

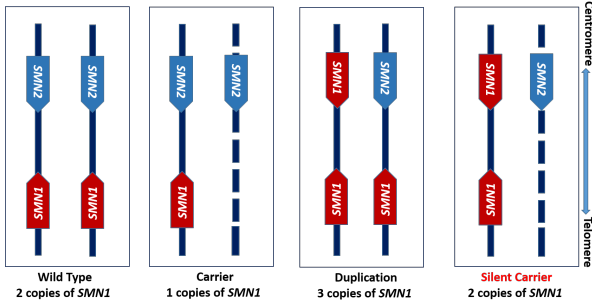
## Enhanced IntRaFast-Q SMA TARAMA KİTİ

Kat. No: 200R-60-01

### GİRİŞ

Spinal Musküler 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 eder. Kit, tam kan örneklerinden hedef genler için taşıyıcı ve hasta birey taramasını %100 spesifite ve %100 sensitivite ile yapmaktadır <sup>(1)</sup>.

SMN1 geninin 1+1 taşıyıcı olmayan ve 2+0 taşıyıcı durumları (Aynı kromozomda cis pozisyonunda iki SMN1-Silent Carrier-Sessiz Taşıyıcı) mevcut dozaj analiz yöntemleri ile ayırt edilememektedir. Bu nedenle, çiftlerde SMA taşıyıcı durumunu teşhis etmek zordur. Son araştırmalar, iki varyantın varlığının, etnik kökündeki sıklığa bağlı olarak SMN1 2+0 durumu ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Şekil 1). SMN1 genindeki bu varyantlar, intron 7'de g.27134 T > G'ye karşılık gelen c.\*3 + 80 T > G ve ekzon 8'de g.27706\_27707delAT'ye karşılık gelen c.\*211\_\*212del'dir. Geliştirilmiş IntRaFast-Q SMA Tarama Kiti, SMA Taramasında taşıyıcıları daha yüksek hassasiyetle tespit etmek için bu iki varyasyonu da analiz eder<sup>(2)</sup>.



Şekil 1: SMN1 Geninde kopya sayılarının farklı durumları.

### 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 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 ve Ekzon 8 delesyonu, ekzon 7 840. pozisyonundaki C/T değişim bölgesine ve SMN1 3+80 T>G and 211-212del için uygun primer-problar içeren iki miks ile test edilir. 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 / Varyasyon | Boya       |
|---------------------------|------------------------------|------------|
| IntRaFast-Q Master Miks 1 | SMN1 Ekzon 7                 | FAM        |
|                           | SMN1 Ekzon 8                 | HEX        |
|                           | Referans Gen                 | TEXAS RED  |
| IntRaFast-Q Master Miks 2 | 3+80 T>G                     | HEX        |
|                           | c.*211_*212del               | QUASAR 705 |
|                           | Referans Gen                 | TEXAS RED  |

### SİSTEM İÇERİĞİ

| Reagents                                      | 20 rxns | 50 rxns |
|-----------------------------------------------|---------|---------|
| IntRaFast-Q Master Mix 1                      | 460 µl  | 1150 µl |
| IntRaFast-Q Master Mix 2                      | 460 µl  | 1150 µl |
| SMN1 Ekzon 7-8 Normal Kontrol **              | 20 µl   | 30 µl   |
| SMN1 Ekzon 7-8 Taşıyıcı Kontrol **            | 20 µl   | 30 µl   |
| SMN1 Ekzon 7-8 Homozigot Del Kont. **         | 20 µl   | 30 µl   |
| SMN1 3+80 G and 211-212del Positive Control** | 20 µl   | 30 µl   |

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

### DNA İZOLASYONU

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

### Spin Kolon Ve Otomatik Dna Ekstraksiyon;

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

### CİHAZ VALIDASYONU İÇİN:

- Master miksler oda sıcaklığında eridikten sonra nazikçe pipetaj yaparak karıştırılır.
- Her örnek için farklı PCR striplerine/tüplerine **23 µl master miks** aktarılır.
- Her bir tüpe **2 µl** farklı **Kontrol DNA'lar** (SMN1 taşıyıcı, homozigot delesyon, Normal ve SMN1 3+80 G ve 211-212del Pozitif kontrol) 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 etmemelidir. Eğer beklenen sonuçları alamazsanız lütfen bizimle irtibata geçin ([tech@snp.com.tr](mailto:tech@snp.com.tr)).
- Validasyon işlemini, **her cihaz ve lot için 2-3 kez** yapmanız yeterlidir.
- Cihaz validasyonundan sonra standart test protokolüne geçilir.

## STANDART TEST PROTOKOLÜ

- Master mikserler oda sıcaklığında eridikten sonra nazıkçe pipetaj yaparak karıştırılır.
- Her örnek için, ayrı 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 | 5 sn.  | <b>35x Döngü</b> |
| 60 °C | 40 sn. |                  |

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

PCR süresi Spin kolon veya otomatik ekstraksiyondan elde edilen DNA örnekleri için **55 dakikadır**.

- Kit, SMN1 Ekzon 7 ve Ekzon 8 Normal / Taşıyıcı ve Homozigot delesyon tespiti için, Intra-Q software uyumluluğundan dolayı yalnızca Bio-Rad CFX96 Cihazı ile kullanılmalıdır.
- Kit, SMN1 taşıyıcılık analizi gerekmeyen durumlarda ve sadece SMN1 Ekzon 7 ve Ekzon 8 Homozigot delesyon ile SMN1 Ekzon 7 ve Ekzon 8 Normal tespiti amacıyla, FAM, HEX ve Texas RED filtresi olan tüm cihazlarla kullanılabilir.
- Miks 2 için QUASAR 705 / IRD700, HEX ve TEXAS RED filtresi olan cihazlar kullanılabilir.

## ANALİZ

- Tüm boyalar için **threshold değeri 1000** olarak ayarlanmalıdır.
- Referans Gen (Texas RED) için ct değeri **≤ 32** olmalıdır. Bu değere uymayan örnekler tekrar edilmelidir.
- Miks 1'in analizi için **IR** değerini hesaplayan Intra-Q Yazılımı kullanılmalıdır. Lütfen Intra-Q Yazılım kullanım kılavuzuna bakınız.
- Intra-Q Yazılımı ile sonuçlar **Şekil 2'deki** gibi görünmelidir.
- Sonuçlar amplifikasyon eğrilerinin görüntüleri ile de değerlendirilebilmektedir (**Şekil 3 – 5**).
- Miks 2 için, QUASAR705 boyasında ve/veya HEX boyasında amplifikasyon olması 2+0 durumu için **"pozitif"** olarak kabul edilmelidir (Şekil 6 ve 7).

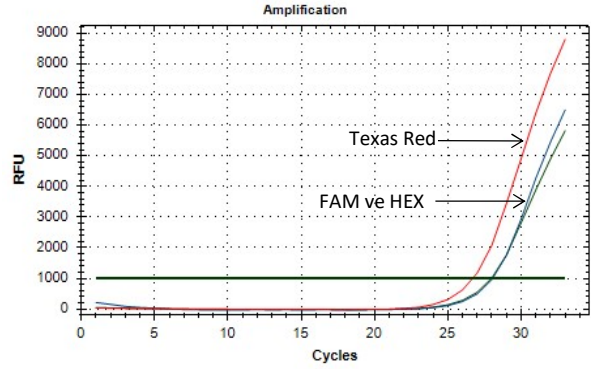
File: D:\SMA Software Analysis\2019\_BLOOD\Experiment\_54 - Quantification Cq Results.xls

|   | 1                          | 2                  | 3                  | 4                  | 5                  | 6                          | 7                  | 8                         | 9                  | 10                 | 11                 | 12                 |
|---|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| A | A01 Wild Type 2.62         | A02 Wild Type 2.85 | A03 Wild Type 2.91 | A04 Wild Type 3.13 | A05 Wild Type 3.13 | A06 Carrier 6.53           | A07 Wild Type 3.08 | A08 Wild Type 3.16        | 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 7 | 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 Carrier 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 3.36 | F04 Carrier 9.04   | F05 Wild Type 3.39 | 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 93.76   | 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 |

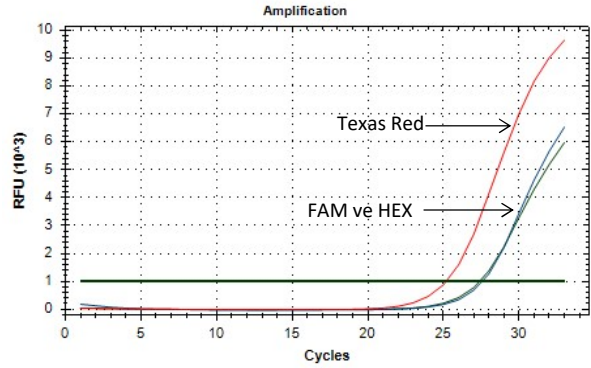
Şekil 2: Intra-Q Yazılımı ile sonuçların görünümü

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 içerisinde gömülü slope eğrisi ile hesaplanmakta ve böylece bu değerlerin birbirine oranı ile de IR değeri tespit edilmektedir. Yazılım SMA testini, bu numerik IR değerlerine bağlı olarak taşıyıcı, homozigot delesyon ve normal şeklinde göstermektedir<sup>(1)</sup>.

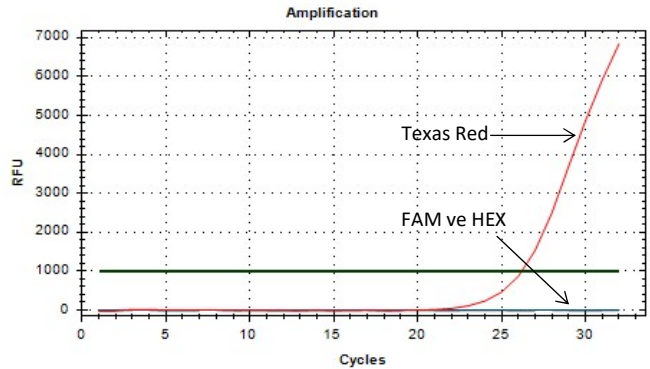
SMN1 normal/taşıyıcı ve homozigot delesyon değerlendirmesi için FAM (SMN1 Ekzon 7 - mavi eğri), HEX (SMN1 Ekzon 8 – yeşil eğri) ve TEXAS RED (Referans gen - kırmızı eğri) boyaları birlikte analiz edilmelidir. Taşıyıcı ve homozigot delesyon çıkan örnekler tekrar edilmelidir.



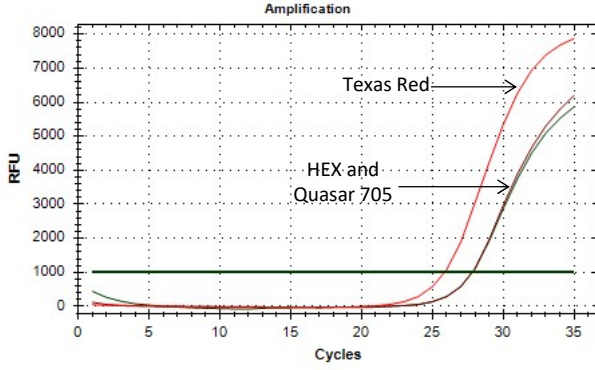
Şekil 3: SMN1 Ekzon 7 ve Ekzon 8 Normal örnek (Miks 1)



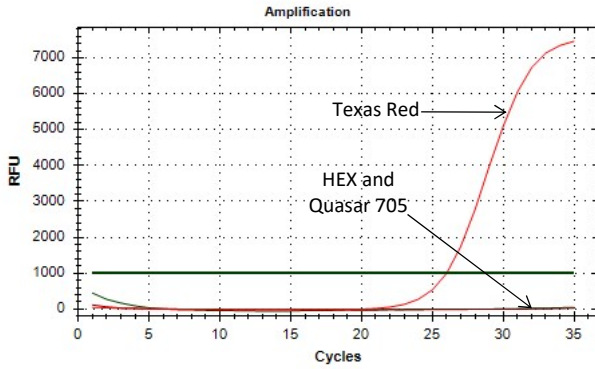
Şekil 4: SMN1 Ekzon 7 ve Ekzon 8 taşıyıcı örnek (Miks 1)



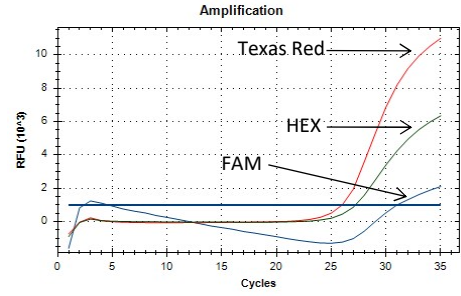
Şekil 5: SMN1 Ekzon 7 ve Ekzon 8 Homozigot Delesyon Örnek (Miks 1)



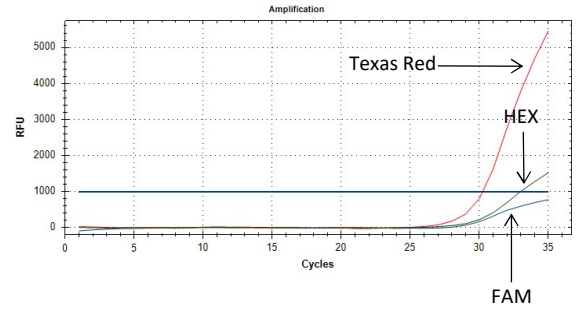
Şekil 6: SMN1 3+80 T>G ve \*211\_\*212del Pozitif örnek (Miks 2)



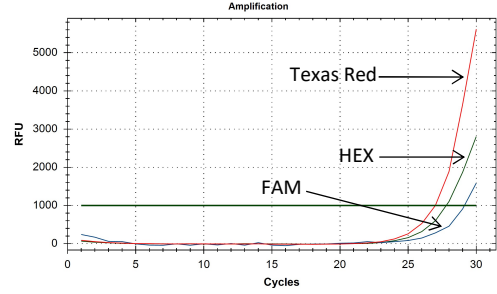
Şekil 7: SMN1 3+80 T>G ve \*211\_\*212del Negatif örnek (Miks 2)



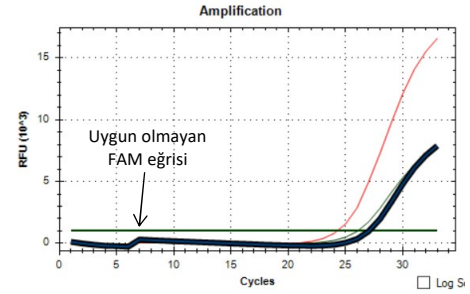
Şekil 8: Uygun olmayan PCR amplifikasyon eğrileri



Şekil 9: Uygun olmayan PCR amplifikasyon eğrileri



Şekil 10: Uygun olmayan PCR amplifikasyon eğrileri



Şekil 11: Uygun olmayan PCR amplifikasyon eğrileri

#### Göz önünde bulundurulması gereken önemli noktalar:

- Homozigot delesyon ve taşıyıcı olarak bulunun örnek sonuçları, cihaza ait yazılımın data analiz ekranından amplifikasyon eğrisi görüntüsü olarak da teyit edilmelidir.
- PCR tüpü içerisinde hava kabarcığı oluşumu, örnek yükleme vb. PCR hataları nedeniyle ortaya çıkan amplifikasyon eğrilerinden bazı örnekler şekil 5, 6, 7 ve 8' de gösterilmiştir. Lütfen amplifikasyon eğrilerini gözden geçirin ve uygun olmayan PCR amplifikasyon eğrilerine sahip örnekler için çalışmayı tekrar ediniz.
- Eğer örnek SMN1 Ekzon 8 taşıyıcı ve Ekzon 7 normal 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 Normal ise, örnek doğrulama için tekrar kit ile test edilmelidir.

#### **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.
- SMA hastalığı, etnik kökene göre farklılık göstermekle beraber, %2-10 aralığında neden olan SMN1 2+0 sessiz taşıyıcılık için yapılan analizlerde c.\*3 + 80 T>G varyantında bulunan NEGATİF sonuçlar SMA taşıyıcılık rezidüel risk değerlendirmesinin düşük olduğunu göstermesine rağmen tamamen ortadan kaldırmamaktadır.

#### **OLASI PROBLEMLER**

##### **Eğer kuvuda hiç amplifikasyon olmamışsa,**

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

Lütfen sorularınız için bizimle temasa geçin. [tech@snp.com.tr](mailto: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 çözündürmek (>5X), ürünün hassasiyetinde azalmalara neden olabilir.

#### **KAYNAKLAR**

1. 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.
2. Alías L., Bernal S., Calucho M., Martínez E., March F., Gallano P., Fuentes-Prior P., Abuli A., Serra-Juhe C., Tizzano EF. "Utility of two SMN1 variants to improve spinal muscular atrophy carrier diagnosis and genetic counselling". European Journal of Human Genetics (2018) 26:1554–1557
3. 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.
4. 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.
5. 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.

**Revizyon Tarihi: 10.08.2023**

