طریق کووالانس به فلئوروکروم متصل‌اند، استفاده می‌شود. معمولاً ماده زیستی بر روی اسلاید میکروسکوپ پخش می‌شود و DNA واسرشت شده و با پروب نشاندار شده با فلئوروکروم، دو رگ می‌شود و سپس فلئورسانس به وسیله میکروسکوپ فلئورسنت آشکار می‌گردد (۱٦). با ابداع روش FISH، بسیاری از ناهنجاریهای کروموزومی که تا پیش از آن توسط دیگر روشها قابل تشخیص نبود، شناسایی شدند. از جمله معایب این روش، ضرورت و الزام مشخص بودن محل و توالی دقیق ناحیه مورد بررسی است، بنابراین، از آن نمی‌توان برای شناسایی ناهنجاریهای ناشناخته استفاده کرد. افزون بر این، این روش در مطالعه همزمانی چندین لوکوس محدودیت دارد و در هر نوبت تنها می‌توان از تعداد محدودی کاوشگر استفاده کرد (۱،۳،٤،۱۷،۱۸).

روش دیگر، دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای (CGH = Comparative Genomic Hybridization) است که در سال ۱۹۹۲ معرفی شد. این روش، قادر به بررسی تغییرات تعدادی توالی‌های کروموزومی و ژن‌ها بوده و می‌تواند همه کروموزوم‌ها را به طور همزمان در یک آزمایش بررسی کند. همچنین به سلولهای تقسیم شونده نیاز ندارد (۸،۱۹). این روش قادر به شناسایی موزاییسم، جابه‌جایی‌های کروموزومی متعادل، واژگونی‌ها و تغییرات پلوییدی همه ژنوم نیست. افزون بر این، یکی از محدودیت‌های این روش قدرت تفکیک آن است. به نحوی که تغییرات کروموزومی کمتر از ۱۰Mb-٥ توسط این روش قابل شناسایی نیستند (۸،۲۰،۲۱).

دورگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای ریزآرایه (microarray CGH) نیز قادر به شناسایی حذف‌ها و دوتا شدگی‌ها می‌باشد. این فن شامل دورگه‌سازی DNA بیمار و مرجع با قطعه‌های کوتاه DNA متصل به اسلایدهای شیشه‌ای است. توالی‌های هدف DNA با استفاده از دستگاههایی روی لام‌های میکروسکوپ لکه‌گذاری می‌شوند تا یک ریزآرایه تولید شود که هر DNA هدف روی آن دارای موقعیت منحصر به فردی است. پس از دورگه‌سازی و شستشو (برای برداشتن DNA متصل نشده)، سطح نسبی فلئورسانس با استفاده از نرم‌افزار رایانه‌ای اندازه‌گیری می‌شود. این روش سریع بوده و قابلیت خودکاری و قدرت تفکیک بالایی (۱۰۰Kb) دارد (۸،۲۲). یکی از محدودیت‌های آرایه CGH در تشخیص‌های پیش از تولد، تفسیر نتایج به ویژه در مواردی است که علایم بالینی یک تغییر

Archive of SID
www.SID.ir

کروموزومی ویژه به طور دقیق مشخص نیست (۸،۲۳).

روش الکتروفورز روی ژل با میدان ضربان‌دار = (pulse - field gel electrophoresis PFGE) قادر به تفکیک قطعه‌هایی از مولکول DNA با طول‌های kb ۱۰۰۰۰-۳۰ و تشخیص حذف‌ها یا دوتاشدگی‌های وسیع می‌باشد. محدودیت این روش این است که حذف ژنی یا دوتاشدگی کوچکتر از حدود ۳۰ کیلو باز با این روش قابل تشخیص نیست (۲٤،۲۵).

لکه‌گذاری ساترن (southern blotting)، یک فن لکه‌گذاری ژل است که در آن قطعه‌های DNA بر حسب اندازه به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز جدا می‌شوند و در همان جا واسرشته شده و به یک فیلتر نیتروسلولزی یا دیگر قالب‌ها به وسیله نیروی موئینگی یا الکتریکی منتقل می‌شوند (انتقال ساترن). اسیدهای نوکلئیک تک رشته‌ای به وسیله حرارت، به نیتروسلولز ثابت شده و از حرکت باز می‌مانند. دورگه‌سازی با پروب‌های نشان‌دار شده با رادیواکتیو یا ترجیحاً غیر رادیواکتیو به شناسایی هر قطعه ویژه، کمک می‌کند (۱٦). این روش، در شناسایی حذف‌ها و دوتاشدگی‌ها قابل اعتماد است، اگرچه قادر به تشخیص حذف‌های کوچک نیست. افزون بر این، وقت‌گیر بوده و نیازمند چندین مرحله دورگه‌سازی است (۳،٤،۲٦،۳۰).

روش PCR کمّی (Quantification PCR) از پرایمرهایی با نشان فلئورسانت استفاده نموده و فرآورده‌های PCR توسط الکتروفورز موئین از هم جدا شده و کمّی می‌گردند. این روش در حالی که قادر به تشخیص حذف‌ها و دوتاشدگی‌ها است، اما ناحیه‌ای را که تغییر تعداد نسخه در آن رخ داده است پیشتر باید شناسایی شده باشد (۲۷،۳۱). در روش دورگه‌سازی پروب تکثیرشونده چندتایی (Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation = MAPH)، ۵۰-٤۰ توالی هدف ویژه کمّی‌سازی می‌گردند. MAPH از پروب‌های اُلیگونوکلئوتیدی استفاده می‌کند که با توالی‌های اسیدنوکلئیک ویژه، دورگ می‌شوند. به طور همزمان، هر پروبِ دورگ شده با استفاده از یک جفت پرایمر تکثیر می‌گردد و یک فرآورده تکثیری با اندازه منحصر به فرد ایجاد می‌کند. تعداد نسخه توالی‌های هدف، در شدت‌های نسبی فرآورده‌های تکثیری پروب MAPH، منعکس می‌گردد (۲۷،۳۲). اگرچه MAPH در تشخیص حذف‌ها و دوتاشدگی‌ها بسیار قابل اعتماد است، استفاده از آن دشوار است. این روش نیازمند لکه‌گذاری نمونه‌های DNA بر روی قطعه‌های کوچک فیلتر نایلونی، مرحله پیش از دورگه‌سازی، دورگه‌سازی، چندین مرحله شستشوی فیلترها، انتقال فیلترها به لوله‌های PCR، دو مرحله PCR چندتایی (مولتی‌پلکس PCR) و سرانجام آنالیز فرآورده‌های PCR است (۱،۳۲).

در سال ۲۰۰۲، Schouten و همکاران در هلند روشی مشابه MAPH با عنوان تکثیر پروب وابسته به الحاق چندتایی (Multiplex Ligation-dependent Probe = MLPA) Amplification ابداع نمودند (۱) که جزییات آن در پی می‌آید.

روش MLPA:

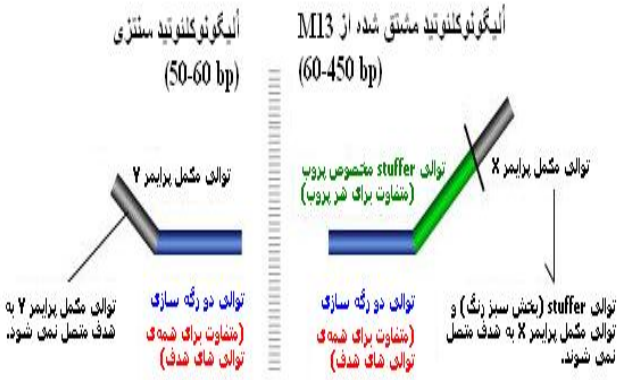
روش MLPA، روشی با کارآیی بالا است که برای مشخص کردن تعداد نسخه‌های ٤۰ تا ۵۰ توالی DNA ژنومی در یک واکنش که بر مبنای PCR چندتایی می‌باشد، توسعه یافته است. قطعه‌های تکثیری حاصل از MLPA، بین ۱۰۰ تا ۵۰۰ نوکلئوتید طول دارند که قابل جداسازی و کمّی‌سازی به وسیله الکتروفورز موئین هستند. MLPA را می‌توان بر روی تا ۹٦ نمونه به طور همزمان انجام داد و به نتایج آن در دو روز دست یافت. اساس فن MLPA مبتنی بر آن است که در خلال PCR، نمونه DNA هدف تکثیر نمی‌شود، بلکه پروب‌های MLPA که مکمل DNA هدف هستند و با آن دورگ می‌شوند، تکثیر می‌گردند. این روش حساس‌تر از MAPH بوده و استفاده از آن آسان‌تر است. افزون بر این، برخلاف MAPH در MLPA، بی‌جنبش‌سازی نمونه‌های اسید نوکلئیک و حذف پروب‌های اضافی لازم نیست (۱).

هر پروب MLPA متشکل از دو اُلیگونوکلئوتید است که باید برای الحاق موفق به هم، در مجاورت هم با DNA هدف دورگ گردند. تنها اُلیگونوکلئوتیدهایی که توسط PCR تکثیر می‌گردند، به هم الحاق می‌شوند. مقدار نسبی هر فرآورده تکثیر پروب، به میزان نسبی توالی هدف پروب در نمونه DNA بستگی دارد. تعداد نسخه‌های غیرعادی، توسط مقایسه نمونه‌های بیمار با نمونه‌های مرجع قابل شناسایی می‌شوند (۱،۳۳).

Archive of SID
www.SID.ir

پروب‌های MLPA:

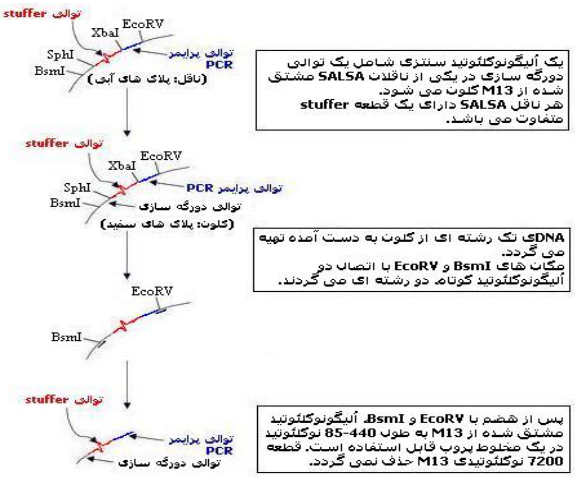
به اختصار هر دو اُلیگونوکلئوتید هر پروب شامل یک توالی کوتاه (۴۳-۲۲ نوکلئوتید) مکمل هدف و یک توالی متصل شونده به یکی از پرایمرهای PCR (که برای همه پرایمرها عمومی است) می‌باشند. به منظور ایجاد تمایز بین فرآورده‌های تکثیری متفاوت، پروب‌ها همچنین دارای یک توالی stuffer غیر دورگ‌شونده با طول متغیر (۳۶۴-۱۹ نوکلئوتید) هستند (شکل ۱) (۱،۳۳).



شکل ۱- پروب‌های MLPA

Ref: (http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mlpa.html

یکی از اُلیگونوکلئوتیدهای پروب یک اُلیگونوکلئوتید سنتزی کوتاه و دیگری یک اُلیگونوکلئوتید طویل مشتق شده از M13 است. اُلیگونوکلئوتید کوتاه سنتزی، حاوی یک توالی (۳۰-۲۱ نوکلئوتید) مکمل هدف در انتهای '۳ و یک توالی ۱۹ نوکلئوتیدی مکمل پرایمر PCR نشاندار در انتهای '۵ می‌باشد. برای تهیه اُلیگونوکلئوتیدهای طویل MLPA، یک اُلیگونوکلئوتید مکمل هدف به طول ۴۳-۲۵ نوکلئوتید در یکی از ناقلان SALSA مشتق از M13، کلون می‌شود (شکل ۲). هر کلون بدست آمده، برای آلوده‌سازی کلی باسیل (E.coli) سوش TG1 به کار می‌رود. DNA تک‌رشته‌ای توسط رسوب‌گذاری ذرات فاژی با پلی‌اتیلن گلیکول، تجزیه ویروس با گرما، و رسوب‌گذاری DNA با Cetyl-trimethyl-ammonium bromide خالص‌سازی می‌شود. DNA تک‌رشته‌ای در مکانهای آنزیم‌های محدود کننده EcoRV و BsmI توسط اتصال دو اُلیگونوکلئوتید کوتاه به طور جزئی دو رشته‌ای می‌گردد. هضم توسط EcoRV و BsmI به شکل‌گیری یک قطعه M13 طویل ۷۲۰۰ نوکلئوتیدی و اُلیگونوکلئوتید طویل پروب MLPA (۴۲۰-۸۰ نوکلئوتید) منجر می‌شود. اُلیگونوکلئوتید طویل پروب حاوی یک توالی ۴۳-۲۵ نوکلئوتیدی مکمل هدف در انتهای فسفریله '۵، یک توالی ۳۶ نوکلئوتیدی مکمل پرایمر غیر نشاندار PCR در انتهای '۳، و یک توالی stuffer با طول متفاوت در بین این دو است (۱).

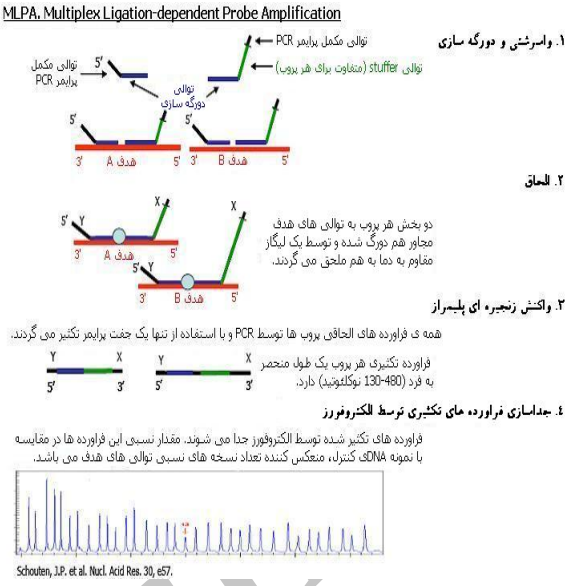


شکل ۲- تهیه اُلیگونوکلئوتید طویل پروب‌های MLPA (۱).

پس از دورگه‌سازی پروب‌ها با توالی هدف، دو نیمه از هر پروبِ دورگ شده توسط واکنش الحاق به هم متصل می‌شوند. اُلیگونوکلئوتیدهای متصل شده، مکانهای اتصالی به هر دو پرایمر PCR را دارایند و می‌توانند توسط PCR تکثیر شوند. کمّیت نسبی هر یک از فرآورده‌های PCR متناسب با تعداد نسخه‌های توالی هدف است. طول‌های متفاوت فرآورده‌ها، امکان جداسازی آنها را به وسیله یک توالی‌یاب موئین فراهم می‌کند و سرانجام، مساحت و یا ارتفاع قله‌ها کمّی می‌گردند (شکل۳). تعداد نسخه‌های غیرعادی، توسط مقایسه نمونه‌های بیمار با نمونه‌های مرجع شناسایی می‌شود (۱،۳۳).

برای آنالیز نتایج حاصله، از نرم‌افزارهایی مانند coffalyser، GeneMapper، Genescan و GeneMarker می‌توان استفاده کرد (۳۴).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳- پروب‌ها و مراحل MLPA (www.mrc-holland.com) ۱. مولکول‌های DNA واسرشت شده و پروب‌ها با توالی هدف دورگ می‌گردند. ۲: دو نیمه از هر پروب دورگ شده توسط واکنش الحاق به هم متصل می‌شوند. ۳: اُلیگونوکلئوتیدهای متصل شده، توسط PCR تکثیر می‌گردند. ۴: فرآورده‌ها توسط یک توالی‌یاب موئین از هم جدا می‌شوند. سرانجام، مساحت و یا ارتفاع قله‌ها محاسبه شده و تعداد نسخه‌های غیرعادی، توسط مقایسه نمونه‌های بیمار با نمونه‌های مرجع شناسایی می‌گردند (۱).

مزایای روش MLPA:

از مهم‌ترین مزایای MLPA، سادگی نسبی، هزینه کم، سرعت انجام در خلال دو روز، سهولت برای انجام چندتایی (بررسی چندین توالی هدف به طور هم زمان) به منظور دستیابی به نتایج مطمئن‌تر، دقت بالا در تخمین تعداد نسخه و توانایی روش برای ترکیب آنالیز تعداد نسخه با دیگر کاربردها مانند ردیابی متیله شدن یا جهش‌های نقطه‌ای می‌باشد. در مقایسه با PCR چندتایی استاندارد، تنها یک جفت پرایمر PCR در واکنش MLPA PCR استفاده می‌شود که آن را به یک سیستم قوی‌تری تبدیل می‌کند. این روش، حساس بوده و تنها به ۲۰ ng/µl از DNA ژنومی نیاز دارد (۱،۳۵).

محدودیت‌های روش MLPA:

مهم‌ترین محدودیت MLPA این است که شدت‌های سیگنال نسبی که در این آزمون به دست می‌آید، به شدت تحت تأثیر کیفیت DNA است. محدودیت دیگر آن است که در اکثر موارد، نوترکیبی‌های ژنومی مانند جابه‌جایی یا واژگونی را شناسایی نمی‌کند، بلکه تنها اطلاعات تعداد نسخه را فراهم می‌آورد. اگرچه، در صورت تعریف دقیق و ویژه نقطه شکست این نوترکیبی‌ها، می‌توان یک سری پروب MLPA را برای تشخیص آنها طراحی کرد. همچنین واریانت‌های کوچک توالی شامل جایگزینی‌های تک بازی درون توالی هدف پروب به ویژه در موقعیت الحاق اُلیگونوکلئوتیدهای پروب، می‌توانند الگوی حذف‌های تک اگزونی را تقلید کنند. البته حتی زمانی که این واریانت‌ها، ۱۱ نوکلئوتید دورتر از این موقعیت قرار گرفته باشند نیز این اثر دیده می‌شود. این اثر آشکارا به کارآمدی دورگه‌سازی و الحاق اُلیگونوکلئوتیدها به هم در حین مراحل اولیه سنجش MLPA مربوط است. بنابراین، هر جهشِ آشکار حذف تک پروب، باید توسط یک روش دیگر تأیید شود (www.mrc-holland.com) (۳۵). در مطالعاتی که Janssen و همکاران، در سال ۲۰۰۵ با روش MLPA بر روی بیماران مبتلا به DMD/BMD انجام داد، به دو مورد حذف کاذب در ژن دیستروفین دست یافت. در یک مورد، حذف سیگنال اگزون ۳۸، در نتیجه یک جهش بی‌معنی p.Q1802X (جهش CAG→TAG در سطح DNA) و در بیمار دیگر حذف اگزون ۳۷، به دلیل یک چندشکلی p.R1735C بود (۳۶).

تهیه پروب‌های MLPA بسیار هزینه‌بردار، وقت‌گیر و پیچیده است. انتخاب توالی‌های هدف، یک مرحله اصلی در طراحی پروب‌های MLPA است. توالی‌های هدف باید منحصر به فرد، فاقد عناصر تکراری و چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphisms = SNPs) رایج یا دیگر چندشکلی‌ها باشند. معمولاً منابعی مانند dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)، RepeatMasker (www.repeatmasker.org)، BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi)، توالی‌های ژنوم مرجع، و برنامه‌های محاسبه‌کننده پارامترهای ترمودینامیکی (مانند RaW_ Probe، www.mlpa.com) به

Archive of SID
www.SID.ir

منظور انتخاب توالی‌های هدف مناسب استفاده می‌شوند. با وجود این تا به حال شمار زیادی کیت گوناگون توسط شرکت MRC-Holland طراحی شده است www.mrc-holland.com (۳۵).

محدودیت دیگر این روش آن است که برخلاف روش FISH، توانایی بررسی سلولها را به صورت انفرادی ندارد. برای نمونه در سلولهای سرطانی و توموری اگر نمونه مورد بررسی کمتر از ۵۰٪ شامل سلولهای سرطانی باشد، تشخیص حذف‌ها و دوتاشدگی‌ها به خوبی قابل انجام نیست. افزون بر این، چنانچه تغییرات تعداد نسخه در اگزون‌ها و یا مکانهای پشت سر هم در ژن رخ نداده و پراکنده باشند، تفسیر نتایج بسیار دشوار می‌گردد (www.mrc-holland.com) (۳۵).

در جدول شماره ۱، مهمترین مزایا و محدودیت‌های روشهای معرفی شده در این مقاله، به اختصار معرفی شده است.

جدول شماره ۱- مقایسه مزایا و محدودیتهای چندین روش در تشخیص بیماریهای ژنتیکی

روش	مزایا	محدودیتها
تهیه کاریوتایپ	بررسی بسیاری از ناهنجاریهای تعدادی کروموزوم‌ها (۸)	با توجه به روش آغازین برای مطالعات سیتولوژیکی، طبیعتاً محدودیتهای متعددی دارد.
روشهای نواربندی	بررسی تغییرات تعدادی و نیز بسیاری از تغییرات ساختاری کروموزوم‌ها	۱- نیاز به سلولهای تقسیم شونده ۲- قدرت تفکیک پائین ۳- عدم شناسایی بسیاری از تغییرات کوچک ساختار کروموزوم‌ها (۴،۸،۱۲).
FISH	۱- بررسی حذف‌هات و دو تاشدگی‌ها ۲- قابلیت استفاده بر روی کروموزوم‌های متافازی و اینترفازی	۱- نیازمند مشخص بودن محل و توالی دقیق ناحیه مورد بررسی و در نتیجه عدم شناسایی ناهنجاریهای ناشناخته ۲- عدم شناسایی ریز حذف‌ها (می‌تواند تنها حذف‌ها و دو تاشدگی‌های قطعه‌های DNA بزرگتر از ۵۰-۲۰۰kb را تشخیص دهد) ۳- استفاده از تعداد محدودی کاوشگر و در نتیجه عدم بررسی همزمان همه ژنوم (۱،۳،۴)
CGH	۱- بررسی تغییرات تعدادی توالی‌های کروموزومی و ژن‌ها ۲- مطالعه همزمان همه کروموزوم‌ها در یک آزمایش ۳- عدم نیاز به سلولهای تقسیم شونده	۱- عدم تشخیص تغییرات کروموزومی کمتر از ۵-۱۰Mb ۲- عدم شناسایی موزاییسم، جابه‌جایی‌های کروموزومی متعادل، واژگونی‌ها و تغییرات پلوئیدی همه ژنوم (۸،۱۹،۲۱).
Microarray CGH	۱- توانایی در شناسایی حذف‌ها و دوتاشدگی‌ها در همه ژنوم ۲- سرعت بالا یا قابلیت خودکاری و قدرت تفکیک بالا (۱۰۰Kb)	محدودیت در تشخیص‌های پیش از تولد و تفسیر نتایج به ویژه در مواردی که علائم بالینی یک تغییر کروموزومی ویژه دقیقاً مشخص نیست (۸،۲۲،۲۶).
PFGE	توانایی تفکیک قطعه‌هایی از مولکول DNA با طول‌های ۳۰-۱۰۰۰kb و تشخیص حذف‌ها یا دوتاشدگی‌های وسیع	عدم تشخیص حذف ژنی یا دوتاشدگی کوچک‌تر از حدود ۳۰ کیلو باز (۲۴،۲۵).
Southern blotting	شناسایی حذف‌ها و دو تاشدگی‌ها	۱- عدم تشخیص حذف‌های کوچک ۲- وقت‌گیر بودن ۳- نیاز به چندین مرحله دو رگه‌سازی (۲۸-۲۶)
Quantification PCR	تشخیص حذف‌ها و دو تاشدگی‌ها	نیاز به شناسایی منطقه‌ای که تغییر تعداد نسخه در آن رخ داده است (۲۷،۳۱)
MAPH	۱- تشخیص حذف‌ها و دو تا شدگی‌ها ۲- مطالعه همزمان ۵۰-۴۰ توالی هدف	۱- دشوار و نیازمند مراحل گوناگون ۲- عدم شناسایی تغییرات ژنومی در مکان‌هایی که پروب برای آنها طراحی نشده است (۱،۲۷،۳۲)
MLPA	۱- بررسی چندین توالی هدف (تا ۵۰ توالی) به طور همزمان در یک واکنش ۲- امکان بررسی جهش‌های نقطه‌ای، متیله شدن و تعداد نسخه در یک آنالیز ۳- نیاز به مقدار اندک DNA (۲۰-۱۰۰ng) ۴- عدم نیاز به سلول کامل ۵- استفاده از تنها یک جفت پرایمر ۶- روش کمی، نسبتاً ارزان، سریع، قوی و آسان با قابلیت خودکاری مناسب برای آزمایشگاههای تشخیص طبی ۷- قادر به تشخیص ریز حذف‌ها	۱- وقت‌گیر، پیچیده بودن و هزینه‌های بالای تهیه پروب ها ۲- عدم توانایی بررسی سلولها را به شکل انفرادی (برخلاف روش FISH) ۳- عدم تشخیص درست به دلیل آلودگی نمونه تومور با سلولهای سالم و نیز درصد کم سلولهای دارای ناهنجاری ژنتیکی ۴- کمبود نمونه‌های مرجع مناسب به ویژه در هنگام مطالعه تومورها ۵- عدم تشخیص جابه‌جایی‌ها و واژگونی‌ها و ضرورت طراحی پروب‌های ویژه برای این منظور ۶- عدم تمایز دیپلوئیدی از تریپلوئیدی (در موارد 69,XXX) ۷- عدم شناسایی تغییرات ژنومی در مکانهایی که پروب برای آنها طراحی نشده است. ۸- نیاز به DNA با کیفیت مناسب و فاقد آلودگی نمک، فنل و مانند آن ۹- نیاز به تأیید جهش‌های شناخته شده به ویژه زمانی که این تغییرات تنها یک پروب را شامل شده و یا در پروب‌های مربوط به مکانهای ژنومی پشت سر هم رخ ندهند (۱،۳۵)

Archive of SID

www.SID.ir

کاربردهای MLPA:

بسیاری از کیت‌های MLPA (توسط شرکت MRC هلند) طراحی شده‌اند که در آنالیز تعداد نسخه ژن‌ها در نمونه‌های DNA ژنومی انسان، ارزیابی آنیوپلوئیدی، مطالعه نواحی ساب‌کروموزومی، یافتن جهش‌های نقطه‌ای، بررسی بیان ژنی یا بررسی متیله شدن DNA کاربرد فراوانی دارند (۱،۳۵).

کاربرد MLPA در تشخیص ناهنجاری‌های ژنومی:

از مهم‌ترین کاربردهای MLPA می‌توان به تشخیص جهش‌های بزرگ در ژن‌های BRCA1 و BRCA2، MLH1 و MSH2، DMD و NF1 و برای آنالیز تغییرات تعداد نسخه در مکانهای ساب‌تلومریک اشاره کرد (۳۵).

سرطان کولورکتال غیرپولیپی ارثی (HNPCC) یک بیماری غالب اتوزومی بوده که در اثر جهش‌هایی در ژن‌های ترمیم باز ناجور جفت، به ویژه ژن‌های MLH1، MSH2 و MSH6 ایجاد می‌گردد. در سال ۲۰۰۲، Gille و همکاران از روش MLPA برای یافتن حذف‌های MLH1 و MSH2 در ۱۲۶ خانواده بیمار استفاده نمودند. در مطالعه آنها حذف‌های ژنومی ۵۴.۸٪ جهش‌های بیماری‌زا را تشکیل می‌داد. همچنین یک حذف کامل ژن MLH1 در دو خانواده یافت گردید (۳۷).

در سال ۲۰۰۳، Hogervorst و همکاران با استفاده از روش MLPA در مطالعه ۶۶۱ خانواده مبتلا به سرطان پستان (که با روشهای سنتی بر اساس PCR، جهشی در ژن‌های BRCA1 و BRCA2 آنها شناسایی نشده بود) توانستند ۵ جهش دودمان زایشی BRCA1 را در ۵ خانواده بیابند. این جهش‌ها شامل حذف اگزون ۸ و اگزون‌های ۲۲-۲۰، دوتاشدگی اگزون ۱۳ و اگزون‌های ۲۳-۲۱ و سه‌تایی شدن اگزون‌های ۱۹-۱۷ هستند (۳۸).

در سال ۲۰۰۴، Meuller و همکاران پس از مطالعه ۲۷ بیمار مبتلا به پولیپوز آدنوماتوز خانوادگی با دو روش کمّی MLPA و quantitative real-time PCR، حذف همه ژن APC را در یک بیمار و حذف اگزون‌های ۱۳-۱۱ این ژن را در دو بیمار دیگر گزارش کردند (۳۹).

Harteveld و همکاران در سال ۲۰۰۵، با استفاده از روش MLPA حذف‌ها و دوتاشدگی‌ها را در خوشه ژنی آلفا و بتاتالاسمی مورد بررسی قرار دادند. در ۱۹ مورد از ۳۸ بیمار آلفاتالاسمی، ۱۱ حذف‌شدگی متفاوت را تشخیص دادند که ۶ مورد آن پیشتر شناخته نشده بود. همچنین در ۳۱ مورد از ۵۱ بیمار بتاتالاسمی، ۱۰ حذف متفاوت را در خوشه ژنی بتا یافتند که ۳ مورد آنها جدید بود. این پژوهشگران نتیجه گرفتند روش MLPA، روشی سریع، حساس و با قدرت تشخیص بالای حذف در خوشه ژنی گلوبین می‌باشد (۴۰).

آتروفی عضلانی نخاعی (Spinal Muscular Atrophy = SMA) یک بیماری عصبی عضلانی بوده و اکثر بیماران دارای حذف هوموزیگوس در حداقل اگزون ۷ ژن SMN-1 هستند. اگرچه یک روش استاندارد طلایی یعنی PCR با پرایمر ناجور (mismatch) و سپس هضم آنزیمی در تشخیص حذف هوموزیگوس SMN-1 بسیار قابل اعتماد می‌باشد، اما تشخیص ناقلان با این روش امکان‌پذیر نیست. در سال ۲۰۰۵، Tomaszewicz و همکاران با استفاده از روش MLPA در ۶ مورد از ۲۰ بیمار SMA حذف هوموزیگوس SMN-1 را یافتند و با روش PCR/ هضم آن را تأیید کردند. حذف هتروزیگوس SMN-1 در هر ۴ والد افراد بیمار توسط روش MLPA شناسایی و سپس توسط یک روش کمّی نسبی دیگر تأیید گردید (۴۱).

در سال ۲۰۰۶، Arkblad و همکاران ۹ بیمار SMA را با روش MLPA مورد بررسی قرار دادند و توانستند یک حذف جزئی در ژن SMN-1 (اگزون‌های ۶-۱) را در دو بیمار غیرخویشاوند بیابند که تا آن زمان گزارش نشده بود و با روشهای تشخیصی سنتی قابل شناسایی نبود. در گزارشی که توسط این گروه ارایه شد، طیف وسیع بالینی و ژنتیکی SMA به نمایش گذاشته شد و نتایج MLPA و توصیفات بالینی از یک بیمار با حذف هوموزیگوس SMN-1 و تنها یک نسخه SMN-2 (شروع پیش از تولد SMA نوع ۱)، یک زن فاقد علایم بیماری با ۵ نسخه SMN-2 (فاقد SMN-1) و بیماران SMA نوع ۱، ۲ و ۳ ارائه گردید. آنها اعلام نمودند چنانچه تعداد نسخه کافی از SMN-2 در فرد موجود باشد آن فرد می‌تواند علائم بیماری را نشان ندهد (۴۲).

در سال ۲۰۰۷، Franco-Hernandez و همکاران به مطالعه تغییرات مقدار ژنی و نیز توالی ژن EGFR در ۴۱

Archive of SID
www.SID.ir

تومور اُلیگودندروگلیال پرداختند و برای این منظور از روشهای MLPA (کیت P105)، real-time quantitative PCR و PCR/SSCP استفاده نمودند. افزایش مقداری (۱ تا ۵ برابری) در ۲۱ مورد از ٤١ نمونه (۵۲/۵٪ موارد) در اگزون ۱۱ و در ۷ مورد (۱۷/۵٪ موارد) در اگزون ۲۵ رخ داده بود. تکثیر ژنی (افزایش بیشتر از ۵ برابری) در ۱۷ مورد (٤۲,۵٪ موارد) در اگزون ۱۱، و در ٦ مورد (۱۵٪ موارد) در اگزون ۲۵ مشاهده شد. در ۳ تومور تکثیر بالای ژنی (بیش از ۱۰۰ نسخه ژنی) با real-time quantitative PCR و MLPA تشخیص داده شد. تغییرات توالی ژنی نیز در ٤ نمونه یافت گردید. نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که جهش‌ها و تکثیر ژنی/ افزایش مقداری در ژن EGFR در تومورهای اُلیگودندروگلیال درجه پایین (low-grade) وجود داشته و می‌توانند در پیشرفت این نئوپلاسم‌های مغزی شرکت داشته باشند (٤۳).

دیستروفی‌های عضلانی دوشن و بکر بیماریهای مغلوب وابسته به X هستند که در اثر جهش در ژن دیستروفین ایجاد می‌شوند. ژن دیستروفین (DMD ;OMIM#300377) دارای ۷۹ اگزون بوده و بزرگ‌ترین ژن شناخته شده در انسان است (٤٤،٤۵). حدود ٦۵٪ موارد DMD و BMD ناشی از حذف‌های ژنی هستند (٤٦،٤۷). دوتاشدگی‌ها نیز ۱۰-۵٪ موارد را در بر می‌گیرند (۲٦،٤۸). بقیه موارد (۳۰-۲۵٪) نیز نتیجه جهش‌های نقطه‌ای است (٤۹). از آنجا که زنان دارای دو کروموزوم X هستند، در صورت حذف هتروزیگوس در ژن دیستروفین، نسخه دیگر توسط PCR تکثیر می‌گردد. بنابراین روش PCR چندتایی برای تشخیص زنان حامل مناسب نیست. همچنین این روش نمی‌تواند دوتاشدگی‌ها را در زنان و مردان بیابد (۵۲-۵۰). روش MLPA همه اگزون‌های ژن دیستروفین را از نظر حذف‌ها و دوتاشدگی‌ها بررسی می‌کند (۳۳). Wang و همکاران در سال ۲۰۰۸، ژن دیستروفین را در ۱۷۹ بیمار غیرخویشاوند با روش MLPA بررسی کردند. ۷۳٪ بیماران دارای حذف (٦٦/۲۵٪) یا دوتاشدگی (٦/۲۵٪) در ژن دیستروفین خود بودند. حذف‌ای تک‌گزونی بیشتر مربوط به اگزون‌ای ۵۲-۵۱ و حذف‌ای چند اگزونی بیشتر مربوط به اگزون‌ای ۵۰-٤۵ بودند. حدود ۹۰٪ بیماران دارای یک حذف با اندازه کوچک (شامل ۱۰ اگزون یا کمتر) بودند که ۲٦/٦۷٪ یک حذف تک‌اگزونی داشتند. اغلب حذف‌های کوچک‌تر، تغییر قالب خواندن را نشان دادند. در یک مورد، حذف اگزون ۵۳ مربوط به یک حذف تک بازی در محل الحاق اُلیگونوکلئوتیدهای مربوط پروب بود. دوتاشدگی‌ها در اکثر موارد، قطعه‌های بزرگ (شامل ٤۱-۱۱ اگزون) را در برگرفته بودند (۵۳).

در سال ۲۰۰۹، Zimowski و همکاران، ۱۰۵ بیمار DMD و ۱۰ بیمار BMD را با روشهای MLPA، SSCP و توالی‌یابی DNA مورد مطالعه قرار دادند و توانستند ۱۰ حذف نادر، ۱٤ دوتاشدگی و ۱٤ جهش نقطه‌ای و ریزحذف را در ژن دیستروفین این بیماران بیابند (۵٤).

Sollaio و همکاران در سال ۲۰۰۹ خوشه ژنی آلفا گلوبین را با روش MLPA بررسی و دوتاشدگی آلفا گلوبین را در ناحیه تنظیمی مشاهده کردند (۵۵).

در سال ۲۰۰۹، Franco-Hernández و همکاران با استفاده از کیت P088 به مطالعه ساختار آللی ۱p و ۱۹q در ۷٦ مورد گلیوما (٤۱ تومور اُلیگودندروگلیال و ۳٤ مورد گلیوبلاستوما و یک مورد آستروسایتومای درجه کم (low-grade astrocytoma) پرداختند. آنها نتایج حاصله از MLPA بر روی موارد اُلیگودندروگلیال را با نتایج بدست آمده از LOH مقایسه نمودند. در ۳۸ مورد (از ٤۱ بیمار) نتایج حاصله از دو روش یکسان بود. همچنین حذف‌هایی در ۱p و/یا ۱۹q در ۱۲ مورد (از ۳۵ مورد) تومورهای آستروسایتیک (۳٤٪) تشخیص داده شد. این مطالعه با مطالعات پیشین در مورد گلیوما که به مقایسه روش MLPA با FISH و CGH پرداخته بودند، سازگاری داشت و روش MLPA را به عنوان روشی مناسب در تشخیص حذف‌های اللی ۱p و ۱۹q در این نئوپلاسم‌های مغز مورد تأکید قرار داد (۵٦).

Stangler Herodez و همکاران در سال ۲۰۰۹ از روش MLPA برای تشخیص دو بیماری عصبی شارکوت، ماری، توث نوع 1A (Charcot – Marie – Tooth 1A = CMT1A) و نوروپاتی ارثی مستعد به فلج ناشی از فشار (Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies = HNPP) استفاده کرده و تعداد ۹ دوتاشدگی و ۱۹ حذف در ژن پروتئین میلین محیطی (PMP22) در ۷۰ فرد مورد نظر (proband) را شناسایی نمودند (۵۷).

Archive of SID
www.SID.ir

در سال ۲۰۱۰، Mohseny و همکاران به مطالعه ساز و کار عدم بیان پروتئین CDKN2A/p16 در بیوپسی تومور ابتدایی شماری از بیماران استئوسارکوما پرداختند. لوکوس CDKN2A در نمونه‌های استئوسارکومای فاقد بیان CDKN2A/p16 و در نمونه‌های دارای بیان بالای این پروتئین با روشهای melting curve analysis-methylation assay (MCA-Meth)، FISH، MLPA و آنالیز جهش بررسی گردید. در همه نمونه‌ها با حذف کامل پروتئین CDKN2A/p16، حذف هوموزیگوس در لوکوس CDKN2A یافت شد و در هیچ یک از آنها بیش متیله شدن ناحیه پروموتر رخ نداده بود (۵۸).

Farshid و همکاران در سال ۲۰۱۱، ۲۰۸ نمونه سرطان پستان تهاجمی را با روشهای دورگه‌سازی درجا (chromogenic ISH و FISH) و MLPA بررسی نمودند. بر اساس نتایج ISH، ۲۵ بیمار دارای تکثیر ژنی و ۱۸۲ بیمار فاقد تکثیر ژنی HER2 بوده و در یک بیمار به دلیل بافت ناکافی تشخیصی داده نشد و مطالعات بعدی نیز بر روی آن انجام نگرفت. نتایج MLPA برای همه ۱۸۲ فرد فاقد تکثیر ژنی، منفی بود. اما در مورد ۲۵ فرد دارای تکثیر ژنی، در ۲۳ مورد (۹۲٪) با MLPA تکثیر نشان داده شد. با استفاده از روش ISH به عنوان آزمون مرجع، روش MLPA دارای ۹۲٪ حساسیت، ۱۰۰٪ ویژگی، ۱۰۰٪ ارزش پیشگویی مثبت، ۹۸/۹٪ ارزش پیشگویی منفی و دقت ۹۹٪ می‌باشد (۵۹).

بررسی عقب‌ماندگی‌های ذهنی:

گزارش شده است که در تقریباً ۵٪ از بیماران با عقب‌ماندگی‌های ذهنی با علت نامشخص، بیماری به دلیل نوترکیبی‌های زیرتلومری (subtelomeric) است که با آنالیز سیتوژنتیکی مرسوم قابل مشاهده نیست. به دلیل شیوع بالای عقب‌ماندگی‌های ذهنی، غربالگری بسیاری از بیماران برای این گونه ناهنجاری‌های کروموزومی ضروری است. در این موارد، روش MLPA جایگزینی مناسب برای روش FISH می‌باشد (۶۰). عقب ماندگی‌های ذهنی نشانگانی (۶۳-۶۱)مانند نشانگان حذف 1P (1P deletion syndrome)، نشانگان ویلیامز بورن (Williams-Beuren syndrome)، نشانگان سوتوس (Sotos syndrome) (۶۴)، نشانگان میلر دیکر (Miller-Dieker syndrome)، نشانگان دی جرج (Di George syndrome)، نشانگان آلاژیل (Alagille syndrome) و نشانگان اسمیت مگنیس (Smith-Magenis syndrome) (۶۵) و غیر نشانگانی وابسته به X (۶۶) نیز با روش MLPA مطالعه می‌شوند.

در سال ۲۰۰۶، Kirchhoff و همکاران با استفاده از روش MRS-MLPA (MLPA طراحی شده برای نشانگان همراه با عقب‌ماندگی ذهنی) به مطالعه ۲۵۸ بیمار عقب‌مانده ذهنی و دیسمورفیک با کاریوتایپ طبیعی پرداختند. این بیماران در ابتدا برای آنالیز HR-CGH (high-resolution metaphase CGH) به آزمایشگاه رجوع داده شده بودند و پیشتر نیز توسط MLPA زیرتلومری بررسی شده بودند. MRS-MLPA در ۱۵ مورد از ۲۵۸ بیمار (۵۸٪ بیماران) عدم توازن کروموزومی؛ (۱۰ مورد حذف شامل حذف‌های 1p36، 5q35 (نشانگان سوتوس)، 7q11 (نشانگان ویلیامز بورن)، 17p11 (نشانگان اسمیت مگنیس)، 15q11 (نشانگان آنجلمن) و 22q11 و نیز ۵ مورد دوتاشدگی در 5q35، 7q11، 17p13، 17p11 و 22q11) تشخیص داد. HR-CGH و MLPA زیرتلومری تنها ۵ مورد از این تغییرات را شناسایی کرده بودند. همچنین در شمار دیگری از بیماران (۱۷ بیمار) که تنها با MRS-MLPA مطالعه شدند، ۲۰ مورد حذف‌شدگی و ٤ مورد دو تا شدگی شناسایی گردید (۶۱).

بررسی آنیوپلوئیدی:

روش MLPA، روشی سریع در تشخیص پیش از تولد آنیوپلوئیدی‌های رایج بوده و کیت MLPA طراحی شده برای این منظور (P095) دارای پروب‌هایی برای کروموزوم‌های ۱۳، ۱۸، ۲۱، X و Y می‌باشد (۶۷،۶۸).

Diego-Alvarez در سال ۲۰۰۶ از کیت P070 که توسط شرکت MRC هلند برای مطالعه عقب‌ماندگی‌های ذهنی طراحی شده بود، در تشخیص آنیوپلوئیدی در نمونه‌های جنینی سقط شده استفاده کرد. این کیت حاوی پروب‌هایی برای نواحی زیرتلومری هر دو بازوی همه کروموزوم‌ها می‌باشد. زمانی که سیگنال‌های حاصله از پروب‌های ساب تلومری هر دو بازوی یک کروموزوم دوتاشدگی را نشان دهند، می‌توان به وقوع

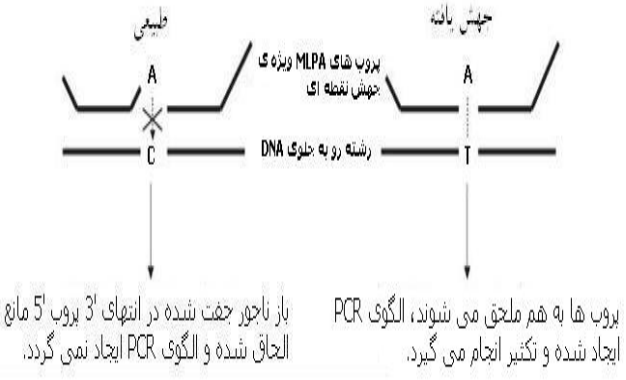
Archive of SID
www.SID.ir

تریزومی در آن کروموزوم مظنون گشت. در این مطالعه نتایج حاصله از MLPA با نتایج حاصله از کاریوتایپینگ و PCR کمّی (QF-PCR) سازگار بود (۶۹).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ توسط Opstal و همکاران برای تشخیص آنیوپلوئیدی در ۴۰۰۰ نمونه مایع آمنیوتیک انجام شد، روش MLPA با روشهای کاریوتایپینگ و FISH مقایسه شد. روش MLPA توانست با حساسیت و نیز ویژگی (specificity) ۱۰۰٪ آنیوپلوئیدی‌های شایع را تشخیص دهد. اگرچه تریپلوئیدی 69,XXX با روش MLPA قابل شناسایی نمی‌باشد، سایر موارد مانند مونوزومی و تریزومی X، 47,XXY یا 47,XYY و نیز تریپلوئیدی 69,XXY را می‌توان با این روش تشخیص داد. همچنین در این مطالعه چندین مورد موزائیک (مانند mos XXY/XY یا mos XYY/XY) و نقایص کروموزومی (مانند حذف بخش‌هایی از کروموزوم‌های ۱۳، ۱۸ و ۲۱) نیز شناسایی شد (۷۰).

شناسایی جهش‌های نقطه‌ای:

برخی از پروب‌های MLPA به نحوی طراحی شده‌اند که قادر به تشخیص جهش‌های نقطه‌ای باشند. به این نحو که مکان الحاق پروب‌ها به هم دقیقاً در مکان جهش قرار می‌گیرد. بنابراین، تنها می‌توان برای جهش‌های نقطه‌های شناسایی شده، پروب طراحی کرد (۷۱) (شکل ٤).



شکل ۴- استفاده از روش MLPA در تشخیص جهش‌های نقطه‌ای. تنها در صورت وجود جهش نقطه‌ای، دو نیمه پروب قادر به اتصال به هم بوده و در نتیجه، توسط واکنش PCR، تکثیر شده و سیگنال ایجاد می‌کنند (۷۱).

برای نمونه کیت طراحی شده برای مطالعه ژن هموگلوبین A دارای پروبی برای تشخیص جهش نقطه‌ای موسوم به Constant Spring بوده و تنها در نمونه‌های مربوط به افراد حامل این جهش، دو نیمه پروب قادر به اتصال به هم بوده و در نتیجه، توسط واکنش PCR، تکثیر شده و سیگنال ایجاد می‌کنند (۷۲).

Bunyan در سال ۲۰۰۷، ۲۳ پروب برای جهش‌های نقطه‌ای ژن دیستروفین طراحی کرد و آنها را همراه با پروب‌هایی که توسط شرکت MRC هلند برای تشخیص حذف‌ها و دوتاشدگی‌ها طراحی شده بود، به کار برد و به این ترتیب امکان بررسی همزمان جهش‌های نقطه‌ای و تغییر تعداد نسخه در ژن دیستروفین را فراهم کرد (۷۱).

RT-MLPA (Reverse Transcriptase MLPA) :

از این روش می‌توان برای بررسی بیان ژنی استفاده نمود. تغییرات در بیان ژن‌ها نقش مهمی در فرآیندهای رشد، تمایز و بیماری‌زایی سلول ایفا می‌کند. دو مجموعه پروب RT-MLPA برای مسیرهای التهاب و آپوپتوز تهیه شده‌اند. این دو مجموعه می‌توانند بیان تا ٤٥ مولکول mRNA را در یک لوله آزمایش کمّی کنند. از آن جا که آنزیم لیگازی که در روش MLPA استفاده می‌شود نمی‌تواند الحاق پروب‌ها را در مولکول دورشته‌ای RNA/DNA انجام دهد، ابتدا توسط آنزیم رونوشت‌بردار معکوس، mRNA به cDNA تبدیل می‌گردد. سپس سایر مراحل مانند یک واکنش استاندارد MLPA انجام می‌گیرد. به منظور ممانعت از ایجاد سیگنالِ حاصل از آلودگی DNA ژنومی که اغلب در نمونه‌های RNA موجود است، تا حد امکان توالی‌های هدف پروب‌های RT-MLPA بر روی مرزهای اگزون-اگزون طراحی می‌شوند (شکل ٥). از مزایای این روش می‌توان به سرعت (حدود ۲ روز)، نیاز به میزان کمی RNA (۱۵۰ng از RNAی کل)، و هزینه کم آن اشاره کرد (۳۵،۷۳،۷٤).

در سال ۲۰۰۳، Eldering و همکاران با روش RT-MLPA بیان دو گروه ژن‌های انسانی (۳۵ ژن تنظیم‌کننده آپوپتوز و ۳۰ ژن درگیر در التهاب (inflammation)) را بررسی نمودند. تحریک لنفوسیت‌ها با لیگاندهای Toll-like

Archive of SID
www.SID.ir

recptor (TLR) به نیم‌رخ‌ها یا پروفایل‌های التهابی آشکاری (نیم‌رخ القای ژن سیتوکین) منجر گردید. افزون بر این، بررسی سلولهای استئوسارکوما پس از درمان با داروهای cytostatic معلوم نمود که رونوشت PUMA القاشونده توسط p53، هدف اولیه در میان همه تنظیم‌کننده‌های آپوپتوزی مورد مطالعه بود (۷۳). یکی از کاربردها و پیشرفت‌های نسبتاً جدید در استفاده از MLPA، MS-MLPA می‌باشد. طراحی پروب‌های MS-MLPA مشابه MLPA است، با این تفاوت که توالی‌های مورد هدف در MS-MLPA حاوی یک مکان تحدیدی (restriction site) برای اندونوکلئاز HhaI بوده که توالی غیرمتیله GCGC را تشخیص می‌دهد (۳۵). پس از مرحله دورگه‌سازی، مراحل الحاق پروب‌ها و هضم آنزیمی به طور همزمان انجام می‌گیرد. چنان‌چه نواحی مورد مطالعه متیله شده باشند، فراورده MLPA مشاهده خواهد شد؛ و در صورتی که غیرمتیله باشد، مجموعه‌ی DNA–پروب توسط آنزیم هضم شده و هیچ فراورده‌ای نخواهیم داشت (شکل ٦) (۳۵،۷۵).

غیرفعال‌سازی ژن‌ها به دلیل متیله شدن CpG می‌تواند اثرات بالینی مشابه حذف ژنی را به همراه داشته باشد. نشانگان‌های پرادرویلی (PWS; OMIM 176270) و آنجلمن (AS; OMIM 105830) بیماریهای نوروژنتیکی هستند که به وسیله حذف یا دیزومی تک والدی کروموزوم 15q11-q13 ایجاد می‌شوند. زمانی که دیزومی تک والدی مادری رخ می‌دهد، هر دو 15q11-q13 توسط متیله شدن، نقش‌گذاری (imprint) شده و بیان نگردیده و به نشانگان پرادرویلی منجر می‌گردند. در حالی که زمانی که دیزومی تک والدی پدری رخ می‌دهد، هر دو نسخه غیر متیله بوده و بیان می‌شوند و به نشانگان آنجلمن منجر می‌گردد. با استفاده از روش MS-MLPA می‌توان ناهنجاری‌های اپی‌ژنتیکی منجر به نشانگان‌های آنجلمن و پرادرویلی را تشخیص داد. نمونه‌های نشانگان آنجلمن با دو الل پدری غیرمتیله، هیچ سیگنالی از پروب‌های MS-MLPA را نشان نمی‌دهد، در حالی که نمونه‌های نشانگان پرادرویلی با دو الل مادری متیله، سیگنالی دو برابر بلندتر از نمونه کنترل را نشان می‌دهد (۳۵،۷۵،۷٦).

در سال ۲۰۰٦، Calounova و همکاران یک مورد غیرمعمول دیزومی تک والدی مادری کروموزوم ۱۵ به دلیل جابه‌جایی متعادل t(8;15)(q24.1;q21.2) را گزارش کردند که موجب نشانگان پرادرویلی در یک دختر سه ساله شده بود. بررسی سیتوژنتیکی، جابه‌جایی متعادل t(8;15) (q24.1;q21.2) را هم در بیمار و هم مادر غیرمبتلا نشان داد. آنالیز FISH هیچ حذفی را در ناحیه PWS نشان نداد، اما آنالیز متیله شدن ژن SNRPN یک الگوی غیرعادی متیله را نمایان ساخت که بیانگر عدم حضور کروموزوم ۱۵ پدری بود. آنالیز ریزماهواره‌ای، چندین لوکوس و MS-MLPA هترودیزومی تک والدی مادری کروموزوم ۱۵ را تأیید نمودند (۷۷).

از دیگر کاربردهای MS-MLPA، ارزیابی متیله شدن در نشانگان‌هایی مانند بک ویت ویدمن (Beckwith-Wiedemann syndrome) است (۷۸،۷۹). در سال ۲۰۰۸، Priolo و همکاران، ۷۳ نمونه نشانگان بک ویت ویدمن و نشانگان سیلور راشل (silver-Russell syndrome) و ۲۰ نمونه کنترل را با روش MS-MLPA مطالعه کردند و توانستند موارد دیزومی تک والدی پدری کروموزوم ۱۱، بیش‌متیله شدن یا کم‌متیله شدن در مرکز نقش‌گذاری ۱ یا ۲ و دوتاشدگی‌های نادر 11p15.5 را بیابند (۷۹). همچنین متیله شدن نواحی غنی از CpG که درون و یا نزدیک پروموتر بسیاری از ژن‌ها قرار دارند، می‌توانند موجب غیرفعال‌سازی رونویسی ژن‌های بازدارنده تومور (tumor suppressor genes)، ژن‌های تعمیر DNA و ژن‌های بازدارنده متاستاز گردند. بنابراین، تشخیص متیله شدن غیرعادی پروموتر ژن‌های مربوط به سرطان برای تشخیص، پیش‌آگهی و یا تشخیص استعداد متاستازی تومورها می‌توانند ضروری باشند (۷۵،۸۰،۸۱).

با وجود این که از عمر روش MLPA ۹ سال بیشتر نمی‌گذرد، اما به دلیل مزیت‌های فراوان و کاربردهای متنوع، استقبال فراوانی از آن در آزمایشگاههای پژوهشی و نیز در تشخیص طبی به عمل آمده و روز به روز با افزایش تعداد کیت‌های MLPA، نواحی جدیدتری در ژنوم مورد مطالعه قرار می‌گیرند. به نظر می‌رسد که در آینده، پیشرفت‌ها و کاربردهای جدیدتری از این روش را شاهد خواهیم بود.

Archive of SID
www.SID.ir

References منابع

1. Schouten JP, Mc Elgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002;30:57.
2. Norman AM, Thomas NS, Kingston HM, Harper PS. Becker muscular dystrophy: correlation of deletion type with clinical severity. *J Med Genet*. 1990;27:236-239.
3. Noori Daloii MR. Principles of medical genetics emery. Trinpni P. 7th ed. Tehran: Jame-eh negar Press; 1990. [Persian].
4. Noori Daloii MR. Molecular genetic medical in third millennium 1st ed. Tehran: Samer Press; 2009. [Persian]
5. Petrijo-Bosch A, Peelen T, van Vliet M, van Eijk R, Olmer R, Drusedau M, et al. BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nat Genet*. 1997;17:341-345.
6. Wijnen J, van der Klift H, Vasen H, Khan PM, Menko F, Tops C, et al. MSH2 genomic deletions are a frequent cause of HNPCC. *Nat Genet*. 1998;20:326-328.
7. Leyland-Jones B, Smith I. Role of herceptin in primary breast cancer: views from North America and Europe. *Oncology*. 2001;61:83-91.
8. Noori Daloii MR, Jalilian N. Application of comparative genomic hybridization in cancer and genetic disorders: a review article. *Tehran University Medical Journal*. 2010;68:1-11. [Persian].
9. Trask BJ. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet*. 2002;3:769-778.
10. Noori Daloii MR, Khosrawinia S, Majidfar F. Culture and genetic engineering. Estefan ward O. 1st ed. Tehran: National Research Center of Genetiuc Engineering and Biotechnology Press; 1994. [Persian]
11. Noori Daloii MR, Rajabpoor F. The role of Micro-RNA in regulating gene expression, a poptosis, cancer diagnosis and treatment a review article. *Journal of Medical Sciences, Islamic Azad University*. 2011;21:151-161. [Persian]
12. Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today*. 2008;13:760-770.
13. Yunis JJ. High resolution of human chromosomes. *Science*. 1976;191:1268-1270.
14. Noori Daloii MR, Khosravania S, Samani AA, Majidfar F. Biotechnology education in schools. 1st ed. Tehran: National Research Center for Genetic Engineering and Bio Technology; 1994. [Persian]
15. Rudkin GT, Stollar BD. High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature*. 1977;265:472-473.
16. Salahshoriifar E, Gashasbi M, Nejat M. Genetics and biotechnology dictionary terms. Kubl g. 1st ed. Tehran: Jame-eh Negar Press; 2005: 350-873. [Persian]
17. Gouas L, Goumy C, Véronése L, Tchirkov A, Vago P. Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities. *Pathol Biol (Paris)*. 2008;56:345-353.
18. Noori Daloii MR, Alizadeh F. Prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma: a review article. *Journal od Hormozgan University of Medical Sciences*. 2011;15:74-89. [Persian].
19. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992;258:818-821.
20. Bayani J, Squire JA. Comparative genomic hybridization. *Curr Protoc Cell Biol*. 2005;22:Unit 22.6.
21. Noori Daloii MR, Tabarestani S. Moulecular genetics, diagnosis and treatment of breast cancer: a review article. *Asrar, Journal of Sabzevar School of Medical Sciences*. 2010;17:74-87. [Persian]
22. Hegde Madhuri R, Chin Ephrem LH, Mulle Jennifer G, Okou David T, Warren Stephen T, Zwick Michael E. Microarray-based mutation detection in the dystrophin gene. *Hum Muta*t. 2008;29:1091-1099.

Archive of SID
www.SID.ir

23. Law LW, Lau TK, Fung TY, Leung TY, Wang CC, Choy KW. De novo 16p13.11 microdeletion identified by high-resolution array CGH in a fetus with increased nuchal translucency. *BJOG*. 2009;116:339-343.

24. Armour JA, Barton DE, Cockburn DJ, Taylor GR. The detection of large deletions or duplications in genomic DNA. *Hum Mutat*. 2002;20:325-337.

25. Noori Daloii MR, Rashvand Z. Molecular genetics and gene therapy in ovarian cancer. *Ofogh-e-Danesh Journal*. 2010;16:5-19. [Persian]

26. Den Dunnen JT, Grootscholten PM, Bakker E, Blonden LA, Ginjaar HB, Wapenaar MC, et al. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet*. 1989;45:835–847.

27. Schwartz M, Duno M. Improved molecular diagnosis of dystrophin gene mutation using the Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification method. *Genet Test*. 2004;8:361-367.

28. Yamagishi H, Kato S, Hiraishi Y, Ishihara T, Hata J, Matsuo N, et al. Identification of carriers of Duchenne/Becker muscular dystrophy by a novel method based on detection of junction fragments in the dystrophin gene. *J Med Genet*. 1996;33:1027-1031.

29. Tabatabaei M, Noori Daloii MR, Biglo CH. Molecular biotechnology primer SB. 1st ed. Tehran: National Research Center for Genetic Enginering and Biotechnology; 1993. [Persian]

30. Noori Daloii MR, Maheronnaghsh R, Sayyah MK. Molecular genetics and gene therapy in esophageal cancer: a review article. *Tehran University Medical Journal*. 2011;69:331-341. [Persian]

31. Yau SC, Bobrow M, Mathew CG, Abbs SJ. Accurate diagnosis of carriers of deletions and duplications in Duchenne/Becker muscular dystrophy by fluorescent dosage analysis. *J Med Genet*. 1996;33:550-558.

32. Armour JA, Sismani C, Patsalis PC, Cross G. Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:605-609.

33. Lai Kent KS, Lo Ivan FM, Tong Tony MF, Cheng Lydia YL, Lam Stephen TS. Detecting exon deletions and duplications of the DMD gene using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). *Clin Biochem*. 2006;39:367-372.

34. Jankowski S, Currie-Fraser E, Xu L, Coffa J. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Analysis on Capillary Electrophoresis Instruments for a Rapid Gene Copy Number Study. *J Biomol Tech*. 2008;19:238–243.

35. Kozlowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis*. 2008;29:4627-4636.

36. 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.

37. Gille JJP, Hogervorst FBL, Pals G, Wijnen JTh, van Schooten RJ, Dommering CJ, Meijer GA, Craanen ME, Nederlof PM, de Jong D, McElgunn CJ, Schouten JP, Menko FH. Genomic deletions of MSH2 and MLH1 in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach. *Br J Cancer*. 2002;87:892-897.

38. Hogervorst FB, Nederlof PM, Gille JJ, McElgunn CJ, Grippeling M, Pruntel R, Regnerus R, et al. Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. *Cancer Res*. 2003;63:1449-1453.

39. Meuller J, Kanter-Smoler G, Nygren AOH, Errami A, Grönberg H, Holmberg E, et al. Identification of genomic deletions of the APC gene in Familial Adenomatous Polyposis by two independent quantitative techniques. *Genet Test*. 2004;8:248-256.

40. Harteveld CL, Voskamp A, Phylipsen M, Akkermans N, den Dunnen JT, White SJ, et al. Nine unknown rearrengments in 16p13.3 and 11p15.4 causing alpha and beta thalassemia charactrised by high resulotion multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet*. 2005;42:922-931.

Archive of SID

www.SID.ir

41. Tomaszewicz K, Kang P, Wu BL. Detection of homozygous and heterozygous SMN deletions of spinal muscular atrophy in a single assay with multiplex ligation-dependent probe amplification. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2005;37:55-57.

42. Arkblad EL, Darin N, Berg K, Kimber E, Brabdberg G, Lindberg C, et al. multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disorders*. 2006;16:830-838.

43. Franco-Hernandez C, Martinez-Glez V, Alonso ME, De Campos JM, Isla A, Vaquero J, et al. Gene dosage and mutational analyses of EGFR in oligodendrogliomas. *Int J Oncol*. 2007;30:209-215.

44. Joncourt F, Neuhaus B, Jostarndt-Foegen K, Kleinle S, Steiner B, Gallati S. Rapid Identification of female carriers of DMD/BMD by quantitative Real-time PCR. *Hum Mutat*. 2004;23:385-391.

45. Prior Thomas W, Bridgman Scott J. Experience and Strategy for the Molecular Testing of Duchene Muscular Dystrophy. *J Mol Diagn*. 2005;7:317-326.

46. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. 1987;50:509-517.

47. Forrest SM, Cross GS, Flint T, Speer A, Robson KJ, Davies KE. Further studies of gene deletions that cause Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Genomics*. 1988;2:109-114.

48. Hu XY, Ray PN, Murphy EG, Thompson MW, Worton RG. Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: its frequency, distribution, origin, and phenotype genotype correlation. *Am J Hum Genet*. 1990;46:682-695.

49. Roberts RG, Bobrow M, Bentley DR. point mutations in the dystrophin gene. *PNAS*. 1992;89:2331-2335.

50. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet*. 1990;86:45-48.

51. Chamberlain JS, GiIbbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:11141-11156.

52. Kunkel LM, Snyder JR, Beggs AH, Boyce FM, Feener CA. Etiology of human diseases at the DNA level. Raven Press. 1991;51-60.

53. Wang X, Wang Z, Yan M, Huang S, Chen TJ, Zhong N. Similarity of DMD gene deletion and duplication in the Chinese patients compared to global population. *Behav Brain Funct*. 2008;4:1-9.

54. Zimowski JG, Holding M, Fidziańska E, Fidziańska A, Ryniewicz B, Dobosz I, et al. Detection of rare mutations in the dystrophin gene. *Med Wieku Rozwoj*. 2009;13:140-145.

55. Sollaio MC, Paglietti ME, Perseu L, Giagu N, Loi D, Galanello R. Association of alpha–Globin gene quadriplication and hetrozigous beta-thalasemia in patients with thalassemia intermedia. *Hematologica*. 2009;94:1445-1448.

56. Franco-Hernández C, Martínez-Glez V, de Campos JM, Isla A, Vaquero J, Gutiérrez M, et al. Allelic status of 1p and 19q in oligodendrogliomas and glioblastomas: multiplex ligation-dependent probe amplification versus loss of heterozygosity. *Cancer Genet Cytogenet*. 2009;190:93-96.

57. Stangler Herodez S, Zagradisnik B, Erjavec Skerget A, Zagorac A, Kokalj Vokac N. Molecular Diagnosis of PMP22 Gene Duplications and Deletions: Comparison of Different Methods. *J Int Med Res*. 2009;37:1626-1631.

58. Mohseny AB, Tieken C, van der Velden PA, Szuhai K, de Andrea C, Hogendoorn PCW, et al. Small deletions but not methylation underlie CDKN2A/p16 loss of expression in conventional osteosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010;49:1095-1103.

59. Farshid G, Cheetham G, Davies R, Moore S. validation of the Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) technique for the determination of HER2 Gene Amplifacation in breast cancer. *Diagn Mol Pathol*. 2011;20:11-17.

Archive of SID
www.SID.ir

60. Palomares M, Delicado A, Lapunzina P, Arjona D, Amiñoso C, Arcas J, et al. MLPA vs multiprobe FISH: comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients with idiopathic mental retardation. *Clin Genet*. 2006;69:228-233.

61. Kirchhoff M, Bisgaard AM, Bryndorf T, Gerdes T. MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5.8% of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williams-Beuren syndrome regions. *Eur J Med Genet*. 2007;50:33-42.

62. Girirajan S, Mendoza-Londono R, Vlangos CN, Dupuis L, Nowak NJ, Bunyan DJ, et al. Smith-Magenis syndrome and Moyamoya disease in a patient with del (17) (p11.2p13.1). *Am J Med Genet*. 2007;143A:999-1008.

63. Sørensen KM, Agergaard P, Olesen C, Andersen PS, Larsen LA, Ostergaard JR, et al. Detecting 22q11.2 deletions by use of multiplex ligation-dependent probe amplification on DNA from neonatal dried blood spot samples. *J Mol Diagn*. 2010;12:147-151.

64. Baujat G,Cormier-Daire V. Sotos syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2007;2:1-6.

65. Elsea SH, Girirajan S. Smith-Magenis syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2008;16:412-421.

66. 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 microdeletions in patients with X-linked mental retardation. *Genet Med*. 2007;9:117-122.

67. Kooper AJ, Faas BH, Kater-Baats E, Feuth T, Janssen JC, van der Burgt I, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) as a stand-alone test for rapid aneuploidy detection in amniotic fluid cells. *Prenat Diagn*. 2008;28:1004-1010.

68. Stembalska A, Ryszard S, Karolina P, Justina G, Maria MS. Prenatal diagnosis - principles of diagnostic procedures and genetic counseling. *Folia Histochemica ET Cytobiologica*. 2007;45:11-16. [review]

69. Diego-Alvarez D, Ramos-Corrales C, Garcia-Hoyos M, Bustamante-Aragones A, Cantalapiedra D, Diaz-Recasens J, et al. Double trisomy in spontaneous miscarriages: cytogenetic and molecular approach. *Hum Reprod*. 2006;21:958-966.

70. Opstal DV, Boter M, de Jong D, Berg Cvd, Bruggenwirth HT, Wildschut HIJ, et al. Rapid aneuploidy detection with multiplex ligation-dependent probe amplification: a prospective study of 4000 amniotic fluid samples. *Eur J Hum Genet*. 2009;17:112–121.

71. Bunyan DJ, Skinner AC, Ashton EJ, Sillibourne J, Brown T, Collins AL, et al. Simultaneous MLPA-based multiplex point mutation and deletion analysis of the Dystrophin gene. *Molecul Biotech*. 2007;35:135-140.

72. Liu JZ, Han H, Schouten JP, Wang LR, Fan XP, Duarte HB, Zhu CJ, Cai R, Xiao B, Wang QT. Detection of α-Thalassemia in China by Using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *Hemogolobin*. 2008;32:561-571.

73. Eldering E, Spek CA, Aberson HL, Grummels A, Derks IA, de Vos AF, et al. Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:153.

74. Hess CJ, Denkers F, Ossenkoppele GJ, Waisfisz Q, Mcelgunn CJ, Eldering E, et al. Gene expression profiling of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia by novel multiplex-PCR-based method. *Leukemia*. 2004;18:1981-1988.

75. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, et al. Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:128.

76. Bittel DC, Kibiryeva N, Butler MG. Methylation-Specific Miltiplex Ligation-Dependent Probe Amplification analysis of subjects with chromosome 15 abnormalities. *Genet Test*. 2007;11:467-475.

77. Calounova G, Novotna D, Simandlova M, Havlovicova M, Zumrová A, Kocarek E, et al. Prader-Willi syndrome due to uniparental disomy in a patient with a balanced chromosomal translocation. *Neuro Endocrinol Lett*. 2006;27:579-585.

Archive of SID
www.SID.ir

78. Schuetzle MN, Uphoff TS, Hatten BA, Dawson DB. Utility of microsatellite analysis in evaluation of pregnancies with placental mesenchymal dysplasia. *Prenat Diag*. 2007;27:1238-1244.

79. Priolo M, Sparago A, Mammi C, Cerrato F, Lagana C, Riccio A. MS-MLPA is a specific and sensitive technique for detecting all chromosome 11p15.5 imprinting defects of BWS and SRS in a single-tube experiment. *Euro J of Hum Genet*. 2008;16:565-571.

80. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol*. 2002;196:1–7.

81. Jeuken JW, Cornelissen SJ, Vriezen M, Dekkers MM, Errami A, Sijben A, et al. MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. *Lab Invest*. 2007;87:1055-1065.

Archive of SID

www.SID.ir

Applications of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) method in diagnosis of cancer and genetic disorders

MR. Noori Daloii , PhD [1] F. Khordadpoor-Deilamani, MSc [2]

Professor Department of Medical Genetics [1] , Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Master of Genetics [2] , Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

(Received 31 Dec, 2011 Accepted 12 May, 2012)

ABSTRACT

Introduction: Lots of human diseases and syndromes result from partial or complete gene deletions and duplications or changes of certain specific chromosomal sequences. Many various methods are used to study the chromosomal aberrations including Comparative Genomic Hybridization (CGH), Fluorescent in Situ Hybridization (FISH), Southern blots, Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation (MAPH) and etc. Some of these techniques showed resolution limitations and are not capable to detect deletions or duplications of single exons. Some of them are time consuming (such as FISH) or require large amounts of sample DNA (like southern blots). Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) method with its sensitivity and robustness is wildly used in diagnosis and researches for the detection of disease causing gene deletions or amplifications. In comparison with array CGH which analyses the Copy Number Variations (CNVs) at the genome-wide level, MLPA method detects the CNVs over small regions of the genome. The present descriped review MLPA method compared with other techniques along with its new applications such as detecting point mutations, MS-MLPA and RT-MLPA in clinical genetics and research laboratories.

Correspondence:
MR. Noori Daloii, PhD.
Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences.
Tehran, Iran
Tel:+98 21 88953005
Email:
nooridaloii@sina.tums.ac.ir

Key words: Cancer - Aneuploidy – Genetic Disorders

Archive

www.SID.ir