

SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ YENİDOĞAN *PLUS* TARAMA KİTİ

Kat. No: 200R-10-02

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 *Plus* Yeni Doğan Tarama Kiti, SMN1 genindeki Ekzon 7, Ekzon 8 delesyonunu ve 840. nükleotiddeki C/T değişimini Kantitatif Real Time PCR (qPCR) yöntemi ile tespit ederek taşıyıcı ve hasta yeni doğan taraması yapmaktadır. Homozigot bireyler %100 spesifite ve sensitivite ile tespit edilirken, yenidoğan taramasında taşıyıcı bireyler %100 sensitivite ve DBS (Dry Blood Spot)'den izolasyon sistemine bağlı olarak %100 spesifite ile tespit edilir.

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 ışınmasını 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 problemlerde gerçekleşir. Amplifikasyon miktarı arttıkça, reporter boyanın açığa çıkmasıyla birlikte ışımaya doğrusal olarak artmakta ve bu artış cihaz tarafından eş-zamanlı olarak tespit edilmektedir. Sistem referans gen ile hedef gen kantitasyonu arasındaki "Intelligent Ratio (IR)" prensibine dayanmaktadır. IR değerleri hedef genlere ve/veya kullanılan Bio-Rad CFX96 Real Time PCR cihazlarına göre bazı farklılıklar gösterebilmektedir. Bu farklılıklar, cihaz validasyonu sırasında kullanılan SMA *Plus* Software ayarlarına tanımlanmaktadır (bkz. Cihaz Validasyonu ve Analiz Bölümleri).

ÜRÜN ÖZELLİKLERİ

Her hasta için SMN1 Ekzon 7, Ekzon 8 ve 840. pozisyonundaki C/T değişim bölgesine uygun, spesifik primer-problar içeren bir miks kullanılır. Sistem üç farklı primer-prob seti içermektedir. SMN1 Ekzon 7 için FAM, Ekzon 8 için CY5 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

- SMA *Plus* Master Miks
- Taşıyıcı Kontrol DNA*
- Homozigot Delesyon Kontrol DNA*
- Wild-Type Kontrol DNA*

* Kontrol DNAlar PCR cihazının ve testin performansını doğrulamak için kullanılmaktadır.

DNA İZOLASYONU

Kit, DBS'den alınan bir parça'dan (3 mm) elde edilen DNA'ya göre optimize edilmiştir. DNA saflığı test için çok önemlidir. Bu nedenle kit ile birlikte verilen **SNP DBS DNA Ekstraksiyon Kiti** (Kat # 21S-03-50) kullanılmalıdır. Kit, 0,4 ng/μl tespit seviyesine (Limit of Detection=LOD) sahiptir.

CİHAZ VALIDASYONU 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).
- 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.	40 Döngü
60 °C	1 dk.	

Floresan boya olarak **FAM, CY5 ve TEXAS RED** seçilmelidir.

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

Bio-Rad CFX96

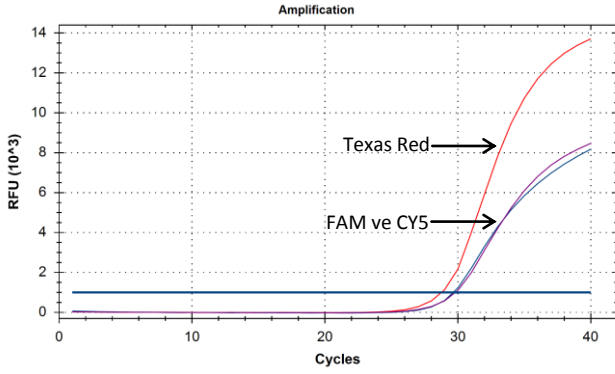
ANALİZ

- Sonuçlarınızı analiz etmek için **IR** değerini hesaplayan SMA *Plus* Software' i kullanmalısınız. Lütfen SMA *Plus* Software kullanım kılavuzuna bakınız.
- Sonuçlar Şekil 1'deki gibi görünmelidir.
- Ayrıca derseniz sonuçlarınızı amplifikasyon pik görüntüleri ile de karşılaştırabilirsiniz (Şekil 2 – 4).

File: D:\SMA Software Analysis\2019_NBS\Experiment_53 - Quantification Cq Results.xls

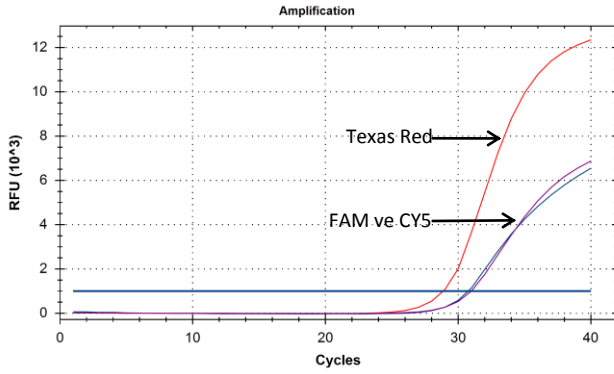
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A01 Wild Type 3.95	A02 Wild Type 2.46	A03 Wild Type 2.01	A04 Wild Type 4.04	A05 Wild Type 2.53	A06 Wild Type 1.96	A07 Wild Type 1.82	A08 Homozygous Deletion -1	A09 Wild Type 2.41	A10 Carrier 8.02	A11 Wild Type 1.87	A12 Wild Type 2.16
B	B01 Carrier 15.14	B02 Wild Type 2.51	B03 Wild Type 3.13	B04 Wild Type 2.42	B05 Wild Type 4.86	B06 Wild Type 1.35	B07 Wild Type 1.78	B08 Wild Type 2.19	B09 Wild Type 2.16	B10 Wild Type 2.84	B11 Wild Type 2.84	B12 Wild Type 2.87
C	C01 Wild Type 3.66	C02 Wild Type 2.31	C03 Wild Type 1.89	C04 Wild Type 3.18	C05 Wild Type 2.19	C06 Wild Type 3.50	C07 Wild Type 2.88	C08 Wild Type 2.95	C09 Wild Type 1.66	C10 Wild Type 1.69	C11 Wild Type 3.77	C12 Wild Type 3.33
D	D01 Wild Type 2.14	D02 Wild Type 1.99	D03 Carrier 7.90	D04 Carrier 16.37	D05 Wild Type 3.33	D06 Wild Type 3.16	D07 Wild Type 2.80	D08 Wild Type 3.19	D09 Wild Type 2.57	D10 Wild Type 2.20	D11 Wild Type 2.32	D12 Carrier 9.89
E	E01 No DNA -2	E02 Wild Type 2.77	E03 Wild Type 4.52	E04 Wild Type 4.02	E05 Homozygous Deletion -1	E06 Wild Type 4.24	E07 Wild Type 4.24	E08 Wild Type 2.92	E09 Wild Type 2.81	E10 Wild Type 3.88	E11 Wild Type 2.93	E12 Wild Type 3.40
F	F01 Wild Type 2.66	F02 Wild Type 3.78	F03 Wild Type 3.39	F04 Wild Type 2.62	F05 Wild Type 2.61	F06 Wild Type 4.86	F07 Carrier 9.83	F08 Wild Type 2.15	F09 Wild Type 2.48	F10 Wild Type 2.39	F11 Wild Type 2.11	F12 Wild Type 4.22
G	G01 Wild Type 3.93	G02 Wild Type 5.28	G03 Wild Type 2.38	G04 Wild Type 2.13	G05 Wild Type 2.76	G06 Wild Type 2.77	G07 Wild Type 3.67	G08 Wild Type 2.12	G09 Wild Type 2.91	G10 Wild Type 2.11	G11 Homozygous Deletion -1	G12 Wild Type 2.38
H	H01 Wild Type 3.87	H02 Wild Type 2.56	H03 Wild Type 3.28	H04 Carrier 4.46	H05 Wild Type 2.41	H06 Wild Type 4.11	H07 Repeat 3.78	H08 Wild Type 2.27	H09 Wild Type 1.59	H10 Wild Type 2.56	H11 Wild Type 1.78	H12 Wild Type 2.15

Şekil 1: SMA Plus Software ile sonuçların görünümü



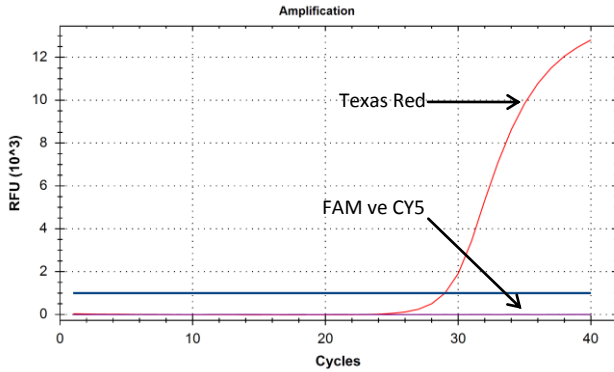
Şekil 2: SMN1 Wild-Type Örnek

SMA taşıyıcılık değerlendirilmesi için FAM (SMN1 Ekzon 7 - mavi pik), CY5 (SMN1 Ekzon 8 - mor pik) ve TEXAS RED (Referans gen - kırmızı pik) boyaları birlikte analiz edilmelidir. Eğer SMN1 pikleri referans gen pikine yakınsa ve örneğin **IR** değerleri SMA Plus Software'de tanımlanan sınır değerden küçükse örnek SMN1 geni için **Wild-Type**'tir.



Şekil 3: SMN1 Taşıyıcı Örnek

Eğer SMN1 pikleri referans gen pikine yakın değilse ve **IR** değerleri SMA Plus Software'de tanımlanan sınır değerden büyükse, örnek SMN1 geni için **Taşıyıcı**dır.



Şekil 4: Homozigot Delesyon Örnek

Eğer FAM ve CY5 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

SMA Tarama Analizinin Dışında Kalan Olasılıklar:

- Spinal Müsküler Atrofi Plus Yeni Doğan Tarama Kiti, SMN1 geni Ekzon 7 ve Ekzon 8 üzerinden taşıyıcılık taraması yapmaktadır. Bu nedenle kit, SMA hastalığına neden olan diğer nadir intragenik mutasyonları (% 2-4) tespit etmemektedir.
- Spinal Müsküler Atrofi Plus Yeni Doğan Tarama Kiti, SMN1 geninin kopya sayısını tespit etmektedir. Normal bir bireyde her kromozomda 1'er adet olmak üzere toplamda 2 kopya SMN1 geni bulunur (1+1). Ancak ender durumlarda (%1-4) bir kromozomda hiç SMN1 geni bulunmazken diğer kromozomda duplike olmuş şekilde 2 adet SMN1 geni bulunabilir (2+0). Bu durumda SMN1 Tarama testi ile sonuç iki kopya SMN1 ve normal olarak rapor edilirken, söz konusu birey SMA hastalığı için taşıyıcı durumdadır.

UYARILAR

- Taşıyıcı veya Homozigot Delesyon çıkan örnekler, DNA izolasyon problemi ihtimaline karşı tekrar edilmelidir. Örnek SMN1 Ekzon 8 taşıyıcı ve Ekzon 7 Normal ise sonuçlar DNA dizi analizi ile teyit 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 çözdürmek, 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.