

## SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ TANI KİTİ

Kat. No: 200R-20-03

### 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 Plus Tanı Kiti, SMN1 genindeki ekzon 7 delesyonunu ve 840. nükleotiddeki C/T değişimini, ekzon 8 delesyonunu, NAIP ekzon 5 delesyonunu ve SMN2 kopya sayısını Kantitatif Real Time PCR (qPCR) yöntemi ile tespit ederek taşıyıcı ve hasta birey taramasını %100 spesifite ve %100 sensitivite ile yapmaktadır. Ayrıca Kit, 0.4 ng/µl tespit seviyesi ile yüksek hassasiyette çalışmaktadır.

### TEST SİSTEMİNİN PRENSİBİ

Test 5' Nükleaz Assay yöntemini kullanmaktadır. 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 ışımını 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 ışım meydana gelir. Bu işlem sadece hedef bölge üzerinde hibridize olmuş problarda gerçekleşir. Amplifikasyon miktarı arttıkça, reporter boyanın açığa çıkmasıyla birlikte ışım 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 SMN1-2 ve NAIP bölgesine uygun, spesifik primer-problar içeren iki mikş kullanılır. Kullandığınız kit sistemi "ready to use" özelliğine sahiptir. Kit, Taq Polimeraz dahil qPCR reaksiyonu için gerekli tüm bileşenleri içermektedir. Mikşlerde yer alan bölgeler ve ilgili boyalar için lütfen tablo 1'e bakınız.

Tablo 1: Mikşler ve içerdiği boyalar

Tüp	Bölge	Boya
Mikş 1	SMN1 Ekzon 7	FAM
	SMN1 Ekzon 8	CY5
	NAIP Ekzon 5	Quasar 705
	Referans Gen	Texas Red
Mikş 2	SMN2 Kopya Sayısı	FAM
	Referans Gen	HEX

### KİT İÇERİĞİ

Bileşen	50 TEST
• SMA Master Mikş 1	1000 µl
• SMA Master Mikş 2	1000 µl
• Kontrol DNA'lar*	50 µl

\* Kontrol DNA'lar PCR cihazının ve testin performansını doğrulamak için kullanılmalıdır (Bkz. Cihaz Validasyonu).

### 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 mikşler oda sıcaklığında erimeye bırakılır.
- Mikşler eridikten sonra nazıkçe pipetaj yaparak karıştırılır.
- Her mikş ayrı tüplerde hazırlanmalıdır.
- Her örnek için PCR striplerine/tüplerine **20 µl master mikş** 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 (Bkz. Tablo 2). 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.

Tablo 2: Cihaz validasyon genotipleri

DNA lar	SMN1 Ekzon 7	SMN1 Ekzon 8
Kontrol DNA 1	Wild-Type	Wild-Type
Kontrol DNA 2	Taşıyıcı	Taşıyıcı
Kontrol DNA 3	Homozigot	Homozigot

### STANDART TEST PROTOKOLÜ

- Master mikşler oda sıcaklığında erimeye bırakılır.
- Mikşler eridikten sonra nazıkçe pipetaj yaparak karıştırılır.
- Her mikş ayrı tüplerde hazırlanmalıdır.
- Her örnek için, PCR striplerine/tüplerine **20 µl master mikş** 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.	32 Döngü
60 °C	1 dk.	

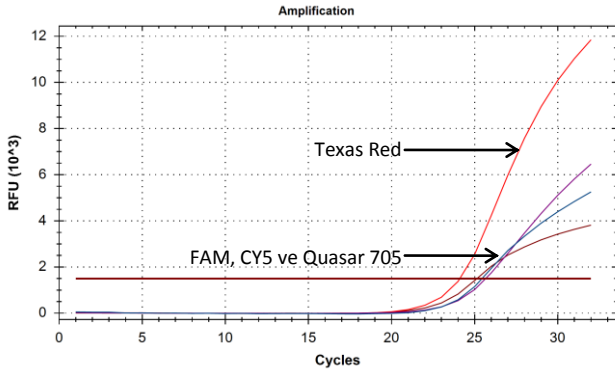
Floresan boya olarak **FAM, HEX, CY5, Quasar 705 ve TEXAS RED** seçilmelidir.

### Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

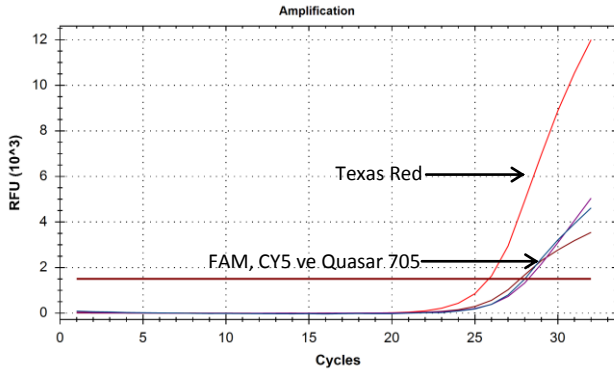
Bio-Rad CFX96

## ANALİZ

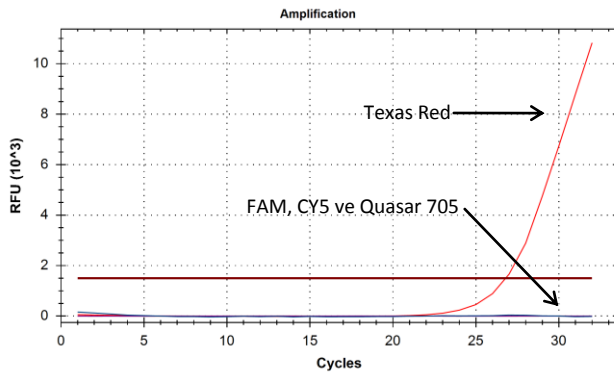
- Sonuçlarınızı analiz etmek için **IR** değerini hesaplayan SMA Plus Software' i kullanmalısınız. Lütfen SMA Plus Software kullanım kılavuzuna bakınız.
- Sonuçlar Şekil 7-8-9 ve 10' daki gibi görünmelidir.
- SMN1 Ekzon 7-8 ve NAIP için sadece Miks 1 kuyucuklarına ait verileri değerlendiriniz.
- SMN2 için sadece Miks 2 kuyucuklarına ait verileri değerlendiriniz.
- Ayrıca dilerseiz sonuçlarınızı amplifikasyon pik görüntüleri ile de kontrol edebilirsiniz (Şekil 1 – 6).



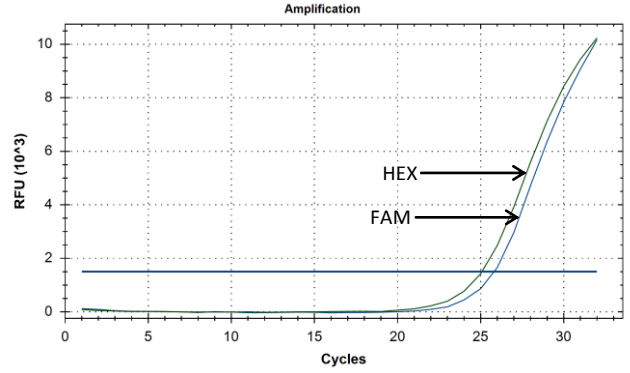
Şekil 1: SMN1 Ekzon 7-8 ve NAIP Ekzon 5 Wild-Type Örnek



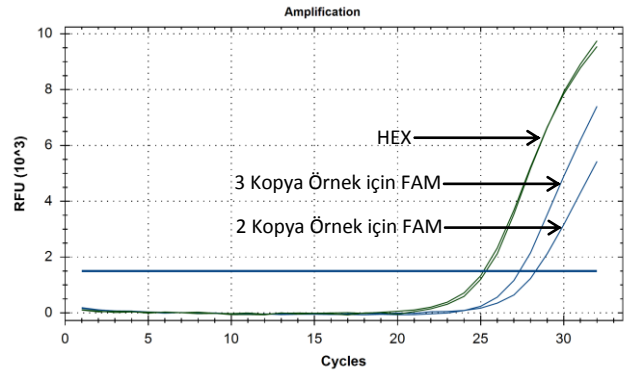
Şekil 2: SMN1 Ekzon 7-8 ve NAIP Ekzon 5 Taşıyıcı Örnek



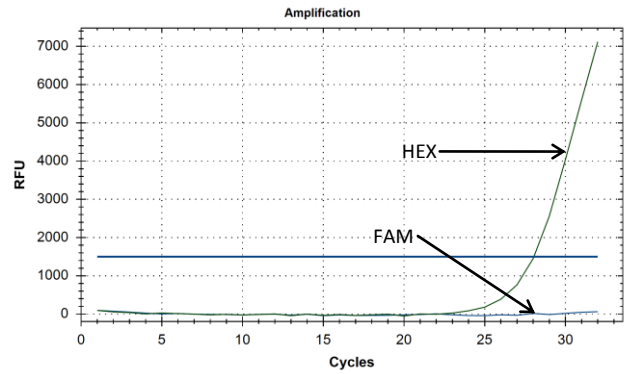
Şekil 3: SMN1 Ekzon 7-8 ve NAIP Ekzon 5 Homozigot Delesyon



Şekil 4: 4 Kopya SMN2



Şekil 5: 3 Kopya ve 2 Kopya SMN2 örnekler



Şekil 6: 0 Kopya SMN2

SMN1 Exon7				1	2	3	4	5	6	7
Miks 1	Miks 1	Miks 2	Miks 2							
Sample 1 Normal -1	Sample 9 Normal 3.03	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 2 Taşıyıcı 11.47	Sample 10 Normal 3.09	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 3 Taşıyıcı 9.93	Sample 11 Normal 4.15	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 4 Taşıyıcı 9.07	Sample 12 Normal 4.36	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 5 Normal 4.50	13 Normal 3.75	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 6 Normal 5.00	Sample 14 Normal 3.44	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 7 Normal 4.56	Sample 15 Normal 2.97	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 8 Normal 3.18	Sample 16 Normal 3.59	Homozigot -1	Homozigot -1							

Şekil 7: SMA Plus Software ile SMN1 Ekzon 7 Sonuçları (Miks 1)

NAIP Exon 5				1	2	3	4	5	6	7
Miks 1	Miks 1	Miks 2	Miks 2							
Sample 1 Normal 3.43	Sample 9 Normal 3.20	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 2 Normal 3.51	Sample 10 Normal 2.64	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 3 Taşıyıcı 8.80	Sample 11 Normal 3.38	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 4 Taşıyıcı 9.65	Sample 12 Normal 3.58	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 5 Normal 3.48	13 Normal 3.73	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 6 Normal 3.54	Sample 14 Normal 2.01	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 7 Normal 3.38	Sample 15 Normal 3.77	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 8 Normal 1.95	Sample 16 Normal 3.49	Homozigot -1	Homozigot -1							

Şekil 9: SMA Plus Software ile NAIP Ekzon 5 Sonuçları (Miks 1)

SMN1 Exon8				1	2	3	4	5	6	7
Miks 1	Miks 1	Miks 2	Miks 2							
Sample 1 Homozigot -1	Sample 9 Normal 3.52	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 2 Taşıyıcı 9.22	Sample 10 Normal 2.70	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 3 Taşıyıcı 10.46	Sample 11 Normal 4.10	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 4 Taşıyıcı 9.61	Sample 12 Normal 3.95	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 5 Normal 4.40	13 Normal 4.26	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 6 Normal 4.52	Sample 14 Normal 3.99	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 7 Normal 5.55	Sample 15 Normal 4.69	Homozigot -1	Homozigot -1							
Sample 8 Normal 2.73	Sample 16 Normal 4.84	Homozigot -1	Homozigot -1							

Şekil 8: SMA Plus Software ile SMN1 Ekzon 8 Sonuçları (Miks 1)

SMN2				1	2	3	4	5	6	7
Miks 1	Miks 1	Miks 2	Miks 2							
0 Kopya -1	0 Kopya -1	Sample 1 4 Kopya 1.59	Sample 9 0 Kopya -1							
0 Kopya -1	0 Kopya -1	Sample 2 4 Kopya 2.06	Sample 10 1 Kopya 120.75							
0 Kopya -1	0 Kopya -1	Sample 3 3 Kopya 6.27	Sample 11 3 Kopya 6.96							
0 Kopya -1	0 Kopya -1	Sample 4 3 Kopya 5.30	Sample 12 3 Kopya 6.75							
0 Kopya -1	0 Kopya -1	Sample 5 3 Kopya 5.17	13 3 Kopya 7.43							
0 Kopya -1	0 Kopya -1	Sample 6 3 Kopya 6.29	Sample 14 0 Kopya -1							
0 Kopya -1	0 Kopya -1	Sample 7 2 Kopya 22.01	Sample 15 3 Kopya 7.48							
0 Kopya -1	0 Kopya -1	Sample 8 2 Kopya 22.57	Sample 16 3 Kopya 7.41							

Şekil 10: SMA Plus Software ile SMN2 Sonuçları (Miks 2)

## 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)

### SMA Tanı Analizinin Dışında Kalan Olasılıklar:

- Spinal Müsküler Atrofi Tanı Kiti, SMN1 geni Ekzon 7-8, NAIP Ekzon 5 ve SMN2 kopya sayısı üzerinden taşıyıcılık tespiti yapmaktadır. Bu nedenle kit, SMA hastalığına neden olan diğer nadir intragenik mutasyonları (% 2-4) tespit etmemektedir.
- Spinal Müsküler Atrofi Tanı Kiti, SMN1-2 ve NAIP 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 duplika olmuş şekilde 2 adet SMN1 geni bulunabilir (2+0). Bu durumda SMN1 Ekzon 7 tanı testi ile sonuç iki kopya SMN1 ve normal olarak rapor edilirken, söz konusu birey SMA hastalığı için taşıyıcı durumdadır.

## SAKLAMA KOSULLARI

- 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.

## 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.
- Kit saklama koşullarına uygun olarak saklanmalıdır.
- Oda sıcaklığında unutulmuş PCR master mikserleri kullanılmamalıdır.
- Çalışma sırasında pudrasız eldiven kullanılmalıdır.
- PCR master miksi oda sıcaklığında tamamen eritilip, baş aşağı edilerek hafifçe karıştırıldıktan sonra tüplere bölünmelidir.
- PCR master mikserlerin raf ömrü 12 aydır. Kullanmadan önce üretim tarihine dikkat edilmelidir.
- Yalnızca in-vitro tanı ve araştırma amaçlı kullanılabilir.

## KAYNAKLAR

- 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.
- 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.
- Verhaart IEC, Robertson A, Wilson DJ, 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.