



tecnolab
S.a.

Estudio de regiones de ADN por MLPA para screening de enfermedades hereditarias

 7 min.



Tecnolab, una empresa con más de 30 años de trayectoria en el mercado, nos presenta y explica cómo funciona la técnica de Biología Molecular llamada Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), sus múltiples aplicaciones y ventajas respecto a otras técnicas existentes en el mercado, como también sus diferentes variantes.



Tecnolab s.a.
Area Patología



E-mail: patologia@tecnolab.com.ar



¿Qué es MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)?

MLPA es una técnica de biología molecular, (Multiplex PCR), que permite que en una misma reacción se pueda detectar copias anormales de hasta 50 secuencias genómicas diferentes de ARN o ADN. La técnica de MLPA se basa en una primera reacción de unión-ligación de sondas con la zona homóloga de interés; sólo las sondas que hayan hibridado podrán ser ligadas, y posteriormente amplificadas por PCR. Mediante un análisis de fragmentos y aprovechando la diferencia de tamaño de cada una de las sondas, se podrán identificar aberraciones en el

número de copias genómicas.

La técnica MLPA posee muchas aplicaciones, incluyendo la detección de mutaciones, el análisis de perfiles de metilación, la cuantificación relativa de ARNm, la caracterización cromosómica de líneas celulares y muestras de tejido, la detección de variaciones en el número de copias del genoma, la detección de duplicaciones y deleciones en genes relacionados con la predisposición al cáncer humano y determinación de aneuploidias. Asimismo, MLPA posee un gran potencial para el diagnóstico prenatal

Ventajas de MLPA para el estudio genético

MLPA ofrece múltiples ventajas respecto a otras técnicas que existen en el mercado para la detección de números de copias genómicas. Los métodos de cromatografía líquida de alta eficacia desnaturizante (DHPLC) y secuenciación poseen una buena especificidad para la detección de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), pero fallan en cuanto a la detección de cambios en el número de copias. Por el otro lado, la técnica de Southern blot permite identificar y diagnosticar grandes aberraciones pero no siempre detecta pequeñas deleciones y además implica una elevada laboriosidad.

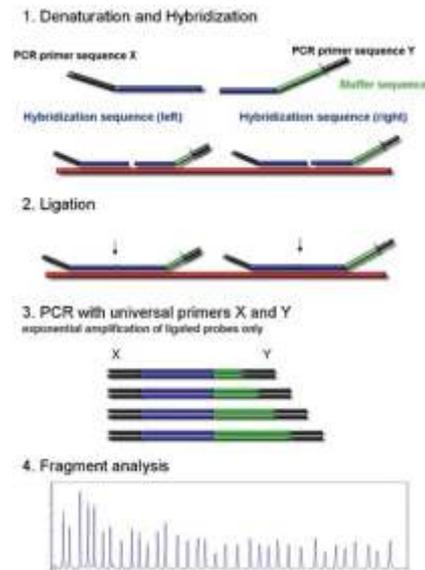
Aunque las deleciones y ampliaciones pueden ser detectadas por PCR, que identifican el exón, el intrón o secuencia reguladora en el que se encuentra la mutación, este tipo de estudio directo solo se puede realizar cuando se conoce el sitio exacto de la mutación. Existen enfermedades genéticas que no están causadas

por mutaciones concretas, como ocurre en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CTFR), los genes de cáncer de mama BRCA1 y BRCA2, y el gen de retinoblastoma (RB1), lo que hace necesario un análisis exhaustivo del gen o genes afectados. La técnica de MLPA presenta la gran ventaja de que existen numerosos genes o regiones determinadas del ADN que se estudian simultáneamente en una sola determinación. Al comparar MLPA con la técnica de Hibridación in situ fluorescente (FISH), MLPA no solo presenta la conveniencia de ser una técnica múltiplex, sino también permite identificar aberraciones que resultan demasiado pequeñas (50-70 nt) para ser detectadas por hibridación in situ. Finalmente, al cotejarla con la hibridación genómica comparada (CGH array), MLPA es una técnica de bajo costo, requiere únicamente de un termociclador y un equipo de electroforesis capilar, y es sencilla. Asimismo, MLPA ofrece un alto rendimiento en el procesamiento, hasta 96 muestras pueden ser manejadas simultáneamente, obteniéndose resultados dentro de las 24 hs. Motivos por los cuales MLPA debe considerarse como la primera alternativa en el estudio genético de enfermedades que van desde las clásicas (Duchene, síndrome DiGeorge, SMA), a las más raras (pancreatitis hereditaria, deficiencia de antitrombina, síndrome de Birt-Hogg-Dube).

MLPA es una técnica complementaria, sensible y específica en la detección de cambios en el número de copias genómicas, no detectados por los métodos convencionales de laboratorio.

Existen numerosos genes y campos donde la técnica MLPA es aplicable, oncohematología, cáncer hereditario, tumores, farmacogenética, neurogenética y retardo mental, entre otros. Actualmente, existen más de 300 sondas dedicadas al estudio de distintas enfermedades.

¿Cómo funciona MLPA?



Cada locus amplificable por PCR consiste en dos hemisondas, cada una de las cuales contiene la mitad de la secuencia blanco, un fragmento cebador variable en tamaño y uno de los cebadores necesarios para la amplificación. Es importante destacar, que a diferencia de la técnica clásica de PCR multiplex, MLPA utiliza un único par de cebadores para amplificar todas las secuencias. La reacción de MLPA se puede dividir en 5 pasos: 1) Desnaturalización del ADN e hibridación con las sondas MLPA; 2) Reacción de ligación; 3) Reacción de PCR; 4) Separación de los productos de amplificación por electroforesis; y 5) Análisis de datos (Fig. 1). Las dos hemisondas serán hibridadas con secuencias inmediatamente adyacentes (Fig. 1: paso 1). Únicamente cuando las dos sondas se encuentren hibridadas correctamente podrán ser ligadas (Fig. 1: paso 2), para posteriormente ser amplificadas por PCR (Fig. 1: paso 3). Finalmente, los productos amplificados generaran fragmentos de longitud variable que serán separados por electroforesis capilar y analizados en un secuenciador automático, pudiéndose estimar la cantidad de producto

obtenido mediante la emisión de un pico de señal. (Fig. 1: paso 4). Las hemisondas que no fueran ligadas, no podrán ser amplificadas exponencialmente, y por consiguiente no generaran señal. Los resultados serán analizados mediante un software. El área de señal de intensidad de pico de los productos de PCR puede ser medido, permitiendo inferir la cantidad de secuencia presente. Una disminución del área de señal indica delección y un aumento duplicación.

Variantes de MLPA

Existen variantes de la técnica, como ser la RT-MLPA (Reverse Transcriptase MLPA), la cual resulta muy útil en estudios de expresión génica. RT MLPA comienza con una transcripción reversa de ARNm a ADNc, para continuar como una reacción de MLPA tradicional. Este primer paso es necesario para que ocurra la ligación de las hemisondas, debido a que la enzima ligasa no puede ligar las sondas si estas se encuentran hibridadas a ARN.

La técnica de MS-MLPA (Methylation-Specific MLPA) puede ser utilizada tanto para la cuantificación del número de copias genómicas como para el análisis del perfil de metilación. MS-MLPA es una herramienta muy útil para realizar estudios epigenéticos y para el análisis de metilaciones aberrantes en muestras tumorales.



MRC-Holland
MLPA®

invbio

Sección arbitrada
para artículos
de investigación

La escritura es un ejercicio esencial del quehacer científico profesional; los procesos de estudio e investigación, sus resultados, avances en diagnóstico clínico in vitro y avances tecnológicos, pasan necesariamente por una mediación fundamental: la comunicación escrita.

Revista Bioanálisis les ofrece InvBio, un escenario donde sus producciones intelectuales encontrarán un espacio de socialización.

contenidos@revistabioanalisis.com