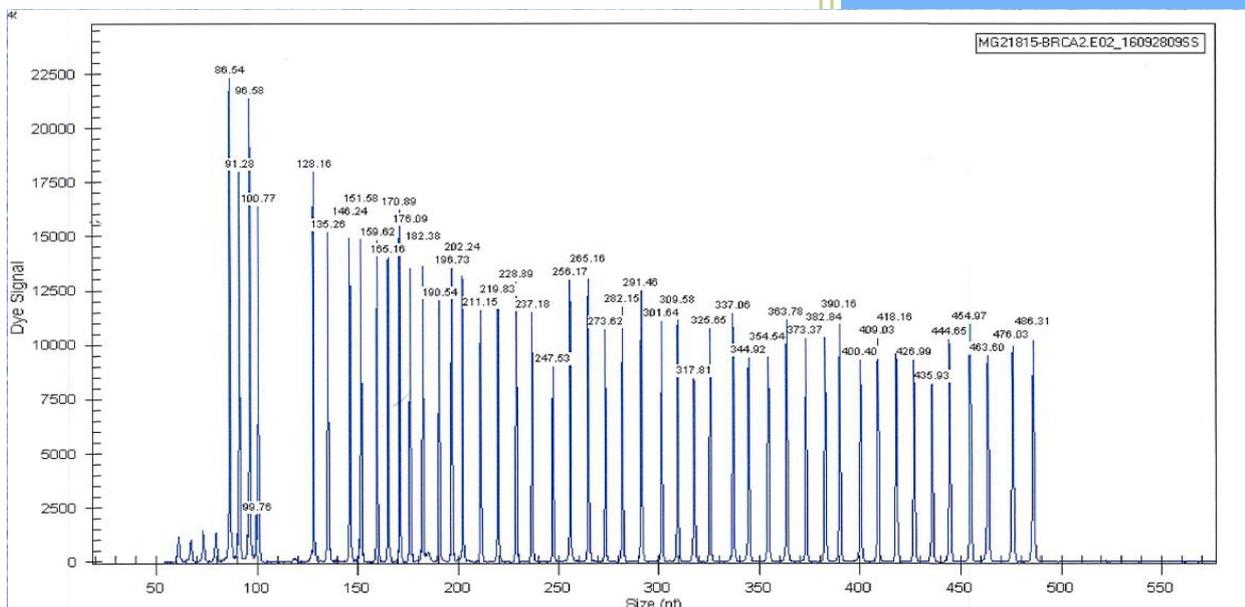


MLPA : Multiplex Ligation Probe Amplification

Applicazione allo studio di BRCA 1 - 2



MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification)

L'MLPA è una tecnica di biologia molecolare descritta per la prima volta nel 2002 (Schouten JP Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* (2002) Jun 15;30(12):e57), utilizzata ampiamente per scopi di ricerca e di diagnostica in tutto il mondo. Le applicazioni attuali riguardano: il rilevamento di alterazioni genomiche come duplicazioni e delezioni (riarrangiamenti di piccole e grandi dimensioni, variazioni del n° di copie di regioni subtelomeriche, aneuploidie); la valutazione dello stato di metilazione delle isole CpG del DNA; l'identificazione di mutazioni puntiformi e/o polimorfismi di singolo nucleotide (SNPs); quantizzazione dell'mRNA.

Da un punto di vista operativo, l'MLPA è una metodica basata sulla "ligation" (ligazione) di due sonde oligonucleotidiche, che ibridano in regioni adiacenti di una sequenza target, seguita dall'amplificazione del prodotto di tale reazione. Costruendo in modo opportuno le sonde, è possibile riconoscere e successivamente amplificare contemporaneamente fino a 50 sequenze, sfruttando il principio della PCR multipla. È importante sottolineare che **solo le sonde ligate correttamente potranno essere sottoposte al processo di amplificazione esponenziale**. La fase di "ligation" è dunque il processo limitante per le reazioni successive oltre che il processo che permette di individuare eventuali anomalie della sequenza target.

I frammenti di PCR separati mediante elettroforesi capillare sono visualizzati come un elettroferogramma. L'area e l'altezza di ogni picco sono proporzionali al numero di copie del locus genico che si sta analizzando.

In caso di delezioni nella regione di interesse la reazione di "ligation" non avviene, ciò determina una riduzione/assenza del prodotto di amplificazione rilevabile come riduzione/assenza del picco corrispondente. In caso di amplificazioni invece si avrà un aumento dell'amplicone ed un picco con un'area più grande. L'MLPA è utile anche per rilevare mutazioni puntiformi già note, in questa occasione le sonde devono essere disegnate in modo che il sito di "ligation" sia corrispondente al sito della mutazione puntiforme. In caso di mutazione si avrà una riduzione del segnale e dell'area del picco.

Sebbene le reazioni di amplificazione mediante MLPA siano molto riproducibili, è presente **una variabilità di efficienza di amplificazione tra le differenti sequenze target; di conseguenza l'analisi di un singolo profilo di reazione si rivela poco informativa. Per un'analisi corretta, il profilo dei picchi di un campione deve essere sempre**

confrontato con quelli ottenuti da almeno due/tre campioni di DNA “normale” (controlli negativi) e di un campione in cui è presente l’anomalia in oggetto (controllo positivo). È preferibile che i campioni di controllo e quelli da testare provengano dalla stessa matrice biologica e siano sottoposti alla stessa metodologia di estrazione e trattamento.

Inoltre ogni kit SALSA MLPA contiene dei controlli interni in grado di evidenziare errori o anomalie verificatesi durante i passaggi sperimentali, sono infatti presenti frammenti per controllare la quantità di DNA, controlli di ligazione, denaturazione; ibridazione e sonde specifiche per il sesso del campione.

Vantaggi e Svantaggi dell’MLPA

L’MLPA è sicuramente una tecnica semplice ed innovativa al tempo stesso. Di seguito sono riportati i vantaggi e gli svantaggi della metodica.

Vantaggi:

1. Ampia gamma di applicazioni.
2. Analisi contemporanea anche di quasi 50 target differenti in una sola reazione.
3. Elevata riproducibilità, facilità di esecuzione.
4. Sensibilità, sono richiesti solo 50 ng di DNA per una reazione.
5. Capacità di discriminare sequenze che differiscono per un singolo nucleotide.
6. Capacità di discriminare variazioni anche minime del numero di copie (3 rispetto a 2) di un gene in una miscela complessa.
7. Possibilità di analizzare piccole delezioni o duplicazioni di lunghezza pari a circa 60 nucleotidi.

Svantaggi :

1. Sensibilità ai contaminanti (inibitori della PCR come tracce di fenolo).
2. Dipendenza dei risultati dalla qualità del campione di partenza.
3. Dipendenza dalla tipologia di controlli utilizzati per l’analisi.
4. Incapacità di discriminare traslocazioni bilanciate.
5. Incapacità di rivelare tutte le triploidie.
6. Incapacità di discriminare mutazioni puntiformi sconosciute.
7. Applicabilità scarsa nello studio dei tumori in presenza di popolazioni cellulari eterogenee, in cui la massa tumorale è inferiore al 50% del totale.
8. Impossibilità di utilizzo per l’analisi di singole cellule a differenza della FISH.
9. Capacità di riconoscere esclusivamente le anomalie delle regioni riconosciute dalle sonde impiegate.

Applicazione allo studio dei geni BRCA1 e 2

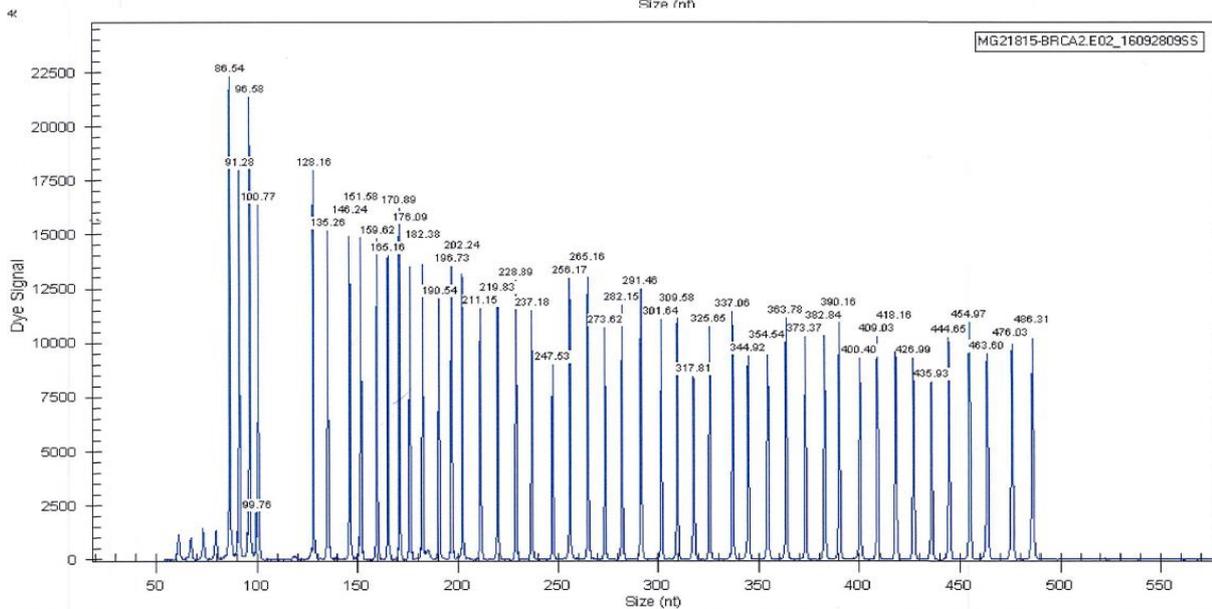
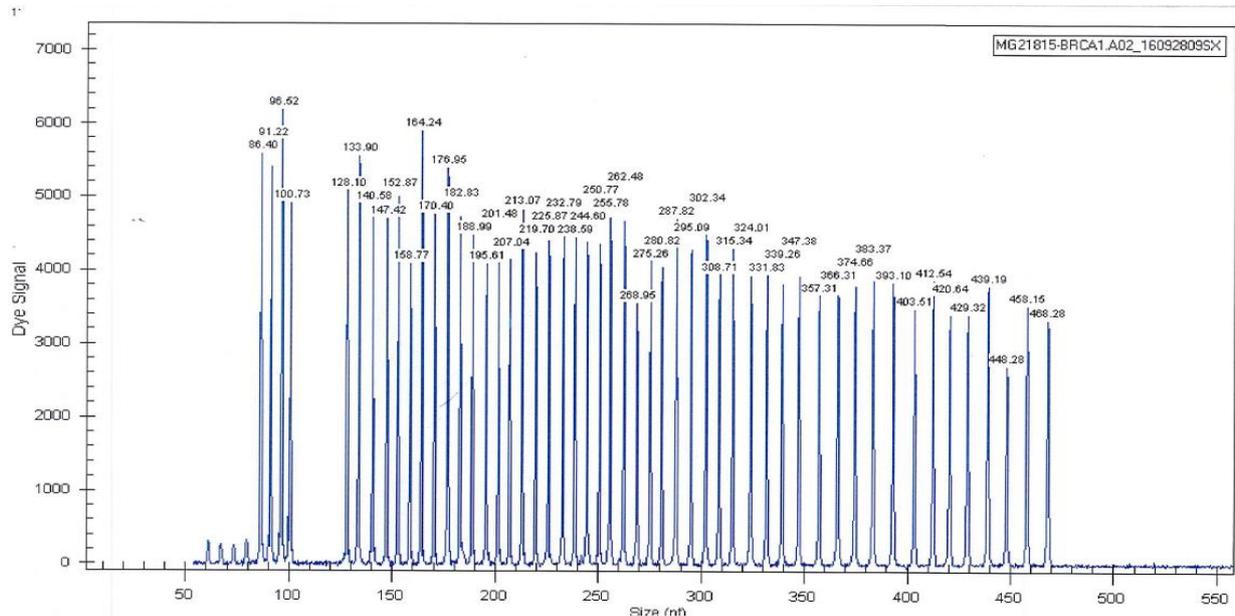
Anomalie germinali nei geni BRCA1 e BRCA2 sono la causa più frequente di predisposizione all'insorgenza di carcinomi del seno ereditari. I tumori ereditari, rispetto a quelli sporadici, sono caratterizzati da: precocità di insorgenza, maggiore frequenza di patologia bilaterale e/o associazione con tumore pancreatico e ovarico; maggiore incidenza tra soggetti della stessa famiglia, insorgenza tra i soggetti maschi della famiglia.

Mutazioni nei geni BRCA1 e BRCA2 si riscontrano nel 20-25% dei tumori al seno ereditari e nel 5-10% di tutti gli altri tumori al seno, inoltre si riscontrano nel 15% dei tumori dell'ovaio complessivamente. La maggior parte delle mutazioni sono di tipo puntiforme, pertanto l'analisi MLPA è raccomandata in combinazione con l'analisi di sequenza.

Per lo studio del gene **BRCA1** (chr.17q21.31) è utilizzato il kit SALSA® MLPA® P002-D1 BRCA1, un test IVD/RUO ottimizzato per lo studio delle delezioni/duplicazioni degli esoni del gene da DNA genomico estratto da sangue, non applicabile a campioni fissati in paraffina o tessuti tumorali. Altre matrici (es. tamponi buccali) devono essere preventivamente validate sperimentalmente in laboratorio. Tutte le delezioni/duplicazioni identificate devono essere confermate mediante metodiche alternative o con il kit SALSA® MLPA® probemix P087. Oltre alle sonde di controllo, il kit SALSA® MLPA® P002-D1 contiene 48 sonde di peso molecolare compreso tra i 130 e i 469 nt, di cui 38 specifiche per il gene BRCA1 e 10 che riconoscono regioni di riferimento su vari cromosomi. Le sonde sono state disegnate per identificare tutti gli esoni del gene BRCA1 (Esoni:1a, 1b, 2, 3, 5-24 secondo la numerazione tradizionale; Esoni: 1a, 1b, 2-23 secondo la numerazione indicata nella sequenza di riferimento NCBI G_005905.2) e due regioni regolatorie localizzate rispettivamente 4.6kb e 0.7kb a monte dell'esone 1. In particolare sono presenti 8 sonde per l'esone 11 data la sua lunghezza, e tre sono presenti per l'esone 13 che è quello più frequentemente deleto/duplicato (Hogervorst et al. 2003).

Per lo studio del gene BRCA2 (chr. 13q12.3) è utilizzato il kit SALSA® MLPA Lot C1-0416, un test **RUO** costituito da 50 sonde con prodotti di amplificazione compresi tra i 130 e i 500nt. Con questo kit è possibile analizzare tutti i 27 esoni del gene BRCA2 (NM_000059.3) (per alcuni esoni es. esone 11 sono presenti più sonde in modo da ricoprire sequenze esoniche di maggiori dimensioni) e gli esoni 1 e 9 del gene CHEK2 (chr. 22q12.1-NM_007194.3). Inoltre sono presenti una sonda specifica per la sequenza "wild-type" dell'esone 3 del gene BRCA2, in grado di identificare la mutazione c.156_157insAlu, e una sonda per la mutazione c.1100delC, nell'esone 11 del gene CHEK2.

Esempi di migrazione elettroforetica BRCA 1 e 2.



MeriGen

Diagnostica Clinica e Biologia Molecolare

MeriGen Research srl – Ricerca e Sviluppo Diagnostico

**Laboratorio “Cesare Pandolfi & C.” sas – Centro Diagnostico
Accreditato SSN Settori Specialistici A1, A2, A3, A4, A6, R**

Traversa Michele Pietravalle, 11 – 80131 – Napoli

Tel. 0815465026

email: info@merigen.it

sito web: www.merigen.it