

Análise de CNVs por MLPA *(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)*

Mariana F. A. Funari
marianafunari@usp.br

Laboratório de Hormônios e Genética Molecular – LIM42
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo

MLPA e suas principais aplicações

- Detecção de **variações no número de cópias** de exons, genes ou regiões cromossômicas;

© 2002 Oxford University Press

Nucleic Acids Research, 2002, Vol. 30, No. 12 e57

Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification

Jan P. Schouten*, Cathal J. McElgunn, Raymond Waaijer, Danny Zwijnenburg, Filip Diepvens and Gerard Pals¹

MRC-Holland, Hudsonstraat 68, 1057SN Amsterdam, The Netherlands and ¹Department of Clinical Genetics, Free University of Amsterdam, v.d. Boechorststraat 7, 1081BT Amsterdam, The Netherlands

- Análise de **metilação** de regiões cromossômicas (síndromes e genes supressores tumorais etc);

Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, No. 14 e128
doi:10.1093/nar/gni127

Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences

Anders O. H. Nygren^{1,2}, Najim Ameziane², Helena M. B. Duarte¹, Raymon N. C. P. Vijzelaar¹, Quinten Waisfisz³, Corine J. Hess³, Jan P. Schouten¹ and Abdellatif Errami^{1,*}

¹MRC-Holland bv, Amsterdam, The Netherlands, ²Department of Clinical and Human Genetics and ³Department of Hematology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands



Vários kits disponíveis

<https://www.mrcholland.com/products>

← → ↻ Seguro | <https://www.mrcholland.com/products>



[Products](#) [Technology](#) [About Us](#) [News](#) [Support](#)

[New & Improved](#) [Product Development](#) [How to Order](#) [Order Form](#)

Assay Finder

Browse

Search

Browse our assays by application

Developmental & Pediatric Disorders >	Intellectual Disability >	Autosomal Dominant
Newborn	Multiple Congenital Anomalies	Autosomal Recessive
Oncology		Imprinting
Organs, Tissues & Systems		Other
		X-linked

Vários kits disponíveis

<https://www.mrcholland.com/products>

← → ↻ Seguro | <https://www.mrcholland.com/products>



[Products](#) [Technology](#) [About Us](#) [News](#) [Support](#)

[New & Improved](#) [Product Development](#) [How to Order](#) [Order Form](#)

Assay Finder

[Browse](#)

[Search](#)

Find our assays

🔍 shox|

[Search](#)

Product Name	Application	Region	Technology
Probemix P018 SHOX	Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD); Langer mesomelic dysplasia (LMD); Idiopathic short stature (ISS)	SHOX Xp22.33/Yp11.32	MLPA
Probemix P329 CRLF2-CSF2RA-IL3RA	Acute lymphoblastic leukemia (ALL)	Xp22.33	MLPA
Probemix P335 ALL-IKZF1	Acute lymphoblastic leukemia (ALL)	IKZF1 7p12.2; PAX5 9p13.2; ETV6 12p13.2; RB1 13q14.2; BTG1 12q21.33; EBF1 5q33.3; CDKN2A-CDKN2B 9p21.3; Xp22.33	MLPA

Sondas SALSA MLPA

Oligonucleotídeo sintético
50-60 pb

Oligonucleotídeo M13-derivado
60-450 pb

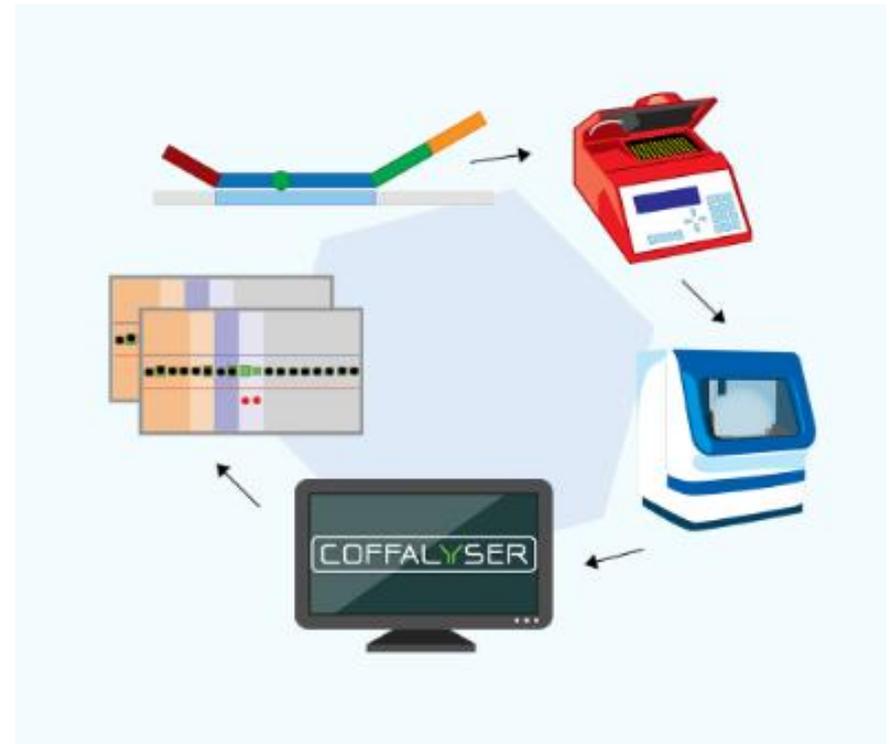


Table 2. Xp/Yp probes arranged according to chromosomal location

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Gene Exon ^(a)	Ligation site ^(b)	Partial sequence ^(c) (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
<i>p</i> -telomere ----- Start of PAR1 -----					227.0 kb
211 [~]	09333-L10292	<i>PPP2R3B</i> gene	PAR1	CGTCCGAGTTCC-ACTCGCGCTACA	91.6 kb
364	18889-L25087	SHOX AREA	CNE-5	GAAATGTTAACA-GCTCCCCGAGCT	61.7 kb
130	18885-L24430	SHOX AREA	CNE-3	ATGGCAGAGCAT-TTGTACCCCTGG	56.3 kb
427	18891-L25088	SHOX AREA	CNE-2	TACACCGTTATG-CGGATGCTCGTT	63.5 kb
266	01341-L20651	SHOX AREA LOC159015	Upstream of <i>SHOX</i>	GCCTGGAACAGA-ACTTCCGCGGGG	4.7 kb
<i>SHOX</i> <i>start codon</i>					
NM_000451.3 692-694 (Ex 2)					
166	01145-L00702	Exon 1	99-100	TTTCTACTGCAA-ACAGAAATGGGA	6.7 kb
204	01146-L06220	Exon 2	920-921	ACCACGTAGACA-ATGACAAGGAGA	3.6 kb
245	01147-L00802	Exon 3	1032-1033	CGGGCAGACCAA-GCTGAAACAGAG	6.2 kb
300 [#]	01148-L15501	Exon 4	1198-1199	CAGAACCGGAGA-GCCAAGTGCCGC	0.2 kb
337 ^Δ	01149-L19676	Exon 5	1261-1262	ACAGCCAACCAC-CTAGACGCCTGC	3.5 kb
231	09337-L00911	Exon 6	1506-1507	AAGCAACAGCAA-GAATTCAGCAT	6.4 kb
<i>stop codon</i>					
1568-1570 (Ex 6)					
226	09336-L20178	<i>SHOX</i> Intron 6	6.4 kb after Ex 6; 8 kb before Ex 7	TGGCTTCACGAG-TTCAGCCCATTG	6.4 kb
395	09338-L24247	<i>SHOX</i> Intron 6	1.4 kb before Ex 7	TCCACATTCCTT-GGAATCACAAATG	56.9 kb
136	05642-L05096	SHOX AREA	6.2 kb after CNE2	GCAGCAGTGAAA-GTGAGCATTCCTC	19.8 kb
154	13821-L14642	SHOX AREA	CNE3	GATGGCTGATAA-TTACTCCGATATG	19.4 kb
172	18886-L24431	SHOX AREA	CNE4	GCCTCCGATACA-GTTTACGGCTTC	37.4 kb
199	13296-L20175	SHOX AREA	CNE5	GGAAAACCACGT-TCCTATCGATCC	29.6 kb
481 [^]	18893-L25091	SHOX AREA	CNE7	CAGACCAGGCTCT-CTGTTCATGT	28.1 kb
318 [^]	05645-L05099	SHOX AREA	2 kb before CNE8	TGTTCCACCGT-AAAACTCACTCC	8.4 kb
439 [^]	05646-L24249	SHOX AREA	5.4 kb after CNE8	TGCATGTCTGCT-TTTTGAATGGCC	10.7 kb
466	13297-L24253	SHOX AREA	6 kb before CNE9	TACAGCAAATGA-TACGTATAAATT	6.3 kb
200	06701-L06722	SHOX AREA	CNE9	CTTCAAAGGCGA-GCAACTCTAATT	0.4 kb

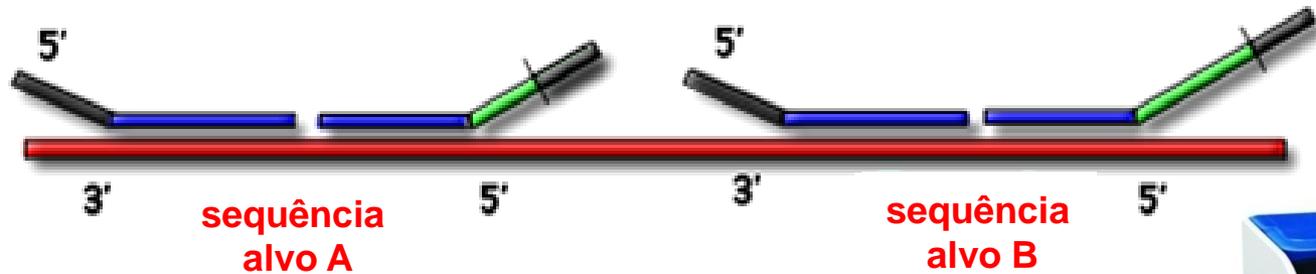
MLPA para identificação de CNVs

1. Desnaturação
2. Hibridação
3. Ligaçãõ
4. Amplificação
5. Eletroforese capilar
6. Análise



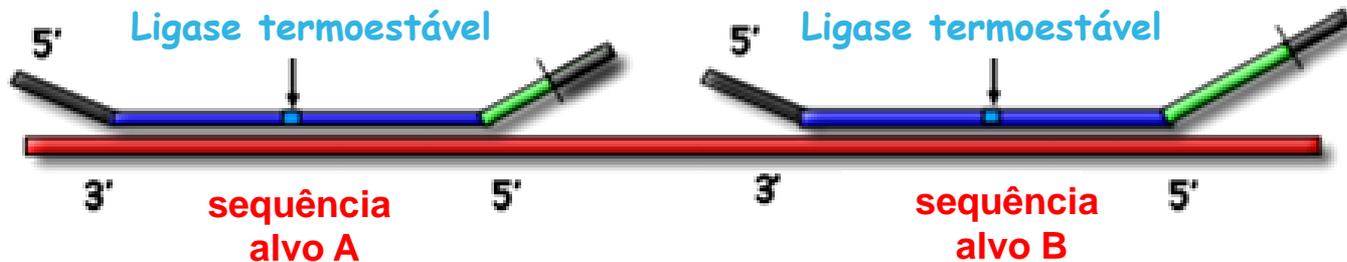
Hibridação

O mix das sondas é adicionado ao DNA genômico desnaturado;
As duas porções de cada sonda hibridam com suas sequências alvos adjacentes;



Ligação

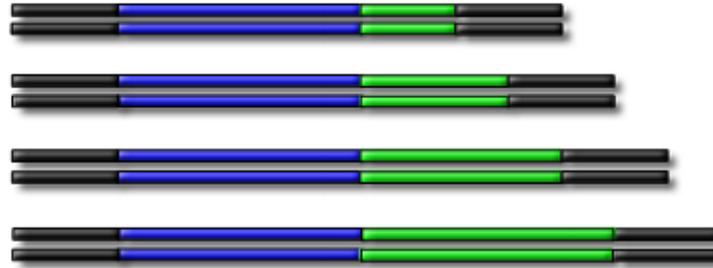
As sondas que hibridaram são unidas por uma ligase termoestável;



Amplificação

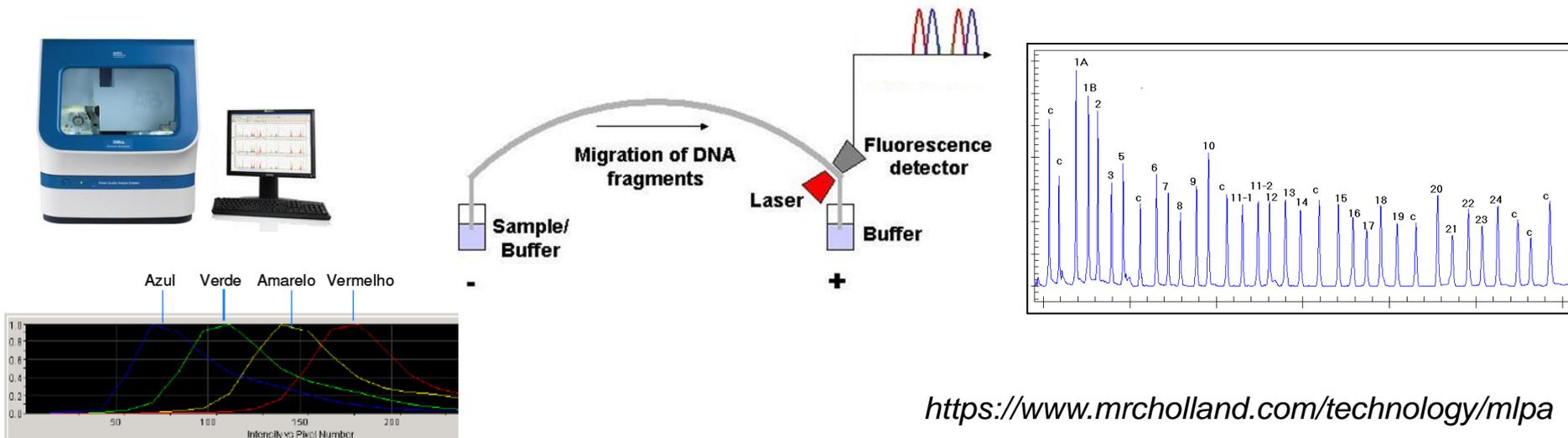
Um único par de *primers* é utilizado para amplificar todas as sondas que foram ligadas (um dos *primers* é marcado com um fluorocromo).

O produto de amplificação de cada sonda tem um tamanho único (130-480 pb).

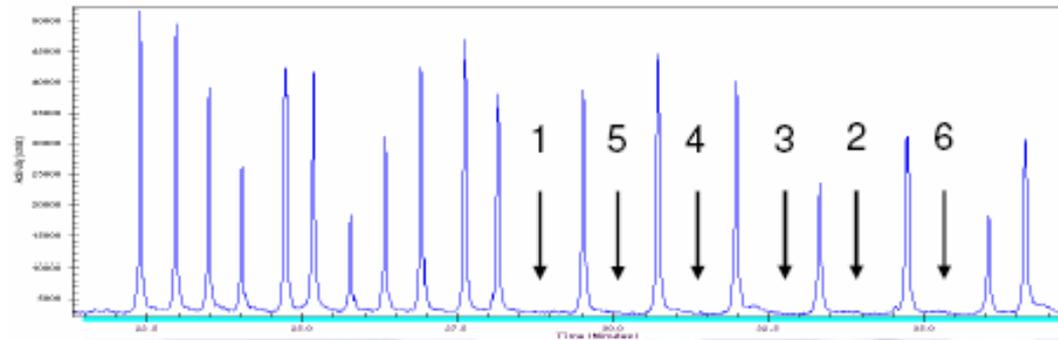


Eletroforese capilar

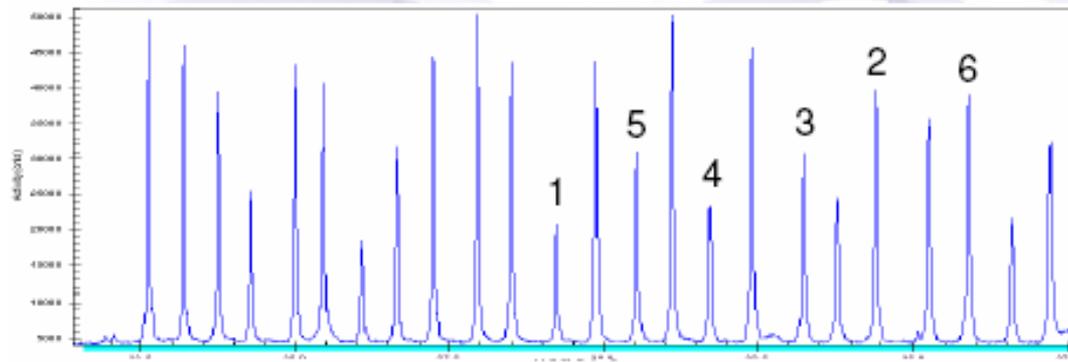
Os fragmentos de diferentes tamanhos marcados são organizados através de uma eletroforese capilar e depois são quantificados.



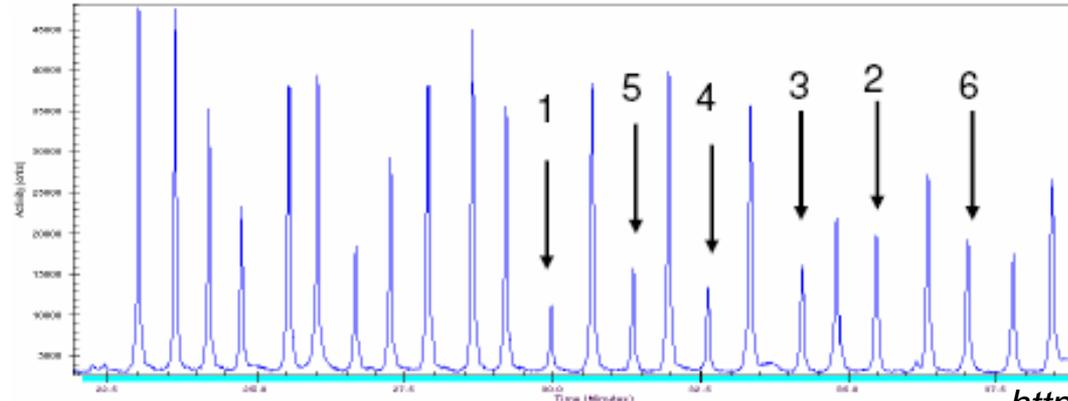
Eletoferogramas com deleções



Deleção em homozigose



Controle normal



Deleção em heterozigose

redução de 35-50%
na área relativa ao pico

MLPA para estudo de metilação

- **Avaliação de regiões que sofrem *imprinting***

Algumas regiões do genoma apresentam padrões de metilação conservados, herdados dos pais, que mantêm alguns genes silenciados. Alterações nesses padrões podem levar a algumas síndromes (Ex.: região do Chr 15 na S. *Prader Willy/Angelman*; região do Chr 11 na S. *Silver Russell/Beckwith-Wiedemann*).

- **Avaliação de metilação de regiões promotoras**

A transcrição gênica pode ser regulada através da metilação de nucleotídeos CpG de regiões promotoras (Ex.: hipermetilação de promotores de genes supressores tumorais resultam em tumores)

Methylation-specific MLPA[®] (MS-MLPA)

1. Desnaturação
2. Hibridação
3. Ligaçã

Reaçã realizada em dois tubos:

tubo 1: sem digestã

tubo2: digestã com enzima Hha1

DNA metilado:

nã é digerido → sinal amplificado

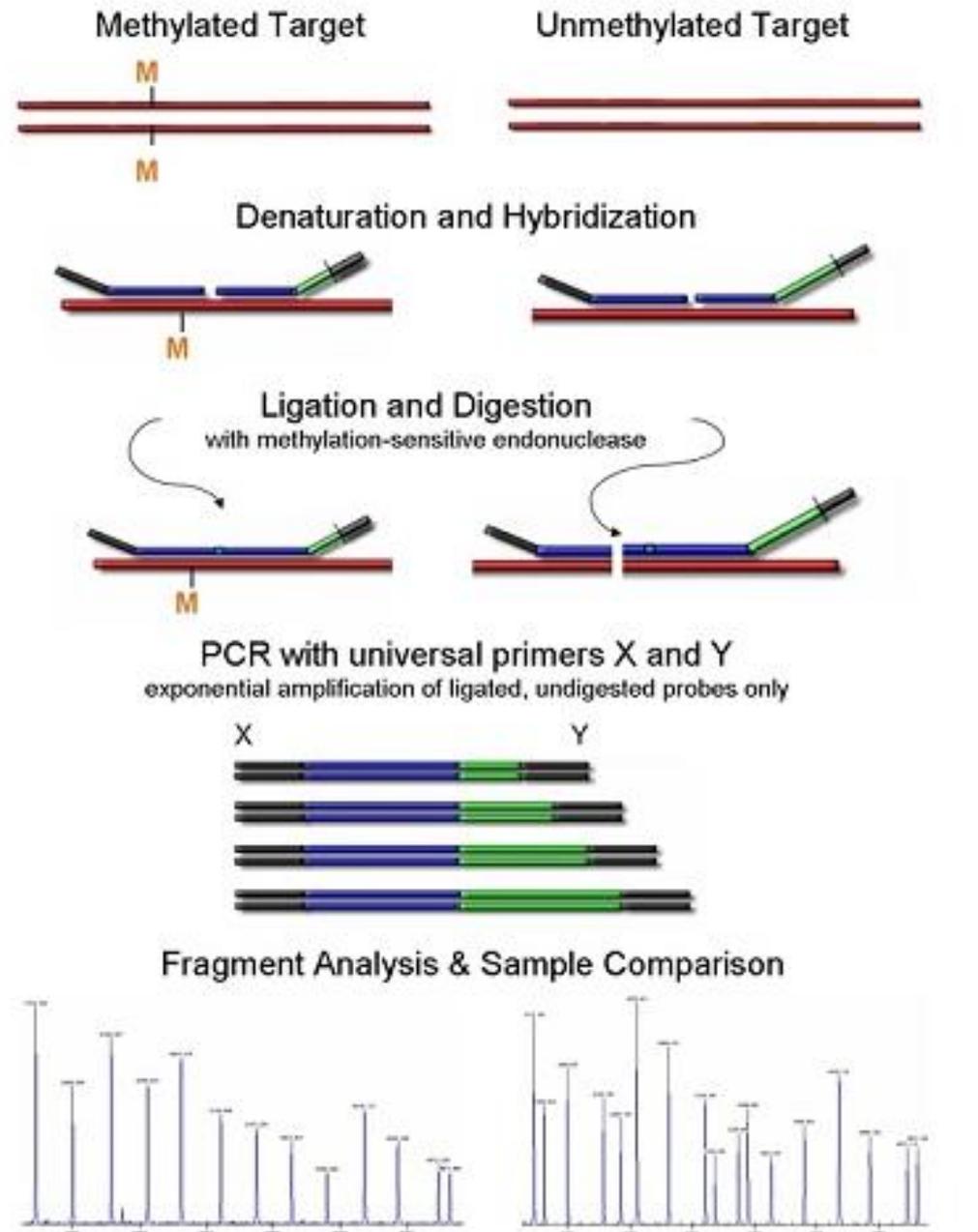
DNA nã metilado:

sonda e alvo sã digeridos → ausênci de amplificaçã

4. Amplificaçã

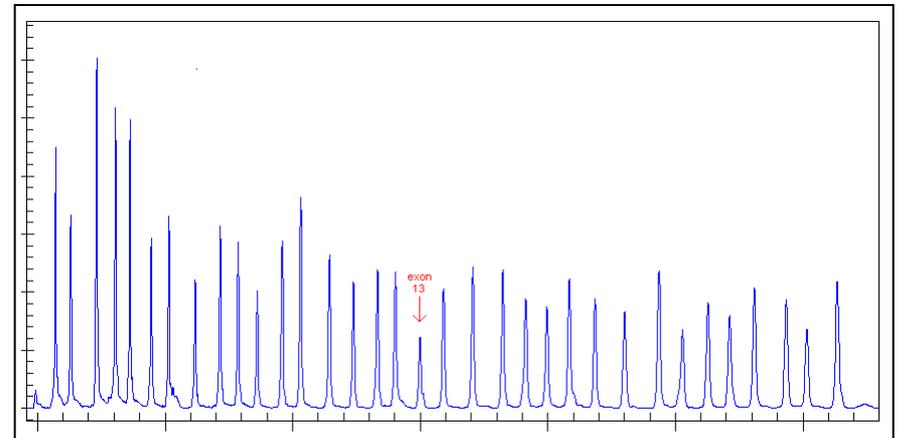
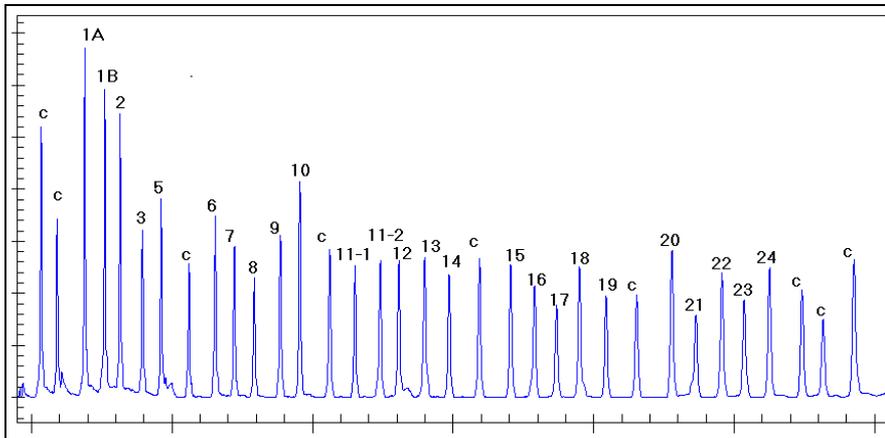
Resultado:

Variaçã do nũmero de cõpias
+ estudo de metilaçã



Amostras controles intra-ensaio

- Necessidade de amostras controles dentro da mesma reação (2 a 4 amostras já testadas sem alterações nas regiões avaliadas pelo kit);
- Amostras da mesma origem e extraídas pela mesma metodologia;
- Em alguns kits as amostras precisam ser do mesmo sexo.



Vantagens

- Analisa até 60 sequências por reação;
- Possibilita a análise de DNA de diferentes origens;
- Não há necessidade do estudo do DNA dos familiares para a investigação de deleções;
- Os kits contêm todos os reagentes necessários;
- Os protocolos são idênticos para todos os kits;
- Os protocolos são muito robustos;
- Os kits podem ser customizados;
- Utiliza equipamentos simples, já existentes nos laboratórios de biologia molecular;
- Muitas amostras podem ser analisadas simultaneamente;
- Resultado em aproximadamente 30 horas, depois da extração do DNA.

Limitações

- Análise é indireta (as sondas é que são amplificadas);
- A presença de variantes alélicas, até mesmo em regiões próximas as sondas, pode resultar em falsas deleções;
- Não detecta translocações balanceadas;
- Grande parte dos kits não possui certificação para uso em diagnóstico (CE/FDA);
- Softwares de análise precisam ser melhorados.

XV CURSO DE ATUALIZAÇÃO EM

endocrinologia

NA PRÁTICA AMBULATORIAL 2020

Diagnóstico
Tratamento
Metabologia
Crescimento
Tireóide
Puberdade
Clínica Médica
Neuroendocrinologia
Hiperaldosteronismo

marianafunari@usp.br



Realização



HOSPITAL CLÍNICAS
F. M. U. S. P.