تکنیک MLPA و کاربرد آن در تشخیص بیماری های ژنتیکی

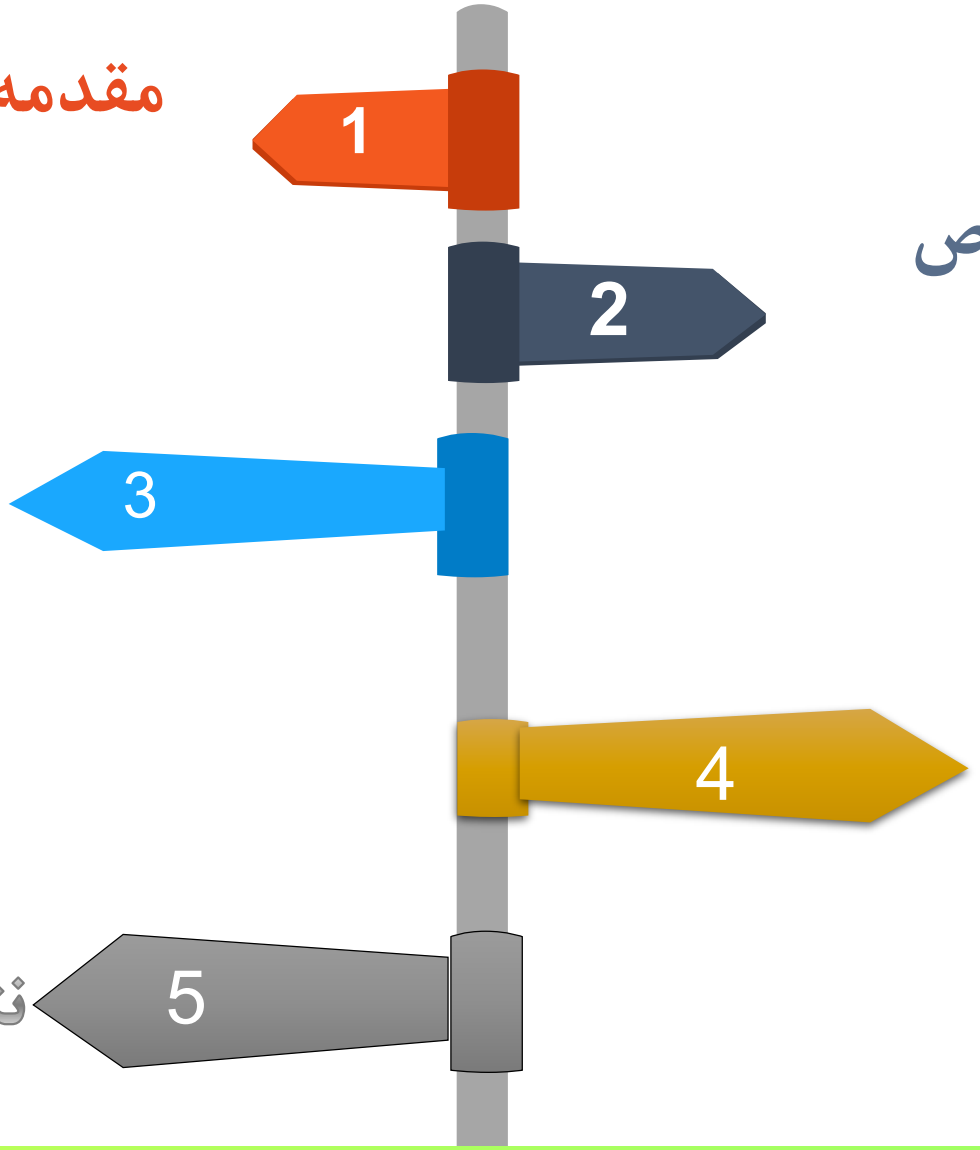
ارائه دهنده: ریحانه هاشمی

استاد راهنما: خانم دکتر فاطمه کیفی

۶ دی ماه

مرکز آموزش عالی علوم پزشکی وارستگان

فهرست مطالب



1. مقدمه
2. انواع روش های تشخیص نقایص کروموزومی
3. تکنیک MLPA
4. تشخیص بیماری های ژنتیکی به روش MLPA
5. نتیجه گیری

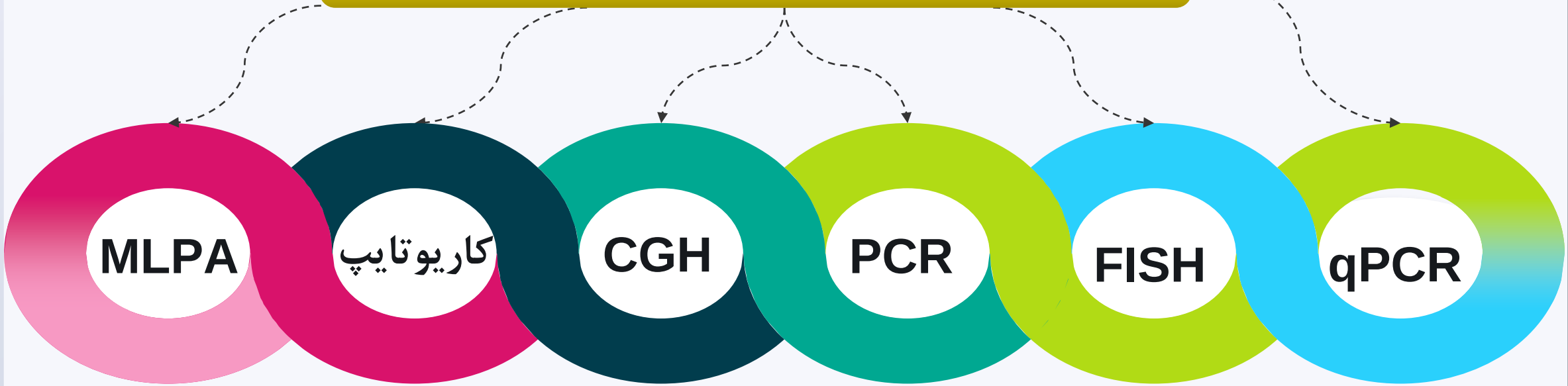
اختصارات

1. MLPA = Multiplex Ligation-dependent probe amplification
2. FISH = Flurescent In Situ Hybridization
3. CGH = Comparative Genomic Hybridization

مقدمه

بخش دوم

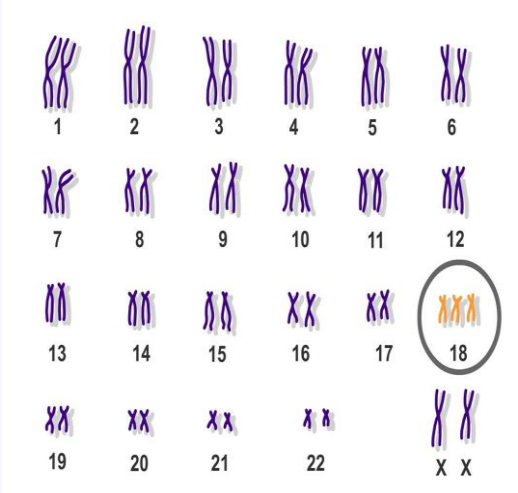
انواع روش های تشخیص نقایص کروموزومی



کاریوتایپ

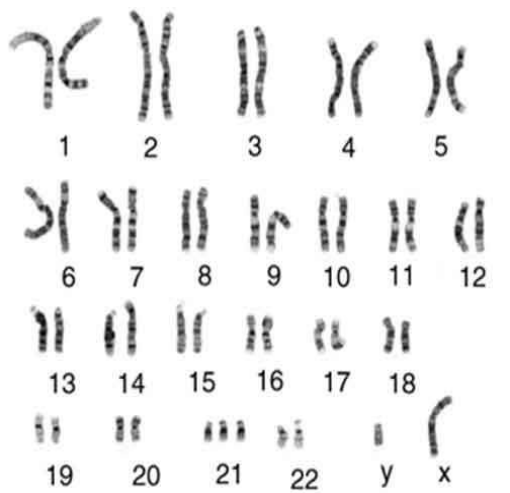
- نمایش محتوای کروموزومی یک سلول
- نخستین روش فراهم کننده ی بررسی تغییرات کروموزومی
- وقت گیر

تری زومی ۱۸



47, XX +18

تری زومی ۲۱



47, XY , + 21

FISH

- ✓ بررسی حذف ها
- ✓ بررسی اضافه شدن ها
- ✓ بررسی کروموزوم های متافازی و اینترفازی

- ✗ عدم تشخیص توالی دقیق
- ✗ عدم شناسایی ریز حذف ها
- ✗ وقت گیر

CGH

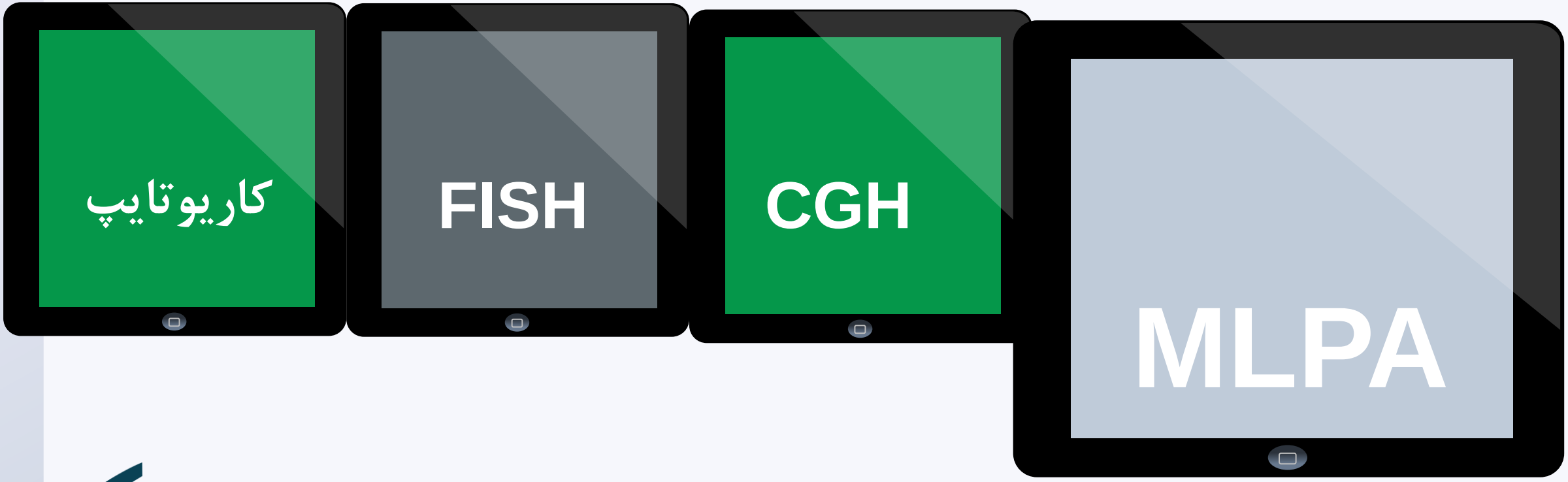
✓ بررسی تغییرات تعدادی توالی های کروموزومی

✓ مطالعه همزمان همه کروموزوم ها

✗ عدم تشخیص تغییرات کروموزومی در مکان های کوچک ژنومی

✗ عدم شناسایی جا به جایی و واژگونی

برتری تکنیک MLPA



کاربرد های MLPA

بررسی جهش‌های نقطه ای

حذف یا اضافه شدن

بررسی همزمان چند ژن

تشخیص همزمان انواع مختلف اختلالات ژنتیکی

بخش سوم

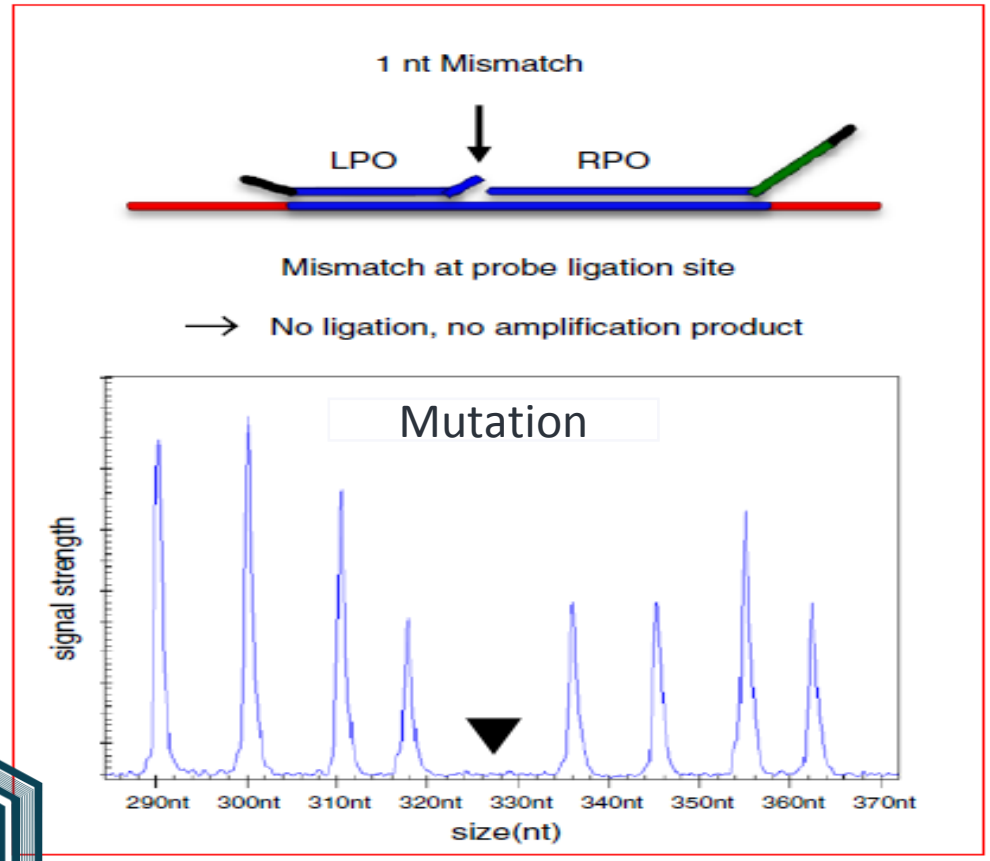
MRC-Holland
MLPA®

How does MLPA work?

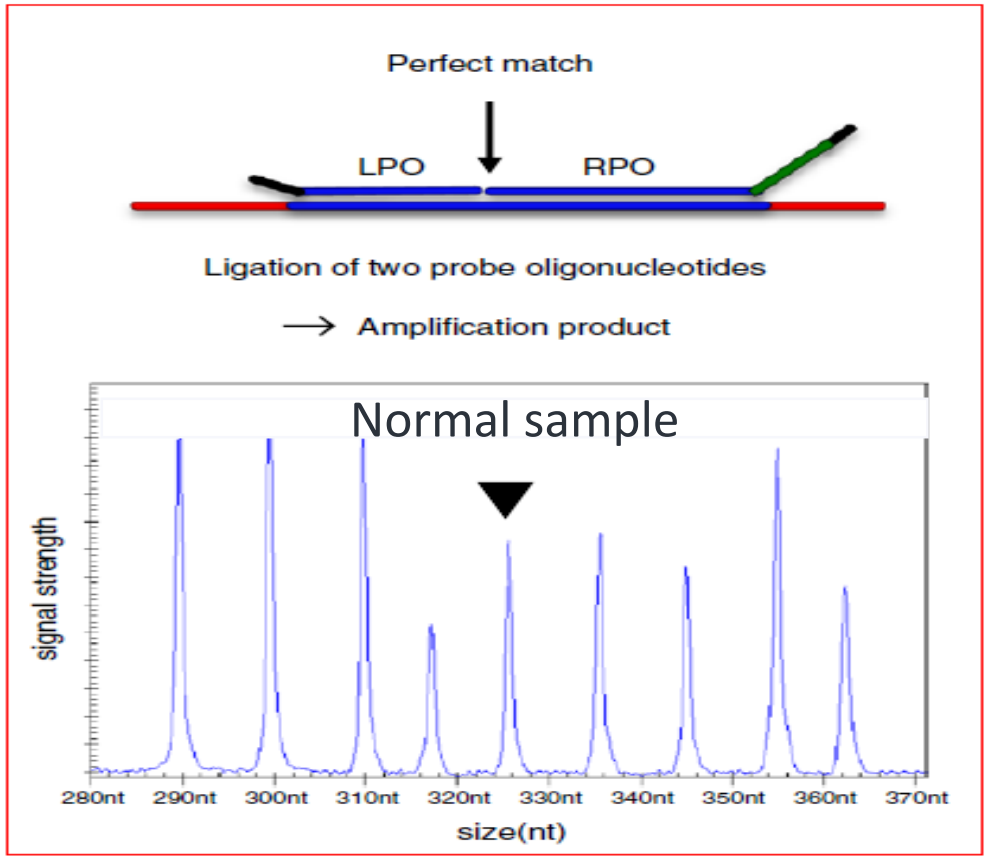
Made With
VivaVideo

مقایسه نمودار فرد سالم و فرد دارای جهش حذف و اضافه شدن

Mutation



Normal



بخش سوم

تشخیص بیماری های ژنتیکی
به کمک تکنیک MLPA

مرکز آموزش عالی علوم پزشکی وارستگان

دیستروفی عضلانی دوشن

عقب ماندگی ذهنی

آتروفی عضلانی

آلفا تالاسمی

بتا تالاسمی

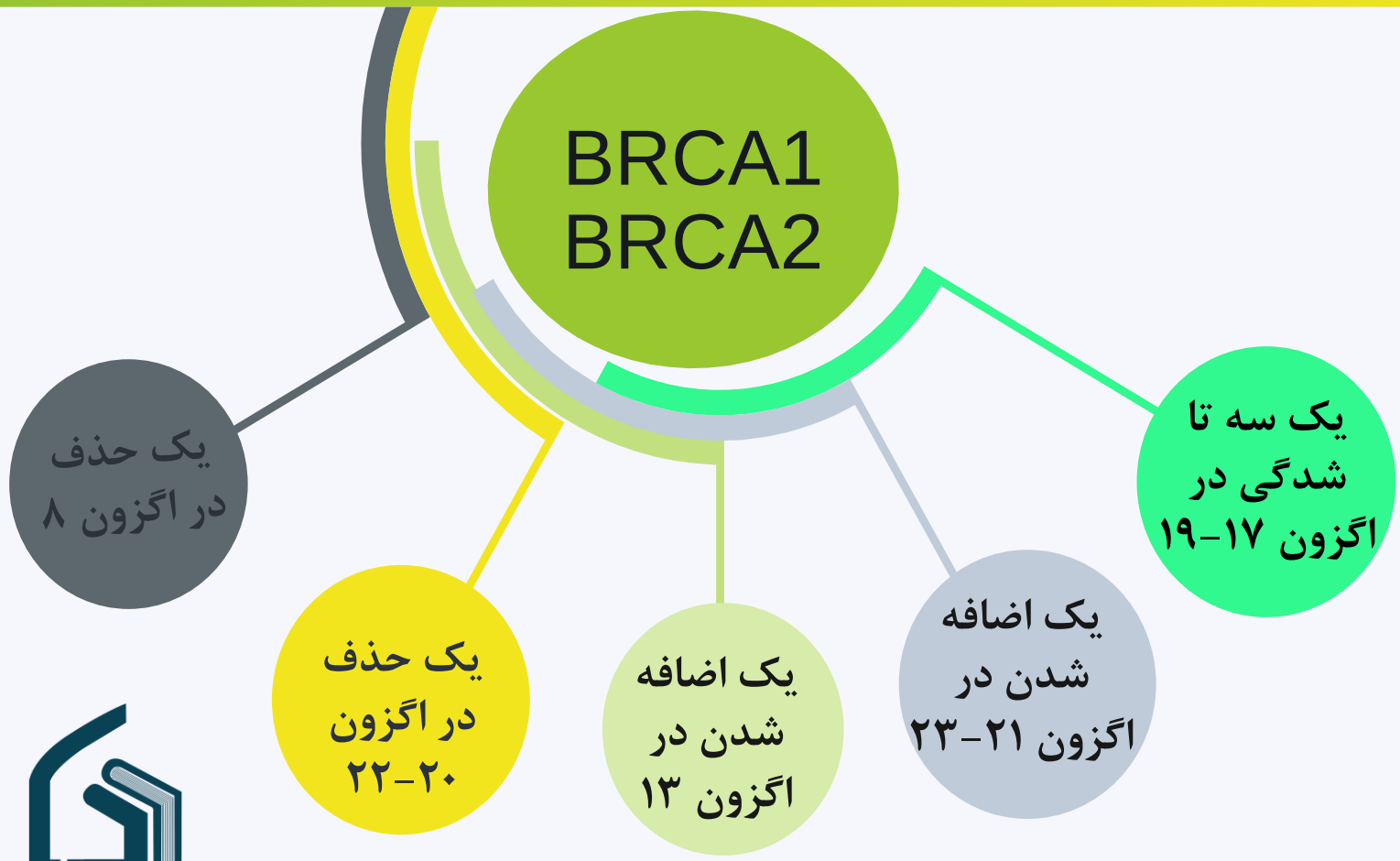
نوروبلاستوما

سرطان پستان

سرطان روده

سرطان پستان

مطالعات ۶۶۱ خانواده:



سرطان کولورکتال غیرپولیپی ارثی

- سرطان HNPCC
- بیماری ژنتیکی غالب اتوزومی

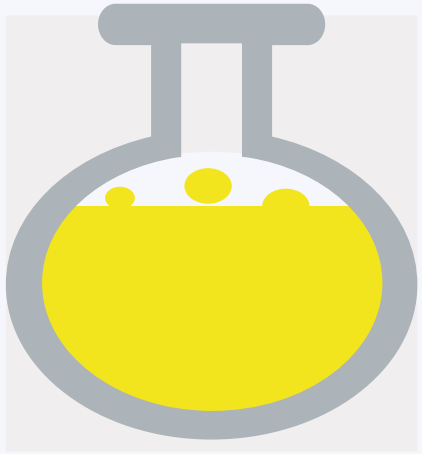
MLH1

MSH2

MSH6

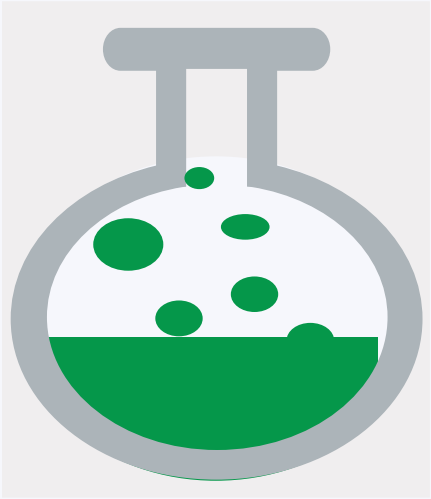
سرطان کولورکتال غیرپولیپی ارثی

۲خانواده



مطالعات برای یافتن
حذف های
MLH1 و MSH2
در بین ۱۲۶ خانواده

54.8%



حذف کامل MLH1

جهش های بیماری زا

آلفا و بتاتالاسمی

- بررسی حذف ها و اضافه شدن ها

در زنجیره های آلفا و بتاتالاسمی بااستفاده از MLPA:

تشخیص ۱۱ حذف متفاوت در ۱۹ مورد از ۳۸ بیمار آلفا تالاسمی

تشخیص ۱۰ حذف در ۳۱ مورد از ۵۱ بیمار بتا تالاسمی

MLPA روشی سریع، حساس و با قدرت بالا

SMA

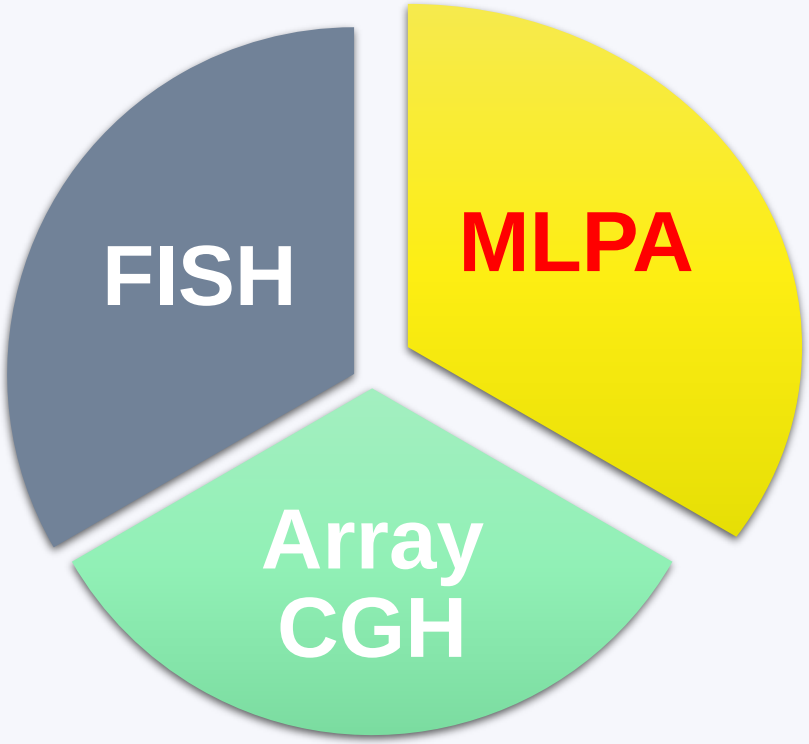
حذف SMN-1

۶ مورد از ۲۰ بیمار

حذف جزئی
SMN-1
در اگزون های ۱-۶

۲ مورد از ۹ بیمار

نوروبلاستوما



- تشخیص با روش های:
- حذف 3P, 4P, 9P, 12P
- ارجحیت روش MLPA به دلیل مناسب بودن آن جهت تشخیص حذف ها و اضافه شدن های بزرگ

بررسی عقب ماندگی های ذهنی

۱	۲	۳
سندروم آنجلمن حذف 15q11	سندروم ویلیامز بورن حذف7q11	روش های مختلف کاریوتایپ، MLPA،FISH

DMD and BMD

۱۷۹ بیمار
غیرخویشاوند

تکنیک MLPA

۷۳ ٪
حذف یا اضافه شدن
در ژن دیستروفین

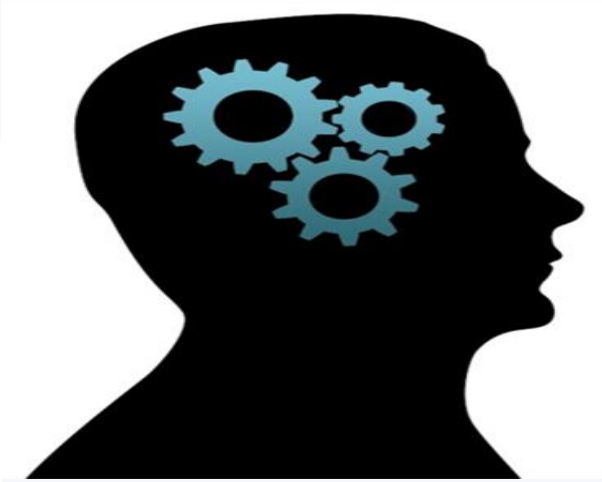
۱۰۵ بیمار DMD

۱۰ بیمار BMD

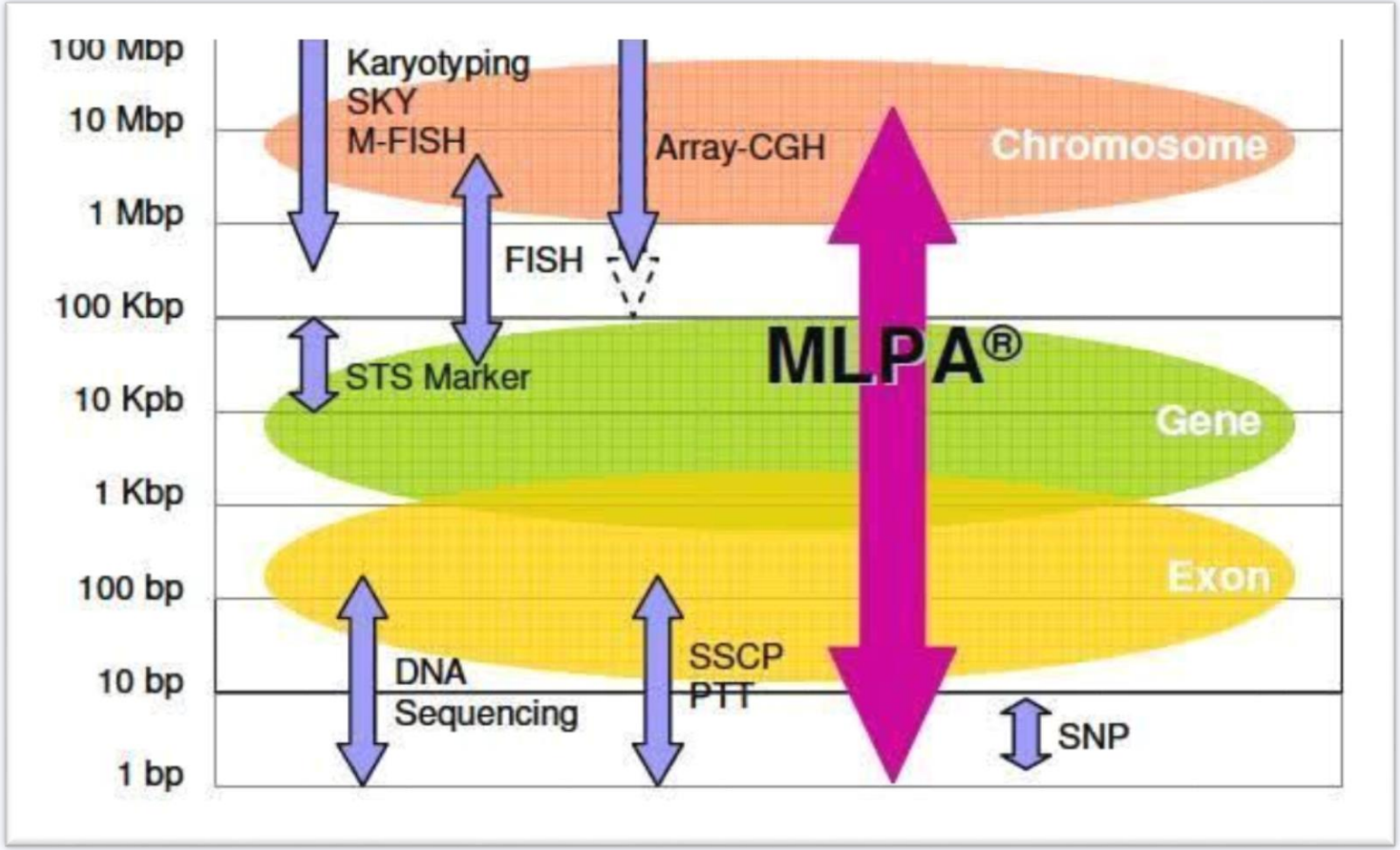
تکنیک MLPA

۱۴ اضافه شدن
۴ جهش نقطه ای
در ژن دیستروفین

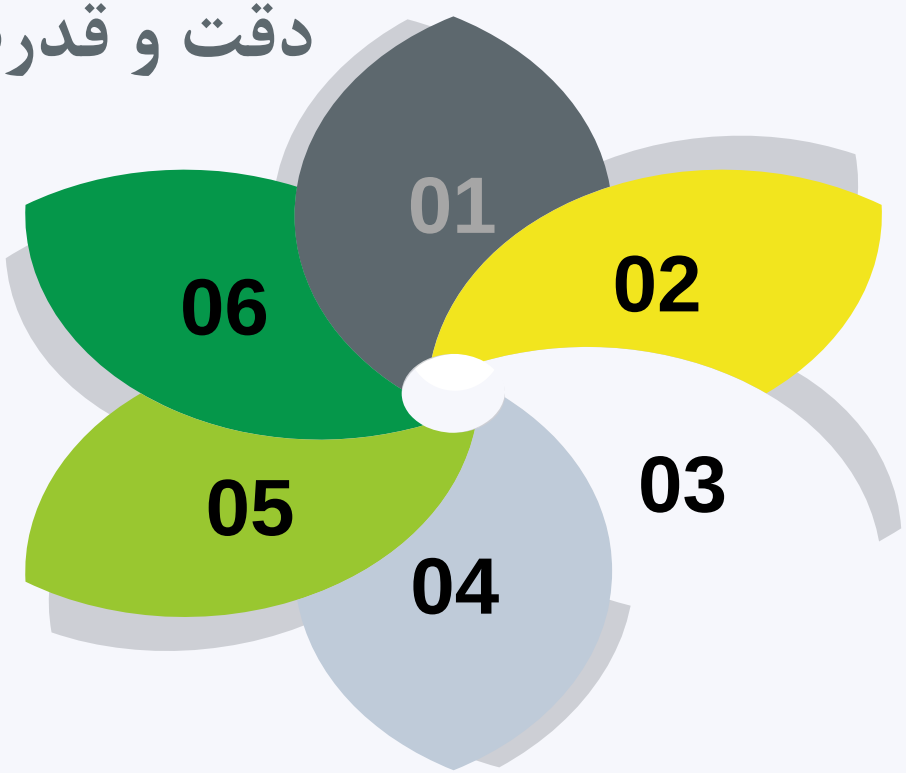
بخش چهارم : نتیجه گیری



مقایسه تکنیک با سایر روش ها MLPA



مزایای استفاده از تکنیک MLPA



دقت و قدرت بالا

امکان تشخیص هم‌زمان اختلالات ژنتیکی

نیاز به میزان کم DNA

تشخیص حذف ها و اضافه شدن های بزرگ

سرعت جوابدهی بالا

هزینه نسبتا کم

معایب روش MLPA

عدم تشخیص جابه جایی ها و واژگونی ها

تهیه ی پروب ها وقت گیر، پیچیده و هزینه بردار

نیاز به DNA با کیفیت بالا

عدم شناسایی تغییرات ژنومی مکان های فاقد پروب

منابع

1. Chauhan RM, Rao MV, Mehta J. MOLECULAR ANALYSIS OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY CARRIERS IN GUJARATI POPULATION USING MLPA. 2017.

2. Zhao Y, Lou J, Sun M, Fu Y, Liu Y. Analysis of the cause of pregnancy failure with combined MLPA assay for subtelomeric regions and ultrasonography. Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi= Zhonghua yixue yichuanxue zazhi= Chinese journal of medical genetics. 2017;34(1):81-4.

3. Ferri L, Cavicchi C, Fiumara A, Parini R, Guerrini R, Morrone A. Pitfalls in the detection of gross gene rearrangements using MLPA in Fabry disease. Clinica Chimica Acta. 2016;452:82-6

منابع

4 Adam N, Coutance G, Drieux F, Viailly P, Rabant M, Gay A, et al. RT-MLPA as a New Tool for the Molecular Diagnosis of Allograft Rejection in Formalin Paraffin-embedded Endomyocardial Biopsies. The Journal of Heart and Lung Transplantation. 2018;37(4):S79.

5 Yang J, Li SY, Li YQ, Cao JQ, Feng SW, Wang YY, et al. MLPA-based genotype–phenotype analysis in 1053 Chinese patients with DMD/BMD. BMC medical genetics. 2013;14(1):29.

6 Benard A, Zondervan I, Schouten J, de Groot K, Ghazavi F, Sarhadi V, et al. A Novel Multiplex NGS-Based Digital MLPA Assay for Copy Number Detection of 700 Target Sequences in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Am Soc Hematology; 2016.

7 Huber C, Baujat G, Zarbrate M, Bole-Feysot C, Masson C, Nitschké P, et al., editors. Molecular analysis of 26 Ellis van Creveld syndrome (EVC) families using targeted NGS, MLPA and array CGH techniques reveals high frequency of a recurrent maternal deletion of EVC. online abstracts; 2016.
using MLPA in Fabry disease. Clinica Chimica Acta. 2016;452:82-6.

منابع

8 Poojar M, Veeramani PK, Polavarapu K, Nalini A, Gayathri N, Singh R, et al. A Comparative Analysis of Findings by mPCR, MLPA and Muscle Biopsy in A Cohort of Children with Duchenne Muscular Dystrophy: A First Study (P6. 254). Neurology. 2015;84(14 Supplement):P6. 254.

9 Sabbaghian N, Srivastava A, Hamel N, Plourde F, Gajtko-Metera M, Niedziela M, et al. Germ-line deletion in DICER1 revealed by a novel MLPA assay using synthetic oligonucleotides. European Journal of Human Genetics. 2014;22(4):564.

10 Vaarwater J, van den Bosch T, Mensink HW, van Kempen C, Verdijk RM, Naus NC, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification equals fluorescence in-situ hybridization for the identification of patients at risk for metastatic disease in uveal melanoma. Melanoma research. 2012;22(1):30-7.

11 NooriDaloii M, Khordadpoor-Deilamani F. Applications of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) method in diagnosis of cancer and genetic disorders. Bimonthly Journal of Hormozgan University of Medical Sciences. 2012;16(3):247-63.

به خدا خوش بین باش

آموخته ام که وقتی نا امید می شوم
خداوند با تمام عظمتش ناراحت می شود
و عاشقانه انتظار می کشد
که به رحمتش امیدوار شوم

مرکز آموزش عالی علوم پزشکی وارستگان