

COVID-19 REAL TIME PCR KİTİ

Kat. No: 114R-10-01

GİRİŞ

Coronavirüsler, Coronaviridae familyasına ait olan ve geniş ölçüde insanlara ve diğer memelilere bulaşabilen RNA virüsleridir. Aralık 2019'da, Wuhan, Hubei, Çin'de kaynağı bilinmeyen bir dizi pnömöni vakasından alınan alt solunum yolu örneklerinden yapılan analizler, 2019 yeni koronavirüs (SARS-CoV-2) olarak adlandırılan yeni bir koronavirüsü varlığını gösterdi. Bu virüsün neden olduğu hastalığa ise COVID-19 denildi. Test Sistemimiz, SARS-CoV-2' nin **RNA-dependent RNA polymerase gene** (RdRP) and **Nucleocapsid protein gene** bölgelerini % 100 hassasiyet ve % 100 özgüllük ile tespit eder.

TEST SİSTEMİNİN PRENSİBİ

RNA molekülü ile gerçekleştirilen PCR çalışmalarında, öncelikle komplementer DNA (cDNA) sentezine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için ters transkriptaz (Revers Transcriptase) enzimi ile RNA'nın kalıbı oluşturulmakta ve elde edilen cDNA direk PCR işleminde kullanılabilir. Kalıp olarak cDNA ve DNA'nın kullanıldığı 5' nükleaz testi için işlemin devamı Taq DNA polimerazın 5'exonuclease aktivitesine dayanmaktadır. Bu test için probun 5' ucunda bir reporter boya ve 3' ucunda da bir quencer boya bulunmaktadır. Quencer boya reporter boyanın ışımamasını 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 ve baskılanmanın ortadan kalkmasıyla ışımaya meydana gelir. Bu işlem sadece hedef bölge üzerinde hibridize olmuş problemlerde 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

Kullandığınız kit sistemi "**ready to use**" özelliğine sahiptir. Kit, 5' Nükleaz PCR için gerekli tüm komponentleri içermektedir.

Sistem iki farklı spesifik primer-prob seti içermektedir. COVID-19 analizi için FAM işaretli, sistemin doğru şekilde çalışıp çalışmadığını kontrol eden internal kontrol analizi için ise HEX/JOE boyası ile işaretli prob kullanılmaktadır.

COVID-19 Real Time PCR Kit için Limit of detection (LOD) değeri 1-10 Kopya/Rxn' dir.

Table 1 : Tüp-Virüs-Boya tablosu

Tüp	Virüs	Boya
Miks	İnternal Kontrol	HEX
	COVID-19	FAM

SİSTEM İÇERİĞİ

Bileşen	100 Test
• COVID-19 Master Miks	1000 µl
• Pozitif Kontrol	50 µl
• Negatif Kontrol	50 µl

SAKLAMA KOŞULLARI

- Tüm bileşenler – 20°C de ve karanlıkta saklanmalıdır.
- Tüm bileşenler, ürün kutusunun üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.
- Sürekli eritip çözdürmek, ürünün hassasiyetinde azalmalara neden olabilir.

RNA İZOLASYONU

Nazofaringial numuneler uygun steril swablarla alınıp içerisinde **SNP Viral İnaktivasyon Solüsyonu** bulunan tüplere aktarılmalıdır. Oda sıcaklığında 15 dk. Bekletildikten sonra herhangi bir RNA İzolasyon Sistemi ile Viral RNA izole edilebilir.

TEST PROSEDÜRÜ

- Nazıkçe pipetaj yaparak master miks karıştırılır.
- Bir örnek için, her optik kapaklı tüp veya strip'e, **10 µl master miks (Ready to use)** aktarılır.
- Bu tüplere **10 µl (~1-100 ng) RNA** eklenir.
- Optik kapaklar kapatılır ve aşağıda belirtilen programla test çalıştırılır.

PCR PROGRAMI*

42 °C	20 dk.	cDNA Sentezi
96 °C	25 sn.	Ön Denatürasyon
96 °C	2 sn.	45 Döngü
60 °C	35 sn.	

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

*Real Time PCR süresi **83 dk**'dir. Bu süre cihaza göre küçük farklılıklar gösterebilir.

Eğer;

- ABI Prism® sistemi kullanıyorsanız, lütfen pasif referans olarak "**none**" seçeneğini seçiniz.
- Mic qPCR Cycler kullanıyorsanız, lütfen "**Adjust Gain Settings**" kısmında **Green Auto Gain** değerini **20'** ye, **Yellow Auto Gain** değerini **10'** a ayarlayın.

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar;

ABI Prism® 7000/7300/7500/7900

Bio-Rad CFX96

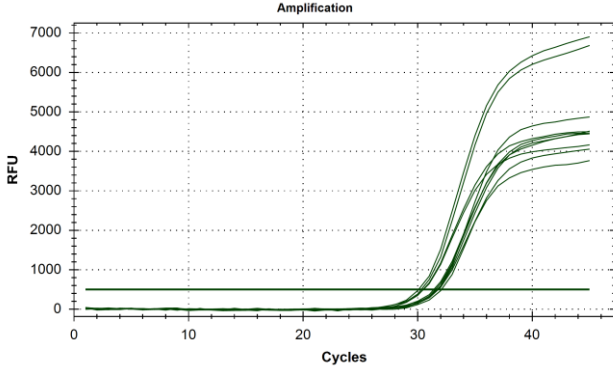
Roche LightCycler® 480 System

Rotor Gene Q

Mic qPCR Cycler

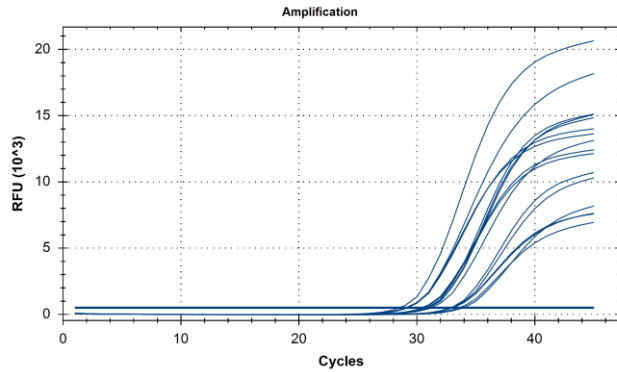
ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM ve HEX/JOE boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri CFX96 cihazına aittir.

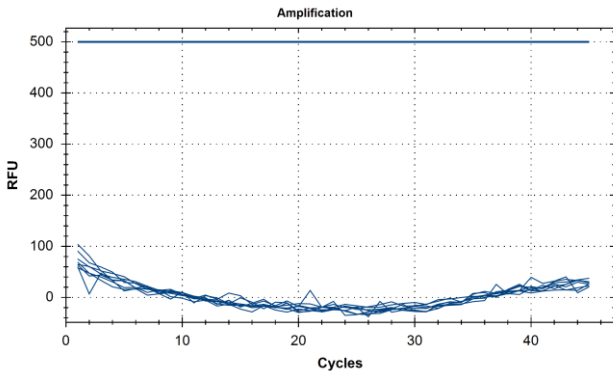


Şekil 1: Internal Kontrol Pikleri (HEX Boyası)

İnternal Kontrol pikleri HEX/JOE boyası ile analiz edilmelidir. RNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise $25 \leq ct \leq 35$ aralığında olmalıdır (Şekil 1).



Şekil 2 : COVID-19 – Pozitif Örnekler (FAM Boyası)



Şekil 3 : COVID-19 – Negatif Örnekler (FAM Boyası)

OLASI PROBLEMLER

Eğer internal kontrol çalışmıyorsa,

- Unutulmuş örnek yükleme.
- Test' te inhibitör varlığı.

Eğer pikler geç başlıyorsa,

Öncelikle örneklerinizin piklerini pozitif kontrol RNA pikleri ile karşılaştırın. Eğer pozitif kontrol RNA da bir sorun yoksa,

- Hedef RNA miktarı düşük olabilir.
- Hedef RNA saf değildir veya az miktarda inhibitör içeriyor olabilir.
- Hedef RNA eldesinde kullanılan "Elüsyon Buffer" 5 mM' dan fazla Tris-HCl içermektedir.

Lütfen sorularınız için bizimle temasa geçin. tech@snp.com.tr

UYARILAR

- Saklama koşullarına uygun olarak saklanmalıdır.
- Oda sıcaklığında unutulmuş PCR master mikserleri kullanılmamalıdır.
- PCR master miksi oda sıcaklığında tamamen eritilip, baş aşağı edilerek hafifçe karıştırıldıktan sonra tüplere bölünmelidir.
- PCR master mikserlerin raf ömrü 12 aydır. Kullanmadan önce üretim tarihine dikkat edilmelidir.
- Yalnızca in-vitro tanı amaçlı kullanılabilir.

