

Příloha č. 3

Princip metody digitální MLPA

Metoda vyšetření: **Digital Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (digiMLPA)**
SALSA® digitalMLPA probemix D001; Hereditary cancer panel (MRC - Holland)

Princip metody:

Princip vyšetření digitální MLPA je založen na amplifikaci 690ti sond, z nichž každá detekuje specifickou sekvenci DNA. DNA je nejprve denaturována a následně je k ní přidána směs sond a barkodů. Každá MLPA sonda se skládá ze dvou oligonukleotidů, které hybridizují do bezprostřední blízkosti, aby v dalším kroku mohlo dojít k jejich ligaci. Během následné PCR reakce jsou všechny zligované sondy současně amplifikovány pomocí jednoho páru primerů a amplikony jsou následně kvantifikovány (detekce copy number variations - CNV na sekvenátorech Illumina). Vyhodnocení probíhá pomocí softwaru Coffalyser digitalMLPA, který detekuje, zda došlo k amplifikaci nebo deleci konkrétních úseků DNA.

D001 Hereditary Cancer Panel zahrnuje geny *APC*, *ATM*, *BAP1*, *BARD1*, *BMPR1A*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP*, *CDH1*, *CDK4*, *CDKN2A*, *CHEK2*, *EPCAM*, *GREM1*, *MITF*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *PALB2*, *PMS2*, *POLE*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *SCG5*, *SMAD4*, *STK11* a *TP53*. Obsahuje také mutačně-specifické próby pro varianty c.156_157insAlu exon3 v *BRCA2*, c.1100delC v *CHEK2*, p.E318K v *MITF*, 10Mb inversi v *MSH2*, intron 7 SVA element inserce v *PMS2* a c.1270C>G v *POLE*.

Limitace metody:

Analýza MLPA nedetekuje malé (bodové) mutace. Nemůže také detekovat změny ležící mimo oblast pokrytou sondami a nedetekuje také většinu inverzí a translokací. Sekvenční změny (např. SNP, bodové mutace, malé delece) v cílové sekvenci sond mohou způsobit falešně pozitivní výsledky.