

SMA Kopya Sayısı Tarama Testi (SMN1)
Ref. No: Dia-KBC (100 test)**Ürün Açıklaması**

Spinal kaslar atrofi (SMA) çoğunlukla otozomal resesif bozukluklardan kaynaklanan, motor nöronların kaybı ile karakterize bir kas hastalığıdır. Bireylerde ilerleyici kas güçlüğü ve felç ile sonuçlanan nöromusküler etkiler gözlenmektedir. SMA hastalığı toplumda 1/10.000 oranında hasta ve 1/40 taşıyıcı sıklığıyla oldukça ciddi bir sağlık sorunudur. SMA Hastalığı kromozom 5q13.3 lokusunda introkromozom tekrarı olarak bulunan Survival Motor Neuron geninin yüksek homolojiye sahip iki kopyası SMN1 ve SMN2 gen bölgeleri üzerinde tipik olarak ekson 7 bölgesinde tespit edilir. (Lefebvre et al., 1995; Schmutz et al., 2004) SMA hastalarının ~95%'inde SMN1 ekson 7 bölgesi bulunmazken, normal bireylerde tipik olarak iki veya daha fazla fonksiyonel SMN1 kopyası görülebilir.

Kitin Tanımı

Hasta bireylerde, Survival Motor Neuron 1 (SMN1) geninde mutasyon, konversiyon veya delesyonların homozigot bozulmaya neden olduğu bildirilmiştir. SMN1 geni 7. ekson üzerindeki C→T (840C→T) geçişi fonksiyonel olarak önemlidir. Gen bölgesinde gerçekleşen bu varyasyon kodlama dizisini değiştirmez, ancak bir ekson birleştirme dizisini ortadan kaldırır. SMA hastalığı ile doğrudan ilişkili olduğu ve saptanan değişimlerin taşıyıcılıkta rol aldığı gösterilmiştir.

Laboratuvar ve Eğitim Gerekliliği

SMA Kopya Sayısı Tarama Testi kapsamında uygulamalar, ilgili teknik ve güvenlik prosedürleri konusunda eğitilmiş personel tarafından uygun donanıma sahip laboratuvarlarda yapılmalıdır.

Real-Time PCR Cihazları

Testin çalışmaya uyumlu olduğu Real-Time PCR cihazları, ABI Prism 7000/7300/7500/7900/Step One Plus olarak belirlenmiştir.

Hasta, Normal ve Taşıyıcı Kontrol

SMA Kopya Sayısı Tarama Test (SMN1) kitinde sunulan Hasta, Taşıyıcı ve Normal kontrol numuneleri sentetik olarak üretilmiş hedef gen bölgeleri (SMN1 ve IC) içeren plazmitler kullanılarak oluşturulmuştur. PCR kurulumlarında amplifikasyon sırasında kontaminasyon varlığını tespit etmek amacıyla nükleaz içermeyen su kullanılabilir.

Kit ile sağlanmayan gerekli olan ekipman ve kimyasallar

- Biyolojik Kabin
- Kandan DNA Ekstraksiyon Kiti (Ref. Quickgene Blood DNA Extraction Kit)
- Real time PCR Cihazı
- Real time PCR test tüpleri/stripleri/pleyleri
- Ayarlanabilir Mikropipetler (0.5µl – 1000µl)
- Filtreli Mikropipet Uçları
- 1.5 ml Mikrosantrifüj Tüpü
- Soğutucu Çalışma Bloğu
- Pudrasız tek kullanımlık eldiven
- Tıbbi Atık Kabı
- Soğutucu Dolaplar (+4/-20)
- Masaüstü santrifüj (Max 2.000xg)
- Vortex karıştırıcı
- Nükleaz İçermeyen Su (Negatif Kontrol)

Uyarılar ve Dikkat Edilecek Hususlar

- PCR kurulum ve uygulamalar eğitilmiş personel tarafından yapılmalıdır.
- Klinik numuneler potansiyel enfeksiyöz materyal olarak kabul edilerek laminar flow kabin içinde hazırlanmalıdır.
- Deneysel basamakları GLP koşulları takip edilerek uygulanmalıdır.
- Tekrarlanan don/çöz işlemi kitin sensitivitesini düşerebilir.
- Reaktifler çözünerek vortex ve spin işlemi uygulanmalıdır.
- Reaksiyon karışımı buz veya soğutucu blok üzerinde hazırlanmalıdır.
- İki farklı çalışma alanı oluşturulmalıdır:
 - DNA ekstraksiyon alanı
 - Amplifikasyon ve deteksiyon alanı
- Pipet ucu, tüp ve diğer malzemeler bir alana ait olup farklı alanlarda kullanılmamalıdır.
- PCR kurulumlarında steril filtreli pipet ucu kullanılmalıdır.
- Aerosollerden kaçınılmalıdır.
- Son kullanma tarihi geçmiş kitler kullanılmamalıdır.

Tablo. Kit Bileşenleri

Ref.	Kit Bileşenleri	100 test	Kapak
1	qPCR 2X MasterMix	500 µl	Mavi
2	SMN1/IC PrimerMix	250 µl	Kırmızı
3	Normal Kontrol	50 µl	Yeşil
4	Taşıyıcı Kontrol	50 µl	Renksiz
5	Hasta Kontrol	50 µl	Beyaz

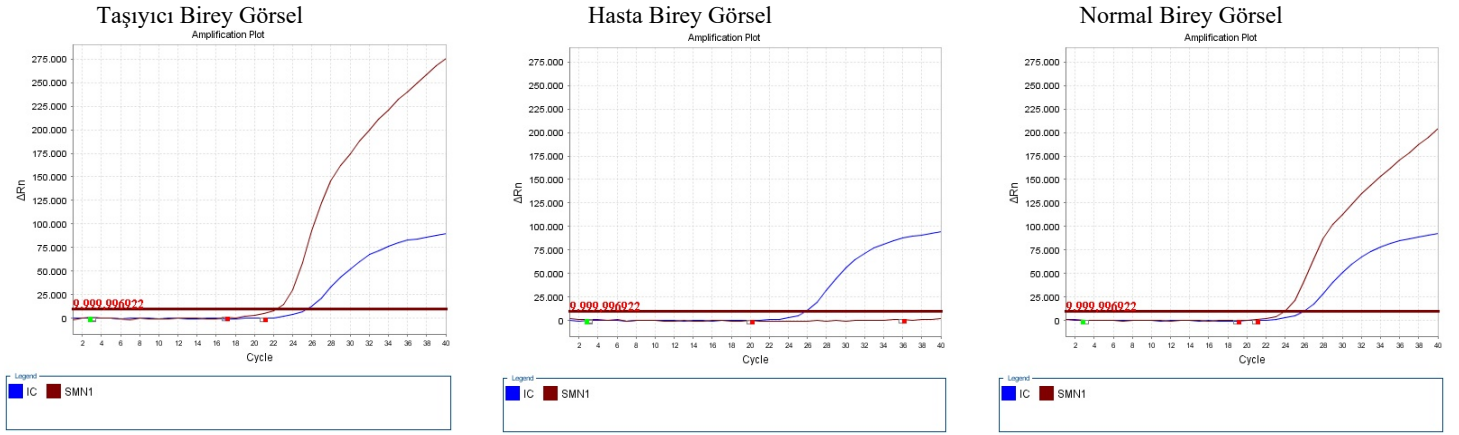
PROTOKOL**PCR Mix Hazırlama**

Sıra	Belirtilen miktarları tek tüpte sırasıyla hazırlayınız.
1	5 µl qPCR 2X MasterMix
2	2,5 µl SMN1/IC PrimerMix
3	2,5 µl DNA (10 ng/µl)
Final	Son hacim 10 µl olmalıdır

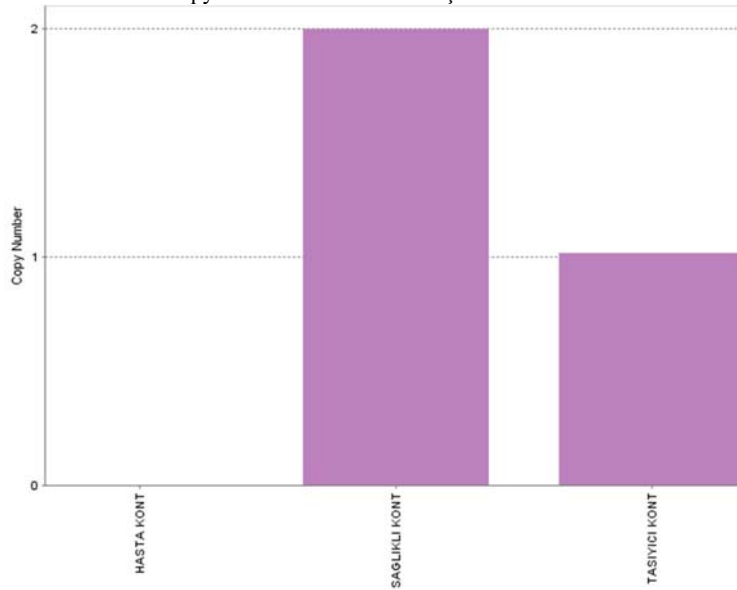
PCR Cihaz Kurulumu

95°C / 10 dk	1 döngü	Floresan Kanal	
95°C / 10 sn	40 döngü	FAM	SMN1
60°C / 30 sn (Floresan ölçümü)		HEX	IC
72 °C / 5 sn			

SONUÇ DEĞERLENDİRME



CopyCaller™ Software Sonuç Görsel



- Cihaz Optimizasyonları: ABI Software uygulamasında Threshold ve Baseline açılmalıdır.
- Cihaz ayarlarından $\Delta Rn=10000$ olarak Threshold ayarlanmalıdır.
- Veri analizi ve yorumlama CopyCaller™ Software ile yapılmalıdır.
- Cihaz verileri aşağıda belirtilen tabloya göre onaylanmalıdır.

Sonuç	CT Değerleri		Sonuç Değerlendirilmesi
	FAM (SMN1 geni)	HEX (IC geni)	
Normal Kontrol	≤ 30	≤ 30	Uygulamada kopya sayısı "2" olarak görülen numuneler Normal olarak kabul edilir.
Taşıyıcı Kontrol	≤ 30	≤ 30	Uygulamada kopya sayısı "1" olarak görülen numuneler Taşıyıcı olarak kabul edilir.
Hasta Kontrol	≥ 35	≤ 30	Beklenen Hasta Kontrol sonucudur.
1.	≤ 35	≤ 35	Örnek Normal ya da Taşıyıcı olarak değerlendirilir.
2.	Tespit Edilmedi	≤ 38	Örnek Hasta olarak değerlendirilir.
3.	≤ 38	Tespit Edilmedi	IC çalışmadığı fakat SMN1 geni çalıştığı durumlarda SMN1 kopya sayısı hesaplanamayacağı için değerlendirme yapılamaz, işlem tekrarlanmalıdır
	≤ 38	Tespit Edilmedi	
4.	Tespit Edilmedi	Tespit Edilmedi	PCR inhibitörü olabilir, numune ekstraksiyon aşamasında itibaren tekrarlanmalıdır.

Daha fazla soru ve destek için info@diagen.com.tr adresi ile teknik hizmetlerle iletişime geçiniz.

Referanslar

1. Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Bulet, P., Viollet, L., & Le Paslier, D. (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, 80(1), 155-16
2. Mayo, P., Hartshome, T., Li, K., McMunn-Gibson, C., Spencer, K., & Schnetz-Boutaud, N. (2010). CNV analysis using TaqMan copy number assays. *Current protocols in human genetics*, 67(1), 2-13.
3. Schmutz, J., Martin, J., Terry, A., Couronne, O., Grimwood, J., Lowry, S., Gordon, L.A., Scott, D., Xie, G., Huang, W., et al., 2004. The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 5. *Nature*, 431(7006):268-274. [doi:10.1038/nature02919]