

MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)

Úvod:

- o kvantitativní metoda umožňující detekci různých genových přestaveb, které nejčastěji vznikají nerovnoměrným crossing-overem mezi repetitivními sekvencemi ležícími v intronových oblastech genu
- o průkaz delecí a duplikací v řádech desítek až stovek kilobází, které nejsou běžnými PCR technikami zjištělné

Princip:

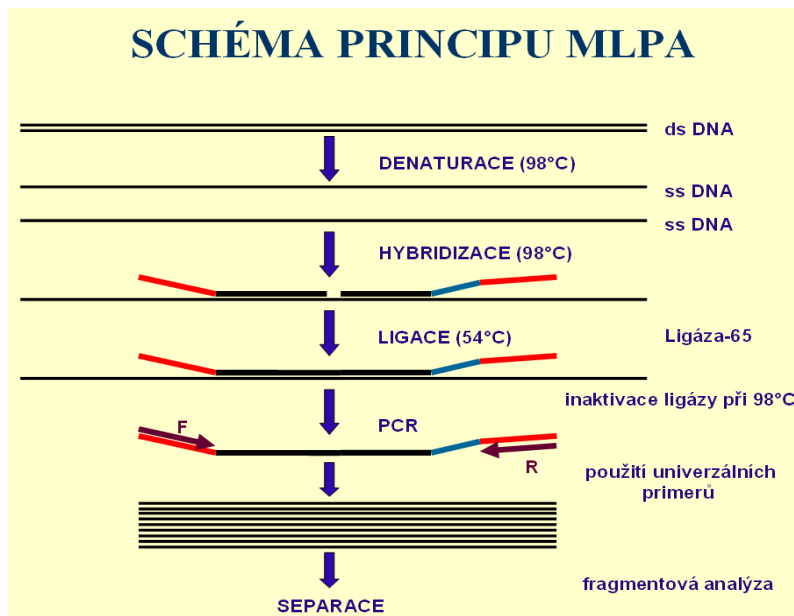
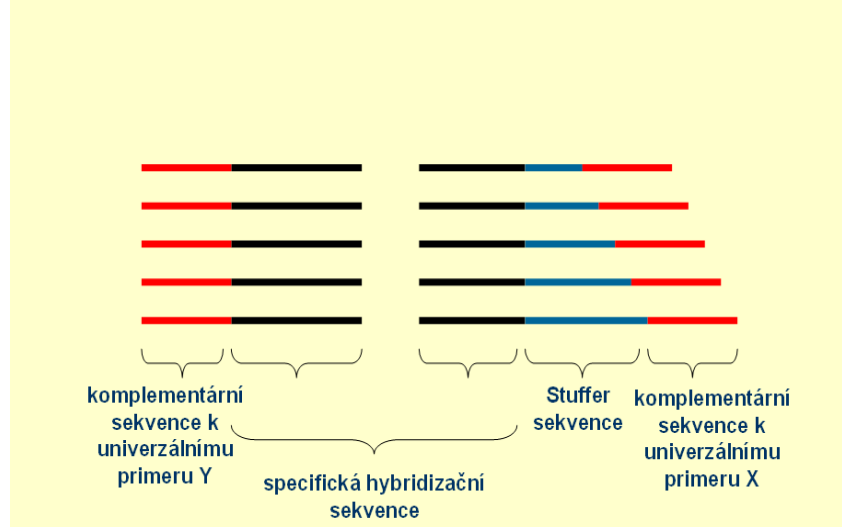


SCHÉMA KONSTRUKCE PÁŘŮ SOND



Úloha:

Stanovení přítomnosti přestaveb v genu pro LDL receptor

Úvod:

LDLR gen: 19. chromozóm (p13.1 - p13.3), 45kb, 18 exonů.

Protein: LDL receptor – 839 aminokyselin.

Mutace nebo přestavby v genu pro LDL receptor jsou příčinou familiární hypercholesterolemie. Jedná se o autozomálně dominantní onemocnění charakterizované zvýšenými koncentracemi celkového a LDL cholesterolu a předčasnou klinickou manifestací ischemické choroby srdeční.

Úkol:

Stanovení přítomnosti přestaveb v genu pro LDL receptor v předložených vzorcích.

Pracovní postup:

DNA denaturace a hybridizace SALSA MLPA sond (1.den odpoledne)

1. Rozmrazit SALSA Probe-mix (černé víčko) a MLPA Buffer (žluté víčko). Nechat na ledu.
2. Do eppendorfků rozpipetovat 5 ul DNA (ideálně kolem 50 – 75 ng/reakce)
3. Vzorky do cyklueru – program MLPA (vyhřívané víčko), 98 °C/5 min, 25 °C/forever. Až se blok vyhladí na 25 °C, počkat 30 sekund – vyndat eppendorfky, přiklopit víčko, program nechat běžet dál
4. Přidat (popř. si udělat) master mix (MM) a rozpipetovat po 3 ul:
+ 1,5 ul SALSA Probe-mix (černé víčko)
+ 1,5 ul MLPA Buffer (žluté víčko)
5. Propipetovat, zakápnout olejem.
6. Zpět do cyklueru, přesunout na další krok – 95 °C/1 min, 60 °C/forever – cca 16 hodin (přes noc)

Ligační reakce (2.den ráno)

1. Rozmrazit Ligase-65 Buffer A (průhledné víčko), Ligase-65 Buffer B (bílé víčko), Ligase-65 (zelené víčko), SALSA PCR Buffer (červené víčko), SALSA PCR – primers (hnědé víčko), SALSA Enzym Dilution Buffer (modré víčko) a SALSA Polymerase (oranžové víčko) – **podtržené na ledu!!**
2. Nachystat si **Ligase-65 mix** (max. 1 hodinu dopředu, uchovávat na ledu)
Pro jednu reakci: **3 ul Ligase-65 Buffer A** (průhledné víčko)
3 ul Ligase-65 Buffer B (bílé víčko)
25 ul voda
1 ul Ligase-65 (zelené víčko)
3. Program v cyklueru přesunout na další krok (54 °C/forever – až se ochladí, počkat 30 s, vyndat vzorky.
4. Přidat **32 ul** připraveného **Ligase-65 mixu**
5. Vzorky vrátit do cyklueru, přesunout na další kroky – 54 °C/15 min, 98 °C/5 min, 10 °C/forever.

PCR reakce:

1. Nachystat si další dva MM:
PCR mix 1 – pro 1 reakci: **2 ul SALSA PCR Buffer** (červené víčko)
13 ul voda

PCR mix 2 (max. 1 hodinu dopředu, uchovávat na ledu, **zabalit do alobalu!!!**)

- pro 1 reakci: **1 ul SALSA PCR – primers (hnědé víčko)**
1 ul SALSA Enzyme Dilution Buffer (modré)
2,75 ul voda
0,25 ul SALSA Polymerase (oranžové víčko)

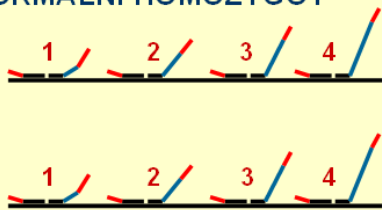
2. **PCR mix 1** rozpipetovat po **15 ul** do nových eppendorfek, přidat do každé **5 ul** produktu MLPA ligační reakce (zbytek si ponechat a schovat do lednice)
3. Vzorky vrátit do cykleru, program přesunout na další krok (60 °C/forever) – nechat prohřát 30s, otevřít víko cykleru a **přímo v cykleru přidávat 5 ul PCR mixu 2**, propipetovat a hned vracet do cykleru
4. Přesunout na další kroky – PCR reakce
5. Kontrola produktů na elektroforéze (2% gel, nanášet 5 ul)
6. Fotku k sekvenátoru, fragmentační analýza

Hodnocení výsledků:

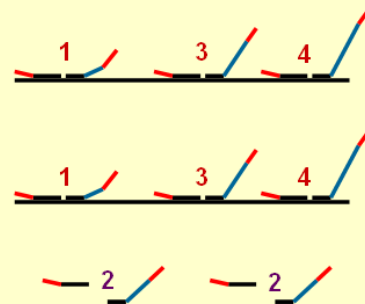
Subjektivní hodnocení výsledků fragmentační analýzi. Hodnocení pomocí softwaru Coffalyser® (MRC Holland)

DETEKCE DELEČÍ

A) NORMÁLNÍ HOMOZYGOT



B) DELETOVANÝ HOMOZYGOT



C) HETEROZYGOT

