Директен (мутационен) и индиректен (полиморфен) ДНК-анализ – предимства, недостатъци и приложение. Техники (методи) за директен и индиректен ДНК-анализ.

**Разкриване на мутациина ДНК ниво. ДНК анализ**

I. Общи стадии на ДНк анализа

Изолация на ДНК

♠ Амплификация на ДНК - Полимеразно-верижна реакция (PCR)

Тестуване на ДНК - елестрофореза в агарозен гел

II. Подходи за ДНК анализ

**1. Директен ДНК анализ**

1.1. Техника за мутационно **скриниране**

♠ Single Stranded Conformational Polymorphism’s Analysis (SSCP)

Heteroduplex Analysis (HA)

Multiplex Polymerase Chain Reaction (Multiplex PCR)

1.2. Техника за **диагностика** на специфични мутации

♠ Southern Blotting Analysis

Allele Specific Olygonucleotide Analysis (ASO Analysis)

Amplification Refractory Mutation System (ARMS)

я♠ Restriction Analysis

DNA Sequencing

**2. Индиректен ДНК анализ**

Restriction Fragment Length Polymorphism’s (RFLP-Analysis)

Amplified Fragment Length Polymorphism’s Analysis (AmpFLP)

3. Доказване на генна експресия

Reverse Transcriptase PCR analysis

**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.

* ДНК анализът може да се извърши директно, чрез доказване на специфична болестна мутация в съответния ген, или индиректно, чрез проследяване унаследяването в конкретна фамилия на ДНК полиморфни маркери, разположени в или близо до интересуващия ни ген
* Подходи за ДНК диагностика:
  + - Директен (мутационен) анализ
    - Индиректен (полиморфен) анализ

Директен ДНК анализ:

* Предимства – точност на диагнозата и възможност да се докаже мутацията в конкретен индивид без да е необходимо изследване да други родственици
* Ограничения – приложение при изследване на известни гени; необходима е предварителна информация за локализацията, вида и честотата на най-честите мутации в гена за конкретната популация; неефективност при голям брой мутации в един ген
* Приложение – за откриване на мутации при някои от най-разпространените наследствени заболявания (кистична фиброза; мускулна дистрофия Дюшен/Бекер; таласемии)

Индиректен ДНК анализ:

* Основава се на проследяване в определена фамилия начина на унаследяване на специфичен полиморфен маркер, който е скачен с патологичен мутантен ген.
* Индиректният анализ не дава отговор за природата на молекулния дефект, лежащ в основата на заболяването, но дава информация за генетичния статус на индивида
* Условия :
  + сигурна клинична диагноза при индексния пациент
  + изследване на достатъчно голям брой родственици (минимум родители и болно дете)
  + възможност за рекомбинация (особено при отдалеченост на маркера от гена или при големи гени)

**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.