

SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ (SMA) ANALİZ KİTİ

Kat. No: 200R-10-01

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. SMA Real Time PCR 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 kandan ve Dry Blood Spot (DBS) örneklerinden %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 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 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 DNA'sı SMN1 Ekzon 7 ve 840. pozisyonundaki C/T değişim bölgesine uygun, spesifik primer-problar içeren bir miks ile çalışılır Bölge / mutasyon ve ilgili boyalar için tablo 1'e bakınız.

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

Tablo 1: Bölge/Mutasyon ve ilgili boyalar

Tüp	Bölge / Mutasyon	Boya
SMA	SMN1 Ekzon 7	FAM
Master Miks	Referans Gen	HEX

SİSTEM İÇERİĞİ

Bileşen	50 Test	20 Test
SMA Master Miks	1000 µl	400 µl
Solüsyon E	1700 µl x3	1000 µl x2
Homozigot Delesyon Kontrol DNA*	40 µl	20 µl
Normal Kontrol DNA*	40 µl	20 µl

* Kontrol DNA'lar plazmid içermektedir ve amplifikasyon eğrileri örnek DNA eğrilerine göre hafif farklılıklar gösterebilir.

DNA İZOLASYONU

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

Kan Örnekleri için;

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

DBS örnekleri için;

- Sistem yenidoğan topuk kanı alınmış DBS örnekleri için uygundur.
- DBS'den DNA izolasyonu için kit içeriğinde bulunan Solüsyon E kullanılır.
- Solüsyon E'yi oda sıcaklığında erimeye bırakın. İlk kullanımdan sonra Solüsyon E oda sıcaklığında saklanabilir.
- 1.5'lik temiz bir santrifüj tüpü içine **1 parça DBS (1 punch - 3 mm)** koyun.
- Solüsyon E'yi ters düz yaparak karıştırın ve **100 µl** Solüsyon E'yi punch üzerine ekleyin. DBS parçasının solüsyon içinde kaldığından emin olun.
- 92 °C'de 15 dakika inkübe edin.**
- Tüpün sıvı kısmından PCR için **Direkt 5 ul** kullanın.

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

96 °C	5 sn.	Kan örnekleri için 30 Döngü
60 °C	40 sn.	DBS örnekleri için 40 Döngü

Floresan boya olarak **FAM ve HEX** seçilmelidir.

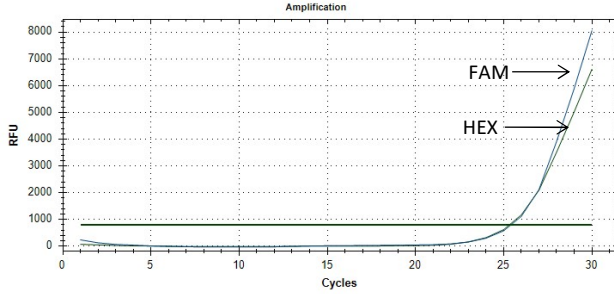
Bu sistemin çalışabileceği cihazlar*:

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

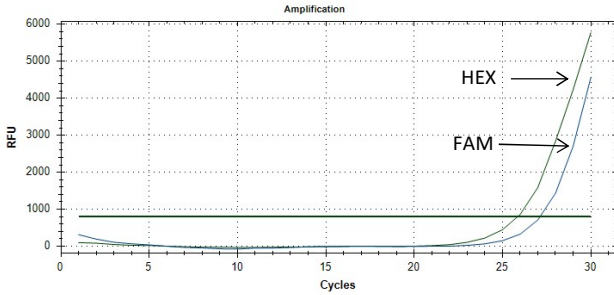
*Sistem FAM ve HEX filtresine sahip tüm cihazlara uygundur.

ANALİZ

- Tüm boyalar için **threshold değeri 800** olarak ayarlanmalıdır.
- Referans Gen (HEX) için ct değeri kandan elde edilen DNA'lar için **≤ 27**, DBS'den elde edilen DNA'lar için **≤ 37** olmalıdır. Bu değere uymayan örnekler tekrar edilmelidir.
- Ardından amplifikasyon eğrilerine bakarak sonuçlarınızı analiz edebilirsiniz.
- Aşağıdaki amplifikasyon eğrileri Bio-RAD CFX96 cihazına aittir. Diğer cihazlar için lütfen iletişime geçiniz (tech@snp.com.tr).

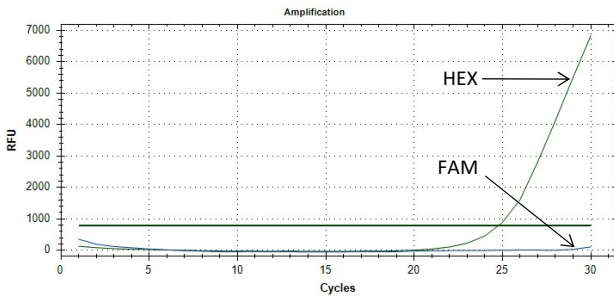


Şekil 1: SMN1 Ekzon 7 Normal – Kan örneği



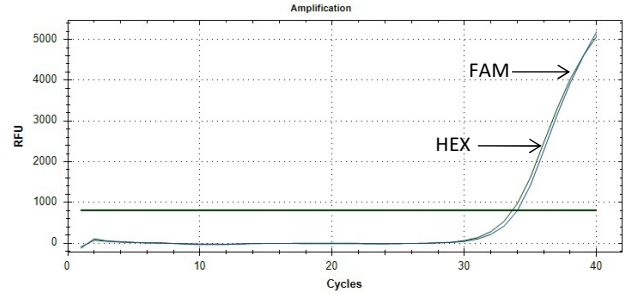
Şekil 2: SMN1 Ekzon 7 Taşıyıcı – Kan örneği

Her iki boyada da (HEX ve FAM) amplifikasyon varsa, örnek SMN1 geni için **Normal'dir**.

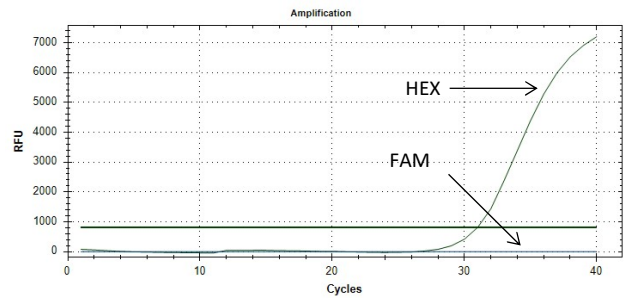


Şekil 3: SMN1 Ekzon 7 Homozigot Delesyon - Kan Örneği

Eğer FAM boyasında amplifikasyon yok ve HEX boyasında amplifikasyon varsa, Örnek SMN1 geni için **Homozigot Delesyon'**dur. **İki boyada da amplifikasyon olmadığı durumlarda örnek, izolasyondan itibaren tekrar edilmelidir.**



Şekil 4: SMN1 Ekzon 7 Normal – DBS Örneği



Şekil 5: SMN1 Ekzon 7 Homozigot Delesyon – DBS Örneği

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

UYARILAR

- Homozigot Delesyon çıkan örnekler, DNA izolasyon/inhibitör problemleri ihtimaline karşı tekrar edilmelidir.
- 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 24 aydır. Kullanmadan önce üretim tarihine dikkat edilmelidir.
- Yalnızca in-vitro tanı ve araştırma amaçlı kullanılabilir.

SAKLAMA KOŞULLARI

- Solüsyon D hariç tüm bileşenler – 20°C de ve karanlıkta saklanmalıdır. Solüsyon D oda sıcaklığında saklanmalıdır.
- Tüm bileşenler, ürün kutusunun üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.
- Sürekli eritip çözündürmek, ürünün hassasiyetinde azalmalara neden olabilir.

KAYNAKLAR

- B. Cavdarlı, I.F. 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.
- 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 SI, 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 JJ, 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.

Revizyon Tarihi: 10.08.2023

