Delta SMA Real-time PCR Kit

دستورالعمل

کیت تشخیص بیماری آتروفی عضلانی نخاعی بر اساس ریل تایم پی‌سی‌آر

REF DD060-001-24

24 tests

DELTA BIOTECHNOLOGY
دلسا تشخیص آریا (دلتا)

۱) مقدمه

بیماری آتروفی عضلانی نخاعی (Spinal muscular atrophy یا SMA) یک بیماری ژنتیکی اتوزومی مغلوب است که بدلیل اختلال عملکرد پروتئین SMN1 در نتیجه‌ی وقوع جهش‌های ژنتیکی در ژن *SMN1* (واقع در ناحیه‌ی تلومری کروموزوم ۵) ایجاد می‌شود. اکثر این جهش‌ها منجر به حذف اگزون ۷ ژن *SMN1* می‌شوند که نهایتا باعث از دست رفتن عملکرد پروتئین کد شده از این ژن می‌شوند. پروتئین SMN1 در بقای نورون‌های حرکتی نقش موثری دارد و از دست رفتن عملکرد آن منجر به از بین رفتن نورون‌های حرکتی شروع علایم بیماری در افراد می‌شود. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که بیماران مبتلا به SMA در تقریبا ۹۵ درصد مواقع دارای یک جهش در موقعیت نوکلئوتیدی ۸۴۰ ترنسکریپت این ژن (C840T) هستند که باعث کاهش کارایی اسپلایسینگ در اگزون ۷ این ژن شده و نهایتا منجر به از دست رفتن عملکرد برخی از نسخه‌های پروتئین می‌شود. علاوه بر ژن *SMN1*، یک ژن دیگر به نام *SMN2* در ناحیه‌ی تلومری کروموزوم ۵ وجود دارد که پارالوگ ژن *SMN1* است. از نظر توالی، این دو ژن مشابه هستند و فقط در پنج نوکلئوتید با یکدیگر تفاوت دارند. یکی از این تفاوت‌ها مربوط به ناحیه‌ی ۸۴۰ ترنسکریپت ژن *SMN2* یا همان C840T است که همانطور که قبلا ذکر شد می‌تواند باعث از دست رفتن عملکرد پروتئین کد شده توسط این ژن نیز شود. بنابراین شناسایی وجود یا عدم وجود جهش C840T در ژن *SMN1* برای غربالگری نوزادان از نظر ابتلا به بیماری SMA کاربرد دارد.

۲) کاربرد کیت

کیت Delta SMA Real-time PCR جهت شناسایی وجود یا عدم وجود جهش ژنتیکی در اگزون ۷ ژن *SMN1* در نمونه‌های DNA استخراج شده از خون به‌منظور غربالگری نوزادان مبتلا به بیماری آتروفی عضلانی نخاعی استفاده می‌شود. این تست تشخیصی بر اساس تکنیک Probe-based real-time PCR طراحی شده است.

۳) اساس تست

در این روش، ابتدا DNA ژنومی موجود در نمونه‌ی خون با استفاده از یک کیت تجاری معتبر استخراج می‌شود و بدنبال آن، واکنش تکثیر هدف ژنومی با استفاده از ریل تایم PCR انجام می‌شود. برای این منظور، یک ناحیه‌ی اختصاصی در اگزون ۷ ژن *SMN1* بر روی ژنوم انسانی بعنوان هدف تشخیصی درنظر گرفته می‌شود. به‌منظور بررسی وجود و عدم وجود جهش C840T در اگزون ۷ از یک جفت پرایمر و یک پروب اختصاصی الیگونوکلئوتیدی دارای رنگ فلوروسنت (فلوروکروم FAM) در انتهای ´۵ و کوئنچر در انتهای ´۳ استفاده می‌شود (TaqMan probe). این پروب به‌گونه‌ای طراحی شده است که قادر به شناسایی آلل وحشی (C) است. حین انجام ریل تایم PCR در صورت وجود آلل وحشی، پرایمرها و پروب‌های اختصاصی به نواحی مربوطه متصل می‌شوند. به‌منظور تکثیر DNA هدف، آنزیم پلیمراز فعال شده و شروع به سنتز رشته‌های جدید می‌کند. در حین سنتز رشته‌های جدید، این آنزیم با استفاده از فعالیت اگزونوکلئازی باعث هیدرولیز پروب متصل شده به ناحیه‌ی هدف مربوطه شده و در نتیجه کوئنچر از فلوروکروم جدا شده و در نتیجه رنگ فلوروسانت FAM ساطع می‌شود که دستگاه Real-time PCR قادر به خوانش و ثبت آن‌ها به صورت منحنی می‌باشد. در صورت وجود جهش C840T (آلل T) پروب مذکور قادر به اتصال به ناحیه هدف در اگزون ۷ نیست در نتیجه Gene target failure رخ می‌دهد و بنابراین حین انجام ریل تایم PCR برای فلوروکروم FAM منحنی مشاهده نخواهد شد (Drop out). بعلاوه یک جفت پرایمر و یک پروب دیگر که دارای فلوروکروم HEX (VIC) و کوئنچر است جهت شناسایی بخشی از یک ژن Housekeeping انسانی بعنوان کنترل داخلی (Internal control) استفاده می‌شوند. لازم به ذکر است که کنترل داخلی، جهت ارزیابی فرآیند نمونه‌گیری و استخراج ژنوم کاربرد دارد.

٤) محتوای کیت

کیت حاضر برای انجام ۲۴ تست تشخیصی است و دارای اجزای زیر می‌باشد:

	ریجنت‌ها*	مقادیر
۱	SMA Master Mix	۱ تیوب X ۳۶۰ میکرولیتر
۲	SMN1 Wildtype Control	۱ تیوب X ۱۰۰میکرولیتر
۳	SMN1 Mutant Control	۱ تیوب X ۱۰۰میکرولیتر
٤	No Template Control (NTC)	۱ تیوب X ۱۰۰ میکرولیتر

* **توجه:**

- ✓ تمامی اجزای کیت در دمای ۱۵- تا ۲۵- درجه سانتیگراد نگهداری شوند.
- ✓ تاریخ انقضای کیت بر روی آن درج شده است.
- ✓ تا حد امکان از ذوب و فریز شدن اجزای کیت خودداری شود. زیرا ممکن است حساسیت تست را کاهش دهد.
- ✓ در صورت نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتیگراد، در کمتر از یک هفته استفاده شود.
- ✓ در صورت نیاز از هرکدام از اجزا بر اساس نیاز الیکوت تهیه شود.
- ✓ محلول Master mix حاوی پرایمر و پروب نشاندار شده با فلوروکروم است و تا حد امکان در معرض نور مستقیم قرار نگیرد.
- ✓ حتما قبل از استفاده از هرکدام از محلول‌های موجود در کیت، ورتکس/ اسپین انجام شود.

۵) سایر تجهیزات و مصرفی‌های لازم

	دستگاه / مصرفی	تعداد	توضیحات
۱	ورک استیشن (کابینت PCR)	۲ عدد	یکی برای تهیه PCR mix و دیگری برای اضافه کردن DNA ژنومی و کنترل‌های کیت است.
۲	ست سمپلر با حجم‌های مختلف	۲ ست	هر یک ست در زیر هر ورک استیشن قرار داده شود.
۳	مینی اسپین / ورتکسر	۲ عدد	هر کدام در زیر هر ورک استیشن قرار داده شود.
٤	مینی اسپین با روتور استریپ خور یا سانتریفیوژ پلیت خور	۱ عدد	به منظور سانتریفوژ کردن استریپ تیوب‌ها یا پلیت حاوی واکنش PCR قبل از قرار دادن در دستگاه Real-time PCR استفاده می‌شود.
۵	دستگاه Real-time PCR	۱ عدد	دستگاه دارای قابلیت خوانش در حداقل ۲ کانال FAM، HEX (VIC) یا معادل طول موج آن‌ها باشد.
٦	کول رک (کرایو رک)	به تعداد لازم	برای حمل و نگهداری اجزای کیت و نمونه‌های DNA در حین کار استفاده می‌شود.
۷	استریپ تیوب یا پلیت مخصوص Real-time PCR	به تعداد لازم	بر اساس نوع دستگاه Real-time PCR از نوع سفید یا شفاف استفاده می‌شود.
۸	اسپری حاوی محلول از بین برنده نوکلئازها (RNaseZAP)	به مقدار لازم	به منظور تمیز کردن سطوح و تمامی وسایل استفاده می‌شود.
۹	سر سمپلر فیلتر دار در حجم‌های مختلف	به تعداد لازم	باید عاری از DNase و RNase باشند.

٦) نمونه‌ی بالینی مورد استفاده

تشخیص اختصاصی بیماری SMA بر اساس شناسایی جهش C840T در اگزون ۷ ژن *SMN1* واقع بر روی ژنوم انسان می‌باشد. بنابراین، به منظور انجام تست تشخیصی (غربالگری) حاضر، نیاز به DNA ژنومی بعنوان الگو در واکنش ریل تایم PCR است. برای این منظور، می‌توان DNA ژنومی را از نمونه‌ی خون یا باکال نوزادان استخراج کرد. جزئیات مربوط به نمونه بالینی مورد استفاده جهت تشخیص بیماری SMA در پروتکل FDA آمریکا برای ارزیابی کیت Eonis SCID-SMA kit ساخت کمپانی PerkinElmer آورده شده است:
https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K203035.pdf

کارایی و پرفورمنس کیت حاضر بستگی به مقدار و کیفیت DNA استخراج شده دارد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود از یک کیت یا یک روش استخراج DNA معتبر (چه دستی و چه اتوماتیک) استفاده شود. تمامی مراحل انجام کار باید توسط افراد آموزش دیده انجام شود. دور ریختن بافرها، ریجنت‌ها و نمونه‌ها باید بر اساس مقررات و گایدلاین‌های مربوطه انجام شود:
https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/9780471729259.mc01a01s13

۷) پروتکل انجام تست

قبل از انجام تست تمامی اجزای کیت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شوند تا به آرامی ذوب شوند. استفاده از کرایورک به منظور نگهداری محلول‌ها در این مرحله پیشنهاد می‌شود. سپس برای حل کردن و هموژن کردن محلول‌ها از ورتکس استفاده شود. در مرحله بعد، تمامی محلول‌ها اسپین شوند تا در صورتی که قطرات محلول روی درب تیوب‌ها باشد به ته میکروتیوب کشیده شود.

۷-۱) در زیر یک ورک استیشن، به ازای هر نمونه مقدار **۱۵ میکرولیتر** از SMA Master mix را درون هر چاهک از پلیت مخصوص Real-time PCR (یا هر تیوب از استریپ تیوب ۸تایی) اضافه نمایید.

۷-۲) در زیر یک ورک استیشن دیگر مقدار **۵ میکرولیتر** از هر یک از DNAهای استخراج شده را به میکس مرحله‌ی قبل اضافه و اسپین نمایید.

نکات:

- ✓ در این مرحله، بطور موازی مقدار ۵ میکرولیتر از هر کدام از کنترل‌های مثبت SMN1 Wildtype Control ، SMN1 Mutant Control و کنترل منفی (NTC) No Template Control موجود در کیت نیز به‌صورت جداگانه به یک چاهک حاوی میکس واکنش اضافه شوند.
- ✓ در حین انجام کار به‌منظور حفظ کیفیت DNAهای استخراج شده، پس از خارج کردن آن‌ها از فریزر، آن‌ها را برروی کرایورک مخصوص حمل و نگهداری نمایید.

۷-۳) واکنش‌ها را به دستگاه Real-time PCR منتقل کرده و برنامه‌ی آورده شده در جدول زیر را اجرا نمایید.

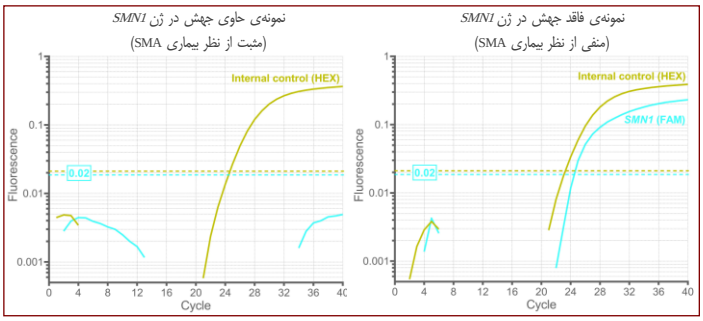
سیکل	مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	زمان (ثانیه)
۱ x	فعال شدن آنزیم پلیمراز	۹۵	۳۰۰
۴۰ x	باز شدن رشته‌های DNA الگو	۹۵	۱۵
	جفت شدن پرایمرها	۴۶	۱۵
	سنتز رشته های جدید	۷۲	۳۰ *
۱ x	خنک شدن	۲۵	۳۰

* خوانش فلوروسنت در کانال‌های **FAM** و **HEX** (**VIC**) در این مرحله انجام شود.

۷-۴) بعد از انجام PCR، تفسیر نتایج بر اساس جدول زیر انجام شود.

تفسیر	HEX	FAM
وجود آلل وحشی (فرد مورد آزمایش مبتلا به بیماری SMA نیست)	±	+ (Ct ≤ 35)
وجود آلل جهش یافته (فرد مورد آزمایش مبتلا به بیماری SMA است)	+ (Ct ≤ 35)	- (Ct > 35)
نمونه گیری به درستی انجام نشده است (تکرار آزمایش) استخراج ژنوم به درستی انجام نشده است (تکرار آزمایش) احتمال وجود مهارکننده‌ی PCR در نمونه‌ی استخراج شده (تکرار آزمایش)	- (Ct > 35)	- (Ct > 35)

○ پروب شناسایی کننده‌ی آلل وحشی با فلوروکروم FAM و پروب شناسایی کننده‌ی ژن Housekeeping انسانی (بعنوان کنترل داخلی) با HEX (VIC) نشاندار شده است (شکل زیر).



○ کیت حاضر دارای ۳ نوع نمونه‌ی کنترل یکی برای آلل وحشی، یکی برای آلل جهش یافته و یک کنترل NTC است. مقادیر Ct هر دو کانال FAM و HEX برای کنترل SMN1 Wildtype Control باید بین ۲۰ تا ۳۰ باشد. همچنین مقادیر Ct کانال HEX برای کنترل SMN1 Mutant Control باید بین ۲۰ تا ۳۰ باشد و برای کانال FAM منحنی ریل تایم مشاهده نمی‌شود (فاقد Ct). نمونه‌ی کنترل No Template Control کیت حاضر باید فاقد Ct یا Ct بزرگتر از ۳۵ باشد. در صورت وجود آلودگی ریجنت‌های کیت با DNA ژنومی یا آلودگی‌های تکنیکی در حین آماده سازی واکنش PCR، ممکن است که رنگ فلوروسنت در کانال‌های مذکور توسط دستگاه خوانش شود. در صورت مشاهده‌ی مقادیر Ct کمتر از ۳۵ برای نمونه‌ی NTC پیشنهاد می‌شود تا آزمایشات تکرار شوند.

REF کاتالوگ تامین
LOT لات تامین
دستورالعمل
تعداد تست‌ها
RUO استفاده تحقیقاتی
تاریخ انقضا
محدوده های نگهداری
کمپانی تولید کننده

آدرس: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز رشد فناوری
شماره تماس: ۰۳۱۹۱۰۱۰۶۵۱ ۰۲۱۹۱۰۱۰۶۵۱
وبسایت: www.deltabiotechno.com