ДНК-анализ при генетични заболявания – Муковисцидоза, Мускулна дистрофия Дюшен/Бекер, Хемоглобинопатии.

**Молекулярно – цитогенетични методи:**

Базира се на уникалната възможност на част от **едноверижна ДНК** (сонда) да хибридизира със своята комплементарна прицелна последователност където и да е локализирана тя върху метафазна пластинка или имобилизирани интерфазни ядра на неделящи се клетки.

**Кистична фиброза   
(CF, муковисцидоза):**

* Протеин – 1480 аминокиселини,

168 kDa

* Функция – хлорен канал
* ТМ – трансмембранен домен
* NBF – нуклеотид свързващи бримки
* R – регулаторен домен

Първата идентифицирана мутация в CFTR e делеция на три нуклеотида на 508 място, водеща до отпадането на фенилаланинов остатък (**F508del**). Mутацията е с различна честота в отделните популации.

Мутациите се доказват с помощта на комерсиални китове или секвениране на гена

**Кистична фиброза – индиректен ДНК анализ:**

* Установяването на някои ДНК полиморфизми, които са тясно свързани с локуса на CFTR, може да има клинично приложение. В едно информативно семейство двете родителски хромозоми, носещи мутантния алел могат да бъдат идентифицирани посредством анализ на ДНК характеристиките на хромозомите на болното дете. Генетичното състояние на плода при следваща бременност се определя от това колко са общите хаплотипи между него и болния сибс.

**Кистична фиброза – RFLP:**

* **Авторадиографски ленти, установени чрез проба pJ311, ДНК рестриктаза Msp I при семейство със случай на муковисцидоза. Засегнатото дете е хомозигот по алел 2, идентифициращ родителските хромозоми, носещи мутантния алел. Фетусът е здрав хетерозигот.**

**Мускулна дистрофия тип Duchenne / Becker:**

* Унаследяване – Х-рецесивно
* Честота – 1/ 3500 или 1/ 20000 момчета
* Локализация на гена – Хр 21.2
* Големина – 2,3 Мb, 79 екзона

Делециите са различни по своята големина и позиция. Те възникват почти единствено по време на майчината мейоза, най-вероятно в резултат на неравен кросинговър. В гена съществуват две горещи точки, като едната обхваща първите 20 екзона, а другата централната част на гена – екзони 45-53.

* Големината на делециите не съответства на тежестта на клиничната картина. Делециите при DMD нарушават рамката на транслацията.

В клиничната практика търсенето на делециите става посредством мултиплексна PCR, при което няколко екзона се амплифицират едновременно

* **Multiplex PCR анализ на екзони 51, 12, 44, и 4 на дистрофиновия ген**
* **Multiplex PCR анализ на дистрофинови делеции. Екзони А, В, С, D са амплифицирани заедно (стрелките показват PCR праймерите). Разделени са на агарозен гел според дължината си.**

**Предимства на MLPA анализа :**

**1. Дава възможност за прецизно откриване на около 90% от мутациите в DMD гена**

**2. Дава възможност за директно изясняване на носителския статус при жени от рискови фамилии**

**3. Дава възможност за генетичен анализ в семейства с починал индексен пациент**

**4. Дава възможност DMD пациенти да бъдат подготвени за генна терапия в бъдеще**

**Мускулна дистрофия тип Duchenne / Becker Индиректен ДНК анализ (RFLPs)**

RFLP (алели 1 и 2) на Х-хромозомата, установени чрез полиморфизъм РERT 87-15, рестриктаза HmnI. Dистрофиновият ген сегрегира с майчиния алел 1, показвайки че дъщерята (D) е с висок риск да бъде носител, а другата (Е) е с нисък риск

**Хемоглобинопатии** – *генетични дефекти, водещи до абнормна структура на една от глобиновите вериги на Нв молекула*

**ДНК анализ:**

**ДНК полиморфизмът на**

***beta S* гена предполага,че той произхожда от 5 отделни мутации:**

**\* 4 в Африка**

**\* 1 в Индия и Средния Изток**

**Southern blotting analysis и Hb електрофореза  
(1.Cellulose acetate pH 8.4 2.Citrate agar pH 6)**