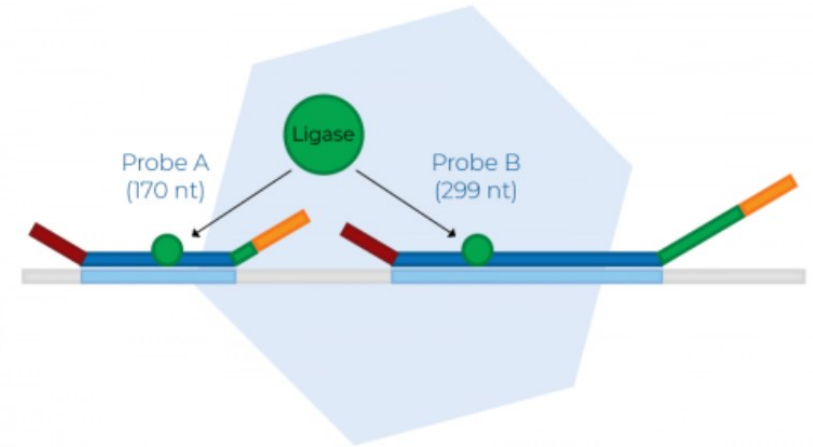




UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI TERAMO

CM biotecnologie avanzate anno 2023/2024  
CORSO TECNOLOGIE GENETICHE AVANZATE  
Docente: Valentina Guida

MLPA



## MLPA

L' **MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)** è una tecnica gold-standard utilizzata per lo studio della variazione nel numero di copie di un frammento di DNA (CNV) rispetto ad una sequenza di riferimento. Nel dettaglio, si tratta di una **tecnica semi-quantitativa, non automatizzata**, che viene utilizzata per determinare il numero di copie (fino a un massimo di 60 sequenze) di DNA in una singola reazione basata sulla PCR multiplex. L'MLPA è molto versatile in quanto può essere utilizzata anche per rilevare i cambiamenti dello stato di metilazione del DNA (MS-MLPA) ed è sufficientemente sensibile per discriminare le aberrazioni di geni da pseudogeni molto simili.

Denaturation

Hybridisation

Ligation

Amplification (by PCR)

Fragment Separation

Data Analysis (by Coffalyser.Net)

# Denaturation



## Hybridisation

### HYBRIDISATION MASTER MIX



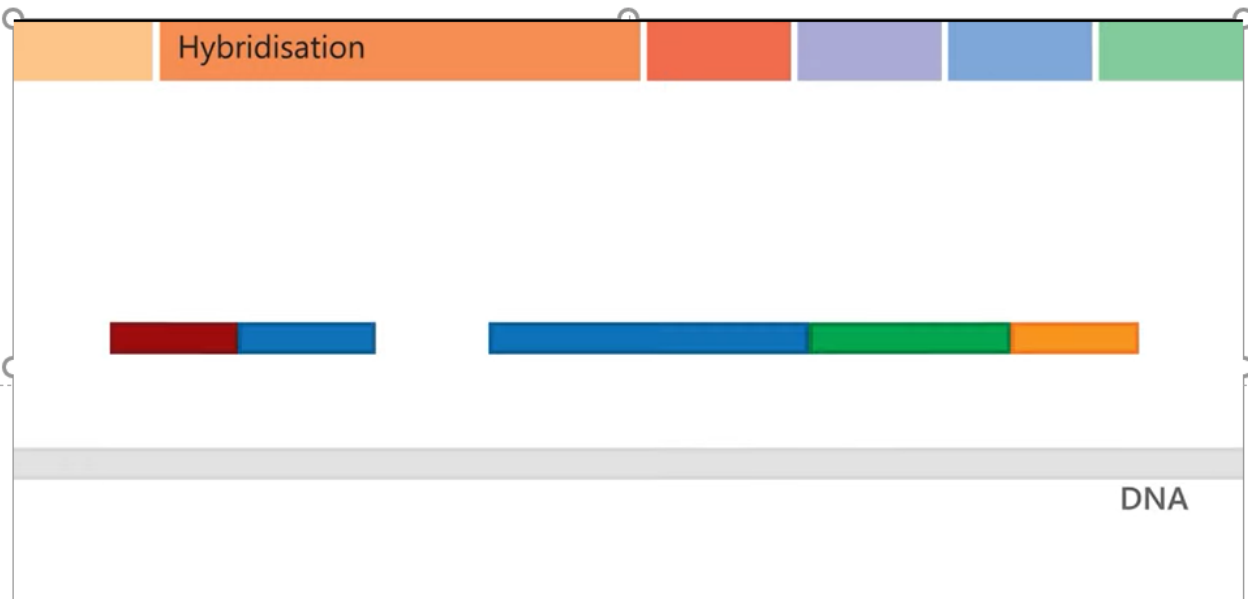
+



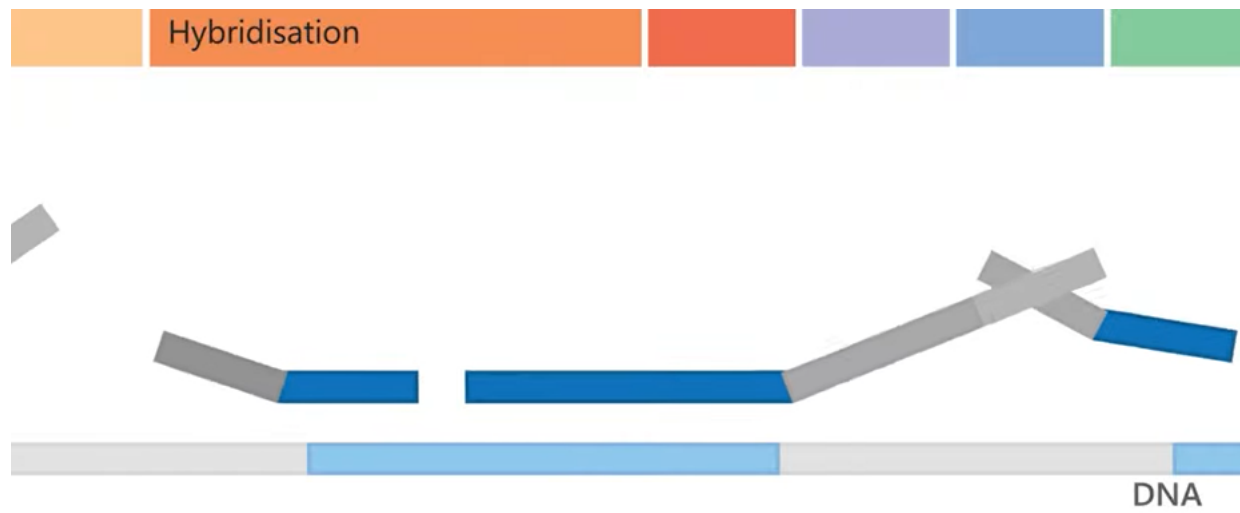
MLPA Probemix



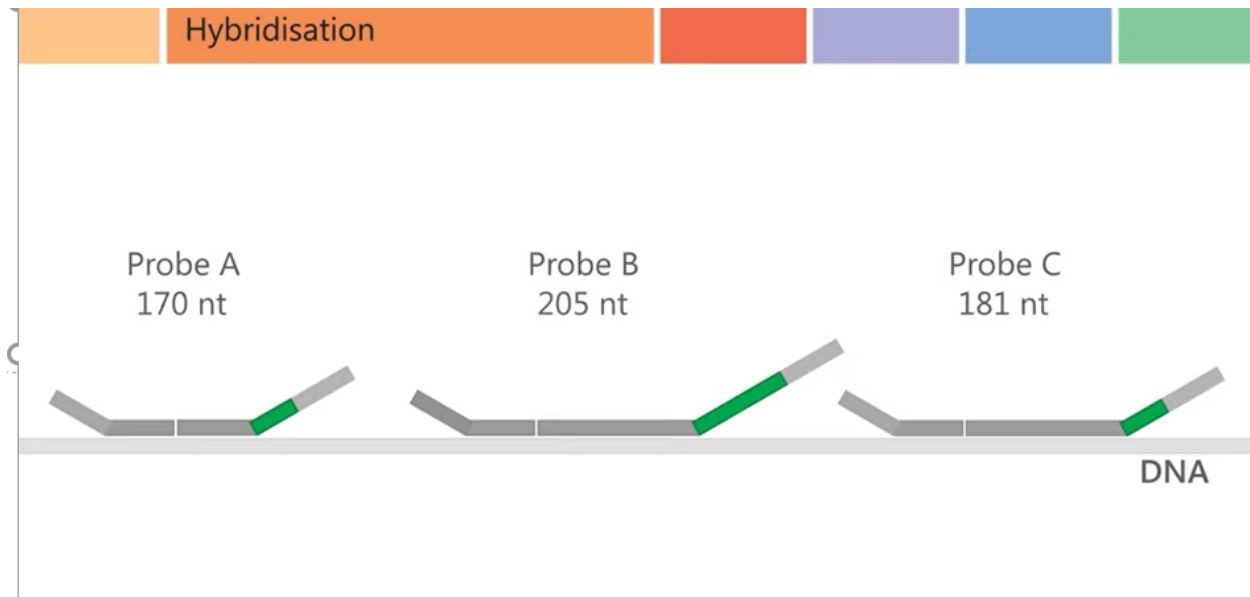
MLPA Buffer



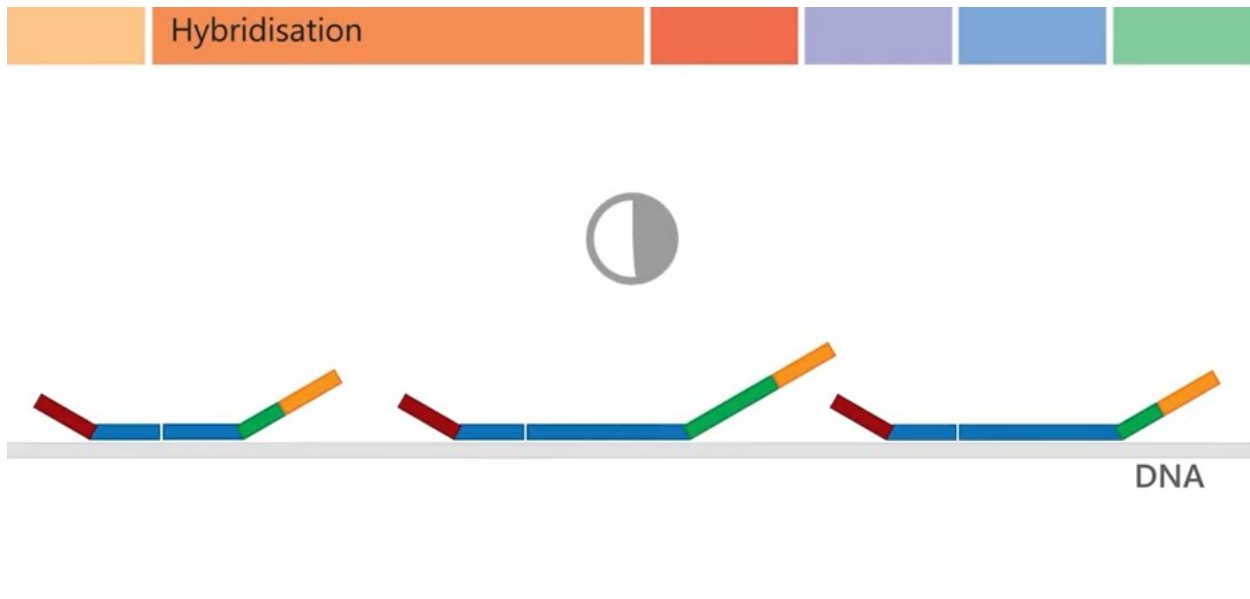
Ogni sonda consiste in due frammenti di DNA a singolo filamento



Le sonde si ibridano in siti adiacenti



Ogni sonda misura circa 60-80nt e sonde di uno stesso saggio sono disegnate con lunghezze diverse



Vengono quindi incubate O/N

Ligation



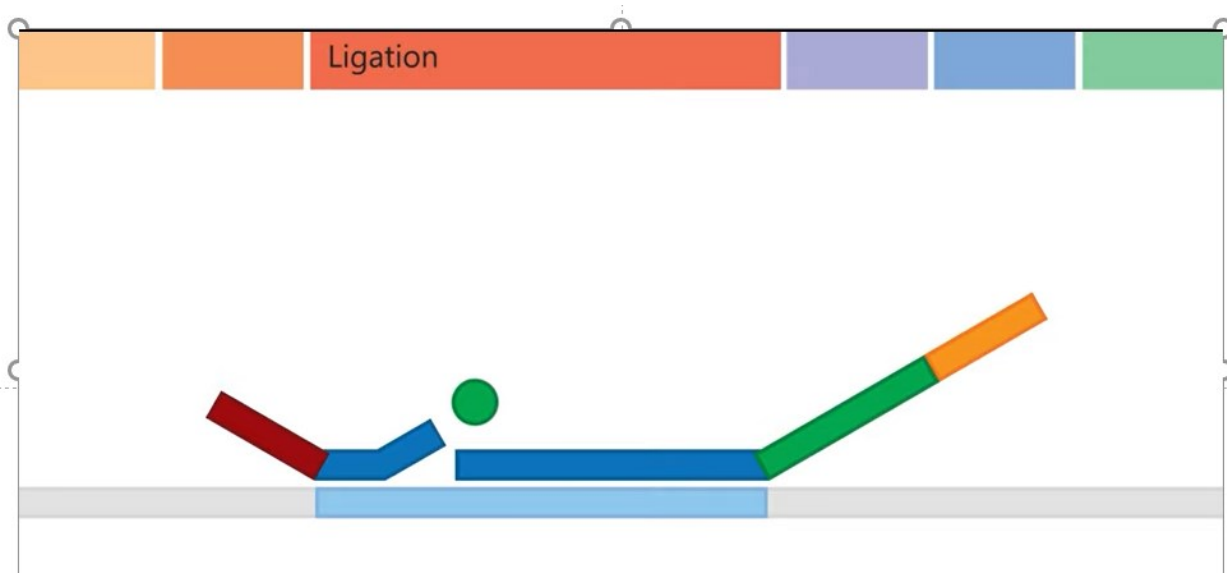
Viene aggiunta la ligasi, l'enzima SALSA\_MLPA, (ligasi buffer A e ligasi buffer B)

Ligation



La ligasi 65 unisce i due frammenti adiacenti e forma un unico probe

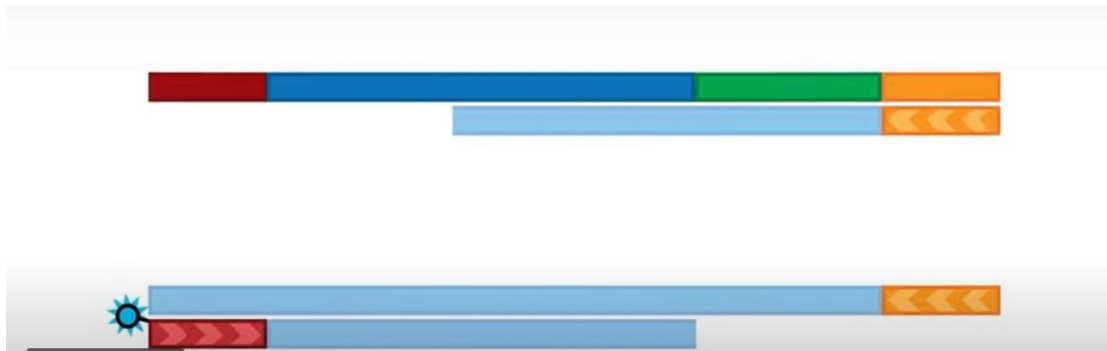




Se c'è un mismatch nella sequenza la sonda non viene ligata



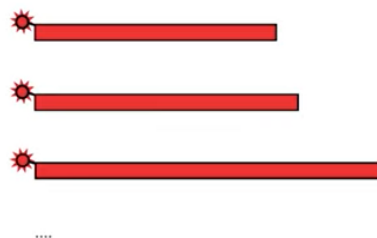
Si procede con l'amplificazione aggiungendo la polimerasi e la mix di PCR che contiene primers di cui il FW marcato con fluoresceina e nucleotidi



Si procede con l'amplificazione per 35 cicli fino ad ottenere una quantità sufficiente di template



Size Standard

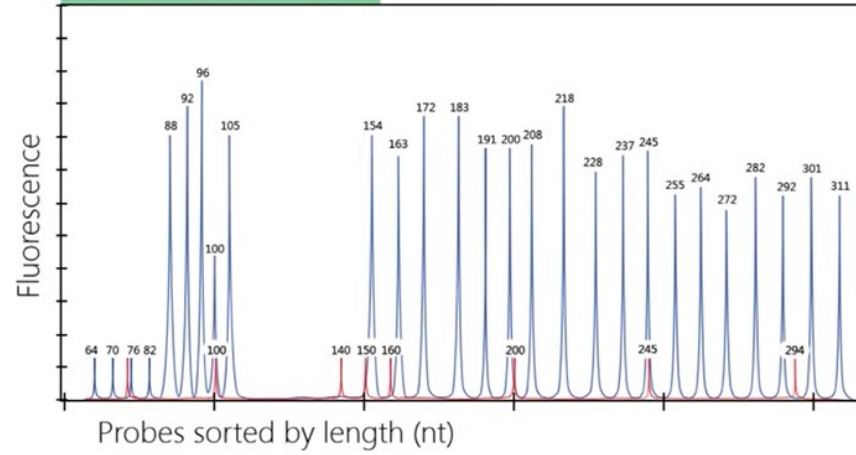


MLPA amplicons



I frammenti vengono separati e gli vien attribuito un valore di lunghezza paragonandoli ad un size standard che ha corso nella stesso pozzetto

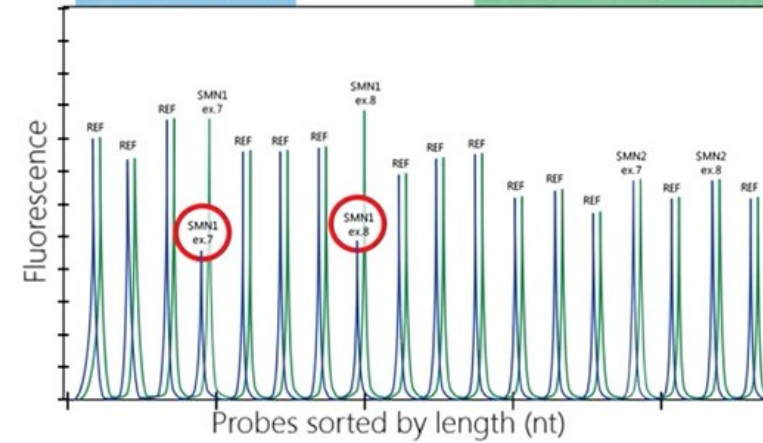
REFERENCE SAMPLE 1



Data Analysis (by Coffalyser.Net)

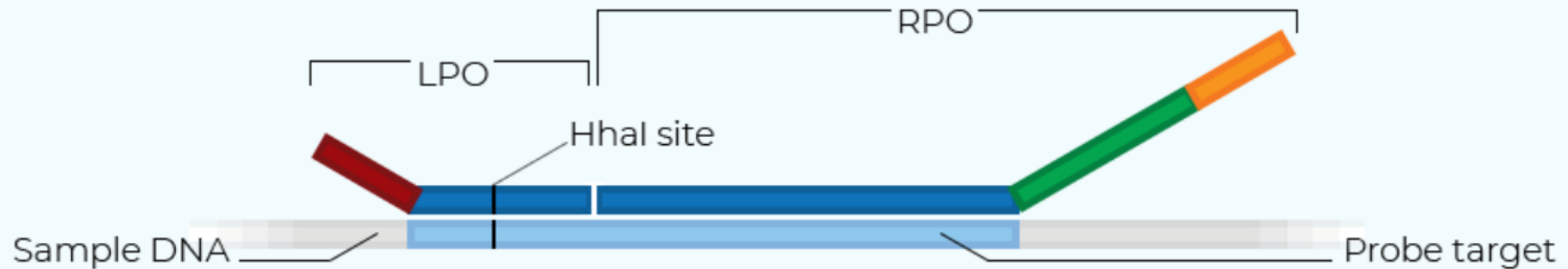
TEST SAMPLE A

REFERENCE SAMPLES (average)



## MS-MLPA

Like [regular MLPA probemixes](#), MS-MLPA probemixes contain probes that target a specific genomic sequence. Each probe consists of two parts: a left and a right probe oligonucleotide (LPO and RPO). Some of the probes in an MS-MLPA probemix target a region that contains a restriction site for the methylation sensitive HhaI endonuclease. These probes can be used for methylation profiling.



## Principle of MS-MLPA

The probes hybridise to their target sequences on the sample DNA. The HhaI enzyme is then used to digest unmethylated double-stranded probe-DNA complexes.

Complexes with unmethylated sample DNA are digested. Digested probes cannot be amplified exponentially, and therefore produce no signal. Complexes with methylated sample DNA are not digested by HhaI, and will generate a normal signal.

