



MLPA

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

Introduzione

Il laboratorio Cancer Genetic Test (CGT Lab) di Cogentech ha sviluppato test di diagnostica molecolare per individuare e valutare le varianti patogeniche che predispongono il paziente e i suoi familiari ad un più elevato rischio di sviluppo di tumori, permettendo all'oncologo di formulare diagnosi tempestive ed accurate per un miglior indirizzo del trattamento il paziente. Nei nostri laboratori vengono effettuati test diagnostici per diverse tipologie di tumori ereditari e test per la ricerca di varianti predittive della risposta ad alcune terapie, in particolare Parp inibitori.

Questi test prevedono l'utilizzo del metodo MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) per l'identificazione di grosse delezioni o duplicazioni. La metodica può essere utilizzata sia per confermare i dati ottenuti mediante Next Generation Sequencing (NGS), sia per accertamenti su parenti di soggetti portatori di varianti già identificate, oppure a completamento di precedenti analisi di sequenziamento che non fossero in grado di individuare variazioni nel numero di copie di uno o più esoni nei geni in esame.

L'MLPA è una tecnica semiquantitativa e non automatizzata in grado di valutare il numero di copie di una sessantina di sequenze grazie a una PCR multiplex.

MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

Il principio dell'MLPA si basa sull'amplificazione di un massimo di 60 sonde per ogni kit, ciascuna delle quali è specifica per una determinata sequenza di DNA. La reazione ha come risultato una serie di ampliconi di specifica lunghezza, compresa tra 64 e 500 nt, separati mediante elettroforesi capillare.

Dopo una denaturazione iniziale del DNA del campione, vengono aggiunte le sonde che sono costituite da due oligonucleotidi che devono ibridarsi con sequenze target direttamente adiacenti per poter essere ligati in un'unica sonda.

Durante la successiva reazione di PCR, tutte le sonde legate vengono amplificate simultaneamente utilizzando la stessa coppia di primer, ottenendo una serie di ampliconi unici. Uno dei primer è marcato con un fluorocromo, consentendo la visualizzazione dei prodotti di amplificazione dopo separazione dei frammenti con elettroforesi capillare. La separazione dei frammenti produce un elettroferogramma specifico del campione.

Le condizioni di amplificazioni sono semiquantitative per cui l'altezza relativa di ogni singolo picco, rispetto alle altezze relative dei picchi della sonda in vari campioni di DNA di riferimento, riflette il numero di copie della sequenza target corrispondente in un campione. L'inclusione di campioni di riferimento nella stessa analisi è quindi essenziale. L'eliminazione di una o più sequenze target è visibile come una diminuzione relativa dell'altezza del picco, mentre un aumento dell'altezza relativa del picco riflette un aumento del numero di copie.

I software utilizzati per l'analisi sono Gene Marker v.3.0.1 (SoftGenetics) e Coffalyser.Net v. 220513.1739 (MRC-Holland).

Il protocollo analitico ha una sensibilità del 99% e una specificità del 97% nell'identificare estese delezioni/duplicazioni (Vorstman et al., Hum Mutat;27(8), 2006).

Sono disponibili in commercio kit SALSA MLPA forniti dalla ditta MRC-Holland (la maggior parte marchiati CE-IVD) con sonde specifiche per geni di interesse, Il test viene eseguito su DNA genomico (gDNA) ottenuto dal prelievo ematico del paziente o estratto da tessuto tumorale incluso in paraffina (FFPE).

Le varianti identificate vengono sempre confermate su seconda aliquota con kit SALSA MLPA alternativi, o con metodiche differenti come QPCR, Long Range PCR o NGS.

Limiti dell'analisi

L'MLPA non è in grado di rilevare alcuna delezione o duplicazione che si trovi al di fuori della sequenza target delle sonde e non è in grado di rilevare inversioni o traslocazioni bilanciate.

Inoltre varianti sotto le sonde o nelle immediate vicinanze possono dare falsi positivi per cui bisogna sempre verificare tale evenienza nel caso venga persa un'unica sonda.



MLPA | Version 1.0 date 01.09.2023

In caso di scarsa denaturazione del DNA del campione, possono dare falsi positivi in particolare le regioni cromosomiche estremamente ricche di GC non vengono denaturate a 98°C quando sono presenti più di 40 mM NaCl o KCl.

Risultati ottimali si ottengono utilizzando DNA di buona qualità, ottenuto da sangue, o comunque non troppo frammentato.

MRC Holland fornisce una scheda per ogni kit che descrive il disegno delle sonde e lo scopo del pannello a cui si deve far riferimento per l'analisi.

Conclusioni

L' MLPA è una metodica affidabile, riproducibile e veloce, grazie anche alla stabilità ed efficienza dei kit commerciali utilizzati e all'accuratezza e precisione dei software di analisi di cui il nostro laboratorio dispone.