IntRaFast-Q SMA REAL TİME PCR TARAMA KİTİ
Kat. No: 200R-40-02

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. IntRaFast-Q SMA Tarama Kiti, SMN1 genindeki Ekzon 7, Ekzon 8 delesyonunu ve ekzon 7 840. nükleotiddeki C/T değişimini Kantitatif Real Time PCR (qPCR) yöntemi ile tespit ederek hedef genler için taşıyıcı ve hasta birey taramasını %100 spesifite ve %100 sensitivite ile yapmaktadır.

TEST SİSTEMİNİN PRENSİBİ

Test 5′ Nükleaz Assay yöntemini kullanmaktadır. Bu yöntem, Taq DNA polimerazın 5′-3′ exonuclease aktivitesine dayanmaktadır. Probun 5′ ucunda bir reporter boya ve 3′ ucunda da bir quencer boya bulunmaktadır. Quencer boya reporter boyanın ışımasını 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 ışıma meydana gelir. Bu işlem sadece hedef bölge üzerinde hibridize olmuş problarda gerçekleşir. Amplifikasyon miktarı arttıkça, reporter boyanın açığa çıkmasıyla birlikte ışıma doğrusal olarak artmakta ve bu artış cihaz tarafından eş-zamanlı olarak tespit edilmektedir. Sistem, referans gen ile hedef gen kantitasyonu arasındaki "**AKILLI ORAN**" - **"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 kit için kullanılan IntRa-Q Yazılımı ayarlarına tanımlanmaktadır (bkz. Cihaz Validasyonu ve Analiz Bölümleri).

ÜRÜN ÖZELLİKLERİ

Her bir örnek DNA'sı SMN1 geni ekzon 7 & 8 delesyonu ve ekzon 7 840. pozisyondaki C/T değişim bölgesine uygun primer-problar içeren miks ile test edilir. IntRaFast-Q master miks içerisinde ekzon 7 delesyonu ve ekzon 7 840. pozisyondaki C/T değişim için FAM, Ekzon 8 delesyonu için HEX ve referans gen için TEXAS RED boyası kullanılmaktadır.

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

SİSTEM İÇERİĞİ

Bileşen	50 Test	20 Test
• IntRaFast-Q Master Miks	1150 µl	460 µl
• Taşıyıcı Kontrol DNA*	30 µl	15 µl
• Homozigot Delesyon Kontrol DNA*	30 µl	15 µl
• Wild-Type Kontrol DNA*	30 µl	15 µl

*Kontrol DNA'lar plazmid içermektedir ve spin kolon/otomatik ekstraksiyondan elde edilen DNA'lara göre ayarlanmıştır. Plazmid DNA'ların amplifikasyon pikleri örnek DNA piklerine göre hafif farklılıklar gösterebilir.

DNA İZOLASYONU

Kit, 0,5 ng/µl DNA tespit seviyesine (Limit of Detection=LOD) sahiptir.

SPİN KOLON VE OTOMATIK DNA EKSTRAKSİYON;

Kit, spin kolon ve otomatik ekstraksiyon sistemlerinden elde edilen DNA'lar için uygundur.

CİHAZ VALİDASYONU İÇİN;

- Master miks oda sıcaklığında erimeye bırakılır.
- Master miks eridikten sonra nazikçe pipetaj yaparak karıştırılır.
- Her örnek için PCR striplerine/tüplerine **23 µl master miks** aktarılır.
- Her bir tüpe **2 µl** farklı **Kontrol DNA'lar** (taşıyıcı, homogizot delesyonlu ve wild tip) ve izolasyon sisteminin kontrolü amacıyla çalışılacak izolasyon sistemine ait 5-10 adet bilinmeyen DNA eklenir. 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 ve lot için 1-2 kez** yapmanız yeterlidir.
- Cihaz validasyonundan sonra standart test protokolüne geçilir.

STANDART TEST PROTOKOLÜ

- Master miks oda sıcaklığında erimeye bırakılır.
- Master miks eridikten sonra nazikçe pipetaj yaparak karıştırılır.
- Her örnek için, PCR striplerine/tüplerine **23 µl master miks** aktarılır.
- Bu tüplere **2 µl örnek DNA**' sı eklenir ve optik kapaklar kapatılır.
- Aşağıda belirtilen programla test çalıştırılır.

PCR PROGRAMI

96 °C	2 sn.	**32 x**
60 °C	40 sn.	

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

PCR süresi Spin kolon veya otomatik ekstraksiyondan elde edilen DNA örnekleri için **48 dakikadır.**

- **Normal, Taşıyıcı ve homozigot delesyon** tespiti için, Intra-Q software uyumluluğundan dolayı kit yalnızca **Bio-Rad CFX96** ile kullanılabilir.
- **Normal** ve **homozigot delesyon** tespiti için kit tüm cihazlarla uyumludur.

SNP Biyoteknoloji Araştırma Geliştirme Ve Üretim Sanayi ve Tic. Ltd. Şti.
Üniversiteler Mah. 1596. Cad. Hacettepe Teknokent 1 nolu Ar-ge Binası No: 97/10 Beytepe - Çankaya / Ankara
Tel: 312 299 23 28 • Faks: 312 299 23 48 • www.snp.com.tr • info@snp.com.tr

ANALİZ

- Sonuçlarınızı analiz etmek için **IR** değerini hesaplayan IntRa-Q Yazılımını kullanmalısınız. Lütfen IntRa-Q Yazılım kullanım kılavuzuna bakınız.
- Sonuçlar **Şekil 1**'deki gibi görünmelidir.
- Ayrıca dilerseniz sonuçlarınızı amplifikasyon pik görüntüleri ile de karşılaştırabilirsiniz **(Şekil 2 – 4)**.

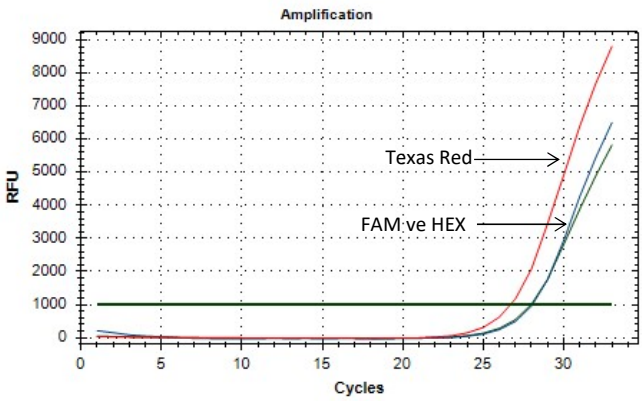
File: D:\SMA Software Analysis\2019_BLOOD\Experiment_54 - Quantification Cq Results.xls

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A01 Wild Type 2.62	A02 Wild Type 2.88	A03 Wild Type 2.91	A04 Wild Type 3.13	A05 Wild Type 3.13	A06 Carrier 8.53	A07 Wild Type 3.08	A08 Wild Type 3.18	A09 Wild Type 2.67	A10 Wild Type 2.94	A11 Wild Type 3.13	A12 Wild Type 4.26
B	B03 Wild Type 2.61	B02 Wild Type 2.84	B01 Carrier 9.59	B04 Wild Type 3.44	B05 Wild Type 3.16	B06 Wild Type 3.33	B07 Wild Type 3.65	B08 Wild Type 3.07	B09 Wild Type 1.82	B10 Wild Type 2.70	B11 Wild Type 2.79	B12 Wild Type 3.87
C	C01 Wild Type 2.98	C02 Wild Type 3.26	C03 Wild Type 3.41	C04 Wild Type 2.83	C05 Wild Type 2.70	C06 Wild Type 3.17	C07 Wild Type 3.42	C08 Homozygous Deletion -1	C09 Wild Type 3.30	C10 Wild Type 3.27	C11 Wild Type 3.83	C12 Wild Type 3.91
D	D01 Wild Type 3.27	D02 Carrier 9.10	D03 Wild Type 2.03	D04 Wild Type 2.99	D05 Wild Type 3.08	D06 Wild Type 3.49	D07 Wild Type 3.87	D08 Wild Type 3.71	D09 Wild Type 3.77	D10 Wild Type 3.16	D11 Wild Type 3.37	D12 Wild Type 4.13
E	E01 Wild Type 2.84	E02 Wild Type 3.27	E03 Wild Type 3.21	E04 Wild Type 2.70	E05 Wild Type 3.08	E06 Wild Type 3.28	E07 Wild Type 3.38	E08 Carrier 10.08	E09 Wild Type 3.47	E10 Carrier 9.84	E11 Wild Type 3.14	E12 Wild Type 3.89
F	F01 Wild Type 3.44	F02 Wild Type 3.13	F03 Wild Type 3.06	F04 Carrier 9.04	F05 Wild Type 3.59	F06 Wild Type 3.21	F07 Wild Type 3.30	F08 Wild Type 3.76	F09 Wild Type 2.73	F10 Wild Type 2.77	F11 Wild Type 3.16	F12 Wild Type 3.42
G	G01 Wild Type 2.86	G02 Wild Type 3.36	G03 Wild Type 1.72	G04 Wild Type 3.04	G05 No DNA -2	G06 Homozygous Deletion -1	G07 Wild Type 3.47	G08 Wild Type 1.80	G09 Repeat 53.76	G10 Wild Type 2.94	G11 Wild Type 3.09	G12 Wild Type 3.36
H	H01 Homozygous Deletion -1	H02 Wild Type 2.85	H03 Wild Type 2.99	H04 Wild Type 2.47	H05 Wild Type 4.42	H06 Wild Type 3.51	H07 Wild Type 3.09	H08 Wild Type 2.73	H09 Wild Type 1.21	H10 Wild Type 2.68	H11 Wild Type 2.93	H12 Wild Type 2.91

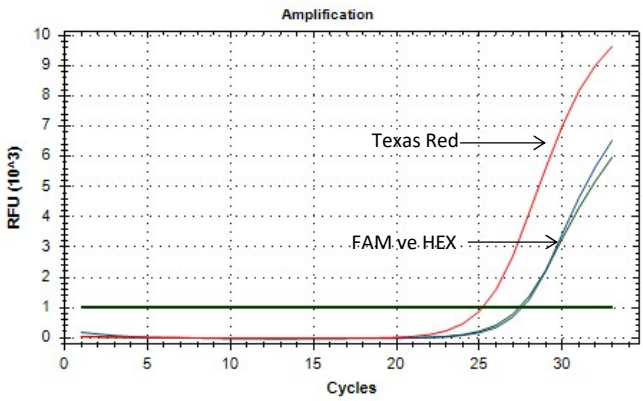
Şekil 1: IntRa-Q Yazılımı ile sonuçların görünümü

IntRa-Q Yazılımı, "referans gen kantitasyonu/ SMN1 geni ekzon 7 ve ekzon 8 kantitasyonu" oranı hesabına dayalı IR metodunu temel almaktadır. Referans ve SMN1 genine ait kantitasyon değerleri yazılım içerisine gömülü slope eğrisi ile hesaplanmakta ve böylece bu değerlerin birbirine oranı ile de IR değeri belirlenmektedir. Yazılım bu değerlere bağlı olarak taşıyıcı, homozigot delesyon ve wild tip şeklinde sonuç vermektedir[1].

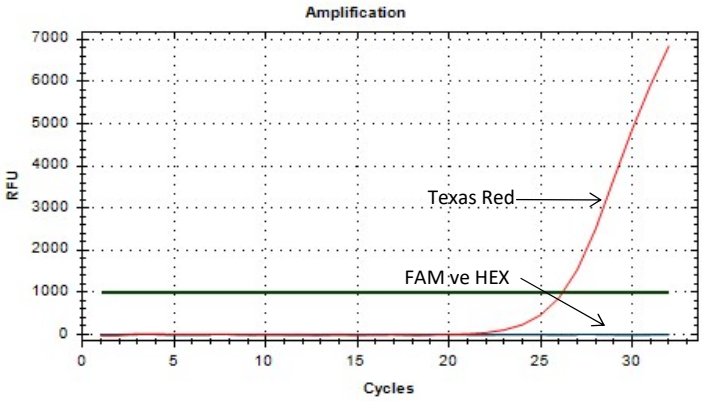
SMA taşıyıcılık ve homozigot delesyon değerlendirmesi için FAM (SMN1 Ekzon 7 - mavi pik), HEX (SMN1 Ekzon 8 - yeşil pik) ve TEXAS RED (Referans gen - kırmızı pik) boyaları birlikte analiz edilmelidir.



Şekil 2: SMN1 Ekzon 7 ve Ekzon 8 Wild Tip örnek



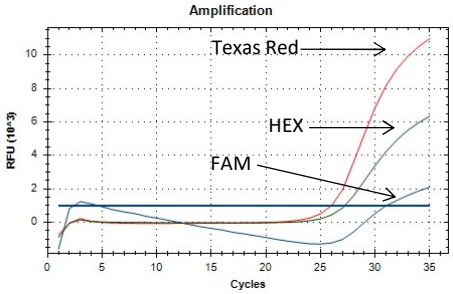
Şekil 3: SMN1 Ekzon7 ve Ekzon 8 taşıyıcı örnek



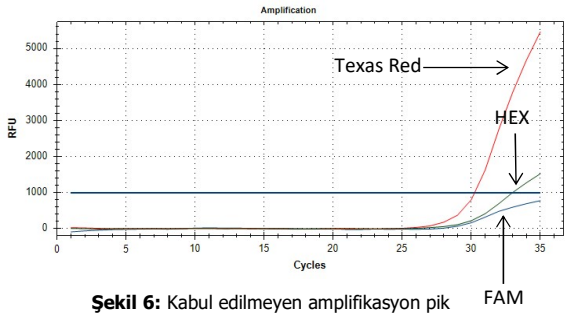
Şekil 4: SMN1 Homozigot Delesyon Örnek

Göz önünde bulundurulması gereken önemli noktalar;

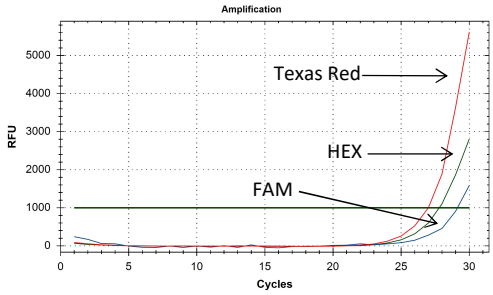
- Homozigot delesyon ve taşıyıcı olarak bulunun örnek sonuçları, cihaza ait yazılımın data analiz ekranından amplifikasyon pik görüntüsü olarak da teyit edilmelidir.
- PCR tüpü içerisinde hava kabarcığı oluşumu, düşük kaliteli DNA, vb. PCR hatasına sebep olabilecek durumlar şekil 5, 6, 7 ve 8 ' de görülebilecek kabul edilmeyen amplifikasyon pik oluşumuna sebep olabilmekte ve yazılım tarafından doğru şekilde değerlendirilemeyebilmektedir. Lütfen amplifikasyon piklerini gözden geçiriniz ve eğer gerekli ise çalışmayı tekrar ediniz.
- Eğer örnek SMN1 ekzon 8 taşıyıcı ve ekzon 7 wild-tip ise, örnek kit ile tekrar test edilmelidir. Sonuç aynı şekilde bulunur ise, test DNA sekans analizi ile doğrulanmalıdır.
- Eğer örnek SMN1 ekzon 7 taşıyıcı ve ekzon 8 wild-tip ise, örnek doğrulama için tekrar kit ile test edilmelidir.



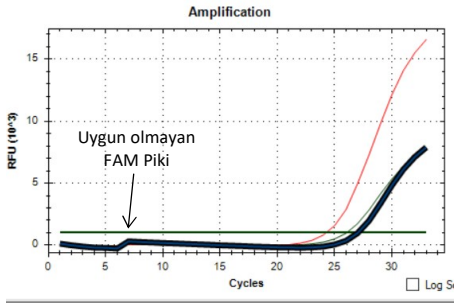
Şekil 5: Kabul edilmeyen amplifikasyon pik



Şekil 6: Kabul edilmeyen amplifikasyon pik



Şekil 7: Kabul edilmeyen amplifikasyon pik



Şekil 8: Kabul edilmeyen amplifikasyon pik

IntRaFast-Q SMA Tarama Analizinin Dışında Kalan Olasılıklar;

- IntRaFast-Q SMA Tarama Kiti, SMN1 geni Ekzon 7 ve Ekzon 8 üzerinden taşıyıcılık ve homozigot delesyon taraması yapmaktadır. Bu nedenle kit, SMA hastalığına neden olan diğer nadir intragenik mutasyonları (% 2-4) tespit etmemektedir.
- IntRaFast-Q SMA 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 IntRaFast-Q SMA Tarama testi ile sonuç iki kopya SMN1 ve normal olarak rapor edilirken, söz konusu birey SMA hastalığı için taşıyıcı durumdadır.

OLASI PROBLEMLER

Eğer kuyuda hiç amplifikasyon olmamışsa,

- DNA eksikliği,
- Örnekte DNA inhibitör(lerin) varlığı söz konusudur.

Lütfen sorularınız için bizimle temasa geçin. tech@snp.com.tr

UYARILAR

- Saklama koşullarına uygun olarak saklanmalıdır.
- Oda sıcaklığında unutulmuş PCR master miksleri kullanılmamalıdır.
- PCR master mikslerin raf ömrü 24 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 (>5X), ürünün hassasiyetinde azalmalara neden olabilir.

KAYNAKLAR

1. B. Cavdarli,1F. N. Ozturk, S. G. Ergun, M. A. Ergun, O. Dogan and E. F. Percin. "Intelligent Ratio: A New Method for Carrier and Newborn Screening in Spinal Muscular Atrophy". Genetic Testing And Molecular Biomarkers, Volume 24, Number 9, 2020.
2. 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.
3. 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.
4. 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.

CE IV