



Real-time PCR detection of PI*S and PI*Z alleles of SERPINA1 gene using SYBR green

Autora del comentario: Dra. Beatriz Martines Delgado. *Instituto de Salud Carlos III (Madrid).*

Ruth Ramos-Díaz, Ainhoa Escuela-Escobar, Ana Díaz-Usera, José María Hernández Pérez, Mario Andrés González-Carracedo, José Antonio Pérez-Pérez.

Gene. 2024 Aug 30;921:148540. doi: 10.1016/j.gene.2024.148540.

En este trabajo se describe un nuevo método de genotipaje para detectar los alelos PIS y PIZ del gen SERPINA1, responsables de la deficiencia de alfa-1 antitripsina (DAAT), como sabemos, una condición genética que predispone a complicaciones pulmonares como el enfisema y EPOC. Estos alelos son los principales responsables de la deficiencia, siendo el PIZ y el PIS las variantes más comunes. Dado que el DAAT está infradiagnosticado a pesar de su prevalencia en la población europea, el objetivo del estudio fue desarrollar un test de genotipaje que permite una detección rápida, precisa y económica de estos alelos.

El método propuesto se basa en la técnica de PCR específica de alelo, en combinación con el análisis de amplicones mediante curvas de fusión, utilizando el colorante fluorescente SYBR Green, que es una alternativa más económica que los reactivos basados en sondas específicas, como TaqMan®.

El estudio incluyó a 60 individuos, representando los seis genotipos posibles resultantes de las combinaciones de las variantes PIS y PIZ. Las muestras de ADN se obtuvieron de sangre seca, y se realizó un protocolo de PCR en tiempo real con primers específicos para cada alelo. El ensayo se diseñó para detectar de manera precisa los alelos PIS y PIZ, diferenciando claramente entre las variantes mutantes y silvestres (no mutantes). Las curvas de fusión para cada uno de los amplicones, mostró diferencias en la temperatura de fusión (T_m) de 2°C para los alelos PIS y no-PIS y una diferencia de 2,9°C para los PIZ y no-PIZ. Por tanto, los alelos PIS y PIZ se pudieron discriminar mediante las diferencias en la T_m , lo que permite realizar el análisis en una única reacción de PCR. Además, el método mostró ser compatible con diferentes tipos de preparaciones de ADN, lo que lo hace versátil y fácil de implementar en diversas plataformas de PCR.

Una de las principales ventajas del nuevo método es su costo reducido. Al utilizar el colorante SYBR Green, en lugar de sondas específicas fluorescentes, se estima un ahorro del 70% en los costos de reactivos, en comparación con otros métodos que utilizan sondas TaqMan®. Además, el ensayo es rápido, permitiendo obtener resultados en 2-3 horas después de recibir las muestras. A pesar de las mejoras, los autores mencionan que detectar la variante PIS (una transversión A>T) puede ser más difícil debido a la pequeña diferencia en la T_m , lo que requiere una plataforma de PCR con alta uniformidad térmica para garantizar la precisión del ensayo. Aun así, supone una mejora considerable en términos de costo, tiempo y simplicidad en comparación con otros métodos existentes.



DAATNEWS

AL DÍA EN ALFA-1-ANTITRIPSINA

Los autores destacan que este método supera las limitaciones de otros métodos como el basado en PCR-RFLP o la secuenciación de Sanger, que suelen ser más costosos y complicados. También resaltan que el método es robusto, adaptable a diferentes condiciones experimentales y adecuado para realizar pruebas a gran escala, como el cribado poblacional.

El nuevo método de genotipaje desarrollado en este estudio podría ser una solución eficiente, precisa y más económica para la detección de los alelos PIS y PIZ asociados al DAAT. Su implementación en plataformas de PCR en tiempo real comunes lo hace accesible para una amplia gama de laboratorios. Además, su capacidad para reducir los costos lo convierte en una herramienta prometedora para la detección masiva y el diagnóstico precoz de una enfermedad infradiagnosticada como el DAAT.