

Referans Malzeme Bilgi Formu  
Reference Material Data Sheet

<b>Malzemenin Adı</b> Name of the Material	:	Liyofilize SARS-CoV-2 Sentetik RNA Fragmanı
<b>Malzemenin Kodu</b> Reference Material Code	:	UME RM 2020
<b>Onay Tarihi</b> Issue Date	:	24.09.2020
<b>Son Revizyon Tarihi</b> Last Revision Date	:	29.04.2021 (Revizyon tarihçesi son sayfadadır)
<b>Geçerlilik Süresi</b> Validity Period	:	Satış tarihinden itibaren 4 ay
<b>Atanmış Değerler</b> Assigned Values	:	

Gen Bölgesi	Atanmış Değer <sup>[1]</sup> Cq	Standart Sapma <sup>[2]</sup> Cq
RdRp-IP2 (Fransa)	24,38	0,35
RdRp-IP4 (Fransa)	21,72	0,12
RdRp (Almanya)	21,70	0,87
E (Almanya)	19,33	0,10
N1 (ABD CDC)	20,81	0,19
N2 (ABD CDC)	22,03	0,19
Orf1ab (Çin CDC)	22,55	0,40
N (Çin CDC)	23,61	0,33
Orf1 (Hong Kong)	22,81	0,23
N (Hong Kong)	22,96	0,12
RNAse P (ABD CDC)	22,01	0,04

[1] Atanmış değer, liyofilize malzemenin sulandırılması ve 1000 kat seyreltilmiş çözeltisinin iki farklı günde üç tekrarlı ( $n = 6$ ) RT-qPCR ölçümünde elde edilen Cq değerlerinin ortalamasıdır.

[2] RT-qPCR ölçümünde elde edilen Cq değerlerinin ( $n = 6$ ) standart sapmasıdır.

**Satış Tarihi**  
Sales Date

  
**Dr. Mustafa ÇETİNTAŞ**  
Enstitü Müdürü  
Director

## **Tanımlama**

### *Description*

Liyofilize SARS-CoV-2 Sentetik RNA Fragmanı (UME RM 2020), SARS-CoV-2 virüsünün, bilimsel literatürde en çok rastlanan Ters Transkripsiyon Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-qPCR) 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 liyofilize edilerek satışa sunulmuştur. Liyofilize malzeme, Qubit RNA floresan ölçümüne göre yaklaşık  $10^{10}$  kopya 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 +4 °C, +25 °C ve +45 °C sıcaklıklarda 17 gün süreyle ve saklama koşullarındaki kararlılığı ise -20 °C, +4 °C ve +25 °C sıcaklıkta dört ay süreyle test edilmiş ve herhangi bir bozunma eğilimi gözlenmemiştir.

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

## **Kullanım Amacı**

### *Intended Use*

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

UME RM 2020, sertifikalı referans malzeme değildir.

## **Kullanım Talimatları**

### *Instructions for Use*

Malzeme, +45 °C ve altındaki ortam sıcaklığında nakliye süresinin iki haftayı geçmemesi koşuluyla taşınabilir.

Malzeme, liyofilize formda olduğundan sulandırma işlemi öncesi santrifüj edilmeli ve malzemeye buz üzerinde 100 µL nükleaz (RNaz ve DNaz) içermeyen saf su eklenmelidir. RNA, tüpün iç çeperlerine yapışmış olabileceğinden tüpün iç çeperleri mikropipet ile beş defa al-ver yapılarak yıkanmalı ve sonrasında tüm sıvı santrifüjlenerek tüp tabanında toplanmalıdır.

Malzeme, sulandırma işleminden 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.

Sayfa 3 / 6 Page	<b>TÜBİTAK</b> <b>ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ</b>	<b>UME RM</b> <b>2020</b>
---------------------	---	------------------------------

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 malzemeden 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*

Liyofilize malzeme, +25 °C veya daha düşük sıcaklıklarda saklanmalıdır.

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

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

### **Güvenlik Uyarıları**

#### *Safety Information*

UME RM 2020, 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.

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

**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.*

### 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 iki gün ve üç tekrarlı ölçümleri sonucunda elde edilmiştir. Her bir gen için elde edilen Cq değerleri ( $n = 6$ ) kullanılarak standart sapmaları hesaplanmış ve atanmış değerler ile birlikte verilmiştir. Primer ve prob dizimleri ve bilgileri Ek1'de verilmektedir.

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].

### 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 referansa düzeltme ve makale ile ilgili bilgi eklendi.
29.04.2021	Malzeme Bilgi Formu'nun geçerlilik süresi satıştan sonra 4 ay olarak güncellendi. Saklama koşulları altında liyofilize malzemenin saklama sıcaklığı +25 °C veya daha düşük sıcaklıklar olarak güncellendi. RT-qPCR metodu kullanılarak bir set ölçüm daha yapılarak Atanmış Değerler tablosu ve "Atanmış Değerin Belirlenmesinde Kullanılan Teknikler" bölümü güncellendi. Tanımlama kısmına Qubit RNA floresan ölçümü ifadesi ve uzun dönem kararlılık sonuçları eklendi. Kullanım talimatlarına seyreltim ile ilgili not eklendi. Referans Malzeme hakkında ayrıntılı bilgi içeren makale bilgisi eklendi.

**Ek 1.** Liyofilize SARS-CoV-2 sentetik RNA fragmanı üretiminde kullanılan hedef gen bölgeleri, ve RT-qPCR ölçümlerinde kullanılan primer ve prob dizi ve içerik bilgileri

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

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

GGGAGAAUGAGCUUAGUCCUGUUGCACUACGACAGAUGUCUUGUGCGCCGGUACUACACAAACUGCUUG  
CACUGAUGACAAUGCGUUAGCUUACUACAACACAACAAAGGGAGGUGACCCUGUGGGUUUUACACUUAAA  
AACACAGUCUGUACCGUCUGCGGUAUGUGGAAAGGUUAUGGCUGUAGUUGUGAUAACUCCGCGAACCCA  
UGCUCAGUCAGCUGAUGCACAAUCGUUUUUGGUAACUGGUAUGAUUUUCGGUGAUUUUCAUACAAACCACG  
CCAGGUAGUGGAGUUCUGUUGUAGAUUCUUAUUUAUUCUUGUUAUUGCCUAUAUUAACCUUGACCAGGG  
GAGUGAAAUGGUCAUGUGUGGCGGUUCACUAUAUGUUAUAAACCAGGUGGAACCUCAUCAGGAGAUGCCACA  
ACUGCUUAUGCUAAUAGUGUUUUUAACAUUUGUCAUUGGGGUUUUACAGGUAACCUACAAGCAACCAUG  
AUCUGUAUUGUCAAGUCCAUGGUAUUGCACAUGUAGCUAGUUGUGAUGCAAUCAUGACUAGGUGUCUAGC  
UGUCCACGAGUCUUGUUAAGCGUGUUGAAGACAGGUACGUUAAUAGUUAUAGCGUACUUCUUUUUCU  
UGCUCUGGUAUUCUUGCUAGUUAACUAGCCAUCUACUGCGCUUCGAUUGUGUGCGUACUGCUGC  
AAUAUUGUGGACCCCAAAAUCAGCGAAAUGCACCCCGCAUUACGUUUGGUGGACCCUCAGAUUCAACUGG  
CAGUAACCAGAAUUAGGGGAACUUCUCCUGCUAGAAUGGCUGGCAAUGGCGGUGAUGCUGCUUCUUGCUUU  
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](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>