

1. Kitin Kullanım Amacı ve Test Prensipleri

Gerçek zamanlı Allele Spesifik Oligonükleotid (ASO) PCR analizi, yeni nesil mutasyon tespit teknolojilerinden biridir. Bu teknoloji 1-çift-bazlık değişimler dahil olmak üzere bilinen mutasyonları yüksek hassasiyetle tespit edilmesine izin vermektedir. SMA, SMN1 (Survival Motor Nöron) genindeki mutasyonlardan kaynaklanan otozomal resesif bir hastalıktır. SMA hastalarının yaklaşık %95'i, yaygın olarak kullanılan moleküler analizlerle tespit edilebilen SMN1 exon 7'nin her iki kopyasından da yoksunken taşıyıcı bireylerde bir kopya bulunur.

TÜSEB DiaKit SMA qPCR Tanı Kiti, SMN1 genini SMN2 geninden ayıran Exon 7, 840. nükleotiddeki C/T değişimini Kantitatif Real Time PCR (qPCR) yöntemi ile tespit eder. $\Delta\Delta Ct$ metodu ile kopya sayısı değişim (CNV= Copy Number Variation) analizi prensibiyle çalışmaktadır. Kit, SMN1 geninin Ekzon7 delesyon tespit işlemini tek bir reaksiyonda tek bir test ile gerçekleştirir.

Primer Problar, SMN1 Ekzon 7 (FAM) ve İnsan Actin- β (HEX) genine özgü TaqMan teknolojisi ile çalışmaktadır.

Kit, taşıyıcılık şüphesi taşıyan bireylerden alınan Tam kan örnekleri ve bunlardan izole edilen genomik DNA'ya uygulanmaktadır. Kit minimum %98 spesifite ve %98 sensitivite oranına sahiptir (9.Sınırlamalar bölümünü okuyunuz).

2. Kit İçeriği

Raf ömrü: 12 ay; kutunun üzerindeki son kullanma tarihine bakınız. Depolama sıcaklığında saklanan her bir reaktif, tüp üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir. Kitin son kullanma tarihi reaktiflerin son kullanma tarihine göre belirlenmektedir.

3. Kit Saklama Sıcaklığı

Kit, saklama sıcaklığı (-15°C ile -25 °C arasında) korunduğu sürece, ambalaj üzerinde yazılı olan son kullanma tarihine kadar stabil kalabilmektedir.

Saklama Sıcaklığı: -20°C; Transfer Koşulları: 2-8°C				
İçerik / Kullanım Amacı	Kanal	İçerik	Miktar(10 μ L Reaksiyon)	Birim Reaksiyon Tüketim
			100 Reaksiyon 1000 Reaksiyon	
DNA polimeraz, dNTP miks, reaksiyon tamponu ve ribonükleaz inhibitörü	-	2X Master Mix	1 x 500 μ L 4 x 1250 μ L	5 μ L
SMN1 Exon7	FAM		1 x 250 μ L 2 x 1250 μ L	2,5 μ L
İnsan Actin- β geni	HEX	Primer Mix		

Tablo 1a. Kit içeriği

Saklama Sıcaklığı: 2-8°C; Transfer Sıcaklığı: 2-8°C Bileşenler donmuşsa -20°C'de saklayınız. İlk çözündürmeden sonra 2-8°C'de saklayınız.			
Negatif Kontrol (Nükleaz İçermeyen Su) Kontaminasyon kontrolü amacıyla, her işletimde testediniz.	NTC	1 x 500 μ L	2,5 μ L
Kontrol DNA: SMN1 Exon7 açısından sağlıklı olduğubilinen DNA numunesi (9. Sınırlamalar bölümünü okuyunuz)	PC	1x 50 μ L	2,5 μ L

Tablo 1b. Kit içeriği-Kontroller

Kullanıcı tarafından sağlanacak olan cihaz ve ekipmanlar

1. Real-Time PCR Cihazı: 4 kanallı, Ramp rate ≥ 3 °C/sec. 2. 1-10 µL mikropipet ve uyumlu pipet ucu (DNaz ve Rnaz içermeyen) 3. Spin Santrifüj: min.3000 rpm (8'li strip ve 2 mL mikrosantrifüj tüpü ile uyumlu) 4. Vorteks	5. PCR kurulumu için UV kabini 6. Soğuk Tüp standı (mikrosantrifüj tüpleri ve PCR tüp/stripleri için) 7. Tek kullanımlık, pudrasız, nitril eldiven.
---	--

Tablo 1c. Kullanıcı tarafından sağlanacak olan cihaz ve ekipmanlar

4. Valide Cihazlar

TÜSEB DiaKit SMA qPCR Tanı Kiti **Tablo 2**'de verilen cihazlar ile valide edilmiştir.

Tablo 2. Valide qPCR Sistemi ve Ekstraksiyon Sistemi

Bio-Rad CFX96 Touch qPCR Sistemi*	Molgen PurePrep-96 Nükleik Asit Ekstraksiyon Sistemi
--	---

*Bio-Rad CFX96 qPCR cihazıyla yalnızca beyaz plate/beyaz strip kullanın!

5. Tam kan Örneklerinin Toplanması, Saklanması ve Transferi

Tam kan örnekleri K2-EDTA'lı tüplere toplanmalıdır. Örnekler laboratuvara gelene kadar 2-8°C'de saklanmalı ve taşınmalıdır. Örnekler 10 gün içinde laboratuvara aktarılmalıdır. Sevkiyatta bir gecikme bekleniyorsa, numuneler -70°C'de dondurulmalı ve kuru buz ile gönderilmelidir. Örneklerin tekrarlanan dondurma-çözdürmeye maruz bırakılmaması önemlidir.

6. qPCR Uygulama Protokolü

Analize başlamadan önce aşağıdaki bilgileri göz önünde bulundurunuz:

- Kit, sadece toplam qPCR hacminin %25'i kadar olan kalıp nükleik asit hacmi için valide edilmiştir.
- Kit, periyodik bakım kayıtları olmayan real time PCR cihazlarıyla kullanılmamalıdır.
- qPCR cihazını aşağıda belirtilen şekilde programlayınız ve reaktifleri qPCR tüplerine aşağıda belirtildiği sırasıyla ekleyiniz, tüpleri kapatınız, qPCR cihazına yerleştiriniz ve işletimi başlatınız (Tablo 3).

7. Uyarılar

- Kiti nükleik asit kaynaklarından ve qPCR ampikonlarından uzakta saklayınız.
- Kit bileşenlerini farklı lot numaralarıyla veya aynı adı taşıyan ancak farklı üreticilere ait kimyasallarla karıştırmayınız.
- Ana stok reaktiflerini PCR kurulumu sırasında soğuk blokta tutunuz.
- Mümkünse, PCR'yi soğuk blokta kurunuz.
- Kullanmadan önce kit bileşenlerini yavaşça karıştırınız.
- qPCR karışımlarını ve template nükleik asitleri pipetlemek için ayrı mikropipetler kullanınız.
- Sıvı transferleri dışında template nükleik asit ve pozitif kontrol tüplerini her zaman kapalı tutunuz.
- Testin yapıldığı oda, tezgâh ve cihazların silinebilir yüzeylerini %10 NaClO ile düzenli olarak temizleyiniz.
- qPCR'ı tamamlanmış reaksiyon tüplerini laboratuvarı açmadan uzaklaştırınız.

Reaksiyon Kurulumu		qPCR Programı		
İçerik	Hacim	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
2X Master Mix	5 µL	1	95°C	10 dk
Primer Mix	2,5 µL	39	95°C	15 sn
Örnek Nükleik Asit	2,5 µL		60°C	1 dk
Toplam reaksiyon hacmi	10 µL	FAM / HEX Okuma		

Tablo 3. Reaksiyon kurulumu ve qPCR program detayları



8. Test Sonuçlarının Yorumlanması

Analiz, test edilen numunedeki hedef gen ve referans gen arasındaki farkın, Hedef gen açısından sağlıklı olduğu bilinen (wildtype) numunenin hedef geni ve referans geni arasındaki fark ile karşılaştırıldığı, karşılaştırmalı Ct* metoduna ($\Delta\Delta Ct$ metodu) dayanmaktadır. Metod prensibi aşağıda tarif edilmiştir**.

**HEX= referans gen (İnsan Actin- β), FAM= Hedef gen (SMN1 Exon7)

Bilinen Sağlıklı numune/kontrol DNA (A) $\Delta Ct = Ct(FAM) - Ct(HEX)$

Hedef DNA/hasta DNA (B) $\Delta Ct = Ct(FAM) - Ct(HEX)$

$\Delta\Delta Ct = (B) - (A)$

Hesaplama yapıldıktan sonra SMN1 Exon7 ifadesinin bulunması için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri hesaplanır.

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ value
Sağlıklı (2 Kopya Exon7) $> 0,62$
$0,59 \leq \text{Gri zon}^{***} \leq 0,62$
Heterozigot delesyon/Taşıyıcı (1 Kopya Exon7) $< 0,59$

Tablo 4. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Değerlerine göre analiz sonuçları

*Ct değeri; numunenin Real-Time PCR sisteminde anlamlı ışımaya başlamaya başladığı döngü sayısını ifade eder. Trashold çizgisi, numune grafiğinin sigmoid eğriliğinin başlangıç noktasına çekilir ve bu noktadaki Ct değeri baz alınır. Hesaplamalar sırasında qPCR cihazı tarafından otomatik trashold değeri kullanılabilir.

*** Gri bölge sonuç aralığında değere sahip bir numune olması durumunda, çalışmanın DNA ekstresi üzerinde tekrarlanması ve aynı sonucun elde edilmesi durumunda PCR çalışmasının ekstraksiyon aşamasından itibaren tekrarlanması önerilir.

Kontrol Türü	İsmi	Kontrol Amacı	Beklenen Sonuç
NTC eklenmesi	NTC	Kontaminasyon kontrol	Cq Yok=Geçerli
Template ekleme yok	NRC	Reaktif kontaminasyon kontrol	Cq Yok=Geçerli

Tablo 5. Kit kontrollerinin beklenen performansı

Herhangi bir kontrol Tablo 5'te açıklandığı gibi çalışmazsa, çalışma geçersiz sayılır ve test tekrarlanır.

- Geçersiz NRC: Üretici ile iletişime geçiniz, reaktifleri yenileyiniz ve reaksiyonu tekrarlayınız.
- Geçersiz NTC: “Uyarılar” bölümüne dikkat ederek analizi tekrarlayınız. Tüm kontroller geçerliyse, sonuçların yorumlanmasına geçiniz.

9. Sınırlamalar

- Kit, SMN1 genindeki ekzon7 delesyon dışındaki nadir mutasyonları (% 2-4) tespit edemez.
- Sağlıklı numuneler normal olarak maternal ve paternal (1+1) olarak iki adet SMN1 genine sahiptir. Nadiren (% 1-4) bazı SMN1 ekzon7 delesyon taşıyıcı bireyler, aynı alelde (2+0) veya (0+2) iki kopya SMN1 genine sahiptir, bu durumlarda kit iki kopya (sağlıklı) olarak sonuç verir.
- Kit, referans gen ile hedef gen arasındaki Ct farkının Sağlıklı referans DNA ile karşılaştırılması prensibiyle kopya sayısının hesaplanması tekniğine dayalı sonuç verir. Dolayısı ile her çalışma için SMN1 exon 7 açısından, en az 1 adet sağlıklı olduğu bilinen DNA çalışmaya eklenmelidir.
- Kitin bahsedilen spesifikite ve sensitivite değerlerine ulaşabilmesi için, referans DNA ile örnek DNA'nın, aynı kit/metot ile elde edilmiş olması önerilmektedir.
- Hedef gen ile referans gen için Taqman probe tasarımları, sonuçların DNA degradasyonundan minimal düzeyde etkilenmesi için mümkün olduğunca yakın bölgelerden seçilmiştir. Ancak yüksek doğruluk oranı için 15 günden eski tam kan ile çalışılmaması tavsiye edilmektedir.

