

Covid-19 Real Time PCR Kit V1

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 pnömoni vakasından alınan alt solunum yolu örneklerinden yapılan analizler, 2019 yeni koronavirüs (SARS-CoV-2) olarak adlandırılan yeni bir koronavirüsün varlığını gösterdi. Bu virüsün neden olduğu hastalığa ise COVID-19 denildi.

TEST SİSTEMİNİN PRENSİBİ

Test Sistemimiz, SARS-CoV-2' nin **RNA-dependent RNA polymerase geni (RdRP)** ve **Nucleocapsid protein (N)** geni bölgelerini yüksek hassasiyet ve özgüllük ile tespit eder.

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 direkt 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 ışmasını 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 problarda 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

Kit, cDNA ve 5'Nükleaz PCR yöntemine özel olarak uyarlanmış One-Step RT-PCR master miks için "Ready-to-use" formatında tüm reaktifleri sağlar. Kit, spesifik primer-prob setleri içermektedir. RdRp geni analizi için FAM, N geni analizi için Texas RED boyası kullanılmaktadır. Ayrıca, PCR reaksiyonunun doğru şekilde çalışıp çalışmadığını kontrol eden internal kontrol analizi için ise HEX/JOE boyası ile işaretli prob kullanılmaktadır. Bölgeler ve ilgili boyalar için Tablo 1'e bakınız.

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

Tablo 1: Bölgeler ve ilgili boyalar.

Tüp	Bölgeler	Boylar
Master Mix	RdRp Geni	FAM
	Nucleocapsid Geni	Texas RED
	Internal Kontrol	HEX

SİSTEM İÇERİĞİ

Bileşenler	100 Test
• Covid-19 Master Miks	1000 µl
• Pozitif Kontrol	60 µl
• Negatif Kontrol	60 µl
• Kullanma Talimatı	1

SAKLAMA KOŞULLARI

- Tüm bileşenler – 20°C de ve karanlıkta saklanmalıdır.
- Tüm bileşenler, ürün kutusunun üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.
- Sürekli eritip çözdürmek (>5X), ürünün hassasiyetinde azalmalara neden olabilir.

RNA EKSTRAKSİYONU

- İnsan nazofarengeal, orofarengeal, ön nazal ve orta konka burun çubuğu ve nazofarengeal yıkama / aspirat veya nazal aspirat örnekleri ve balgam örnekleri uygun steril pamuklu çubukla viral nakil sıvısına toplanmalıdır. Örneklerin güvenli bir şekilde taşınması için SNP İnaktivasyon ve Taşıma Solüsyonu Kiti' nin (Kat. No 23S-04) kullanılmasını öneriyoruz.
- Kit, Spin Kolonu RNA Ekstraksiyonu, Otomatik RNA Ekstraksiyonu, fenol/kloroform ve tuz çöktürme gibi RNA İzolasyon Sistemleri ile elde edilmiş örnekler için uygundur. SNP Covid-19 Real Time PCR Kit için özellikle geliştirilen SNP Viral Ekstraksiyon Kiti'nin (Kat. No 21S-04) kullanılmasını öneriyoruz.

TEST PROSEDÜRÜ

- Çalışmaya başlamadan önce eriyen master miks nazıkçe pipetaj yapılarak karıştırılır.
- Bir örnek için, her optik kapaklı tüp veya strip'e, **10 µl master miks** (Ready to use) aktarılır. Optimum sonuçlar için beyaz Real Time PCR tüp/strip/plate kullanımını tavsiye ediyoruz.
- Bu tüplere **10 µl Örnek RNA'sı** eklenir.
- Optik kapaklar kapatılır ve aşağıda belirtilen programla test çalıştırılır.

PCR PROGRAMI*

42 °C	8 dk.	cDNA Sentezi
96 °C	1 sn.	40 Döngü
60 °C	25 sn.	

Floresan boya olarak FAM, Texas RED ve HEX seçilmelidir.

* **Real Time PCR süresi 55 dk'dır.** Bu süre cihaza bağlı olarak küçük farklılıklar göstermektedir.

Eğer;

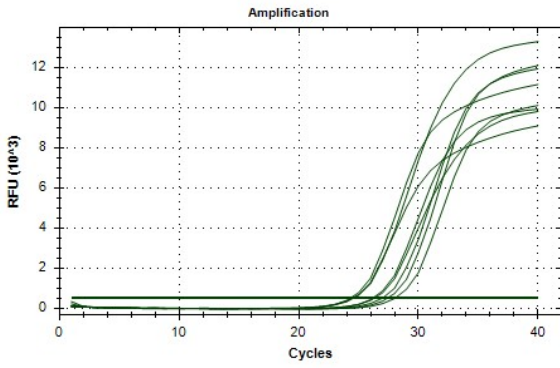
- ABI Prism® sistemi kullanıyorsanız, lütfen pasif referans olarak **"none"** seçeneğini seçiniz.
- Mic qPCR Cycler kullanıyorsanız, lütfen "Adjust Gain Settings" kısmında Green Auto Gain değerini 20' ye, Yellow Auto Gain değerini 10' a ayarlayın.

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar;

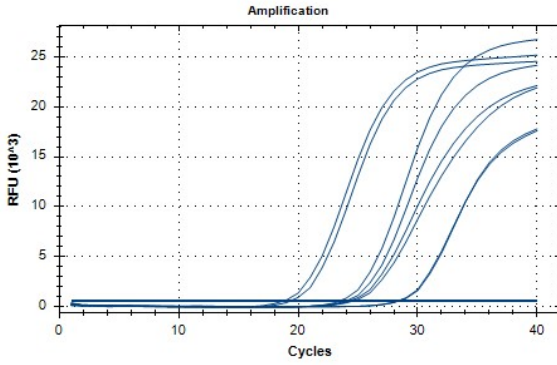
Bio-Rad CFX96
ABI 7500/7500 Fast
Rotor Gene Q
Mic qPCR Cycler
LongGene Q

ANALİZ

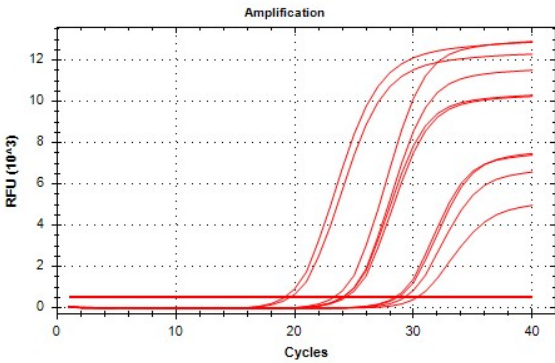
PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM, Texas RED ve HEX/JOE boyasında analiz edebilirsiniz (Tablo 2). Aşağıdaki analiz resimleri CFX96 cihazına aittir. Threshold değeri beyaz tüpler için 500, şeffaf tüpler için 50 olmalıdır. Farklı cihazlar için lütfen iletişime geçiniz (info@snp.com.tr). İnternal Kontrol pikleri HEX/JOE boyası ile analiz edilmektedir. RNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. İnternal kontrolün Ct değeri ise RNA konsantrasyonuna bağlı olarak ≤ 35 olmalıdır (Şekil 1). FAM ve/veya Texas RED boyasında her amplifikasyon için "pozitif" olarak sonuç verilmelidir (Şekil 2 ve 3). Eğer FAM ve Texas RED boyasında herhangi bir pik yoksa sonuç COVID-19 için "negatif" tir (Şekil 4). FAM ve Texas RED boyasındaki bazı görüntüler ise kontaminasyon olarak değerlendirilmelidir (Şekil 5).



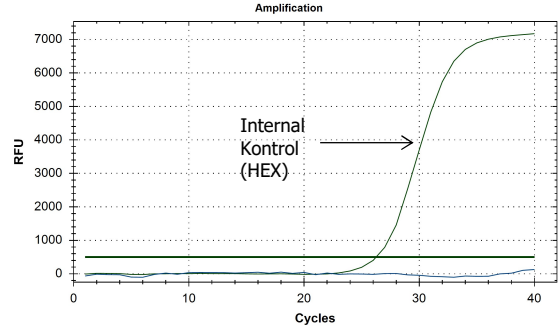
Şekil 1: İnternal Kontrol Pikleri (HEX boyası)



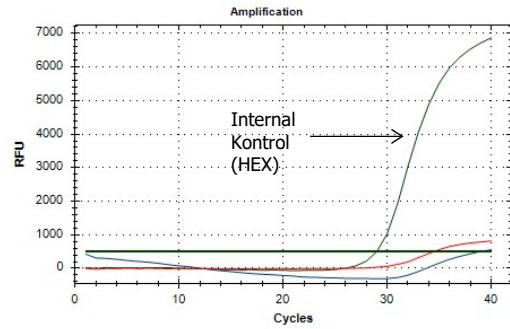
Şekil 2: SARS-CoV-2 Pozitif Örnek (FAM boyası)



Şekil 3: SARS-CoV-2 Pozitif Örnek (FAM boyası)



Şekil 4: SARS-CoV-2 Negatif Örnek



Şekil 5: FAM ve Texas RED boyasında kontaminasyon

Tablo 2: Sonuçların Değerlendirilmesi

Örnekler	İnternal Kontrol (HEX)	RdRp Geni (FAM)	N Geni (T.RED)	Sonuç	Değerlendirme
Örnek 1	+/-	+	+	SARS-Cov-2 Pozitif	Sonuç geçerli. SARS-Cov-2 RNA Tespit Edilmiştir
Örnek 2	+/-	-	+		
Örnek 3	+/-	+	-		
Örnek 4	+/-	-	-	SARS-Cov-2 Negatif	Sonuç geçerli. SARS-Cov-2 RNA Tespit Edilmemiştir
Örnek 5	+/-	-	-		
Örnek 6	+/-	-	-		
Örnek 7	-	-	-	Geçersiz Sonuç	Ekstrakte RNA'yı diliye ediniz veya ekstraksiyonu tekrarlayınız.
Örnek 8	-	-	-		

OLASI PROBLEMLER

Eğer internal kontrol çalışmıyorsa

- Unutulmuş örnek yükleme,
- Testte PCR 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 kalitesi iyi değildir. RNA örneğini 1 e 1 oranında Nuclease free su ile sulandırın.
- Hedef RNA miktarı düşük olabilir.

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

UYARILAR

- Temas halinde tahrış edici olabilir. Eldivensiz kullanmayın.
- Temas durumunda, temas edilen yeri bol su ile yıkayınız.
- Tüm bileşenler saklama koşullarına uygun olarak saklanmalıdır.
- Oda sıcaklığında unutulmuş PCR master mikşleri kullanılmamalıdır.
- PCR master mikşlerin raf ömrü 12 aydır. Kullanmadan önce üretim tarihine dikkat edilmelidir.
- Yalnızca in-vitro tanı amaçlı kullanılabilir.