SERPINA1 генийн S, Z мутант аллелийг бодит хугацааны ПГУ-аар илрүүлсэн нь

Г.Чимэдлхамсүрэн[1], Ж.Жамбалдорж[1,2], Д.Ичинноров[3], Ж.Сарантуяа[1,4]

[1]АШУҮИС, Био-Анагаахын Сургууль, Молекул биологи-Удам зүйн тэнхим
[2]АШУҮИС, Эрдмийн сургууль, Эрүүл мэндийн судалгааны тэнхим
[3]АШУҮИС, Анагаах Ухааны сургууль, Уушги харшил судлалын тэнхим
[4]АШУҮИС, Био-Анагаахын хүрээлэн
Цахим шуудан: chimedlkhamsuren@mnums.edu.mn, Утас: 99139520

Түлхүүр үг:
Мутаци
Альфа-1 антитрипсины дутагдал
Генотип
бхПГУ

Товч утга:
Үндэслэл: *SERPINA1* генийн мутацийг судлах, эмнэлзүйд S, Z мутант аллелийг илрүүлэхэд найдвартай, хугацаа богино шаарддаг молекул биологийн шинжилгээний аргачлал шаардлагатай байна. Өмнөх судалгаануудад *SERPINA1* генийн S, Z мутант аллелийг судлахдаа уламжлалт полимеразын гинжин урвал (ПГУ)-д суурилсан огтлогдсон хэрчмийн уртын полиморфизм (ОХУП), аллель өвөрмөц ПГУ зэрэг нь аргуудыг түлхүү ашиглажээ. Бид *SERPINA1* генийн S, Z мутант аллелийг илрүүлэх TaqMan проб бүхий бодит хугацааны ПГУ (бхПГУ)-ын аргыг загварчилсан ба уг аргыг харьцуулан судлах шаардлагад үндэслэн энэ судалгааг хийлээ. **Зорилго:** *SERPINA1* генийн мутацийг тодорхойлох ОХУП ба бхПГУ-ын аргуудыг харьцуулан судалж, аналитик мэдрэг, өвөрмөц чанарыг тогтоох. **Арга, аргачлал:** Судалгаанд 473 хүний ДНХ сорьц ашигласан. *SERPINA1* генийн M, S, Z аллелиудыг ОХУП ба бхПГУ-аар илрүүлсэн. S, Z мутант аллель илэрсэн тохиолдлуудад нуклеотидын дараалал тогтоох Сангерын арга ашиглан дарааллыг тогтоож баталгаажуулсан. Статистик боловсруулалтанд MedCalc програм ашигласан каппа коэффициент, аналитик мэдрэг ба өвөрмөц чанаруудыг тооцоолов. **Үр дүн:** Үр дүнгээр *SERPINA1* генийн MZ генотип 0.21% (n=1), MS генотип 1.06% (n=5), SS генотип 0.42% (n=2)-тай илэрсэн. ОХУП аргын аналитик мэдрэг чанар 71.43% (95% ИИ, 29.04-96.33%), харин бхПГУ-ын аргын аналитик мэдрэг чанар 100.0% (95% ИИ, 99.21-100.0%) байсан. **Дүгнэлт:** ОХУП аргатай харьцуулахад бхПГУ нь аналитик мэдрэг чанараар илүү байгаа нь тогтоогдлоо.

Үндэслэл: *SERPINA1* ген нь альфа-1 антитрипсин (A1AT) уургийг кодлодог ба уг уураг нь эластаз гэх мэт протеазуудыг идэвхгүй болгож үрэвслийн үед эдийн сөнөрөл хэт даамжрахаас хамгаалдаг байна.[1,2] Гэвч *SERPINA1* генийн rs17580 ба rs28929474 полиморфизмын мутант S, Z аллелиуд нь A1AT уургийн дутагдал үүсгэж улмаар уушгины архаг бөглөрөлт өвчин (УАБӨ), элэгний цирроз, элэгний хавдар үүсэх шалтгаан болдог.[3-5] rs28929474 полиморфизмын үед c.1096G>A (GAG→AAG) болж өөрчлөгдсөнөөр 366 дахь амин хүчил глутамины хүчлээс лизин болно.[6,7] Мөн rs17580 полиморфизмын үед c.863A>T (GAA→GTA) болж өөрчлөгдсөнөөр 288 дахь амин хүчил глутамины хүчлээс валин болдог. Энэхүү амин хүчлийн өөрчлөлт нь A1AT-ийн бүтэц, орон зайн хэлбэр, элэгний эсээс ялгарах A1AT-ний хэмжээ, нейтрофилийн элестазид холбогдох авцаал чанар зэрэгт нөлөөлдөг байна.[6,8]

Судлаач de Serres FJ (2012) нарын судалгаагаар 97 орны 5.26 тэрбум хүн амын дунд ZZ, SZ, SS, MZ, MS генотип 190 сая гаруй хүнд тохиолдсон буюу 1000 хүнд 36.2 тохиолдож байгааг тодорхойлсон байна. Тэдгээрийн 0.1% ZZ, 0.7% SZ, 24% SS ба MZ, 75% MS генотип тус тус байгааг, Al-Jameil (2017) нар мутант S, Z аллелиудын давтамж Саудын арабын хүн амын дунд 1000 хүн тутамд 6.5, УАБӨ-тэй 1000 хүн тутамд 87 тохиолдож байгааг тус тус тогтоожээ.[9-10] Одоогоор Монголчуудын дунд *SERPINA1* генийн мутант S, Z аллелиуд тархалт тодорхойгүй байна.

Нөгөө талаас *SERPINA1* генийн мутант S, Z аллелиудыг шинжлэх нь эмчилгээний ач холбогдолтой байдаг.[11,12]"УАБӨ-ийэрсрэгдэлхийнийтийнсанаачлага"-аас гаргасан удирдамжид генетикийн шинжилгээгээр

А1АТ-ий дутагдлыг ялган оношлож, улмаар А1АТ уураг нөхөх сонгомол эмчилгээ хийхийг зөвлөмж болгодог.[13] Мөн Монгол улсын Эрүүл Мэндийн Яамны Сайдын 2021 оны А/130 дугаар тушаалд дэлхийн эрүүл мэндийн байгууллагын зөвлөмжөөр УАБӨ-тэй бүх хүнд *SERPINA1* генийн мутаци илрүүлэх шинжилгээ хийх шаадлагатай хэмээн тусгасан боловч өнөөдрийг хүртэл эмнэлзүйд мутаци тодорхойлох шинжилгээ хийгддэггүй хэвээр байна.[14] Цаашид *SERPINA1* генийн rs17580 ба rs28929474 полиморфизмыг Монгол хүн амын дунд судлах, эмнэлзүйн шинжилгээ хийхэд хялбар, хурдан, найдвартай арга шаардлагатай байгаа нь энэхүү судалгааг хийх үндэслэл болсон ба бид өмнөх судалгаануудад ашигласан уламжлалт ПГУ-д ОХУП, аллель өвөрмөц ПГУ зэрэг аргуудаас илүү хялбар, богино хугацаа зарцуулдаг TaqMan проб бүхий бхПГУ-ын аргыг загварчилж, тус аргаар *SERPINA1* генийн rs17580 ба rs28929474 полиморфизмын мутант S, Z аллелиудыг илрүүлэн бусад аргуудтай харьцуулж, үр дүнг нуклеотидын аргаар баталгаажуулах судалгаа хийлээ.[15-17]

Зорилго: *SERPINA1* генийн rs17580 ба rs28929474 полиморфизмын M, S, Z аллелиудыг илрүүлэх ОХУП ба бхПГУ-ын аргуудыг харьцуулан судалж, аналитик мэдрэг, өвөрмөц чанарыг тогтоох

Зорилт:

1. *SERPINA1* генийн rs17580 ба rs28929474 полиморфизмын M, S, Z аллелиудыг ОХУП ба бхПГУ-ын аргаар илрүүлэх, аллелиудын давтамжийг тодорхойлох
2. S, Z мутант аллель илэрсэн тохиолдлуудыг нуклеотидын дараалал тогтоох аргаар баталгаажуулах, ОХУП ба бхПГУ-ын аргын аналитик мэдрэг, өвөрмөц чанарыг тодорхойлох

Арга, аргачлал: АШУҮИС-ийн Судалгааны ёс зүйн хяналтын хорооны 2020 оны 1 дүгээр сарын 17-ны өдрийн (2020/3-02) хурлын шийдвэрээр судалгааны төслийг эхлүүлэх ёс зүйн зөвшөөрөл олгосны дагуу хийж гүйцэтгэв. Судалгааг Монгол хүн амын дундах генетикийн вариац ба зарим удамшимтгай эмгэгүүдэд өртөмхий байдлыг тодорхойлох төслийн хүрээнд гүйцэтгэсэн ба нийт 473 хүний ДНХ сорьцыг ашиглав. *SERPINA1* генийн rs17580, rs28929474 полиморфизмыг ОХУП аргаар тодорхойлохдоо Чорос онош компаний үйлдвэрлэсэн Taq 2x холимог ба праймеруудыг ашиглан бай дарааллыг олшруулав. (Хүснэгт 1) *Taq*ᵅI рестрикцийн эсгэгээр үйлчилж үр дүнг гель электрофорезийн аргаар тодорхойлсон. Харин бхПГУ-д Bioneer корпорацийн үйлдвэрлэсэн AccuPower® Plus DualStar™ qPCR PreMix (with UDG) (Кат №: K-6607) бхПГУ-ын холимог, праймер ба пробуудыг ашиглаж *SERPINA1* генийн S, Z мутацийг тодорхойлсон.

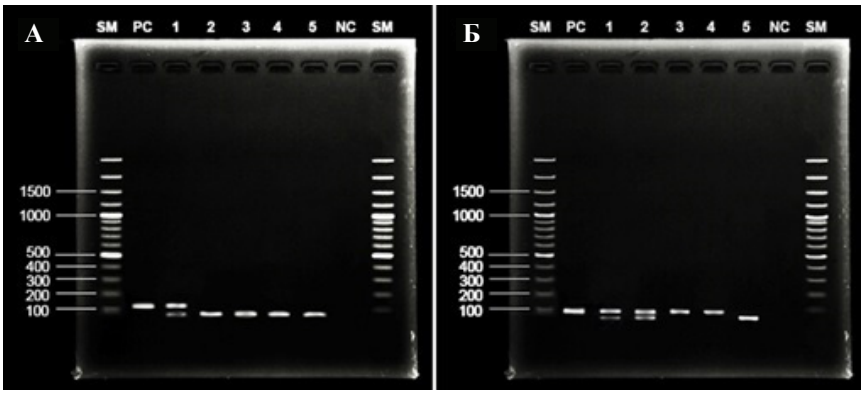
Хүснэгт 1. ОХУП ба бхПГУ-д ашигласан праймер, пробын дарааллал

Мутаци	Нэр	Дарааллал	ОДХУ*	Та°C†
rs17580	Шууд	5`-GAGGGGAAACTACAGCACCTCG-3`	98 х.н.	59°C
	Урвуу	5`-ACCCTCAGGTTGGGGAATCACC-3`		
rs28929474	Шууд	5`-TAAGGCTGTGCTGACCATCGTC-3`	110 х.н.	59°C
	Урвуу	5`-CAAAGGGTTTGTTGAACTTGACC-3`		
rs17580	Шууд	5`-TGGCTAAGAGGTGTGGGCAGC-3`	174 х.н.	58°C
	Урвуу	5`-GATGAAATACCTGGGCAATGCC-3`		
	M-580	5`FAM-GTTCATTTTCCAGGTGCTG-3`BHQ		
	S-580	5`HEX-GTTCATTTACCAGGTGCTG-3`BHQ		
rs28929474	Шууд	5`-TTCCTGGGAGGTGTCCAC-3`	242 х.н.	58°C
	Урвуу	5`-CATGAAGAGGGGAGACTTGG-3`		
	M-474	5`FAM-CCATCGACGAGAAAGGGA-3`BHQ		
	Z-474	5`HEX-CATCGACAAGAAAGGGACT-3`BHQ		

***Тайлбар:** *Олшрох ДНХ хэрчмийн урт, †ПГУ-ын праймер холбогдох шатны температур*

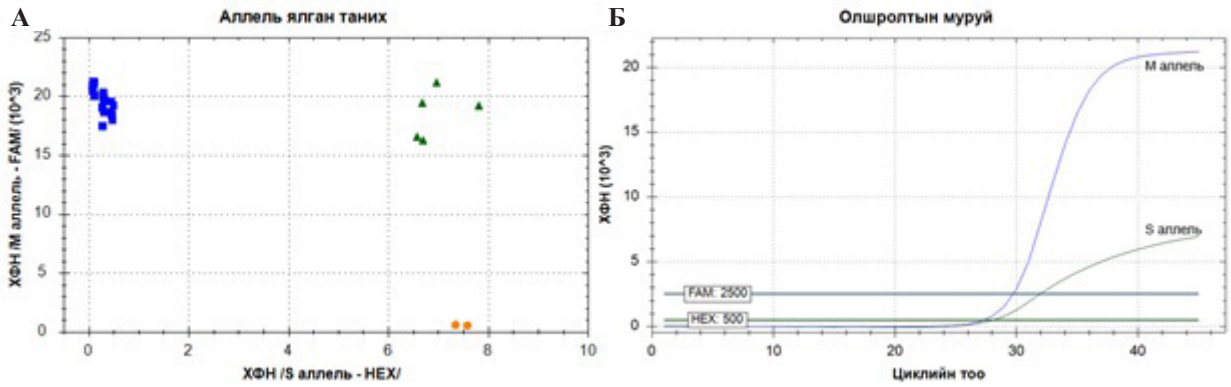
Бид Sangon biotech компанид үйлдвэрлэсэн *SERPINA1* генийн S эсвэл Z мутант аллелийг агуулсан puc57 плазмидыг судалгаанд эерэг хяналт болгон ашигласан. *SERPINA1* генийн S, Z мутант аллель илэрсэн тохиолдлуудыг нуклеотидын дараалал тогтоох Сангерын аргаар шинжилж баталгаажуулав. Ингэхдээ дээр дурьдсан праймерыг ашиглан ПГУ-аар бай дарааллыг олшруулж, ПГУ-ын бүтээгдэхүүнээс Bioneer корпорацийн үйлдвэрлэсэн AccuPrep® PCR/Gel Purification Kit цомог ашиглан олширсон ДНХ хэрчмүүдийг цэвэршүүлсэн. Цэвэршүүлсэн ДНХ уусмалыг праймерын хамт Занаспекс компанид илгээж захиалгаар нуклеотидын дараалал тогтоох шинжилгээ хийлгэв. бхПГУ-ын үр дүнд CFX Maestro програм ашиглан дүн шинжилгээ хийсэн ба FAM ба HEX будагт харгалзах бай дарааллын олшролтыг илтгэх харьцангуй флюресценцийн нэгж (ХФН)-д тулгуурлан аллель ялган таних анализ хийсэн. Судалгааны үр дүнгийн статистик боловсруулалтанд MedCalc програм ашиглан каппа коэффициентээр ОХУП ба бхПГУ аргуудын нийцлийг илэрхийлж, аналитик өвөрмөц, мэдрэг чанарыг тодорхойлсон.

Үр дүн: Судалгаанд ашигласан 473 сорьцоос ОХУП-ын аргаар 0.21% (n=1)-д MZ генотип, 0.63% (n=3)-д MS генотип, 0.42% (n=2)-д SS генотип тус тус илэрсэн. ОХУП-ын аргаар *SERPINA1* генийн rs17580, rs28929474 полиморфизмын генотипийг илрүүлсэн үр дүнг харуулав. (Зураг 1)



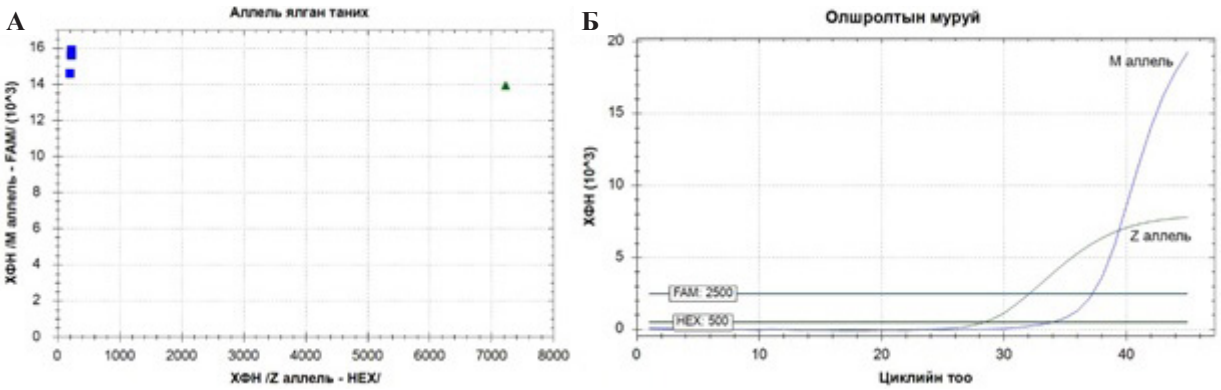
Зураг 1. ***SERPINA1*** **генийн S, Z мутацийг ОХУП аргаар тодорхойлсон үр дүн.**
Тайлбар: А. *SERPINA1* генийн rs28929474 полиморфизмыг тодорхойлсон гелийн зураглал. PC, эерэг хяналт, NC, сөрөг хяналт, 1 дугаартай баганад гетерозигот MZ генотип, 2-5 дугаартай баганад MM генотип илэрсэн. Б. *SERPINA1* генийн rs17580 полиморфизмыг тодорхойлсон гелийн зураглал. PC, эерэг хяналт, NC, сөрөг хяналт, 1, 2 дугаартай баганад гетерозигот MS генотип, 3, 4 дугаартай баганад SS генотип, 5 дугаартай баганад MM генотип илэрсэн.

Харин бхПГУ-ын аргаар шинжилгээ хийхэд 0.21% (n=1)-д MZ генотип, 1.06% (n=5)-д MS генотип, 0.42% (n=2)-д SS генотип тус тус илэрсэн. *SERPINA1* генийн S, Z мутант аллель илэрсэн бүх тохиолдлыг нуклеотидын дараалал тогтоох Сангерын аргаар шинжилж баталгаажуулсан. бхПГУ-ын аргаар *SERPINA1* генийн rs17580 полиморфизмын генотипийг тодорхойлов. (Зураг 2)



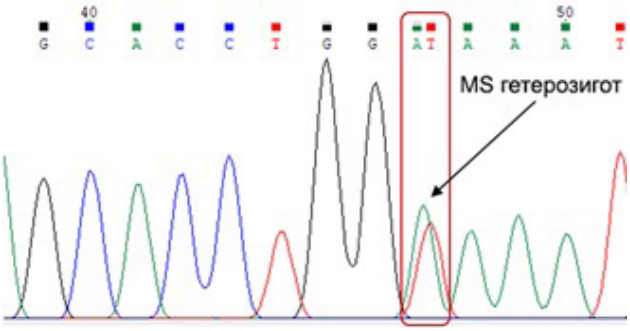
Зураг 2. ***SERPINA1*** **генийн S мутацийг бхПГУ-ын аргаар тодорхойлсон үр дүн.**
Тайлбар: А. CFX manager програм ашиглан аллель ялган таних анализ хийсэн үр дүн. FAM ба HEX будагт харгалзах харьцангуй флюресценцийн нэгжид тулгуурлан хөх өнгөтэй дөрвөлжин дүрсээр MM генотип, ногоон өнгөтэй гурвалжин дүрсээр MS гетерозигот генотип, улбар шар өнгөтэй дугуй дүрсээр SS генотипийг тус тус ялган харуулсан. Б. Хөх өнгөөр FAM будагтай M аллель, ногоон өнгөөр HEX будагтай S аллелийн дараалал олшролтын муруйг харуулав.

ОХУП ба бхПГУ-аар ялгаатай үр дүнтэй гарсан 2 сорьцыг нуклеотидын дараалал тогтоох шинжилгээгээр баталгаажуулахад тус 2 сорьцод MS генотип илэрсэн. Өөрөөр хэлбэл ОХУП аргаар шинжлэхэд уг 2 сорьцод хуурамч сөрөг хариу гаргасан байсан. Зураг 3-т бхПГУ-ын аргаар *SERPINA1* генийн rs28929474 полиморфизмын генотипийг илрүүлсэн үр дүнг харуулав.



Зураг 3. *SERPINA1* генийн Z мутацийг бхПГУ-ын аргаар тодорхойлсон үр дүн.
Тайлбар: А. CFX manager програм ашиглан аллель ялган таних анализ хийсэн үр дүн. FAM ба HEX будагт харгалзах харьцангуй флюресценцийн нэгжид тулгуурлан хөх өнгөтэй дөрвөлжин дүрсээр MM генотип, ногоон өнгөтэй гурвалжин дүрсээр MZ гетерозигот генотипийг тус тус ялган харуулсан. Б. Хөх өнгөөр FAM будагтай M аллель, ногоон өнгөөр HEX будагтай Z аллелийн дараалал олшролтын муруйг харуулав.

ОХУП ба бхПГУ-ын аргуудын хоорондын нийцэмжийг каппа коэффициентээр тооцоолоход 0.831 (95% ИИ, 0.601-1.00) буюу сайн нийцэлтэй байсан. Зөрүүтэй илэрсэн 2 сорьцыг нуклеотидын дараалал тогтоох шинжилгээгээр баталгаажуулсны дараах байдлаар ОХУП аргын аналитик мэдрэг чанар 71.43% (95% ИИ, 29.04-96.33%), аналитик өвөрмөц чанар 100.0% (95% ИИ, 99.24-100.0%) байлаа. Харин бхПГУ-ын аргын аналитик мэдрэг чанар 100.0% (95% ИИ, 59.04-100.0%), аналитик өвөрмөц чанар 100.0% (95% ИИ, 99.21-100.0%) байв.



Зураг 4. *SERPINA1* генийн MS гетерозигот генотипийг нуклеотидын дараалал тогтоох Сангерын аргаар тодорхойлсон үр дүн.
Тайлбар: Хар өнгөөр G, хөх өнгөөр C, ногоон өнгөөр A, улаан өнгөөр T нуклеотидын дохиог тэмдэглэсэн. 47 дахь байрлалд A ба T давхардсан дохио илэрсэн байна.

Хэлцэмж: Бид энэхүү судалгаагаар бхПГУ ба ОХУП аргууд ашиглан *SERPINA1* генийн ZZ, SZ, SS, MZ, MS генотипийг илрүүллээ. Нуклеотидын дараалал тогтоох Сангерын аргаар баталгаажуулсны дараах үр дүнгээр 0.21% (n=1)-д MZ генотип, 0.42% (n=2)-д SS генотип, 1.06% (n=5)-д MS генотип тус тус илэрсэн. Өөрөөр хэлбэл SS ба MZ генотип 1000 хүнд 6.34, MS генотип 1000 хүнд 10.57 тус тус давтамжтай байна. Энэ нь de Serres FJ (2012) нарын судалгааны SS ба MZ генотип нь 1000 хүнд 8.69 тохиолдсон үр дүнтэй дүйж байлаа.[9] Судалгааны үр дүнгээр MS генотиптэй 2 сорьц ОХУП аргаар MM генотиптэй тодорхойлогдсон ба ОХУП аргын аналитик мэдрэг чанар 71.43% (95% ИИ, 29.04-96.33%)-тай байсан. Харин бхПГУ-ын аргын аналитик мэдрэг чанар 100.0% (95% ИИ, 59.04-100.0%), аналитик өвөрмөц чанар 100.0% (95% ИИ, 99.21-100.0%) байсан нь бхПГУ-ын арга мэдрэг чанараар илүү болохыг харууллаа. Мөн *SERPINA1* генийн M, S, Z аллелиудыг ОХУП аргаар илрүүлэх туршилтын нийт хугацаа 14-16 цаг, ПГУ-ын холимог бэлтгэх, ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг гель электрофорезоор илрүүлэх, рестрикцийн анализ хийх холимог бэлтгэх, гель электрофорезоор ДНХ хэрчмүүдийг илрүүлэх зэрэг олон гар ажиллагаа бүхий алхамуудтай байсан бол бхПГУ-ын аргын хувьд мастер холимог бэлтгэхээс өөр гар ажилбар шаардахгүй, *SERPINA1* генийн M, S, Z аллелиудыг ердөө 92 минутанд илрүүлж байсан зэрэг давуу талтай байсан. Мөн ОХУП-ын хувьд үр дүнг нүдээр харж ажигладаг бол бхПГУ-ын арга нь дараалалд харгалзах флуоресцент гэрлийн тодролыг тоон үзүүлэлтээр хэмжиж, програмын тусламжтай тооцоолол хийж аллелиудыг тодорхойлж байсан нь судлаачдад үр дүнг үнэлэхэд хялбар болгож байлаа.

Өмнөх судалгаануудад *SERPINA1* генийн мутацийг тодорхойлоход олон төрлийн аргуудыг ашигласан байдгаас ОХУП, аллель өвөрмөц ПГУ, нуклеотидын дараалал тогтоох аргуудыг түгээмэл ашигласан байдаг.[15-17] Тодруулбал, цөөн түүвэртэй гэр бүлд суурилсан удамзүйн судалгаа, шинэ мутаци илрүүлэх зэрэг судалгаанд нуклеотидын дараалал тогтоох аргыг ашигладаг.[18,19] Мөн мутаци илрүүлэх бусад төрлийн аргуудыг баталгаажуулахад уг аргыг ашигласан байдаг. Харин ОХУП ба аллель өвөрмөц ПГУ аргуудыг харьцангуй олон тооны түүвэр бүхий судалгаануудад түлхүү ашиглажээ. Судлаач Ramos-Díaz R (2024) нар *SERPINA1* генийн M, S, Z аллелиудыг илрүүлэх сайбер ногоон будагт суурилсан бхПГУ-ын аргыг боловсруулсан. Уг аргаар M ба S аллелийг ердөө 2°C, M ба Z аллелийг 2.9°C зөрүү бүхий хайлах муруйн хазайлтаар ялгаж таньдаг аж. Судлаачид уг аргыг мэдрэг чанар сайтай учир олон хүн амын дунд M, S, Z аллелиудын илрүүлэг шинжилгээнд ашиглах боломжтой хэмээн дүгнэжээ.[15] Бидний судалгаатай төстэй судалгааг судлаач Osaki R (2011) нар хийсэн ба уг судалгаагаар rs1142345, rs1127354, rs3765534 зэрэг нэг нуклеотидын полиморфизмуудыг TaqMan бхПГУ ба ОХУП аргуудаар тодорхойлж, үр дүнг харьцуулсан байна. Нийт 12 сорьцын генотип хоёр аргуудаар

ялгаатай хариутай гарсан ба нуклеотидын дараалал тогтоох шинжилгээний хариу TaqMan бхПГУ аргын хариутай тохирч байсан.[20] Өөрөөр хэлбэл TaqMan бхПГУ арга нь илүү найдвартай, үнэн зөв хариуг өгсөн нь бидний судалгааны үр дүнтэй дүйж байна.[20] Мөн Campsall P (2004) нар *Varicella-Zoster* вирусийн генотип тодорхойлоход хоёр төрлийн ОХУП арга ба бхПГУ-ыг харьцуулан судлажээ.[21] Үр дүнгээр TaqMan бхПГУ арга 100 дахин өндөр мэдрэг, шинжилгээний найдвартай байдал 100% байгааг тогтоожээ. Дээрх судалгааныудын үр дүн бидний судалгааны үр дүнтэй дүйж байна. Xia Z (2018) нар нийтлүүлсэн уламжлалт ПГУ ба бхПГУ-ыг харьцуулсан судалгаанаас үзэхэд уламжлалт ПГУ-ын ялган дүйх хязгаар нь $1*10^{-6}$ нг/мкл харин бхПГУ-ын ялган дүйх хязгаар $1*10^{-7}$ нг/мкл байсан. Мөн илрүүлэх чадамжаар бхПГУ харьцангуй илүү байсан тухай дурьджээ.[22] Энэ нь ОХУП аргаар 2 сорьцод S аллель илрээгүй нь тус аргын ялган дүйх хязгаартай холбоотой байх боломжтойг илтгэж байна. Цаашид синтетик ДНХ уусмал ашиглан ОХУП ба бхПГУ аргуудын ялган дүйх хязгаарыг судлах шаардлагатай байна.

Дүгнэлт: Судалгааны үр дүнгээр ОХУП аргатай харьцуулахад бхПГУ-ын арга нь аналитик мэдрэг чанар илүү, цаг хугацаа бага шаарддаг, хялбар зэрэг давуу талтай байлаа. Цаашид бхПГУ-ын аргыг *SERPINA1* генийн rs17580, rs28929474 полиморфизмыг тодорхойлох судалгаа, шинжилгээнд хэрэглэхэд тохиромжтой байна.

Ном зүй:

1. *Ehlers MR. Immune-modulating effects of alpha-1 antitrypsin. Biological chemistry. 2014;395(10):1187-1193.*
2. *Kokturk N, Khodayari N, Lascano J, Riley EL, Brantly ML. Lung Inflammation in alpha-1-antitrypsin deficient individuals with normal lung function. Respiratory research. 2023;24(1):40.*
3. *Fromme M, Schneider CV, Trautwein C, Brunetti-Pierri N, Strnad P. Alpha-1 antitrypsin deficiency: A re-surfacing adult liver disorder. Journal of Hepatology. 2022;76(4):946-958.*
4. *Stone H, Pye A, Stockley RA. Disease associations in alpha-1-antitrypsin deficiency. Respiratory Medicine. 2014;108(2):338-343.*
5. *Strnad P, McElvaney Noel G, Lomas David A. Alpha1-Antitrypsin Deficiency. New England Journal of Medicine. 2020;382(15):1443-1455.*
6. *Moll M, Jackson VE, Yu B, et al. A systematic analysis of protein-altering exonic variants in chronic obstructive pulmonary disease. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology. 2021;321(1):L130-l143.*
7. *Seixas S, Marques PI. Known Mutations at the Cause of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency an Updated Overview of SERPINA1 Variation Spectrum. The application of clinical genetics. 2021;14:173-194.*
8. *Foil KE. Variants of SERPINA1 and the increasing complexity of testing for alpha-1 antitrypsin deficiency. Therapeutic advances in chronic disease. 2021;12_suppl:20406223211015954.*
9. *de Serres FJ, Blanco I. Prevalence of α1-antitrypsin deficiency alleles PI*S and PI*Z worldwide and effective screening for each of the five phenotypic classes PI*MS, PI*MZ, PI*SS, PI*SZ, and PI*ZZ: a comprehensive review. Therapeutic advances in respiratory disease. 2012;6(5):277-295.*
10. *Al-Jameil N, Hassan AA, Hassanato R, et al. The prevalence of PI*S and PI*Z SERPINA1 alleles in healthy individuals and COPD patients in Saudi Arabia: A case-control study. Medicine. 2017;96(42):e8320.*
11. *Feitosa PH. Diagnosis and augmentation therapy for alpha-1 antitrypsin deficiency: current knowledge and future potential. Drugs in context. 2023;12.*
12. *Buck E, Presotto MA, Brock J, et al. Augmentation therapy with human alpha-1-proteinase inhibitor reduces exacerbations in patient with bronchiectasis and alpha-1-antitrypsin deficiency. Respiratory medicine case reports. 2022;39:101740.*
13. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Global Strategy for Prevention, Diagnosis and Management of COPD: 2024 Report. Bethesda: GOLD; https://goldcopd.org/2024-gold-report.*
14. *Эрүүл Мэндийн Яамны Сайдын тушаал дугаар А/130. Эмнэзүйн заавар батлах тухай /Уушгины архаг бөглөрөлт өвчний оношилгоо, эмчилгээний эмнэлзүйн заавар/ 2021 https://moh.gov.mn/uploads/files/4c3d2198a557feb7f4b-9fbd0b82b9b993fdd2b5f.pdf.*
15. *Ramos-Díaz R, Escuela-Escobar A, Díaz-Usera A, Hernández Pérez JM, González-Carracedo MA, Pérez-Pérez JA. Real-time PCR detection of PI*S and PI*Z alleles of SERPINA1 gene using SYBR green. Gene. 2024;921:148540.*
16. *El-Dawa AN, ElSaid AM, Refaat S, El-khawaga OY. Association of A1AT genetic polymorphism and NSCLC: a case- control study in Egyptian population. BMC Medical Genomics. 2023;16(1):173.*
17. *Sansom ME, Ferry BL, Sherrell ZP, Chapel HM. A preliminary assessment of alpha-1 antitrypsin S and Z deficiency allele frequencies in common variable immunodeficiency patients with and without bronchiectasis. Clinical and experimental immunology. 2002;130(3):489-494.*
18. *Silva D, Oliveira MJ, Guimarães M, Lima R, Gomes S, Seixas S. Alpha-1-antitrypsin (SERPINA1) mutation spectrum: Three novel variants and haplotype characterization of rare deficiency alleles identified in Portugal. Respiratory Medicine. 2016;116:8-18.*
19. *Ferrarotti I, Carroll TP, Ottaviani S, et al. Identification and characterisation of eight novel SERPINA1 Null mutations. Orphanet Journal of Rare Diseases. 2014;9(1):172.*
20. *Osaki R, Imaeda H, Ban H, et al. Accuracy of genotyping using the TaqMan PCR assay for single nucleotide polymorphisms responsible for thiopurine sensitivity in Japanese patients with inflammatory bowel disease. Exp Ther Med. 2011;2(5):783-786.*
21. *Campsall P, Au N, Prendiville J, Speert D, Tan R, Thomas E. Detection and Genotyping of Varicella-Zoster Virus by TaqMan Allelic Discrimination Real-Time PCR. Journal of clinical microbiology. 2004;42:1409-1413.*
22. *Xia Z, Johansson ML, Gao Y, et al. Conventional versus real-time quantitative PCR for rare species detection. Ecology and Evolution. 2018;8(23):11799-11807.*

Detection of S and Z mutant alleles of *SERPINA1* gene by real-time PCR

Chimedlkhamsuren G[1], Jambaldorj J[1,2], Ichinnorov D[3], Sarantuya J[1,4]

[1]Department of Molecular biology and Genetics, School of Biomedicine, MNUMS
[2]Department of Health Research, Graduate School, MNUMS
[3]Department of Pulmonology and Allergology, School of Medicine, MNUMS
[4]Institute of Bio-Medical Sciences, MNUMS
E-mail: chimedlkhamsuren@mnums.edu.mn, Tel: +976-99139520

Background: A reliable and fast molecular biological analysis method is needed to detect S and Z mutant alleles of *SERPINA1* gene in the practice. In previous studies, conventional polymerase chain reaction (PCR)-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) and allele-specific PCR methods were used to investigate S and Z mutant alleles of *SERPINA1* gene. We designed a real-time PCR (qPCR) method with TaqMan probes to detect S and Z mutant alleles of *SERPINA1* gene, and conducted this study to compare with RFLP.
Aim: To compared RFLP and real-time PCR (qPCR) methods for detection of *SERPINA1* gene mutations and determined the anaytical sensitivity and specificity.
Materials and Methods: DNA samples from 473 people were used in the study. M, S, and Z alleles of *SERPINA1* gene were detected by qPCR and RFLP. Cases with S and Z mutant alleles were confirmed using Sanger nucleotide sequencing. Kappa coefficients, analytical sensitivity and specificity were calculated using MedCalc software for statistical analysis.
Results: According to the results, MZ genotype of *SERPINA1* gene was detected in 0.21% (n=1), MS genotype in 1.06% (n=5), and SS genotype in 0.42% (n=2). The analytical sensitivity of the RFLP was 71.43% (95% CI, 29.04-96.33%), while the analytical sensitivity of the qPCR was 100.0% (95% CI, 99.21-100.0%).
Conclusion: This finding indicating that the qPCR method is more sensitive and suitable compared with RFLP.

Keywords: Mutation, Alpha-1 antitrypsin deficiency, Genotype, qPCR