

## SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ TARAMA KİTİ

Kat. No: 200R-10-03

### GİRİŞ

Spinal Müsküler Atrofi (SMA), Spinal kord ve beyin kökünde, dejenerasyon ve hücre kaybı sonucu ortaya çıkan kas zayıflığı ile karakterize bir hastalıktır. Otozomal resesif olarak kalıtılır. Taşıyıcı sıklığı 1/20 – 1/60 arasında değişir. Spinal Müsküler Atrofi Tarama Kiti, SMN1 genindeki ekzon 7 delesyonunu ve 840. nükleotiddeki C/T değişimini Kantitatif Real Time PCR (qPCR) yöntemi ile tespit ederek hasta birey taramasını %100 spesifite ve %100 sensitivite ile yapmaktadır.

### TEST SİSTEMİNİN PRENSİBİ

Test 5' Nükleaz Assay yöntemini kullanılmaktadır. Bu yöntem, Taq DNA polimerazın 5'-3' exonuclease aktivitesine dayanmaktadır. Proben 5' ucunda bir reporter boya ve 3' ucunda da bir quencer boya bulunmaktadır. Quencer boya reporter boyanın ışımamasını baskılamakta aynı zamanda da probun primer gibi davranarak uzamasına engel olmaktadır. PCR esnasında enzim aktivitesi ile birlikte reporter ve quencer arasında bulunan prob parçalanarak ayrılır, baskılanmanın ortadan kalkmasıyla ışımaya meydana gelir. Bu işlem sadece hedef bölge üzerinde hibridize olmuş problarda gerçekleşir. Amplifikasyon miktarı arttıkça, reporter boyanın açığa çıkmasıyla birlikte ışımaya doğrusal olarak artmakta ve bu artış cihaz tarafından eş-zamanlı olarak tespit edilmektedir.

### ÜRÜN ÖZELLİKLERİ

Her hasta için SMN1 Ekzon 7 ve 840. pozisyonundaki C/T değişim bölgesine uygun, spesifik primer-problar içeren bir miks kullanılır. Sistem iki farklı primer-prob seti içermektedir. SMN1 için FAM ve referans gen için TEXAS RED boyası ile işaretli prob kullanılmaktadır.

Kullandığınız kit sistemi "ready to use" özelliğine sahiptir. Kit, Taq Polimeraz dahil qPCR reaksiyonu için gerekli tüm bileşenleri içermektedir.

### SİSTEM İÇERİĞİ

Bileşen	50 Test
• SMA Master Miks	1000 µl
• Homozigot Delesyon Kontrol DNA*	50 µl
• Wild-Type Kontrol DNA*	50 µl

\* Kontrol DNAlar PCR cihazının ve testin performansını doğrulamak için kullanılmalıdır.

### DNA İZOLASYONU

Kit, 0.4 ng/µl tespit seviyesine (Limit of Detection=LOD) sahiptir. Kit, Macharey-Nagel Ekstraksiyon kiti ya da benzer spin kolon kit sistemlerine uygun olarak optimize edilmiştir. Son DNA elüsyonunun 150- 200 µl olması önerilmektedir.

### CİHAZ VALİDASYONU İÇİN:

- Master miks oda sıcaklığında erimeye bırakılır.
- Master miks eridikten sonra nazıkçe pipetaj yaparak karıştırılır.
- Her örnek için PCR striplerine/tüplerine **20 µl master miks** aktarılır.
- Bu tüplere **5 µl Kontrol DNA**'sı eklenir ve optik kapaklar kapatılır.
- Aşağıda belirtilen programla test çalıştırılır.
- Kontrol örnekleri, cihaz validasyonu için beklenen genotipleri tespit etmelidir. Eğer beklenen sonuçları alamazsanız lütfen bizimle irtibata geçin ([tech@snp.com.tr](mailto:tech@snp.com.tr)).
- **Validasyon işlemini, her cihaz için sadece bir kez yapmanız yeterlidir.**
- Cihaz validasyonundan sonra standart test protokolüne geçilir.

### STANDART TEST PROTOKOLÜ

- Master miks oda sıcaklığında erimeye bırakılır.
- Master miks eridikten sonra nazıkçe pipetaj yaparak karıştırılır.
- Her örnek için, PCR striplerine/tüplerine **20 µl master miks** aktarılır.
- Bu tüplere **5 µl örnek DNA**'sı eklenir ve optik kapaklar kapatılır.
- Aşağıda belirtilen programla test çalıştırılır.

### PCR PROGRAMI

95 °C	3 dk.	Taq Aktivasyonu
95 °C	15 sn.	29 Döngü
60 °C	1 dk.	

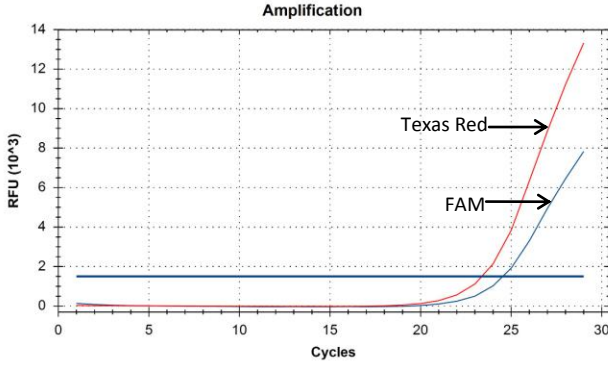
Floresan boya olarak **FAM ve TEXAS RED** seçilmelidir.

### Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

Bio-Rad CFX96  
LightCycler 480 System  
ABI 7500 / 7500 Fast  
Rotor-Gene Q

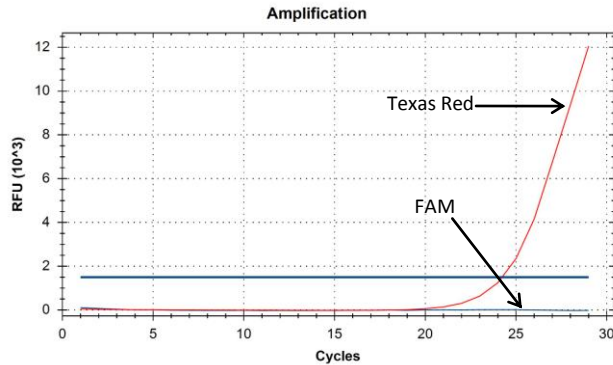
## ANALİZ

**Sonuçları analiz etmeden önce her iki boya için de threshold çizgisini 1500'e ayarlayınız.**



Şekil 1: SMN1 Wild-Type Örnek

Her iki boyada da (Texas Red ve FAM) pik varsa, örnek SMN1 geni için **Wild-Type**'tir.



Şekil 2: Homozigot Delesyon Örnek

Eğer FAM boyasında pik yok ve TEXAS RED boyasında pik varsa, Örnek SMN1 geni için **Homozigot Delesyon**'dur.

## OLASI PROBLEMLER

### **Eğer kuyuda hiç amplifikasyon olmamışsa.**

- DNA eksikliği,
- Test'te inhibitör varlığı söz konusudur.

Lütfen sorularınız için bizimle temasa geçin. [tech@snp.com.tr](mailto:tech@snp.com.tr)

## UYARILAR

- Homozigot Delesyon çıkan örnekler, DNA izolasyon problemi ihtimaline karşı tekrar edilmelidir.
- Saklama koşullarına uygun olarak saklanmalıdır.
- Oda sıcaklığında unutulmuş PCR master miksleri kullanılmamalıdır.
- Çalışma sırasında pudrasız eldiven kullanılmalıdır.
- PCR master miksi oda sıcaklığında tamamen eritilip, baş aşağı edilerek hafifçe karıştırıldıktan sonra tüplere bölünmelidir.
- PCR master mikslerin raf ömrü 12 aydır. Kullanmadan önce üretim tarihine dikkat edilmelidir.
- Yalnızca in-vitro tanı ve araştırma amaçlı kullanılabilir.

## SAKLAMA KOŞULLARI

- Tüm bileşenler – 20°C de ve karanlıkta saklanmalıdır.
- Tüm bileşenler, ürün kutusunun üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.
- Sürekli eritip çözdüremek, ürünün hassasiyetinde azalmalara neden olabilir.

## KAYNAKLAR

1. American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Genetics in collaboration with committee members Britton Rink, Stephanie Romero, Joseph R. Biggio Jr, Devereux N. Saller Jr. and Rose Giardine. Committee Opinion. Number 691. March 2017.
2. Shin S1, Park SS, Hwang YS, Lee KW, Chung SG, Lee YJ, Park MH. Deletion of SMN and NAIP genes in Korean patients with spinal muscular atrophy. J Korean Med Sci. 2000;15:93-8.
3. Verhaart IEC, Robertson A, Wilson IJ, Aartsma-Rus A, Cameron S, Jones CC, Cook SF, Lochmüller H. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy - a literature review. Orphanet J Rare Dis. 2017;12:124.