

Sars Cov-2 Varyant Real Time PCR Kit V1

Kat. No: 114R-10-03

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 Sistemimiz, SARS-CoV-2' nin **RNA-dependent RNA Polymerase Geni (RdRP)** ve **Nucleocapsid Protein Geni (N)** bölgelerini yüksek hassasiyet ve özgüllük ile tespit eder.

2020 sonbaharında SARS-CoV-2 virüsünde oluşan birkaç mutasyon sonucu varyant virüsler oluştu. Dünya genelinde, İngiltere varyantı (B.1.1.7), Güney Afrika varyantı (B.1.351) ve Brezilya varyantı (B.1.1.28) olmak üzere üç önemli varyant rapor edildi. Varyant virüslerin bulaştırıcılık özellikleri yüksek olduğu için tespit edilmeleri son derece önemlidir. Bu üç varyant da **Spike Protein Geni (S)**'nde **N501Y** mutasyonunu taşımaktadır. Kitimiz ayrıca **N501Y** mutasyonunu da test ederek pozitif örneğin varyant olup olmadığını 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 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 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 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 yönetime özel olarak uyarlanmış One-Step RT-PCR master miks için "Ready-to-use" formatında tüm reaktifleri sağlar. Kit, spesifik primer-prob setleri içermektedir. Ayrıca, PCR reaksiyonunun doğru şekilde çalışıp çalışmadığını kontrol eden internal kontrol analizi için ise CY5 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
COVID-19 Master Mix	RdRp Geni	FAM
	Nucleocapsid Geni	TEXAS RED
	N501Y Mutasyonu	HEX
	İnternal Kontrol	CY5

SİSTEM İÇERİĞİ

Bileşenler	100 Test
COVID-19 Master Miks	1000 µl
SARS-CoV-2 Positive Control	60 µl
Varyant SARS-CoV-2 Positive Control	60 µl
SARS-CoV-2 Negative Control	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 çözdüremek (>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 Kiti 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 RNA** eklenir.
- Optik kapaklar kapatılır ve aşağıda belirtilen programla test çalıştırılır.

PCR PROGRAMI*

42 °C	10 dk.	cDNA Sentezi
96 °C	25 sn.	Ön denatürasyon
96 °C	2 sn.	40 Döngü
60 °C	35 sn.	

Floresan boya olarak FAM, HEX, TEXAS RED ve CY5 seçilmelidir.

* **Real Time PCR süresi 63 dk'dır.** Bu süre cihaza bağlı olarak küçük farklılıklar göstermektedir.

Eğer;

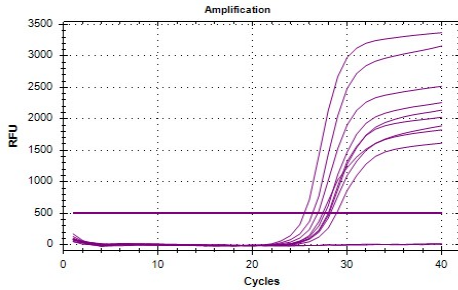
- ABI Prism® sistemi kullanıyorsanız, lütfen pasif referans olarak "none" seçeneğini seçiniz.
- Mic qPCR Cycler kullanıyorsanız, lütfen "Adjust Gain Settings" kısmında Green Auto Gain değerini 20' ye, Yellow Auto Gain değerini 10' a ayarlayın.

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar;

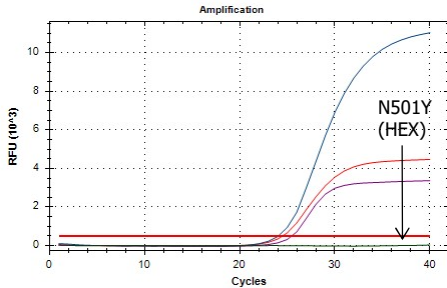
Bio-Rad CFX96
ABI 7500/7500 Fast
Rotor Gene Q
Mic qPCR Cycler
LongGene Q

ANALİZ

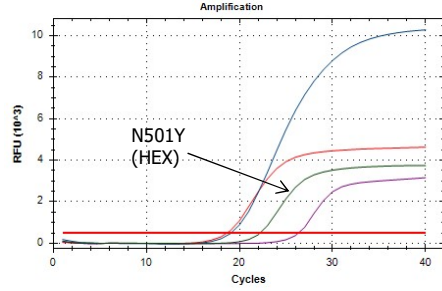
PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM, HEX, TEXAS RED ve CY5 boyasında analiz edebilirsiniz (Tablo 2). Aşağıdaki analiz resimleri CFX96 cihazına aittir. Threshold değeri beyaz tüpler için 500, şeffaf tüpler için 50 olmalıdır. Farklı cihazlar için lütfen iletişime geçiniz (info@snp.com.tr). İnternal Kontrol pikleri CY5 boyası ile analiz edilmelidir. RNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. İnternal kontrolün Ct değeri ise RNA konsantrasyonuna bağlı olarak ≤ 35 olmalıdır (Şekil 1). FAM ve TEXAS RED boyaalarında her amplifikasyon için SARS-Cov-2 "pozitif" olarak sonuç verilmelidir (Şekil 2). HEX boyasında pik varsa pozitif örnek **SARS-CoV-2 Varyant**' tır (Şekil 3). Eğer FAM, HEX ve TEXAS RED boyaalarında herhangi bir pik yoksa sonuç SARS-Cov-2 için "negatif" 'tir (Şekil 4).



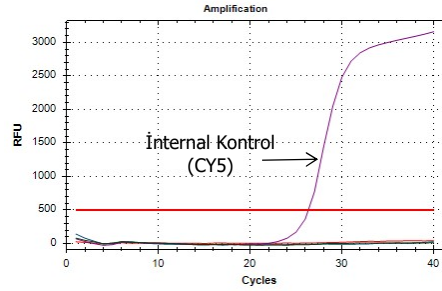
Şekil 1: İnternal Kontrol Pikleri
(CY5 boyası)



Şekil 2: SARS-CoV-2 Pozitif Örnek
(FAM, HEX, TEXAS RED ve CY5 Boyaları)



Şekil 3: "Varyant" SARS-CoV-2 Pozitif Örnek
(FAM, HEX, TEXAS RED ve CY5 Boyaları)



Şekil 4: SARS-CoV-2 Negatif Örnek
(FAM, HEX, TEXAS RED ve CY5 Boyaları)

Tablo 2: Sonuçların Değerlendirilmesi

Örnekler	İnternal Kontrol (CY5)	RdRP Geni (FAM)	N Geni (TEXAS RED)	N501Y Mutasyonu (HEX)	Sonuç	Değerlendirme
Örnek 1	+/-	+	+	+	Varyant SARS-Cov-2	Tüm sonuçlar geçerli. SARS-CoV-2 virüsü tespit edilmmiştir .
Örnek 2	+/-	-	+	+		
Örnek 3	+/-	+	-	+	SARS-Cov-2 Pozitif	
Örnek 4	+/-	+	+	-		
Örnek 5	+/-	-	+	-	SARS-Cov-2 Pozitif	
Örnek 6	+/-	+	-	-		
Örnek 7	+	-	-	-	SARS-Cov-2 Negatif	Tüm sonuçlar geçerli. SARS-CoV-2 virüsü tespit edilmemiştir .
Örnek 8	+	-	-	-		
Örnek 9	-	-	-	-	Geçersiz Sonuç	RNA'yı dilüe ediniz ya da örneği yeniden ekstrakte ediniz.

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 mikserleri kullanılmamalıdır.
- PCR master mikserlerin raf ömrü 12 aydır. Kullanmadan önce üretim tarihine dikkat edilmelidir.
- Yalnızca in-vitro tanı amaçlı kullanılabilir.