

Malzemenin Adı Name of the Material	:	SARS-CoV-2 Sentetik RNA Fragmanı
Malzemenin Kodu Reference Material Code	:	UME RM 2019
Onay Tarihi Issue Date	:	24.09.2020
Son Revizyon Tarihi Last Revision Date	:	29.04.2021 (Revizyon tarihçesi son sayfadadır)
Geçerlilik Süresi Validity Period	:	Satış tarihinden itibaren 4 ay
Atanmış Değerler Assigned Values	:	

Gen Bölgesi	Atanmış Değer ^[1] Cq	Standart Sapma ^[2] Cq
RdRp-IP2 (Fransa)	24,73	0,35
RdRp-IP4 (Fransa)	21,79	0,13
RdRp (Almanya)	20,92	0,06
E (Almanya)	19,64	0,26
N1 (ABD CDC)	21,06	0,12
N2 (ABD CDC)	22,70	0,29
Orf1ab (Çin CDC)	23,27	0,57
N (Çin CDC)	24,17	0,26
Orf1 (Hong Kong)	23,38	0,38
N (Hong Kong)	23,26	0,40
RNAse P (ABD CDC)	22,42	0,29

[1] Atanmış değer, malzemenin 1000 kat seyreltilmiş çözeltisinin üç farklı günde üç tekrarlı ($n = 9$) RT-qPCR ölçümünde elde edilen Cq değerlerinin ortalamasıdır.

[2] RT-qPCR ölçümünde elde edilen Cq değerlerinin ($n = 9$) standart sapmasıdır.

Satış Tarihi
Sales Date


Dr. Mustafa ÇETİNTAŞ
Enstitü Müdürü
Director

Atanmış Değerler

Assigned Values

:

Gen Bölgesi	Atanmış Değer ^[1] kopya/μL	Standart Sapma ^[2] kopya/μL
RdRp-IP2 (Fransa)	8,4E+07	5,4E+06
RdRp-IP4 (Fransa)	7,9E+07	4,3E+06
RdRp (Almanya)	9,1E+07	1,1E+07
E (Almanya)	6,1E+07	1,3E+06
N1 (ABD CDC)	8,7E+07	8,5E+06
N2 (ABD CDC)	7,2E+07	5,1E+06
Orf1ab (Çin CDC)	8,3E+07	2,2E+06
N (Çin CDC)	7,7E+07	6,3E+06
Orf1 (Hong Kong)	8,2E+07	4,4E+06
N (Hong Kong)	7,6E+07	5,7E+06
RNase P (ABD CDC)	8,5E+07	9,5E+06

[1] Atanmış değer, malzemenin 100.000 kat seyreltilmiş çözeltisinin iki farklı günde üç tekrarlı ($n = 6$) RT-ddPCR ölçümünde elde edilen derişimin (kopya/μL) seyreltme faktörü ile çarpımından elde edilen ana stok değerlerinin ortalamasıdır.

[2] RT-ddPCR ölçümünde elde edilen derişim (kopya/μL) değerlerinin ($n = 6$) standart sapmasıdır.

Tanımlama

Description

SARS-CoV-2 Sentetik RNA Fragmanı (UME RM 2019), SARS-CoV-2 virüsünün, bilimsel literatürde en çok rastlanan Ters Transkripsiyon Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-qPCR) ve Ters Transkripsiyon Sayısal Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-dPCR) ölçüm protokollerinde kullanılan gen fragmanlarını içermektedir (Ek 1). Malzeme, 10 farklı SARS-CoV-2 gen fragmanı ve insan RNase P gen fragmanı içeren 1079 baz uzunluğunda tek iplikli sentetik RNA'dan oluşmaktadır (Ek 2). Malzeme, oluşturulan yapının plazmit içerisine klonlanması, plazmidin restriksiyon enzim ile kesimi sonrası *in vitro* transkripsiyonu ile elde edilmiştir. Malzemenin dizisi, ters transkripsiyon sonrası Sanger Dizileme yöntemi ile doğrulanmış ve Gen Bankası'na MW001217 erişim numarası ile kaydedilmiştir.

Malzeme, 2,5 ng/μL toplam insan kontrol RNA'sı (Thermo Fisher 4307281) eklenmiş 1 mM sodyum sitrat tamponu (pH: 6,5) içerisinde sıvı formda 100 μL hacimde doldurulmuş ve dondurularak satışa sunulmuştur. Malzeme, Qubit RNA floresan ölçümüne göre yaklaşık 10^8 kopya/μL SARS-CoV-2 sentetik RNA fragmanı içermektedir.

Üniteler arasındaki homojenlik testinde bağıl standart sapma %0,4 bulunduğundan malzemenin kullanım amacına uygun yeterli homojenliğe sahip olduğu gösterilmiştir.

Malzemenin taşıma koşullarındaki kararlılığı -20 °C sıcaklıkta 16 gün süreyle ve saklama koşullarındaki kararlılığı ise -20 °C sıcaklıkta dört ay süreyle test edilmiş ve herhangi bir bozunma eğilimi gözlenmemiştir.

Malzeme satışta olduğu sürece kararlılık kontrolleri yapılarak kararsızlık durumunda müşteriler bilgilendirilecektir.

Bu bilgi formu, TÜBİTAK UME'nin yazılı izni olmadan kısmen kopyalanıp çoğaltılamaz. İmzasız ve mühürsüz bilgi formu geçersizdir.
This data sheet shall not be reproduced other than in full except with the permission of TÜBİTAK UME. Data sheet without signature and seal is not valid.

Kullanım Amacı

Intended Use

Malzeme, COVID-19 hastalığı etkeni SARS-CoV-2 virüsünün, ters transkripsiyon basamağından itibaren, RT-qPCR ve RT-dPCR yöntemleri ile ölçülmesinde pozitif kalite kontrol malzemesi olarak kullanıma uygundur.

UME RM 2019, sertifikalı referans malzeme değildir.

Kullanım Talimatları

Instructions for Use

Malzeme, -20 °C ve altındaki sıcaklıklarda nakliye süresinin iki haftayı geçmemesi koşuluyla taşınabilir.

Malzeme, buz üzerinde eritilmesinden hemen sonra nükleaz (RNaz ve DNaz) içermeyen saf su ile seri olarak 1000 kat veya istenilen farklı bir oranda seyreltilip tüplere bölünerek -70 °C veya daha düşük sıcaklıkta saklanmalıdır. Tüm seyreltme işlemleri buz üzerinde yapılmalıdır.

Seyreltilerek dondurulmuş malzeme, her bir deney için buz üzerinde eritilmeli ve PCR tüpüne eklenene kadar buz üzerinde tutulmalıdır. Tüp içerisinde kalan malzeme tekrar kullanılmamalıdır.

Seyreltimi yapılan referans malzemedен her bir RT-qPCR veya RT-dPCR için en az 5 µL hacimde kullanılmalıdır.

Malzemenin 1000 kat seyreltimi ile 100 µL hacimde 1000 adet tüp elde edilebilmektedir. Her bir RT-qPCR veya RT-dPCR için 5 µL kullanıldığında bu referans malzeme ile 20000 RT-qPCR veya RT-dPCR gerçekleştirilebilmektedir.

Referans malzemenin seyreltimi ile ilgili daha fazla bilgi, ürün gönderimi bilgilendirmesine ek olarak paylaşılmaktadır.

Saklama Koşulları

Storage Conditions

Malzeme, -20 °C veya daha düşük sıcaklıklarda saklanmalıdır.

Malzemenin seyreltilmesinden sonra -70 °C veya daha düşük sıcaklıkta saklanması önerilmektedir.

TÜBİTAK UME malzeme ile ilgili bildirdiği saklama koşulları ve kullanım talimatına uyulmaması nedeniyle malzemedе meydana gelebilecek değişikliklerden sorumlu tutulamaz.

Güvenlik Uyarıları

Safety Information

UME RM 2019, SARS-CoV-2 virüsünün küçük gen fragmanlarını içermekte olup *in vitro* koşullarda (deney tüpünde) üretilmiştir. Malzeme, canlı virüs içermediğinden enfeksiyöz özelliği bulunmamaktadır.

Normal laboratuvar önlemleri uygulanır. Malzemenin mevcut olan güvenlik kurallarına göre kullanımı ve atılması önemle tavsiye edilir.

Lütfen, kullanımdan önce Güvenlik Bilgi Formu'nu okuyunuz.

Katılımcılar

Participants

Malzemenin hazırlama ve ölçüm çalışmalarının gerçekleştirildiği laboratuvara ait bilgiler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Laboratuvar Adı	Adresi
TÜBİTAK UME	TÜBİTAK Gebze Yerleşkesi, Barış Mah. Dr. Zeki Acar Cad. No.1 41470 Gebze - Kocaeli, Türkiye

Atanmış Değerin Belirlenmesinde Kullanılan Teknikler

Techniques Used for the Determination of the Assigned Values

Gen bölgelerinin RT-qPCR ölçümleri Roche LightCycler® 480 Real Time PCR cihazı ve SensiFAST™ No-ROX One-Step Kiti (Meridian Bioscience BIO-76001) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tek aşamalı RT-qPCR koşulları: Ters transkripsiyon 45 °C 10 dakika (RdRp-Almanya: 30 dakika); enzim aktivasyonu 95 °C 5 dakika (RdRp-Almanya: 15 dakika); denatürasyon 95 °C 15 s; amplifikasyon 58 °C 45 s ve toplamda 50 döngüdür.

Malzemenin içerdiği gen bölgeleri için belirlenen Cq değerleri, kullanım talimatında belirtildiği şekilde 1000 kat seyreltilerek hazırlanan malzemenin RT-qPCR metodu ile üç gün ve üç tekrarlı ölçümleri sonucunda elde edilmiştir. Her bir gen için elde edilen Cq değerleri ($n = 9$) kullanılarak standart sapmaları hesaplanmış ve atanmış değerler ile birlikte verilmiştir. Primer ve prob dizilimleri ve bilgileri Ek 1'de verilmektedir.

Malzemenin derişimi (kopya/ μ L) ise Ters Transkripsiyon Damlacıklı Sayısal Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-ddPCR) metodu kullanılarak farklı gen bölgelerinin yapılan ölçümleri sonucunda elde edilmiştir. RT-ddPCR ölçümleri QX200 BioRad PCR cihazı ve One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes (BioRad, 1864021) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RT-ddPCR koşulları: Ters transkripsiyon 50 °C 60 dakika; enzim aktivasyonu 95 °C 10 dakika; denatürasyon 95 °C 30 s; amplifikasyon 58 °C 1 dakika (E-Almanya ve N-Çin 61 °C 1 dakika); enzim inaktivasyonu 98 °C 10 dakika ve toplamda 40 döngüdür. Tüm RT-ddPCR ölçümlerinde çift sönümleyici özellikte olan ZEN-IBFQ yapılı problemler kullanılmıştır (Ek 1). Gravimetrik seri seyreltim ile 100000 kat seyreltilerek hazırlanan malzemenin derişimi, iki gün üç tekrarlı ölçüm sonucunun seyreltim faktörü ile çarpılmasıyla elde edilmiştir. Malzemenin içerdiği her bir gen için belirlenen derişim değerleri (kopya/ μ L, $n = 6$) kullanılarak standart sapmalar hesaplanmış ve atanmış değerler ile birlikte verilmiştir.

Belirtilen değerler sertifikalandırılmış değerler olmayıp sadece referans malzemenin içeriği hakkında bilgi vermektedir.

Referans malzemenin hazırlanması ve değer ataması hakkında daha ayrıntılı bilgi makalede verilmiştir [6].

Sayfa 5 / 7 Page	TÜBİTAK ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ	UME RM 2019
---------------------	---	------------------------------

Revizyon Tarihçesi

Revision History

Tarih	Açıklama
24.09.2020	İlk yayın.
11.11.2020	RdRp (Almanya) gen fragmanı analizi için düzeltilmiş ters primer dizisi ve yeni prob ile atanmış değer değiştirildi. Ek 1'de yer alan RdRp (Almanya) gen fragmanı analizi için ters primer dizisi ve prob boyası bilgisi değiştirildi. Cihaz modeli, kit bilgisi ve RT-qPCR koşulları ile ilgili bilgiler eklendi. Kaynaklar bölümündeki [2] numaralı referans düzeltildi ve makale ile ilgili bilgi eklendi.
29.04.2021	Malzeme Bilgi Formu'nun geçerlilik süresi satıştan sonra 4 ay olarak güncellendi. RT-ddPCR metodu kullanılarak yapılan ölçümler sonucunda elde edilen derişim (kopya/ μ L) ve ilgili standart sapma değerleri eklendi. Tanımlama kısmına Qubit RNA floresan ölçümü ifadesi ve uzun dönem kararlılık testi ile ilgili bilgiler eklendi. "Atanmış Değerin Belirlenmesinde Kullanılan Teknikler" bölümüne RT-ddPCR deney protokolü eklendi. Kullanım talimatlarına seyreltim ile ilgili not eklendi. Referans Malzeme hakkında ayrıntılı bilgi içeren makale bilgisi eklendi.

Bu bilgi formu, TÜBİTAK UME'nin yazılı izni olmadan kısmen kopyalanıp çoğaltılamaz. İmzasız ve mühürsüz bilgi formu geçersizdir.
This data sheet shall not be reproduced other than in full except with the permission of TÜBİTAK UME. Data sheet without signature and seal is not valid.

TÜBİTAK Gebze Yerleşkesi PK 54 41470 Gebze-Kocaeli /TÜRKİYE T +90 262 679 50 00 F +90 262 679 50 01 www.ume.tubitak.gov.tr

FRM-07-U-10-04/Rev. 1/19.06.2018

Ek 1. SARS-CoV-2 sentetik RNA fragmanı üretiminde kullanılan hedef gen bölgeleri ve RT-qPCR ölçümlerinde kullanılan primer ve prob dizi ve içerik bilgileri. Tüm RT-ddPCR ölçümlerinde çift sönümleyici özellikte olan ZEN-IBFQ yapıları kullanılmıştır.

Gen Bölgesi	Primer ve Prob Dizileri	Modifikasyon	Referans
RdRp-IP2 (Fransa)	F-ATGAGCTTAGTCCTGTTG R-CTCCCTTTGTTGTGTTGT P-AGATGTCTTGTGCTGCCGGTA	HEX-BHQ-1	[1]
RdRp-IP4 (Fransa)	F-GGTAACCTGGTATGATTTTCG R-CTGGTCAAGGTTAATATAGG P-TCATACAAACCACGCCAGG	FAM-BHQ-1	[1]
RdRp (Almanya)	F-GTGARATGGTCATGTGTGGCGG R-CARATGTTAAARACACTATTAGCATA P-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC	FAM-ZEN-IBFQ	[2]*
E (Almanya)	F-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT R-ATATTGCAGCAGTACGCACACA P-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG	FAM-ZEN-IBFQ	[2]
N1 (ABD CDC)	F-GACCCCAAATCAGCGAAAT R-TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG P-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC	FAM-ZEN-IBFQ	[3]
N2 (ABD CDC)	F-TTACAAACATTGGCCGCAAA R-GCGCGACATTCCGAAGAA P-ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG	FAM-ZEN-IBFQ	[3]
Orf1ab (Çin CDC)	F-CCCTGTGGGTTTTACTTAA R-ACGATTGTGCATCAGCTGA P-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG	FAM-BHQ-1	[4]
N (Çin CDC)	F-GGGGAACCTTCTCCTGCTAGAAT R-CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG P-TTGCTGCTGCTTGACAGATT	FAM-BHQ-1	[4]
Orf1 (Hong Kong)	F-TGGGGYTTTACRGGTAACCT R-AACRCGCTTAACAAAGCACTC P-TAGTTGTGATGCWATCATGACTAG	FAM-BHQ-1	[5]
N (Hong Kong)	F-TAATCAGACAAGGAACTGATTA R-CGAAGGTGTGACTTCCATG P-GCAAATTGTGCAATTTGCCG	FAM-BHQ-1	[5]
RNase P (ABD CDC)	F-AGATTTGGACCTGCGAGCG R-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT P-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG	HEX-BHQ-1	[3]

Bu bilgi formu, TÜBİTAK UME'nin yazılı izni olmadan kısmen kopyalanıp çoğaltılamaz. İmzasız ve mühürsüz bilgi formu geçersizdir.
This data sheet shall not be reproduced other than in full except with the permission of TÜBİTAK UME. Data sheet without signature and seal is not valid.

Ek 2. SARS-CoV-2 Sentetik RNA Fragmanı Baz Dizilimi

GGGAGAAUGAGCUUAGUCCUGUUGCACUACGACAGAUGUCUUGUGCGCCGGUACUACACAAACUGCUUG
CACUGAUGACAAUGCGUUAGCUUACUACAACAACAAGGGAGGUGACCCUGUGGGUUUUACACUUAAA
AACACAGUCUGUACCGUCUGCGGUAUGUGGAAAGGUUAUGGCUGUAGUUGUGAUCAACUCCGCGAACCCA
UGCUUCAGUCAGCUGAUGCACAAUCGUUUUUGGUAACUGGUAUGAUUUUCGGUGAUUUUCAUACAAACCACG
CCAGGUAGUGGAGUUCUGUUGUAGAUUCUUAUUAUUAUUGUUAUUGCCUAUAUUAACCUUGACCAGGG
GAGUGAAAUGGUCAUGUGUGGGCGGUUCACUAUAUGUUAACCAGGUGGAACCUCAUCAGGAGAUGCCACA
ACUGCUUAUGCUAAUAGUGUUUUUAACAUUUGUCAUUGGGGUUUUACAGGUAACCUACAAAGCAACCAUG
AUCUGUAUUGUCAAGUCCAUGGUAUUGCACAUGUAGCUAGUUGUGAUGCAAUCAUGACUAGGUGUCUAGC
UGUCCACGAGUCUUGUUAAGCGUGUUAAGACAGGUACGUUAAUAGUUAUAGCGUACUUCUUUUUCU
UGCUUUCGUGUAUUCUUGCUAGUUAACUAGCCAUCCUACUGCGCUUCGAUUGUGUGCGUACUGCUGC
AAUUAUUGUGGACCCCAAAAUCAGCGAAAUGCACCCCGCAUUAUGUUGGUGGACCCUCAGAUUCAACUGG
CAGUAACCAGAAUUGGGGAACUUCUCCUGCUAGAAUGGCUGGCAAUGGCGGUGAUGCUGCUUCUUGCUUU
GCUGCUGCUUGACAGAUUGAACCAGCUUGAGAGCAAAAUGUCUGGUACUAAUCAGACAAGGAACUGAUUA
CAAACAUUGGCCGCAAUUGCACA AUUUGCCCCAGCGCUUCAGCGUUCUUCGGAUUGUCGCGCAUUGGC
AUGGAAGUCACACCUUCGUCGAGCCGGGAGAUUUGGACCUGCGAGCGGGUUCUGACCUGAAGGCUCUGC
GCGGACUUGUGGAGACAGCCGCUCGGAUC

Kaynaklar

[1] "Protocol: Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2", Pasteur Enstitüsü, Paris, Fransa: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf>

[2] Corman V. M. et al., "Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCov) by real-time RT-PCR", Euro Surveill. 2020, 25(3), 1-8, doi: [10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045).

*Makale düzeltmesi: "Editöre mektup: SARS-CoV-2 detection by real-time RT-PCR" vol: 25, 2000880, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7268274/>

[3] "2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes", Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA, ABD, 2020.06.24: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>

[4] "Real-Time Fluorescence-based Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) assay of the 2019-nCoV Nucleic Acid", Chinese Center for Disease Control and Prevention: doi: [10.46234/ccdcw2020.085.2020.03.13](https://doi.org/10.46234/ccdcw2020.085.2020.03.13)

[5] Leo Poon, Daniel Chu and Malik Peiris, "Protocol: Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases by RT-PCR", School of Public Health, The University of Hong Kong, Hong Kong: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf?sfvrsn=de3a76aa_2

[6] Akyurek, S., Demirci, S.N.S., Bayrak, Z. et al. The production and characterization of SARS-CoV-2 RNA reference material. Anal Bioanal Chem (2021). <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03284-w>