

METODICKÝ LIST – TECHNIKA MLPA

Technika MLPA (multiplex ligation-depend probe amplification) je nová metóda molekulevej biológie, ktorú využívame od roku 2012. Princípom metódy je naviazanie oligonukleotidových sond na cieľovú sekvenciu DNA na základe komplementarity. Každá sonda sa skladá z dvoch oligonukleotidov. Po hybridizácii na cieľové miesto sú obidve sondy spojené ligázou. Iba spojené sondy sú po denaturácii amplifikované pomocou klasickej PCR reakcie použitím dvojice univerzálnych primerov. Namnožené sondy sú rozdelené kapilárnou elektroforézou na základe ich rôznej dĺžky. Posledným krokom je analýza pomocou špeciálneho počítačového programu.

Výhodou tejto metódy je, že v jednej reakcii môžeme vyšetrovať až 40-45 rôznych úsekov DNA pomocou jedného reakčného kitu MLPA. Je možné testovať veľký počet DNA vzoriek súčasne. Je to technika, ktorá je vysoko citlivá, dokáže zachytiť sekvencie líšiace sa v jednom nukleotide.

Na jednu MLPA reakciu je potrebná DNA s koncentráciou 20 ng, ktorá môže byť rôzneho pôvodu (izolovaná z periférnej krvi, kostnej drene, plodovej vody, choriových klkov.....). Metóda MLPA dokáže detegovať iba numerické zmeny – delécie, duplikácie, neodhalí však balancované prestavby, ako sú translokácie alebo inverzie.

V našom laboratóriu využívame nasledovné reakčné MLPA kity.

SALSA MLPA P377 probemix:

Je určený pre vzorky DNA získané z krvi alebo kostnej drene pacientov s hematologickými malignitami, vrátane akútnej lymfoblastovej leukémie (ALL), akútnej myeloickej leukémie (AML), chronickej lymfoickej leukémie (CLL), chronickej myeloickej leukémie (CML), myelodysplastického syndrómu (MDS) a rôznych typov lymfómov.

Obsahuje sondy pre niekoľko génov a chromozómových oblastí, ktoré majú diagnostickú alebo prognosticky významnú úlohu v hematologických malignitách: 2p (*MYCN* a *ALK*), 5q (*MIR145*, *EBF1* a *MIR146A*), 6q, 7p12 (*IKZF1*), 7q, 8q24 (*MYC*), 9p (*JAK2 V617F* mutácie, *MTAP*, *CDKN2A*, *CDKN2B* a *PAX5*), 10q23 (*PTEN*), 11q23 (*ATM*), 12p (*ETV6*), 12q, 13q (*RB1*, *MIR15A*, *DLEU2*, *DLEU1*), 17p (*TP53*), 17q, Chr 18 a Chr 19, 21q (*RUNX1*).

SALSA MLPA P145 MDS probemix:

Obsahuje sondy pre niekoľko chromozómov, ktoré majú diagnostický alebo prognostický význam v MDS (myelodysplastický syndróm): 5, 7, 8, 11, 12 (*ETV6*), 17 (*TP53*), 20 a 21 (*RUNX1*).

SALSA MLPA P290 probemix:

Je určený pre prenatálny mikrolečný skrining a detekciu trizómie chromozómov 13,18 a 21.

Mikrolečné syndrómy detegované pomocou probemixu P290 :

1p36 , 15q24, 17q21, 22q13 / Phelan-McDermid, Cri du Chat sy., DiGeorge sy. 22q11, Langer-Giedion sy. 8q, Miller-Dieker sy. 17p, Prader-Willi / Angelman, MECP2 / Xq28 duplikácie, Smith-Magenis sy., WAGR sy., Williams sy., Wolf-Hirschhorn sy.,

SALSA MLPA P245 probemix:

Je určený pre mikrolečný skrining. Obsahuje až 21 sond na detekciu známych mikrolečných syndrómov (1p36, 2p16, 2q23 / MBD5, 2q33 / SATB2, 3q29, 9q22.3, 15q24, 17q21, 22q13 / Phelan-McDermid, Cri du Chat / 5p15, DiGeorge sy. 22q11, 22q11, DiGeorge region 2 / 10p15, Langer-Giedion sy. 8q, Miller-Dieker sy./ 17p, NF1, Prader-Willi / Angelman, MECP2 / Xq28 dup., Rubinstein-Taybi sy., Smith-Magenis sy., Sotos syndrome 5q35.3, Williams sy., Wolf-Hirschhorn 4p16.3.

Vhodný biologický materiál:*Periférna krv a kostná dreň:*

Za účelom izolácie DNA sa odoberá 2-5 ml periférnej krvi alebo kostnej drene do sterilnej skúmavky s 0,05M roztokom EDTA (ako na krvný obraz). Premieša sa a do transportu a aj počas neho sa uchováva pri teplote 4-8°C.

Plodová voda

Za účelom izolácie DNA sa odoberá 2-4 ml nefixovanej plodovej vody do sterilnej skúmavky. V prípade, že sa nedá biologický materiál dopraviť do laboratória hneď, je potrebné uchovávať odobratú vzorku pri teplote 4-8°C.

Tkanivo choriových klkov:

Na genetickú analýzu sa odoberá nefixované, materskou DNA nekontaminované tkanivo. Vhodným transportným médiom je fyziologický roztok.

Na MLPA analýzu je vhodná akákoľvek vzorka izolovanej DNA.

Označenie materiálu:

Každá vzorka materiálu musí byť jednoznačne identifikovateľná a sprevádzaná žiadanou.

Materiál:

1. meno a priezvisko pacienta
2. rok narodenia pacienta
3. druh materiálu

Žiadanka:

1. meno a priezvisko pacienta
2. rodné číslo
3. kód poisťovne
4. pečiatku a podpis indikujúceho lekára
5. druh biologického materiálu
6. požadované vyšetrenie

Transport materiálu:

Materiál aj s riadne vyplnenou žiadanou sa odošle na pracovisko Medirex a.s.

Dostupnosť vyšetrenia

Centrálne laboratórium Bratislava

Centrálne laboratórium Košice

Vypracoval

Medirex, a.s.: RNDr. Renata Lukačková, laboratórny diagnostik Medirex, a.s.

Kontakt

+421 904 586 952, +421 2 208 29 271, renata.lukackova@medirex.sk

Revidované v Bratislave, august 2014