



Instructions for life science research use only. Not tested for use in diagnostic procedures. For *in vitro* use only.



Instructions For Use

VirSNIp SARS-CoV-2 Spike N501Y

530

Cat.-No. 53-0780-96

Roche SAP n° 09 405 577 001

Kit with reagents for 96 PCR reactions 20 µl for genotyping of SARS-CoV-2 RNA [lyophilized]

1. Content, Storage and Expiry

- 1 Vial yellow cap 96 reactions SARS CoV (lyophilized)
1 Mixed positive control 501N/Y, wt/69,70del, 681P/H

Storage at Arrival:

Store cooled or at ambient temperature
Do not freeze the lyophilized reagents.

- Kits are stable for one year after production (store 4°C to 25°C in the dark). See lot-specific expiry date.
• Reconstituted reagents are stable for two weeks if stored protected from light and cooled (2°C to 8°C).
• Dissolved reagent can be stored long-term if frozen (-15°C to -25°C). Avoid multiple freeze-thaw cycles.
• Reconstituted positive controls must be stored frozen. Minimize freeze-thaw cycles.

2. Additional Reagents required

LightCycler® Multiplex RNA Virus Master

Cat.-No. 06 754 155 001

3. Introduction

The SARS-CoV-2 genome was published 11.1.20 (Genbank MN908947). Hundreds of thousand isolates have been sequenced. The UK\* strain VUI-202012/01 is reported to be more contagious. Spike protein variants del69/70, del144, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A and D1118H are marker for this cluster.

Table with 8 columns: Spike Prot. Variation, Genetic Variation, UK\* B.1.1.7, ZA 501.V2, Nigeria, DK mink V, Function, Effect, Assay. Rows include various mutations like del HV69/70, K417N, N439K, Y453F, E484K, N501Y, D614G, P681H, V1176F.

4. Description

A 130 bp long fragment is amplified and analyzed running a 501Y-specific probe-based melting curve. The amplification of isolates containing the 501N variant is not visible.

5. Specification

Sensitivity better than 50 copies viral RNA UK strain B.1.1.7 (50% signal compared to 4,000 copies).

6. Sample Material and Extraction

Coronaviruses affect normally the lower respiratory system, but SARS-CoV-2 is found also in nose and throat. Typical clinical samples are throat and nasopharyngeal swabs, sputum, saliva or gargle solution. Product tested with heat-treated gargle solution. For RNA extraction see manufacturer's kit instructions.

7. Material Safety Data (MSDS)

This product is not hazardous (according to regulation (EC) No 1272/2008), not toxic, not IATA-restricted. Not from human, animal or plant origin. Product contains synthetic oligonucleotide primers and probes.

According to OSHA 29CFR1910.1200, Australia [NOHSC:1005, 1008 (1999)] and EU Directives (EC) No 1907/2006 and (EC) No 2015/830 any products which do not contain more than 1% of a component classified as hazardous or classified as carcinogenic do not require a MSDS.



## 8. Instructions for Use

Instruction for Roche 480 instruments. Capillary LightCycler®, LightCycler® 96, MyGo and BioRad CFX96 instruments give similar results. For other instruments use the SYBR Green melting option.

### 8.1. Programming Roche 480 Instruments

**Detection Format 530 Channel**      **Set Quant Factor 10, Max Integration Time 1 sec**

LightCycler® 480 Instrument: 483-533

LightCycler® 480 II Instrument: 465-510

cobas z 480 Analyzer (open channel): 465-510

Program Step:	RT Step	Denaturation	Cycling			Cooling
<b>Parameter</b>						
Analysis Mode	None	None	Quantification mode			None
Cycles	1	1	45			1
Target [°C]	55	95	95	60	72	40
Hold [hh:mm:ss]	00:05:00	00:05:00	00:00:05	00:00:15	00:00:15	00:00:30
Ramp Rate [°C/s] <b>96</b>	4.4	4.4	4.4	2.2	4.4	1.5
Ramp Rate [°C/s] <b>384</b>	4.6	4.6	4.6	2.4	4.6	2.0
Acquisition Mode	None	None	None	Single	None	None

Table 1

#### 8.1.1. Melting Analysis (may be added or programmed as second run)

**Detection Format**      Hydrolysis Probe or SimpleProbe

LightCycler® 480 Instrument: 483-533

LightCycler® 480 II Instrument: 465-510

cobas z 480 Analyzer (open channel): 465-510

Program Step:	Melting			Cooling
<b>Parameter</b>				
Analysis Mode	Melting Curves mode			None
Cycles	1			
Target [°C]	95	40	75	40
Hold [hh:mm:ss]	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate [°C/s]	4.4	1,5	-	1.5
Acquisition Mode	-	-	Continuous	2.0
Acquisitions [per °C]	-	-	3*	None

Table 2

\* Melting slope shall be 0.19 to 0.29°C per second. If reading more channels reduce the number of acquisitions/sec.

## 8.2. Experimental Protocol

- **Sample material:** Use aqueous nucleic acid preparations
- **Negative control:** Always run at least one no-template control (NTC) - replace the template NA with water.
- **Positive control:** Run a positive control - replace the template NA with the provided Positive Control.

For an increased sensitivity use 10 µl nucleic acid per 20 µl reaction.

Product tested for 10 µl reaction volume (192 reactions).

### 8.2.1. Preparation of Parameter-Specific Reagents (PSR, 96 reactions):

The reagent vial with an **yellow** cap contains the primers and probe to run 96+ PCR reactions.

**Check for the orange pellet**, then **add 50 µl** PCR-grade water, mix (vortex) and spin down. For robotic pipetting the volume can be extended to 55 µl (signals will decrease by 10-20%).

► **Use 0.5 µl** reagent per 20 µl PCR reaction.

## 8.2.2. Preparation of the Positive Control

Add **160 µl** PCR-grade water the vial with the **black** cap, if using 10 µl sample volume add **320 µl**. Mix by pipetting up and down 10 times. If vortexing spin down to collect the solution. Store dissolved controls frozen.

**Notes:** Opening this vial may cause contamination of the workspace. Pulse spin vial prior to opening.

► Use **5 µl** positive control (≈ Cp 27-30) for a 20 µl PCR reaction (10 µl if using 10 µl sample volume).

## 8.2.3. Preparation of the Reaction Mix

Multiply volumes by the number of reactions plus controls and one reserve, prepare in a cooled tube:

For use with the Roche LightCycler® Multiplex RNA Virus Master		
for 5 µl extract	Component	10 µl extract
10.4 µl	<b>Water</b> , PCR-grade (colorless cap, provided with the Roche Master kit)	5.4 µl
0.5 µl	<b>Reagent</b> mix (parameter specific reagents containing primers and probes)	0.5 µl
--	Control Reaction and additional assays (Multiplex PCR)	--
4.0 µl	<b>Roche Master</b> (see Roche manual)	4.0 µl
0.1 µl	<b>RT Enzyme</b> (see Roche manual)	0.1 µl
<b>15.0 µl</b>	<b>Volume of Reaction Mix</b>	<b>10.0 µl</b>

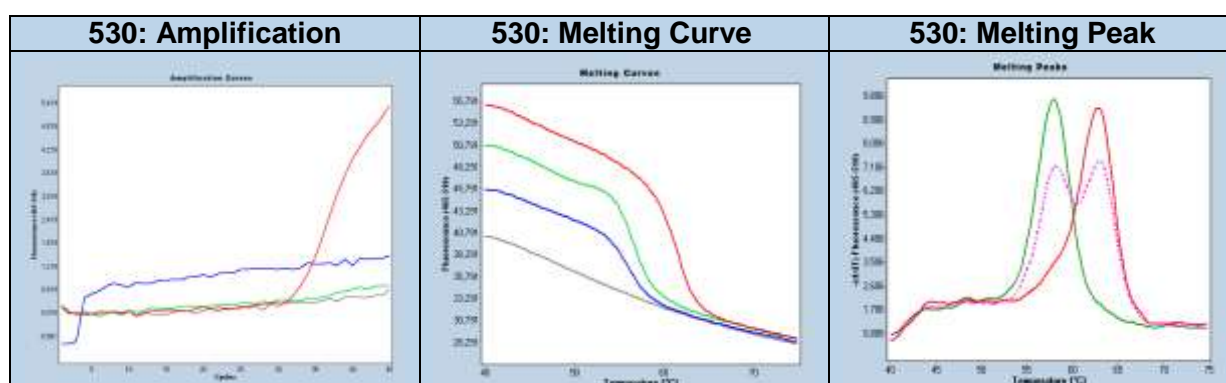
Table 3

Mix gently, spin down and **transfer 15 µl (10 µl)** per well.

Add **5 µl (10 µl)** of sample or control to each well for a final reaction volume of 20 µl. Seal plate and centrifuge.

**Start run**

## 9. Typical Results



**Figure 1.** Blue SARS RNA, Green 501N, Red 501Y, Pink pos control **Left** Only 501Y visible in the amplification. **Center** Melting curves. **Right** 501N has a melting temperature of 56.5 (± 2)°C, 501Y has a Tm of 61.2 (± 2)°C.

## 10. Reading the Results

We recommend using the Second Derivative Maximum method (Automated (F'' max)). View results in the 530 channel. The negative control (NTC) must show no signal. For the melting curve analysis use 'Tm calling'.

Channel 530 Amplification	Channel 530 Melting analysis	Channel 530 NTC Control	Result
Not relevant	Not relevant	Negative / no peak	No virus amplified / not detectable
Invisible	Tm ~ 56.5°C	Negative	SARS Spike 501N (not the UK variant)
Visible	Tm ~ 61.2°C	Negative	SARS Spike 501Y (UK or ZA variant)
Not relevant	Not relevant	Positive	Contamination Repeat experiment

## 11. References

Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. Rambaut et al., 2020

[www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-brief-rapid-increase-sars-cov-2-variant-united-kingdom](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-brief-rapid-increase-sars-cov-2-variant-united-kingdom)

The circulating SARS-CoV-2 spike variant N439K maintains fitness while evading antibody-mediated immunity. Thomson et al., 2020


Mutations in SARS-CoV-2 spike protein and RNA polymerase complex are associated with COVID-19 mortality risk. Hahn et al., 2020

## 12. Multiplex PCR Compatibility Respiratory Virus Panel

- no tested -

## 13. Version History

V201222	Release version	2020-12-22
V201227	Mutation table, references added, DOM	2020-12-27
V210101	1. Content / 8.2.2 Positive control included, 5. Sensitivity range	2020-12-31

<b>Certificate of Analysis (CoA)</b>						
Lot n° 4994						
Expiry : YYYY-MM-DD						
	501N	501Y	wtRNA	Cp range	PC	passed
<b>Tm range Measured</b>	55-57°C	60-62°C	55-57°C		27-30	✓
<b>Signal level Measured</b>	2-10	2-10	2-10			✓
<b>Negatives</b>	10/10					✓
<b>Note:</b> Cp (crossing point) values collected with pDNA (single target PCR). Fluorescence (FL) levels depend on instrument settings and may vary. The Cp values will vary from instrument to instrument by up to 2 cycles, while the distance between two dilution steps should be relative constant ( $\Delta$ Cp).						
DOM (manufactured): YYYY-MM-DD			QC Acceptance: YYYY-MM-DD			
We, the undersigned, certify that the product designated above has been obtained in accordance with the rules of production and quality control.						
<b>Name(s) :</b>						
Name1			Name2			

**TIB MOLBIOL** Syntheselabor GmbH | Eresburgstr. 22-23 | D-12103 Berlin | Germany  
Tel. +49 30 78 79 94 55 | FAX +49 78 79 94 99 | [dna@tib-molbiol.de](mailto:dna@tib-molbiol.de) | [WWW.TIB-MOLBIOL.COM](http://WWW.TIB-MOLBIOL.COM)  
Geschäftsführer (CEO): Olfert Landt | Register HRB 93163 B | Registergericht Berlin Charlottenburg



Instructions For Use

VirSNIp SARS-CoV-2 Spike del H69/V70

530

Cat.-No. 53-0781-96

Roche SAP n° 09 405 674 001

Kit with reagents for 96 PCR reactions 20 µl for genotyping of SARS-CoV-2 RNA [lyophilized]

1. Content, Storage and Expiry

Storage at Arrival:

- 1 Vial yellow cap 96 reactions CoV (lyophilized)
1 Mixed positive control 501N/Y, wt/69,70del, 681P/H

Store cooled or at ambient temperature
Do not freeze the lyophilized reagents.

- Kits are stable for one year after production (store 4°C to 25°C in the dark). See lot-specific expiry date.
• Reconstituted reagents are stable for two weeks if stored protected from light and cooled (2°C to 8°C).
• Dissolved reagent can be stored long-term if frozen (-15°C to -25°C). Avoid multiple freeze-thaw cycles.
• Reconstituted positive controls must be stored frozen. Minimize multiple freeze-thaw cycles.

2. Additional Reagents required

LightCycler® Multiplex RNA Virus Master

Cat.-No. 06 754 155 001

3. Introduction

The SARS-CoV-2 genome was published 11.1.20 (Genbank MN908947). Hundreds of thousand isolates have been sequenced. The UK\* strain VUI-202012/01 is reported to be more contagious. Spike protein variants del69/70, del144, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A and D1118H are marker for this cluster.

Table with 8 columns: Spike Prot. Variation, Genetic Variation, UK\* B.1.1.7, ZA 501.V2, Nigeria, DK mink V, Function, Effect, Assay. Rows include variants like del HV69/70, K417N, N439K, Y453F, E484K, N501Y, D614G, P681H, V1176F.

4. Description

A 119 (113) bp long fragment is amplified and analyzed running a melting curve using a deletion-specific detection probe. The amplification of isolates containing the wild type variant is barely visible.

5. Specification

Sensitivity better than 50 copies viral RNA UK strain B.1.1.7 (50% signal compared to 4,000 copies).

6. Sample Material and Extraction

Coronaviruses affect normally the lower respiratory system, but SARS-CoV-2 is found also in the upper part. Typical clinical samples are throat or nasopharyngeal swabs, sputum, saliva, or gargle solution. Product tested with heat-treated gargle solution. For RNA extraction see manufacturer's kit instructions.

7. Material Safety Data (MSDS)

This product is not hazardous (according to regulation (EC) No 1272/2008), not toxic, not IATA-restricted. Not from human, animal or plant origin. Product contains synthetic oligonucleotide primers and probes.

According to OSHA 29CFR1910.1200, Australia [NOHSC:1005, 1008 (1999)] and EU Directives (EC) No 1907/2006 and (EC) No 2015/830 any products which do not contain more than 1% of a component classified as hazardous or classified as carcinogenic do not require a MSDS.



## 8. Instructions for Use

Instruction for Roche 480 instruments. Capillary LightCycler<sup>®</sup>, LightCycler<sup>®</sup> 96, MyGo and BioRad CFX96 instruments give similar results. For other instruments use the SYBR Green melting option.

### 8.1. Programming Roche 480 Instruments

**Detection Format 530 Channel**                      **Set Quant Factor 10, Max Integration Time 1 sec**

LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument:                      483-533

LightCycler<sup>®</sup> 480 II Instrument:                      465-510

cobas z 480 Analyzer (open channel):                      465-510

Program Step:	<i>RT Step</i>	<i>Denaturation</i>	<i>Cycling</i>			<i>Cooling</i>
<b>Parameter</b>						
Analysis Mode	<b>None</b>	None	Quantification mode			None
Cycles	1	1	45			1
Target [°C]	55	95	95	60	72	40
Hold [hh:mm:ss]	00:05:00	00:05:00	00:00:05	00:00:15	00:00:15	00:00:30
Ramp Rate [°C/s] <b>96</b>	4.4	4.4	4.4	2.2	4.4	1.5
Ramp Rate [°C/s] <b>384</b>	4.6	4.6	4.6	2.4	4.6	2.0
Acquisition Mode	None	None	None	<b>Single</b>	None	None

Table 1

#### 8.1.1. Melting Analysis (may be added or programmed as second run)

**Detection Format**                                      Multi Color HybProbe Detection Formats

LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument:                      483-533

LightCycler<sup>®</sup> 480 II Instrument:                      465-510

cobas z 480 Analyzer (open channel):                      465-510

Program Step:	<i>Melting</i>			<i>Cooling</i>
<b>Parameter</b>				
Analysis Mode	Melting Curves mode			None
Cycles	1			
Target [°C]	95	40	75	40
Hold [hh:mm:ss]	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate [°C/s]	4.4	1,5	-	1.5
Acquisition Mode	-	-	<b>Continuous</b>	2.0
Acquisitions [per °C]	-	-	3*	None

Table 2

\* Melting slope shall be 0.19 to 0.29°C per second. If reading more channels reduce the number of acquisitions/sec.

## 8.2. Experimental Protocol

- **Sample material:** Use aqueous nucleic acid preparations
- **Negative control:** Always run at least one no-template control (NTC) - replace the template NA with water.
- **Positive control:** Run a positive control - replace the template NA with the provided Positive Control.

For an increased sensitivity use 10 µl nucleic acid per 20 µl reaction.

Product tested for 10 µl reaction volume (192 reactions).

### 8.2.1. Preparation of Parameter-Specific Reagents (PSR, 96 reactions):

The reagent vial with an **yellow** cap contains the primers and probe to run 96+ PCR reactions.

**Check for the orange pellet**, then **add 50 µl** PCR-grade water, mix (vortex) and spin down.

For robotic pipetting the volume can be extended to 55 µl (signals will decrease by 10-20%).

► **Use 0.5 µl** reagent per 20 µl PCR reaction.

## 8.2.2. Preparation of the Positive Control

Add **160 µl** PCR-grade water the vial with the **black** cap, if using 10 µl sample volume add **320 µl**. Mix by pipetting up and down 10 times. If vortexing spin down to collect the solution. Store dissolved controls frozen.

**Notes:** Opening this vial may cause contamination of the workspace. Pulse spin vial prior to opening.

► Use **5 µl** positive control (≈ Cp 27-30) for a 20 µl PCR reaction (10 µl if using 10 µl sample volume).

## 8.2.3. Preparation of the Reaction Mix

Multiply volumes by the number of reactions plus controls and one reserve, prepare in a cooled tube:

For use with the Roche LightCycler® Multiplex RNA Virus Master		
for 5 µl extract	Component	10 µl extract
10.4 µl	<b>Water</b> , PCR-grade (colorless cap, provided with the Roche Master kit)	5.4 µl
0.5 µl	<b>Reagent</b> mix (parameter specific reagents containing primers and probes)	0.5 µl
--	Control Reaction and additional assays (Multiplex PCR)	--
4.0 µl	<b>Roche Master</b> (see Roche manual)	4.0 µl
0.1 µl	<b>RT Enzyme</b> (see Roche manual)	0.1 µl
<b>15.0 µl</b>	<b>Volume of Reaction Mix</b>	<b>10.0 µl</b>

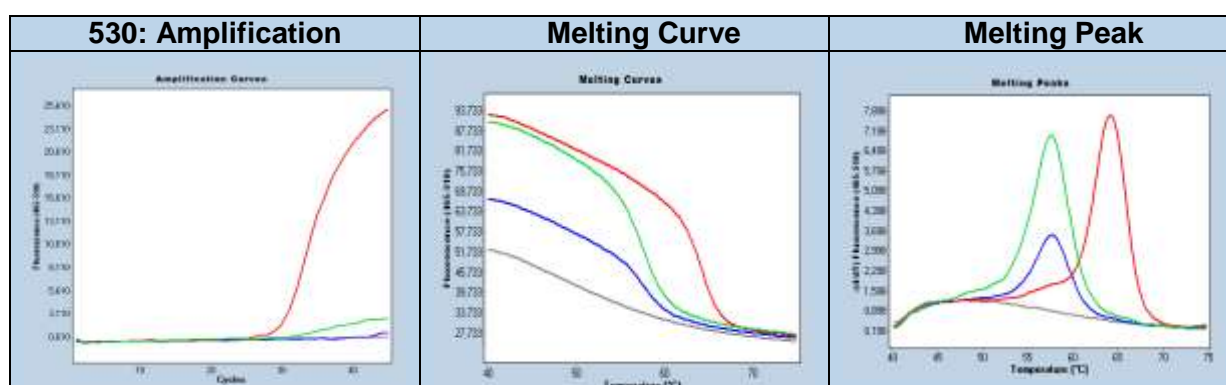
Table 3

Mix gently, spin down and **transfer 15 µl (10 µl)** per well.

Add **5 µl (10 µl)** of sample or control to each well for a final reaction volume of 20 µl. Seal plate and centrifuge.

**Start run**

## 9. Typical Results



**Figure 1.** Blue SARS RNA, Green wt, Red deletion pos control **Left** Deletion is clearly visible in the amplification. **Center:** Melting curves. **Right** Wt has a melting temperature of 57.8 (± 1)°C, deletion has a T<sub>m</sub> of 64.0 (± 1)°C.

## 10. Reading the Results

We recommend using the Second Derivative Maximum method (Automated (F'' max). View results in the 530 channel. The negative control (NTC) must show no signal. For the melting curve analysis use 'T<sub>m</sub> calling'.

Channel 530 Amplification	Channel 530 Melting analysis	Channel 530 NTC Control	Result
Not relevant	Not relevant	Negative / no peak	No virus amplified / not detectable
Invisible or low	<b>T<sub>m</sub> ~ 57.8°C</b>	Negative	<b>SARS Spike wild type (not UK variant)</b>
Visible	<b>T<sub>m</sub> ~ 64.0°C</b>	Negative	<b>SARS Spike del69/70 (UK or cluster V)</b>
Not relevant	Not relevant	<b>Positive</b>	<b>Contamination Repeat experiment</b>

## 11. References

Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. Rambaut et al., 2020

[www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-brief-rapid-increase-sars-cov-2-variant-united-kingdom](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-brief-rapid-increase-sars-cov-2-variant-united-kingdom)

The circulating SARS-CoV-2 spike variant N439K maintains fitness while evading antibody-mediated immunity. Thomson et al., 2020


Mutations in SARS-CoV-2 spike protein and RNA polymerase complex are associated with COVID-19 mortality risk. Hahn et al., 2020

## 12. Multiplex PCR Compatibility Respiratory Virus Panel

- no tested -

## 13. Version History

V201227	Release version	2020-12-22
V210101	1. Content / 8.2.2 Positive control included, 5. Sensitivity range	2021-01-06

Certificate of Analysis (CoA)						
Lot n° 4996 Expiry : YYYY-MM-DD						
<b>Tm range</b>	<b>wt</b>	<b>del69/70</b>	<b>wtRNA</b>	<b>Cp range</b>	<b>PC</b>	<b>passed</b>
Measured	57-58°C	63-65°C	57-58°C		27-30	✓
Signal level	2-10	2-10	2-10			✓
Measured						✓
<b>Negatives</b>	<b>10/10</b>					✓
<b>Note:</b> Cp (crossing point) values collected with pDNA (single target PCR). Fluorescence (FL) levels depend on instrument settings and may vary. The Cp values will vary from instrument to instrument by up to 2 cycles, while the distance between two dilution steps should be relative constant ( $\Delta$ Cp).						
DOM (manufactured): YYYY-MM-DD			QC Acceptance: YYYY-MM-DD			
We, the undersigned, certify that the product designated above has been obtained in accordance with the rules of production and quality control.						
<b>Name(s) :</b>						
<i>Name1</i>			<i>Name2</i>			

**TIB MOLBIOL** Syntheselabor GmbH | Eresburgstr. 22-23 | D-12103 Berlin | Germany  
Tel. +49 30 78 79 94 55 | FAX +49 78 79 94 99 | dna@tib-molbiol.de | WWW.TIB-MOLBIOL.COM  
Geschäftsführer (CEO): Olfert Landt | Register HRB 93163 B | Registergericht Berlin Charlottenburg





Instructions for life science research use only. Not tested for use in diagnostic procedures. For *in vitro* use only.



Instructions For Use

VirSNIp SARS B117 (Spike del+501)

530

Cat.-No. 53-0790-96

Roche SAP n° 09 429 506 001

Kit with reagents for 96 PCR reactions 20 µl for genotyping of SARS-CoV-2 RNA [lyophilized]

1. Content, Storage and Expiry

- 1 Vial yellow cap 96 reactions SARS CoV (lyophilized)
1 Mixed positive control 501N/Y, wt/69,70del, 681P/H

Storage at Arrival:

Store cooled or at ambient temperature
Do not freeze the lyophilized reagents.

- Kits are stable for one year after production (store 4°C to 25°C in the dark). See lot-specific expiry date.
• Reconstituted reagents are stable for two weeks if stored protected from light and cooled (2°C to 8°C).
• Dissolved reagent can be stored long-term if frozen (-15°C to -25°C). Avoid multiple freeze-thaw cycles.
• Reconstituted positive controls must be stored frozen. Minimize freeze-thaw cycles.

2. Additional Reagents required

LightCycler® Multiplex RNA Virus Master
or 1-step RT polymerase

Roche Cat.-No. 06 754 155 001
90-9999-96

3. Introduction

The SARS-CoV-2 genome was published 11.1.20 (Genbank MN908947). Hundreds of thousand isolates have been sequenced. The UK\* strain VUI-202012/01 is reported to be more contagious. Spike protein variants del69/70, del144, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A and D1118H are marker for this cluster.

Table with 9 columns: Spike Prot. Variation, Genetic Variation, UK\* B.1.1.7, ZA B.1.351, Nigeria B.1.1.238, Brazil B.1.1.28, DK mink Clust V, Function, Effect, Assay. Rows include variants like del HV69/70, K417T, N439K, Y453F, E484K, N501Y, A570D, D614G, P681H, V1176F.

4. Description

130 bp for 501 and a 119 (113) bp fragment for 69/70 are amplified and analyzed with a melting curve using mutation-specific probes. For Roche polymerase the amplification of wildtype virus is not visible.

5. Specification

Sensitivity better than 50 copies viral RNA UK strain B.1.1.7 (50% signal compared to 4,000 copies).

6. Sample Material and Extraction

Coronaviruses affect normally the lower respiratory system, but SARS-CoV-2 is found also in nose and throat. Typical clinical samples are throat and nasopharyngeal swabs, sputum, saliva or gargle solution. Product tested with heat-treated gargle solution. For RNA extraction see manufacturer's kit instructions.

7. Material Safety Data (MSDS)

This product is not hazardous (according to regulation (EC) No 1272/2008), not toxic, not IATA-restricted. Not from human, animal or plant origin. Product contains synthetic oligonucleotide primers and probes. According to OSHA 29CFR1910.1200, Australia [NOHSC:1005, 1008 (1999)] and EU Directives (EC) No 1907/2006 and (EC) No 2015/830 any products which do not contain more than 1% of a component classified as hazardous or classified as carcinogenic do not require a MSDS.



## 8. Instructions for Use

Instruction for Roche 480 instruments. Capillary LightCycler<sup>®</sup>, LightCycler<sup>®</sup> 96, MyGo and BioRad CFX96 instruments give similar results (FAM channel). For other instruments use SYBR Green melting option.

### 8.1. Programming Roche 480 Instruments (Standard ModularDx Program)

**Detection Format 530 Channel**      **Set Quant Factor 10, Max Integration Time 1 sec**  
 LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument:      483-533  
 LightCycler<sup>®</sup> 480 II Instrument:      465-510  
 cobas z 480 Analyzer (open channel): 465-510

Program Step:	RT Step	Denaturation	Cycling			Cooling
<b>Parameter</b>						
Analysis Mode	<b>None</b>	None	Quantification mode			None
Cycles	1	1	40-45			1
Target [°C]	55	95	95	60	72*	40
Hold [hh:mm:ss]	00:05:00	00:05:00	00:00:05	00:00:15	00:00:15	00:00:30
Ramp Rate [°C/s] <b>96</b>	4.4	4.4	4.4	2.2	4.4	1.5
Ramp Rate [°C/s] <b>384</b>	4.6	4.6	4.6	2.4	4.6	2.0
Acquisition Mode	None	None	None	<b>Single</b>	None	None

\* 72°C step can be skipped. 95°C can be cut to 3 s, 60°C to 12 s. RT and Den to 3 min (total time 45 min) Table 1

#### 8.1.1. Melting Analysis (may be added or programmed as second run)

**Detection Format**      Hydrolysis Probe or SimpleProbe  
 LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument:      483-533  
 LightCycler<sup>®</sup> 480 II Instrument:      465-510  
 cobas z 480 Analyzer (open channel): 465-510

Program Step:	Melting			Cooling
<b>Parameter</b>				
Analysis Mode	Melting Curves mode			None
Cycles	1			
Target [°C]	95	40	75	40
Hold [hh:mm:ss]	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate [°C/s]	4.4	1,5	-	1.5
Acquisition Mode	-	-	<b>Continuous</b>	
Acquisitions [per °C]	-	-	3*	None

Table 2

\* Melting slope shall be 0.19 to 0.29°C per second. If reading more channels reduce the number of acquisitions/sec.

## 8.2. Experimental Protocol

- **Sample material:** Use aqueous nucleic acid preparations
- **Negative control:** Always run at least one no-template control (NTC) - replace the template NA with water.
- **Positive control:** Run a positive control - replace the template NA with the provided Positive Control.

For an increased sensitivity use 10 µl nucleic acid per 20 µl reaction.  
 Product tested for 10 µl reaction volume (192 reactions).

### 8.2.1. Preparation of Parameter-Specific Reagents (PSR, 96 reactions):

The reagent vial with the **yellow** cap contains the primers and probe to run 96+ PCR reactions.

**Check for the orange pellet**, then **add 50 µl** PCR-grade water, mix (vortex) and spin down.  
 For robotic pipetting the volume can be extended to 55 µl (signals will decrease by 10-20%).

► **Use 0.5 µl** reagent per 20 µl PCR reaction.

## 8.2.2. Preparation of the Positive Control

Add **160 µl** PCR-grade water to the vial with the **black** cap, if using 10 µl sample volume add **320 µl**. Mix by pipetting up and down 10 times. If vortexing spin down to collect the solution. Store dissolved controls frozen.

**Notes:** Opening this vial may cause contamination of the workspace. Pulse spin vial prior to opening.

► Use **5 µl** positive control ( $\approx$  Cp 27-30) for a 20 µl PCR reaction (10 µl if using 10 µl sample volume).

## 8.2.3. Preparation of the Reaction Mix

Multiply volumes by the number of reactions plus controls and one reserve, prepare in a cooled tube:

LightCycler® Multiplex RNA Virus Master		1-step RT Polymerase 90-9999-96	
10.4 µl	Water, PCR-grade	Water, PCR-grade	4.4 µl
0.5 µl	This reagent (PSR)	This reagent (PSR)	0.5 µl
4.0 µl	Roche Mastermix	TIB Mastermix	10.0 µl
0.1 µl	RT Enzym	-	-
<b>15.0 µl</b>		<b>15.0 µl</b>	

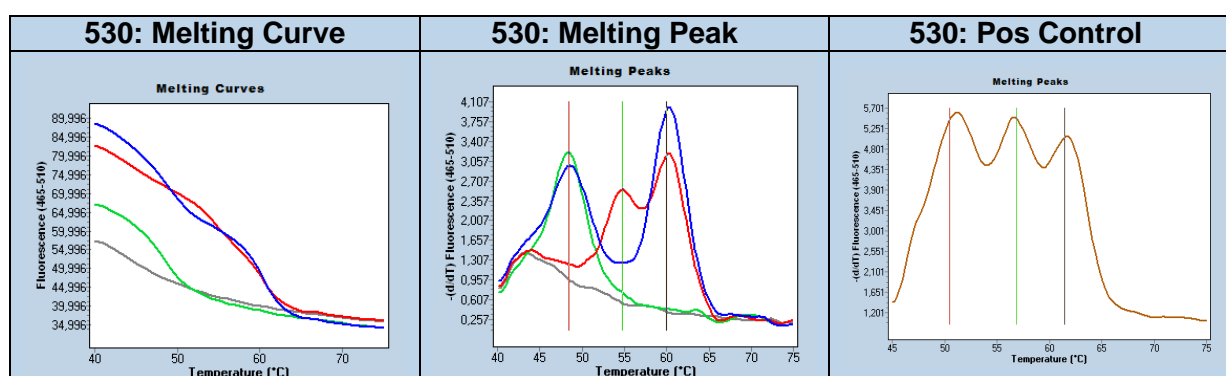
Table 3

Mix gently, spin down and transfer **15 µl (10 µl)** per well.

Add **5 µl (10 µl)** of sample or control to each well for a final reaction volume of 20 µl. Seal plate and centrifuge.

**Start run**

## 9. Typical Results



**Figure 1.** Green wild type, Blue Cluster V, Red UK variant. **Center** 501N has a  $T_m$  of  $48.5 (\pm 2)^\circ\text{C}$ , 501Y has a  $T_m$  of  $54.7 (\pm 2)^\circ\text{C}$ , the deletion has a  $T_m$  of  $60 (\pm 2)^\circ\text{C}$ . **Right** Positive Control has three peaks.

## 10. Reading the Results

View results in the 530 channel. Use 'Tm calling'. The negative control (NTC) must show no signal.

Peaks	Channel 530 $T_m \sim 48.5^\circ\text{C}^*$	Channel 530 $T_m \sim 54.7^\circ\text{C}^*$	Channel 530 $T_m \sim 60.0^\circ\text{C}^*$	Result	Reference Strain
1	X			501N / no deletion	'wild type'
2	X		X	501N + deletion	Common mutation known from Cluster V or Berchtesgarden
1		X		501Y / no deletion	poss. South Africa or Brasil
2		X	X	501Y + deletion	probably UK variant

$T_m$  values shift depending on the instrument, speed of heating, mastermix, salt contents and detection format.

\* Temperatures with 1step RT pol. 90-9999-96 are 3-4°C higher.

## 11. References

Genomic characterisation of emergent SARS-CoV-2 lineage in UK defined by novel set of spike mutations. Rambaut et al., 2020 [www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-brief-rapid-increase-sars-cov-2-variant-united-kingdom](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-brief-rapid-increase-sars-cov-2-variant-united-kingdom)  
 Circulating SARS-CoV-2 spike var. N439K maintains fitness while evading antibody-mediated immunity. Thomson et al., 2020  
 Mutations in SARS-CoV-2 spike protein and RNA pol. are associated with COVID-19 mortality risk. Hahn et al., 2020  
[www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/DESH/Bericht\\_VOC\\_05022021.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/DESH/Bericht_VOC_05022021.pdf?__blob=publicationFile)

## 12. Multiplex PCR Compatibility

This SNP assay can be combined with 51-0776-96 SARS E+N and either EAV spiked extraction control or UBC human mRNA extraction control or with the complete kit 60-0770-96 Sarbecovirus E+N+UBC.

### Multiplex PCR and Instrument Compatibility

Color Comp 40-0320 mandatory only for Multiplex PCR using more channels


500	530	580	610	640	660
	SNP				
SarbecoV	SNP	UBC mRNA			
SarbecoV	SNP				EAV
	SNP	N gene	E gene		EAV
	SNP	N gene	E gene		UBC

480 II	z 480	LC96	LC2.0	Nano
X	X	X	X	X
X				
X				
X	X	X		
X	X	X		

Table 3

## 13. Version History

V210111	Release version	2021-01-12
V210122	10. Tm values for 1-step RT polymerase 90-9999-96	2021-01-22
V210123	8.2.3 Instructions for 1-step RT polymerase 90-9999-96	2021-02-08

Certificate of Analysis (CoA)						
Lot n° 5009 Expiry : YYYY-MM-DD						
	<b>501N</b>	<b>501Y</b>	<b>deletion</b>		<b>PC</b>	<b>passed</b>
<b>Tm range Measured</b>	48-50°C	55-57°C	59-62°C	<b>Cp range</b>	27-30	✓
<b>Signal level Measured</b>	2-10	2-10	2-10			✓
<b>Negatives</b>	<b>10/10</b>					✓
<b>Note:</b> Cp (crossing point) values collected with pDNA (single target PCR). Fluorescence (FL) levels depend on instrument settings and may vary. The Cp values will vary from instrument to instrument by up to 2 cycles, while the distance between two dilution steps should be relative constant ( $\Delta$ Cp).						
DOM (manufactured): YYYY-MM-DD			QC Acceptance: YYYY-MM-DD			
We, the undersigned, certify that the product designated above has been obtained in accordance with the rules of production and quality control.						
<b>Name(s) :</b>						
<i>Name1</i>			<i>Name2</i>			

**TIB MOLBIOL** Syntheselabor GmbH | Eresburgstr. 22-23 | D-12103 Berlin | Germany  
 Tel. +49 30 78 79 94 55 | FAX +49 78 79 94 99 | dna@tib-molbiol.de | WWW.TIB-MOLBIOL.COM  
 Geschäftsführer (CEO): Olfert Landt | Register HRB 93163 B | Registergericht Berlin Charlottenburg



Instructions for life science research use only. Not tested for use in diagnostic procedures. For *in vitro* use only.



### Instructions For Use

# VirSNIp SARS-CoV-2 Spike L452R

**530**

Cat.-No. 53-0793-96

Roche SAP n° 09 459 022 001

Kit with reagents for 96 PCR reactions 20 µl for genotyping of SARS-CoV-2 RNA [lyophilized]

## 1. Content, Storage and Expiry

1 Vial yellow cap 96 reactions CoV (lyophilized)

## Storage at Arrival:

Store cooled or at ambient temperature  
**Do not freeze the lyophilized reagents.**

- Kits are stable for one year after production (store 4°C to 25°C in the dark). See lot-specific expiry date.
- Reconstituted reagents are stable for two weeks if stored protected from light and cooled (2°C to 8°C).
- Dissolved reagent can be stored long-term if frozen (-15°C to -25°C). Avoid multiple freeze-thaw cycles.

## 2. Additional Reagents required

LightCycler® Multiplex RNA Virus Master  
or 1-step RT polymerase

Cat.-No. 06 754 155 001  
90-9999-96

## 3. Introduction

Hundreds of thousands of isolates have been sequenced since the SARS-CoV-2 genome was published (MN908947). The Spike **L452R** mutation is predicted to increase infectivity and host immune evasion and is a marker for the Californian CAL.20C variant; 81% GISAID entries are B.1.427 or B.1.429 lineage.

Spike Prot. Variation	Genetic Variation	UK B.1.1.7	UK B.1.525	ZA B.1.351	Brazil P.1	Calif B.1.429	DK mink Clust V	Function, Effect	Single assay
del HV69/70	del21765-770	x	x				x	evasion of immune response	53-0781
K417N	G22813T			N	T			RBD (ACE binding domain)	53-0787
N439K	C22879A							ACE binding, immune escape	53-0788
L452R	T22917G					x		ACE binding, immune escape	53-0793
Y453F	A22920T						x	RBD (weaker ACE binding)	53-0783
E484K	G23012A		x	x	x			RBD (ACE binding domain)	53-0789
N501Y	A23063T	x	x	x	x			RBD (stronger ACE binding)	53-0780
A570D	C23271A	x	x						53-0791
D614G	A23403G	x	x	x	x		x	RBD (stronger ACE binding)	53-0782
P681H	C23604A	x	x					furin cleavage site	53-0786
V1176F	G25088T				x			increased mortality	53-0784

## 4. Description

A 111 bp long fragment is amplified and analyzed running a melting curve, using a 452R specific detection probe. The amplification of wild type 452L is not visible.

## 5. Specification

Sensitivity better than 500 copies viral RNA.

## 6. Sample Material and Extraction

Coronaviruses affect normally the lower respiratory system, but SARS-CoV-2 is found also in nose and throat. Typical clinical samples are throat and nasopharyngeal swabs, sputum, saliva or gargle solution. Product tested with heat-treated gargle solution. For RNA extraction see manufacturer's kit instructions.

## 7. Material Safety Data (MSDS)

This product is not hazardous (according to regulation (EC) No 1272/2008), not toxic, not IATA-restricted. Not from human, animal or plant origin. Product contains synthetic oligonucleotide primers and probes. According to OSHA 29CFR1910.1200, Australia [NOHSC:1005, 1008 (1999)] and EU Directives (EC) No 1907/2006 and (EC) No 2015/830 any products which do not contain more than 1% of a component classified as hazardous or classified as carcinogenic do not require a MSDS.



## 8. Instructions for Use

Instruction for Roche 480 instruments. Capillary LightCycler®, LightCycler® 96, MyGo and BioRad CFX96 instruments give similar results. For other instruments use the SYBR Green melting option.

### 8.1. Programming Roche 480 Instruments (Standard ModularDx Program)

**Detection Format 530 Channel**                      **Set Quant Factor 10, Max Integration Time 1 sec**

LightCycler® 480 Instrument: 483-533

LightCycler® 480 II Instrument: 465-510

cobas z 480 Analyzer (open channel): 465-510

Program Step:	RT Step	Denaturation	Cycling			Cooling
<b>Parameter</b>						
Analysis Mode	<b>None</b>	None	Quantification mode			None
Cycles	1	1	40-45			1
Target [°C]	55	95	95	60	72*	40
Hold [hh:mm:ss]	00:05:00	00:05:00	00:00:05	00:00:15	00:00:15	00:00:30
Ramp Rate [°C/s] <b>96</b>	4.4	4.4	4.4	2.2	4.4	1.5
Ramp Rate [°C/s] <b>384</b>	4.6	4.6	4.6	2.4	4.6	2.0
Acquisition Mode	None	None	None	<b>Single</b>	None	None

\* 72°C step can be skipped. 95°C can be cut to 3 s, 60°C to 12 s. RT and Den to 3 min (total time 45 min) Table 1

#### 8.1.1. Melting Analysis (may be added or programmed as second run)

**Detection Format**                                      Hydrolysis Probe or SimpleProbe

LightCycler® 480 Instrument: 483-533

LightCycler® 480 II Instrument: 465-510

cobas z 480 Analyzer (open channel): 465-510

Program Step:	Melting			Cooling
<b>Parameter</b>				
Analysis Mode	Melting Curves mode			None
Cycles	1			
Target [°C]	95	40	75	40
Hold [hh:mm:ss]	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate [°C/s]	4.4	1,5	-	1.5
Acquisition Mode	-	-	<b>Continuous</b>	2.0
Acquisitions [per °C]	-	-	3**	None

Table 2

\*\* Melting slope shall be 0.19 to 0.29°C per second. If reading more channels reduce the number of acquisitions/sec.

## 8.2. Experimental Protocol

- **Sample material:** Use aqueous nucleic acid preparations
- **Negative control:** Always run at least one no-template control (NTC) - replace the template NA with water.
- **Positive control:** Run a positive control

For an increased sensitivity use 10 µl nucleic acid per 20 µl reaction.  
Product tested for 10 µl reaction volume (192 reactions).

### 8.2.1. Preparation of Parameter-Specific Reagents (PSR, 96 reactions):

The reagent vial with the **yellow** cap contains the primers and probe to run 96+ PCR reactions.

**Check for the orange pellet**, then **add 50 µl** PCR-grade water, mix (vortex) and spin down.  
For robotic pipetting the volume can be extended to 55 µl (signals will decrease by 10-20%).

► **Use 0.5 µl** reagent per 20 µl PCR reaction.

## 8.2.2. Preparation of the Positive Control

- not provided

## 8.2.3. Preparation of the Reaction Mix

Multiply volumes by the number of reactions plus controls and one reserve, prepare in a cooled tube:

LightCycler® Multiplex RNA Virus Master		1-step RT Polymerase 90-9999-96	
10.4 µl	Water, PCR-grade	Water, PCR-grade	4.4 µl
0.5 µl	This reagent (PSR)	This reagent (PSR)	0.5 µl
4.0 µl	Roche Mastermix	TIB Mastermix	10.0 µl
0.1 µl	RT Enzym	-	-
<b>15.0 µl</b>		<b>15.0 µl</b>	

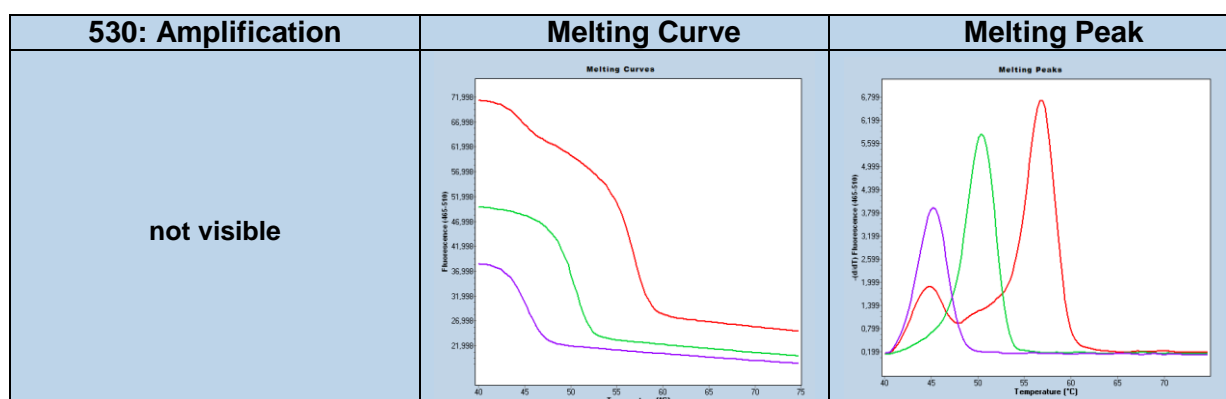
Table 3

Mix gently, spin down and **transfer 15 µl (10 µl)** per well.

**Add 5 µl (10 µl)** of sample or control to each well for a final reaction volume of 20 µl. Seal plate and centrifuge.

**Start run**

## 9. Typical Results



**Figure 1.** Green 452L (wild type), Red 453R, Purple 453F **Left. Center:** Melting Curve. **Right** 452L has a melting temperature of 50.3 ( $\pm 1$ )°C, 453R has a  $T_m$  of 56.8 ( $\pm 1$ )°C, 453F has a  $T_m$  of 45°C

## 10. Reading the Results

View results in the 530 channel. Use 'Tm calling'. The negative control (NTC) must show no signal.

Channel 530 Amplification	Channel 530 Melting analysis	Channel 530 NTC Control	Result
Not relevant	Not relevant	Negative / no peak	No virus amplified / not detectable
Invisible	<b><math>T_m \sim 45^\circ\text{C}^*</math></b>	Negative	SARS Spike 453F
Invisible	<b><math>T_m \sim 50^\circ\text{C}^*</math></b>	Negative	SARS Spike 452L
Invisible or low	<b><math>T_m \sim 57^\circ\text{C}^*</math></b>	Negative	SARS Spike 452R
Not relevant	Not relevant	<b>Positive</b>	<b>Contamination Repeat experiment</b>

$T_m$  values shift depending on the instrument, speed of heating, mastermix, salt contents and detection format.

\* Temperatures with 1step RT pol. 90-9999-96 are 3-4°C higher.

Single peak with lower  $T_m$  values are an indication for the presence of another mutation in the probe region.

The assay detects the genetic situation and not a strain; the correlation to a reference strain describes the most likely assignment for European isolates isolated winter 2020/2021.

## 11. References

Genomic characterisation of emergent SARS-CoV-2 lineage in UK defined by novel set of spike mutations. Rambaut et al., 2020 [www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-brief-rapid-increase-sars-cov-2-variant-united-kingdom](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-brief-rapid-increase-sars-cov-2-variant-united-kingdom)  
 Mutations in SARS-CoV-2 spike protein and RNA pol. are associated with COVID-19 mortality risk. Hahn et al., 2020 [www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/DESH/Bericht\\_VOC\\_05022021.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/DESH/Bericht_VOC_05022021.pdf?__blob=publicationFile)

## 12. Multiplex PCR Compatibility

This SNP assay can be combined with 51-0776-96 SARS E+N and either EAV spiked extraction control or UBC human mRNA extraction control or with the complete kit 60-0770-96 Sarbecovirus E+N+UBC.

### Multiplex PCR and Instrument Compatibility

Color Comp 40-0320 mandatory only for Multiplex PCR using more channels

500	530	580	610	640	660
	SNP				
SarbecoV	SNP	UBC mRNA			
SarbecoV	SNP				UBC
SarbecoV	SNP				EAV
	SNP	SARS N	SARS E		UBC


480 II	z 480	LC96	LC2.0	Nano
X	X	X	X	X
X	X	X		
X	X	X		
X	X	X		
X	X	X		

Table 3

## 13. Version History

V210313 Release version

2020-03-13

Certificate of Analysis (CoA)					
Lot n° 5025					
Expiry : YYYY-MM-DD					
					
	<b>L452</b>	<b>452R</b>	<b>453F</b>	<b>PC</b>	<b>passed</b>
<b>Tm range</b>	48-51°C	56-58°C	44-46°C	<b>Cp range</b>	-
<b>Measured</b>					✓
<b>Signal level</b>	2-10	2-10	2-10		✓
<b>Measured</b>					✓
<b>Negatives</b>	<b>10/10</b>				✓
<b>Note:</b> Cp (crossing point) values collected with pDNA (single target PCR). Fluorescence (FL) levels depend on instrument settings and may vary. The Cp values will vary from instrument to instrument by up to 2 cycles, while the distance between two dilution steps should be relative constant ( $\Delta$ Cp).					
<b>DOM (manufactured):</b> YYYY-MM-DD			<b>QC Acceptance:</b> YYYY-MM-DD		
We, the undersigned, certify that the product designated above has been obtained in accordance with the rules of production and quality control.					
<b>Name(s) :</b>					
<i>Name1</i>			<i>Name2</i>		

**TIB MOLBIOL** Syntheselabor GmbH | Eresburgstr. 22-23 | D-12103 Berlin | Germany  
 Tel. +49 30 78 79 94 55 | FAX +49 78 79 94 99 | dna@tib-molbiol.de | WWW.TIB-MOLBIOL.COM  
 Geschäftsführer (CEO): Olfert Landt | Register HRB 93163 B | Registergericht Berlin Charlottenburg





## Recherche du SARS-CoV-2 par RT-PCR avec détection en temps réel

	Noms
Auteur(s) :	<u>Lyne Désautels</u>
	_____
Réviser(s) :	<u>Joel Ménard</u>
	<u>Mélanie Côté</u>
	_____
	_____
Approbateur :	<u>Hugues Charest</u>
Coordonnateur du document :	<u>Lyne Désautels</u>

# 1 Préambule

Ce document remplace le document PR-BM-131 version 04.. Les changements apportés dans cette version sont les suivants :

Section	Modification	Justification
3. Principe	Ajout d'explications concernant la détection des variants à surveillance rehaussée (VSR)	Nouvelles épreuves analytiques (informations ajoutées à la CH-516).
7.1 Exposé de la procédure	Ajout pour une demande de recherche de variants Ajout des 2 nouveaux mélanges dans le tableau : Ewt3 et 501	
8. Résultats	Ajout de 2 points séparés : 1 pour détection et confirmation et 2 pour variants/ciblage	Pour préciser la distinction entre les tests et les différences dans l'entrées des résultats
Annexe 1	Ajout des séquences des amorces et sondes pour Swt3aby, FAM-N501 et JUN-Y501 Ajout des composantes des mélanges réactionnel pour mix Ewt3 et 501	Nouvelles cibles pour tester les variants et nouveaux mélanges réactionnels

## 2 Champ d'application

Ce document est destiné au personnel du secteur Biologie moléculaire.

## 3 Principe

Le SARS-CoV-2 (auparavant nommé 2019-nCoV) est un virus du genre des Betacoronavirus apparu dans la région de la ville de Wuhan en Chine à la fin de 2019. Il possède 80 % d'identité avec le coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-1) au niveau des acides nucléiques. Le réservoir zoonotique n'est pas connu. Dans les épreuves de détection par RT-PCR présentée ici, deux réactions ciblant deux régions distinctes du génome sont utilisées. Un premier jeu d'oligonucléotides amplifie un fragment du gène E, un protocole présenté dans Corman *et al.* (2020) ; le deuxième jeu cible le gène N (développé au LSPQ) en 3' du génome, gène dont l'ARNm est le plus fortement représenté dans les cellules infectées. Ces protocoles RT-PCR ont été adaptés pour les réactifs et l'appareillage déjà en usage au LSPQ. Pour les demandes d'analyses codées NCOV dans le SGIL (détection), une seule réaction RT-PCR est utilisée (généralement celle ciblant le gène N); pour les demandes de confirmation (CCOV dans SGIL), les deux réactions sont effectuées d'emblée.

Depuis son saut chez l'humain en 2019, le virus CoV SRAS-2 évolue et acquiert des nouvelles caractéristiques génétiques. Les souches circulantes sont maintenant catégorisées en clades et en variants. Quelques mutations clés dans la protéine *spike* (spicule), entre autres, sont reconnues pour contribuer à une augmentation de la contagiosité, de la virulence et/ou pour modifier les épitopes ciblés par les vaccins. Ces souches sont regroupées sous l'appellation 'variants à surveillance rehaussée (VSR)'. Identifier les souches portant ces mutations (criblage) permet des interventions de santé publique particulières visant à minimiser leur expansion. Des essais RT-PCR multiplex de

criblage pour les mutations Del 69/70 et N501Y sont inclus dans cette procédure. L'essai pour le Del69-70 a été développé au LSPQ, celui pour la 501Y a été adaptée d'une procédure fournie par le laboratoire de l'Ontario Public Health.

## 4 Spécimens

Extraits d'acides nucléiques préparés à l'aide d'une plateforme robotisée (PR-BM-052 ou PR-BM-096), ou selon la procédure PR-BM-010. Un échantillon contrôle d'extraction négatif, typiquement du milieu de culture et un contrôle d'extraction positif (voir annexe 2), est inclus dans chaque série analysée.

Une analyse avec la trousse NxTAG Respiratory Pathogen Panel (RPP) de Luminex (PR-BM-119) peut être effectuée en parallèle. Le cas échéant, il est nécessaire d'effectuer deux extractions des acides nucléiques séparées pour chaque spécimen, car le volume d'élution pour cette technique est de 110 µl au lieu de 60 µl.

**Note** : les échantillons présentant de la matière en suspension ou dont la mucosité/viscosité rend le pipetage difficile sont traités par passage sur colonnes QIAshredder (QIAGEN). L'échantillon est déposé sur la colonne et est centrifugé durant 1 minute à 14 000 RPM. Du milieu de culture virale peut-être ajouté à l'échantillon pour faciliter le passage à travers la matrice de la colonne. **Le traitement d'un échantillon par cette méthode doit être noté sur le registre de travail associé à la procédure d'extraction utilisée.**

Volume minimum nécessaire : 0,5 ml

## 5 Matériel requis

### 5.1 RT-PCR et détection en temps réel

#### 1) Appareillages et jetables

- Micropipettes pour des volumes variant de 2 µl à 1000 µl
- Embouts tamponnés stériles de capacité de 2 µl à 1000 µl
- Tubes de 1,5 ml ou 2,0 ml stériles avec bouchons vissés, de type Sarstedt
- Microcentrifugeuse
- Agitateur-mélangeur à vortex
- Support réfrigéré pour plaque 96 puits
- QuantStudio 3 ou 5 de Thermo Fisher Scientific, ou appareil équivalent
- MicroAmp Optical Adhesive Film (ABI, no cat : 4311971)
- Spatule pour sceller le ruban optique à la plaque 96 puits
- MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate 0,1 ml (ABI, no cat: 4346907)

- Pellicule scellante pour plaque de format 96 puits, pour transport entre locaux

## 2) Trousses et Réactifs

- Mélange réactionnel TaqPath 1- Step Multiplex NO ROX de la compagnie Thermo Fisher Scientific (disponible en plusieurs formats)
- Solution d'amorces et de sondes 2X pour chaque multiplex (les séquences et les quantités utilisées sont présentées à l'annexe 1)
- Échantillons contrôles positifs et négatifs

## 6 Contrôle de la qualité

L'efficacité de l'amplification pour chaque cible est contrôlée par l'analyse des valeurs Ct obtenues pour le contrôle positif d'extraction pour les essais de détection et de criblage. Le contrôle positif d'extraction sélectionné est un «wildtype», c'est-à-dire détecté pour COVID mais sans présence de mutations. Vérifier les dates de péremption des réactifs. Compléter le registre RE-BM-290.

## 7 Exposé de la procédure

### Amplification par RT-PCR avec détection en temps réel

D'abord s'assurer d'avoir un appareil de détection en temps réel allumé en post-PCR ; préparer le schéma de plaque ; consulter le document PR-BM-098.

- 1) Au local des réactifs, à l'aide du registre RE-BM-290, préparer le ou les mélanges réactionnels selon les analyses demandées et selon les quantités suivantes par échantillon, et bien mélanger.
  - Pour une demande de **Détection** (NCOV), préparer le mix C (gène N)
  - Pour une demande de **Confirmation** (CCOV), préparer les mix C et E (gènes N et E)
  - Pour une demande de **Variants/criblage** (VMUT), préparer les mix Ewt3 et 501 (gènes E, Swt3aby (Del 69-70), FAM-N501 et JUN-Y501). Tous les échantillons sont criblés d'emblée pour les deux mutations.

Réactifs	N° lot ou date de fabrication	Date de péremption	Volume (µl) par réaction	Volume total
4X TaqPath 1-Step Multiplex NO ROX			5,0	
Mix amorces/sondes	E : C : Ewt3 : 501 :		10,0	


\* Le registre RE-BM-290 présente les recettes des mélanges d'amorces et sondes. Il est conservé au local des réactifs.

**Note : conserver les mélanges réactionnels sur glace ou sur un support réfrigéré.**

- 2) Pour chaque mélange d'amorces et sonde, distribuer 15 µl par puits dans une plaque de 96 puits sur un portoir ABI sans glace selon le schéma de travail établi et apposer une pellicule scellante pour le transport entre locaux.
- 3) Passer à un local préPCR et ajouter 5 µl de chaque préparation d'extraits d'acides nucléiques à chaque mélange réactionnel, selon le schéma de travail établi. N'ouvrir qu'une seule languette de bouchons à la fois.
- 4) Retirer la feuille protectrice d'un ruban optique ABI et sceller la plaque 96 puits.

**Note : Ne pas toucher au ruban optique avec les doigts.**

- 5) Passer au local post PCR, vortexer une dizaine de secondes puis centrifuger la plaque une dizaine de secondes (lorsque la vitesse maximale de la microcentrifugeuse est atteinte).
- 6) Placer la plaque 96 puits dans le bloc d'amplification de l'appareil pour détection en temps réel et démarrer la méthode préprogrammée suivante :

SARS-CoV-2			
	53 °C	10 min	
	95 °C	2 min	
	95 °C	3 sec	45 cycles
	60 °C	30 sec	

Consulter le document PR-BM-098 et/ou la liste LI-BM-008.

**Note : les QuantStudio 3 et 5 de Thermo Fisher sont validés pour fonctionner à une température inférieure à 30 °C.**

## 8 Résultats

### 1) Pour les tests de détection et de confirmation :

Le résultat des analyses avec détection en temps réel est exprimé par une valeur de concentration threshold [Ct]. Celle-ci représente le nombre de cycles d'amplification par PCR requis pour obtenir une émission de fluorescence détectable. Le signal de fluorescence dans l'échantillon est directement proportionnel à la quantité de produits PCR spécifique amplifié par la réaction.

Pour une épreuve de détection un résultat est considéré comme positif lorsque la valeur de Ct est égale ou inférieure à 37. La courbe d'amplification doit être d'allure logarithmique et ressembler à

celle du contrôle positif. Si la valeur de Ct de l'échantillon contrôle négatif est inférieure à 40 pour l'une des cibles ou si le contrôle positif ne rencontre pas la valeur attendue, tous les échantillons de la série devront être analysés une 2<sup>e</sup> fois pour le ou les Mix en particulier (C ou E), à partir de l'étape d'extraction des acides nucléiques. Une épreuve de confirmation (CCOV) pour laquelle une seule des deux cibles produit un résultat positif, le résultat final inscrit automatiquement dans SGIL est 'indéterminé'.

Les échantillons présentant une Ct supérieure à 37, mais inférieure à 40 pourraient être réanalysés afin de confirmer le résultat.

### Échantillons en « Pool » ou en tube individuel

Les résultats des échantillons individuels sont rapportés tel que générés et transférés dans le SGIL par l'appareillage, soit détecté ou non détecté, selon leur valeur de Ct.

Les échantillons qui ont été « poolés » sont traités comme suit :

- Pool négatif : tous les échantillons contenus dans le pool sont rapportés négatifs.
- Pool positif : tous les échantillons contenus dans le pool doivent être extraits et analysés de façon individuelle. Le résultat obtenu pour chacun est alors rapporté tel que généré par l'appareil, soit positif ou négatif selon et avec leur valeur ct respective

### 2) Pour les tests de variants/criblage :

Le résultat des analyses avec détection en temps réel est exprimé par une valeur de concentration threshold [Ct]. Celle-ci représente le nombre de cycles d'amplification par PCR requis pour obtenir une émission de fluorescence détectable. Le signal de fluorescence dans l'échantillon est directement proportionnel à la quantité de produits PCR spécifique amplifié par la réaction pour la cible E uniquement. Les profils d'amplification de chacune des réactions de criblage sont les suivants :

- 1) Del69-70 (réaction multiplexée avec la PCR de détection du gène E).

C'est l'allure de la courbe d'amplification (en ABY) qui permet de distinguer les souches ayant la délétion de celles qui contiennent les 6 nucléotides codant pour les acides aminés 69 et 70 (i.e. la souche sauvage ou wt, pour *wildtype*). L'amplification à partir d'acides nucléiques de souches wt est logarithmique comme celle du contrôle positif puisque la sonde Spwt3 est parfaitement; celle de souches mutées montre un  $\Delta R_n$  très diminué et dont l'allure est facilement reconnaissable. À des valeurs de Ct faibles (pour le gène E), cette dernière amplification est pratiquement indétectable.

- 2) Mutation N501Y (PCR compétitive)

Une souche doit produire une amplification avec allure logarithmique avec l'une ou l'autre des deux sondes. Si l'amplification est détectable en JUN, la souche porte la mutation N501Y; celle en FAM est spécifique à la souche sauvage (N501). Si aucune amplification n'est détectée et que la charge virale est détectable (résultat au PCR du gène E), il peut s'agir d'un problème de

spécificité des sondes dû à du polymorphisme dans les séquences bordant le site codant pour l'acide aminé 501 du gène S.

Tout profil d'amplification qui diffère des situations susmentionnées est évalué par le responsable de ces analyses.

Consulter les aide-mémoire AI-BM-094 (NCOV), AI-BM-101 (CCOV) et AI-BM-104(VMUT).

## 9 Enregistrement des données

Colliger les registres signés, les graphiques et le rapport produits par le Quantstudio3 ou 5 dans le cartable correspondant à cette procédure au secteur Biologie moléculaire.

## 10 Références

Corman *et al.* (2020). Euro Surveil 25. PMID : [3199387](#)

## 11 Documents associés

- Extraction automatisée d'acides nucléiques — plateforme NucliSens™ — easyMAG de bioMérieux (**PR-BM-052**)
- Extraction automatisée d'acides nucléiques — plateforme NucliSens™ — EMAG de bioMérieux (**PR-BM-096**)
- Utilisation et entretien du QuantStudio3 et Quantstudio5 de la compagnie Thermo Fischer Scientific (**PR-BM-098**)
- Méthodes préprogrammées pour la détection en temps réel (**LI-BM-008**)
- Saisie des résultats et validation — Détection SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel (**AI-BM-094**)
- Saisie des résultats et validation — Confirmation SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel (**AI-BM-101**)
- Saisie des résultats et validation – SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel (PR-BM-131) Analyse VMUT (**AI-BM-104**)
- RT-PCR en temps réel — Détection du SARS-CoV-2 (**RE-BM-290**)
- Préparation des mélanges d'amorces et sondes — Recherche du SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel (**RE-BM-291**)

# Annexe 1

## Séquence des amorces et sondes

Cible	Amorce sens	Amorce antisens	Sonde
E	<b>E_Sarbeco_F1 :</b> ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT	<b>E_Sarbeco_R2:</b> ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A	<b>E_Sarbeco_P1:</b> ACA CTA GCC ATC CTT ACT GCG CTT CG
N	<b>WuhanCoVnf :</b> AAC CAG AAT GGA GAA CGC AGT G	<b>WuhanCoVnr :</b> CGG TGA ACC AAG ACG CAG TAT TAT	<b>CoVnp :</b> CGA TCA AAA CAA CGT CGG CCC CAA GGT TTA C
Swt3aby	<b>Sforw :</b> CAA TGT TAC TTG GTT CCA TG	<b>Srev:</b> CAT CAT TAA ATG GTA GGA CAG	<b>Swt3Aby :</b> ACA TGT CTC TGG GAC CAA TGG TA
FAM-N501	<b>501F:</b> GAA GGT TTT AAT TGT TAC TTT C	<b>501R:</b> AAA CAG TTG CTG GTG CAT GT	<b>FAM-N501:</b> CCA ACC CAC TAA TGG TGT TG
JUN-Y501	<b>501F:</b> GAA GGT TTT AAT TGT TAC TTT C	<b>501R:</b> AAA CAG TTG CTG GTG CAT GT	<b>JUN-Y501 :</b> CCA ACC CAC TTA TGG TGT TG

## Composition des mélanges réactionnels

Mix	Cible	Amorces sens [μM]	Amorces antisens [μM]	Sondes	
				[μM]	Fluorophore
E	E (Corman)	E_Sarbeco_F1 [0,4]	E_Sarbeco_R2 [0,4]	E_Sarbeco_P1 [0,2]	FAM (ZEN)-IABQ1
C	N (LSPQ)	WuhanCoVnf [0,4]	WuhanCoVnr [0,4]	CoVnp [0,2]	FAM (ZEN)-IABQ1
Ewt3	E (Corman)	E_Sarbeco_F1 [0,4]	E_Sarbeco_R2 [0,4]	E_Sarbeco_P1 [0,2]	FAM (ZEN)-IABQ1
	Swt3aby	Sforw [0,4]	Srev [0,4]	Swt3aby [0,2]	ABY
501	FAM-N501	501F [0,4]	501R [0,4]	FAM-N501 [0,2]	FAM (ZEN)-IABQ1
	JUN-Y501			JUN-Y501 [0,2]	JUN



## Annexe 2

### Préparation du contrôle positif d'extraction

- 1) Sélectionner un spécimen clinique (de préférence «wildtype» )ayant obtenu un résultat positif pour le gène N (Mix C) ayant une valeur Ct d'environ 12-13.
- 2) Prendre un flacon de 500 ml de MEM (Minimum Essential Medium).
- 3) Dans un tube sarstedt 1,5 ml, faire une dilution de 400 µl de MEM et ajouter 100 µl de l'échantillon positif sélectionné en 1. Vortexer quelques secondes, faire une brève centrifugation.
- 4) Prendre la totalité de la dilution préparée à l'étape 3 et la transférer dans le flacon de 500 ml de MEM.
- 5) Mélanger le flacon par inversion environ 30 secondes pour que le mélange soit homogène.
- 6) Distribuer 250 µl dans des tubes sarstedt ou dans des boîtes bleues (collection microtubes 96 puits de QIAGEN).
- 7) Compléter le RE-BM-123.



## Détection en temps réel sur LightCycler 480 II Criblage de mutations dans le gène S du SARS-CoV-2

Auteur(s) : Cynthia Massé

Réviseur(s) : Marc-Christian Domingo

Approbateur : Marc-Christian Domingo

Coordonnateur du document : Mélanie Pilote

CONFIDENTIEL - COPIE DE COURTOISIE

## 1. Préambule

Ce document est une nouvelle procédure.

## 2. Objet

Ce document vise à décrire la procédure à suivre pour effectuer la détection de variants du SARS-CoV-2 portant des mutations dans le gène S (Spike protein) dans des spécimens cliniques provenant de prélèvements nasopharyngés ou par gargarisme.

Dans le contexte de pandémie à la COVID-19, devant l'émergence de plusieurs variants de la souche originale de SARS-CoV-2 et l'apparition constante de nouvelles mutations, le besoin de détecter les types de variants, dont certains sembleraient plus contagieux, devient un enjeu de santé publique important afin de : i) contenir le plus rapidement possible les éclosions dues aux variants, ii) surveiller leur évolution et leur prédominance dans la population, iii) établir les liens épidémiologiques; iv) fournir de l'information permettant d'évaluer l'efficacité des différents vaccins.

## 3. Champs d'application

Ce document est destiné au personnel des secteurs Identification bactérienne-Biologie moléculaire et Biologie moléculaire.

## 4. Définition des termes

Se référer à LI-GQ-016 version électronique du secteur Gestion de la qualité.

## 5. Principes

### Criblage de mutations offert :

- Détection de la mutation N501Y : si présence de la mutation 501Y, indication du variant Britannique (UK B.1.1.7) ou Sud-Africain (B.1.351) ou Brésilien (B.1.1.28).
- Détection de la délétion 69-70 : si présence de la délétion, indication du variant Britannique (UK B.1.1.7).
- Détection de la mutation E484K : si présence de la mutation 484K, indication du variant Sud-Africain (B.1.351) ou Brésilien (B.1.1.28).
- Détection de la mutation L452R : si présence de la mutation 452R, indication du variant Californien B.1.429

Étant donné que ces mutations pourraient être décrites chez d'autres variants, il serait prudent d'interpréter les résultats des mutations selon le contexte épidémiologique de propagation des variants.

## 6. Spécimen

- **Extraits d'ARN purifiés** (selon une méthode validée au LSPQ) obtenus à partir de prélèvements nasopharyngés ou gargarisme (criblage seulement)
- **Contrôle négatif** : Eau de la trousse de réactifs LightCycler® Multiplex RNA Virus Master
- **Contrôle positif d'amplification**: Contrôle positif associé à la trousse de criblage réhydraté dans 320 µL d'eau de la trousse de réactifs.

## 7. Matériel requis

### A) Matériel

- Plaques à réaction « LightCycler 480 Multiwell plate 96 white »
- Scellant pour plaque à réaction « LightCycler 480 Sealing foil » ou équivalent, de qualité optique
- Portoir pour plaque à réaction 96 puits
- Tubes de 1,5 mL ou 2 mL à bouchon vissé
- Portoirs pour tubes de 1,5 mL et 2 mL
- Micropipettes
- Embouts tamponnés stériles
- Récipients pour matériel contaminé de type « conocup » et « pipet keeper »

### B) Réactifs

- LightCycler® Multiplex RNA Virus Master
- Mélange d'amorces et de sonde pour chacune des cibles :
  - Mutation N501Y: VirSNIp SARS-CoV-2 Spike N501Y
  - Mutation del69/70 : VirSNIp SARS-CoV-2 Spike del H69/V70
  - Mutation E484K: VirSNIp SARS-CoV-2 Spike E484K
  - Mutations en duplex: VirSNIp SARS B1117 (Spike del+501)
  - Mutation L452R : VirSNIP SARS-CoV-2 Spike L452R

## 8. Équipement

- Mélangeur de type vortex
- Enceinte close avec lampe UV
- Micro-centrifugeuse pour tubes de 1,5 et 2 mL
- Centrifugeuse à plaques
- LightCycler 480 II de Roche©

## 9. Contrôle de la qualité

- Vérifier et respecter les dates de péremption des réactifs;
- Vérifier et respecter la date de contrôle de l'appareil;
- Se référer au *Guide des bonnes pratiques de laboratoire en IDBM (GU-IDBM-001)* pour le comportement général dans les locaux.

## 10. Précautions spéciales

- ❖ Utiliser le marqueur le plus discrètement possible, et seulement sur les côtés de la plaque, afin de ne pas nuire à la lecture dans l'appareil;
- ❖ Éviter de toucher le scellant de la plaque aux endroits de lecture;
- ❖ Toujours centrifuger la plaque avant la lecture dans l'appareil pour éliminer les bulles au ménisque (l'appareil effectue la lecture de la fluorescence au ménisque).

## 11. Exposé de la procédure

1. Compléter le registre de travail associé à la procédure;
2. Au local Post-PCR :
  - Ouvrir l'appareil LC480 II et le logiciel et cliquer sur «New experiment from template»;
  - Sélectionner le gabarit : SNP-SARSCOV
3. Enregistrer le fichier dans le dossier EXPERIMENTS/VARIANTS-COVID-ROUTINE selon la nomenclature AAAA/MM/JJ-nom de la mutation;
4. Vérifier que les paramètres du programme PCR sont exacts;
5. Sous l'onglet « Subset editor », créer un nouveau « subset » avec les positions occupées seulement;

6. Sous l'onglet « Sample editor », sélectionner « Abs Quant », sélectionner le « subset » créé et éditer les numéros de spécimens; imprimer le schéma de plaque en cliquant sur « Toggle view (Table) » et avec l'outil de capture d'écran.
7. Au local des réactifs, procéder au mélange réactionnel selon le registre associé.
8. Homogénéiser le mélange réactionnel au vortex à puissance maximale pendant quelques secondes, puis centrifuger brièvement.
9. Distribuer **10 µl** de mélange réactionnel dans les puits sélectionnés.
10. Au local pré-PCR, déposer **10 µl** d'extrait d'ARN purifié, préalablement centrifugé et mélangé, de chaque échantillon et contrôle. S'assurer de la correspondance entre la numérotation des échantillons sur le registre et le schéma de la microplaque.
11. Couvrir la microplaque d'un scellant de qualité optique spécifique à l'appareil.
12. Déposer la plaque dans l'appareil LC4800 II et démarrer l'analyse.

## 12. Résultats

- A) Lorsque l'analyse est terminée, cliquer sur l'onglet « Analysis » et choisir l'analyse 'Tm calling' et ensuite 'calculate'.
- B) Avertir le professionnel en charge que l'analyse est disponible pour l'émission des résultats.

## 13. Interprétation des résultats

Pour chaque spécimen, analyser les courbes des températures de dissociation et les interpréter selon les recommandations du fabricant. Les courbes atypiques devront être interprétées avec circonspection et au besoin, le spécimen séquencer.

Mutation N501Y	Tm (°C) LC480	Mutation del69-70	Tm (°C) LC480
Souche sauvage 501N (WT)	55 – 57	Souche sauvage (WT)	57-59
N501Y	60 – 62	del69-70	63-66

Mutation duplex N501Y/del69-70	Tm (°C) LC480	Mutation E484K	Tm (°C) LC480
Souche sauvage 501N (WT)	48,5±2	Souche sauvage 484E (WT)	52-55
501Y	54,7±2	484K	56-58
del69-70	60±2	484Q	48-51

Mutation L452R	Tm (°C) LC480
Souche sauvage L452 (WT)	48-51
452R	56-58
453F	44-46

## 14. Limites de la méthode

La validation de la méthode a démontré une limite de détection pour chaque trousse décrite ci-bas :

Mutations N501Y, del H69/V70 et duplex del+501 : détection jusqu'à 100 copies par  $\mu\text{l}$  (dilution  $10^{-4}$ )

Mutation E484K : détection jusqu'à 1000 copies par  $\mu\text{l}$  (dilution  $10^{-3}$ )

La limite de la méthode pour chaque trousse a été établie à l'aide des standards Britannique, Sud-Africain et Brésilien de la compagnie Twist Bioscience (Standards purs concentrés à 1 million de copies/ $\mu\text{l}$ ).

## 15. Guide de dépannage

Se référer à la procédure d'utilisation en vigueur du LightCycler 480 II de Roche© pour la manipulation de l'appareil et le manuel du fabricant.

## 16. Enregistrement des données

Chaque analyse est enregistrée dans le dossier informatique dédié. Le secteur Identification bactérienne-Biologie moléculaire a la responsabilité d'informer le professionnel responsable lorsque l'analyse est terminée et ce dernier est responsable de la gestion des résultats qui s'en suit. Ces résultats sont transmis au professionnel responsable du dossier SGIL à l'aide d'un fichier excel.

## 17. Références

- Manuel d'utilisation VirSNiP SARS-CoV-2 Spike N501Y Cat.-No. 53-0780-96
- Manuel d'utilisation VirSNiP SARS-CoV-2 Spike del H69/V70 Cat.-No. 53-0781-96
- Manuel d'utilisation VirSNiP SARS-CoV-2 Spike E484K Cat.-No. 53-0789-96
- Manuel d'utilisation VirSNiP SARS B117 (Spike del+501) Cat.-No. 53-0790-96
- Manuel d'utilisation VirSNIP SARS CoV-2 Spike L452R Cat-No. 53-0793-96

- LightCycler® 480 Probes Master. Version June 2005
- Présentation du système LightCycler® 480. Auteur : Laurent Acoca M. Sc. A

## 18. Documents associés

RE-IDBM-186	Détection de mutations du SARS-CoV-2 sur LC480
PR-IDBM-065	Guide d'utilisation du LightCycler 480 II de Roche©



## Annexe 1 Mélanges réactionnels et protocoles PCR

Réactifs	Volume par réaction	Volume total
Eau de la trousse	5.4 µl	
Amorces et sonde (bouchon jaune)	0.5 µl	
Master Mix	4,0 µl	
RT enzyme	0,1 µl	
<b>Volume à distribuer</b>	10 µl	
<b>Volume d'ARN</b>	10 µl	
<b>Volume total</b>	20 µl	

	Mode	Température	Durée	Cycle	Ramp rate
Amplification	RT	55 °C	5 min.	1	4,4
	Dénaturation	95 °C	5 min.	1	4,4
	Cycles	95°C	5 sec.	45 cycles	4,4
		60°C	15 sec.		2,2
72°C		15 sec.	4,4		
Melting curve		95°C	30 sec.	Acquisition mode : continuous Acquisitions [per °C] : 3 Melting slope : entre 0.19 et 0.29 °C/s	4,4
		40 °C	2 min.		1,5
		75 °C	0:00 minute		N/A
Refroidissement		40 °C	30 sec.	N/A	1,5



Instructions For Use

# VirSNIp SARS-CoV-2 Spike E484K

530

Cat.-No. 53-0789-96

Kit with reagents for 96 PCR reactions 20 µl for genotyping of SARS-CoV-2 RNA [lyophilized]

## 1. Content, Storage and Expiry

- 1 Vial yellow cap 96 reactions SARS CoV (lyophilized)
- 1 Mixed positive control

## Storage at Arrival:

Store cooled or at ambient temperature  
Do **not** freeze the lyophilized reagents.

- Kits are stable for one year after production (store 4°C to 25°C in the dark). See lot-specific expiry date.
- Reconstituted reagents are stable for two weeks if stored protected from light and cooled (2°C to 8°C).
- Dissolved reagent can be stored long-term if frozen (-15°C to -25°C). Avoid multiple freeze-thaw cycles.
- Reconstituted positive controls must be stored frozen. Minimize freeze-thaw cycles.

## 2. Additional Reagents required

LightCycler® Multiplex RNA Virus Master  
or 1-step RT polymerase

Cat.-No. 06 754 155 001  
90-9999-96

## 3. Introduction

The SARS-CoV-2 genome was published 11.1.20 (Genbank MN908947). Hundreds of thousand isolates have been sequenced. The UK and the South Africa variant are reported to be more contagious. Spike protein variants 417N, **484K**, 501Y and 614G are marker for the South African cluster.

Spike Prot. Variation	Genetic Variation	UK* B.1.1.7	ZA B.1.351	Nigeria B.1.1.238	Brasil B.1.1.28	DK mink Clust V	Function, Effect	Assay
del HV69/70	del21765-770	x				x	evasion of immune response	53-0781
K417N	G22813T		x				RBD (ACE binding domain)	53-0787
N439K	C22879A						ACE binding, immune escape	53-0788
Y453F	A22920T					x	RBD (weaker ACE binding)	53-0783
E484K	G23012A		x		x		RBD (ACE binding domain)	53-0789
N501Y	A23063T	x	x		x		RBD (stronger ACE binding)	53-0780
A570D	C23271A	x						53-0791
D614G	A23403G	x	x	x	x	x	RBD (stronger ACE binding)	53-0782
P681H	C23604A	x		x			furin cleavage site	53-0786
V1176F	G25088T				x		increased mortality	53-0784

## 4. Description

A 76 bp PCR long fragment is amplified and analyzed with a melting curve using a 484K-specific probe. For using Roche polymerase the amplification of both variants 484E and 484K is not visible.

## 5. Specification

Sensitivity not tested.

## 6. Sample Material and Extraction

Coronaviruses affect normally the lower respiratory system, but SARS-CoV-2 is found also in nose and throat. Typical clinical samples are throat and nasopharyngeal swabs, sputum, saliva or gargle solution. Product tested with heat-treated gargle solution. For RNA extraction see manufacturer's kit instructions.

## 7. Material Safety Data (MSDS)

This product is not hazardous (according to regulation (EC) No 1272/2008), not toxic, not IATA-restricted. Not from human, animal or plant origin. Product contains synthetic oligonucleotide primers and probes.

According to OSHA 29CFR1910.1200, Australia [NOHSC:1005, 1008 (1999)] and EU Directives (EC) No 1907/2006 and (EC) No 2015/830 any products which do not contain more than 1% of a component classified as hazardous or classified as carcinogenic do not require a MSDS.



## 8. Instructions for Use

Instruction for Roche 480 instruments. Capillary LightCycler®, LightCycler® 96, MyGo and BioRad CFX96 instruments give similar results (FAM channel). For other instruments use SYBR Green melting option.

### 8.1. Programming Roche 480 Instruments (Standard ModularDx Program)

**Detection Format 530 Channel**                      **Set Quant Factor 10, Max Integration Time 1 sec**

LightCycler® 480 Instrument: 483-533

LightCycler® 480 II Instrument: 465-510

cobas z 480 Analyzer (open channel): 465-510

Program Step:	RT Step	Denaturation	Cycling			Cooling
<b>Parameter</b>						
Analysis Mode	<b>None</b>	None	Quantification mode			None
Cycles	1	1	40-45			1
Target [°C]	55	95	95	60	72*	40
Hold [hh:mm:ss]	00:05:00	00:05:00	00:00:05	00:00:15	00:00:15	00:00:30
Ramp Rate [°C/s] <b>96</b>	4.4	4.4	4.4	2.2	4.4	1.5
Ramp Rate [°C/s] <b>384</b>	4.6	4.6	4.6	2.4	4.6	2.0
Acquisition Mode	None	None	None	<b>Single</b>	None	None

\* 72°C step can be skipped. 95°C can be cut to 3 s, 60°C to 12 s. RT and Den to 3 min (total time 45 min) Table 1

#### 8.1.1. Melting Analysis (may be added or programmed as second run)

**Detection Format**                                      Hydrolysis Probe or SimpleProbe

LightCycler® 480 Instrument: 483-533

LightCycler® 480 II Instrument: 465-510

cobas z 480 Analyzer (open channel): 465-510

Program Step:	Melting			Cooling
<b>Parameter</b>				
Analysis Mode	Melting Curves mode			None
Cycles	1			
Target [°C]	95	40	75	40
Hold [hh:mm:ss]	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate [°C/s]	4.4	1,5	-	1.5
Acquisition Mode	-	-	<b>Continuous</b>	
Acquisitions [per °C]	-	-	3**	None

Table 2

\*\* Melting slope shall be 0.19 to 0.29°C per second. If reading more channels reduce the number of acquisitions/sec.

## 8.2. Experimental Protocol

- **Sample material:** Use aqueous nucleic acid preparations
- **Negative control:** Always run at least one no-template control (NTC) - replace the template NA with water.
- **Positive control:** Run a positive control - replace the template NA with the provided Positive Control.

For an increased sensitivity use 10 µl nucleic acid per 20 µl reaction.

Product tested for 10 µl reaction volume (192 reactions).

### 8.2.1. Preparation of Parameter-Specific Reagents (PSR, 96 reactions):

The reagent vial with the **yellow** cap contains the primers and probe to run 96+ PCR reactions.

**Check for the orange pellet**, then **add 50 µl** PCR-grade water, mix (vortex) and spin down. For robotic pipetting the volume can be extended to 55 µl (signals will decrease by 10-20%).

► **Use 0.5 µl** reagent per 20 µl PCR reaction.

## 8.2.2. Preparation of the Positive Control

Add **160 µl** PCR-grade water to the vial with the **black** cap, if using 10 µl sample volume add **320 µl**. Mix by pipetting up and down 10 times. If vortexing spin down to collect the solution. Store dissolved controls frozen.

**Notes:** Opening this vial may cause contamination of the workspace. Pulse spin vial prior to opening.

► Use **5 µl** positive control (≈ Cp 27-30) for a 20 µl PCR reaction (10 µl if using 10 µl sample volume).

## 8.2.3. Preparation of the Reaction Mix

Multiply volumes by the number of reactions plus controls and one reserve, prepare in a cooled tube:

For use with the Roche LightCycler® Multiplex RNA Virus Master		
for 5 µl extract	Component	10 µl extract
10.4 µl	Water, PCR-grade (colorless cap, provided with the Roche Master kit)	5.4 µl
0.5 µl	Reagent mix (parameter specific reagents containing primers and probes)	0.5 µl
--	Control Reaction and additional assays (Multiplex PCR)	--
4.0 µl	Roche Master (see Roche manual)	4.0 µl
0.1 µl	RT Enzyme (see Roche manual)	0.1 µl
<b>15.0 µl</b>	<b>Volume of Reaction Mix</b>	<b>10.0 µl</b>

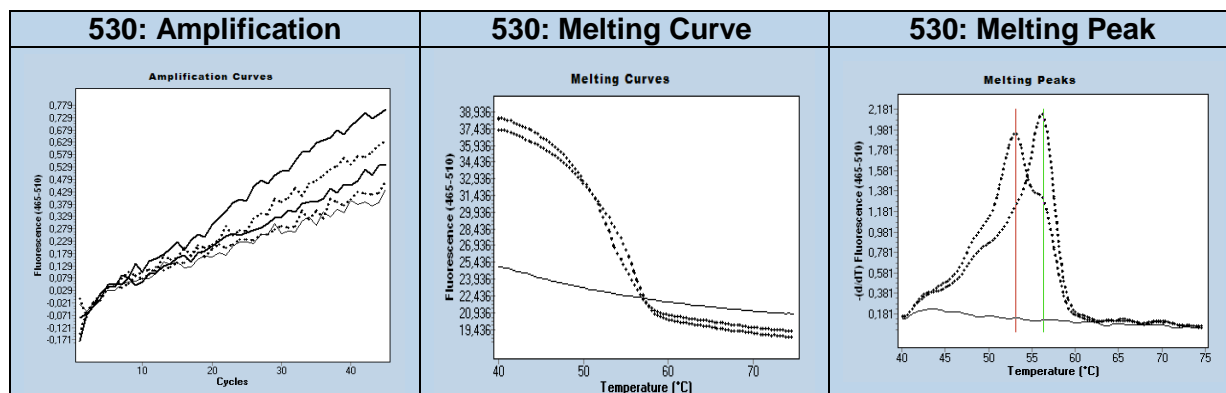
Table 3

Mix gently, spin down and transfer **15 µl (10 µl)** per well.

Add **5 µl (10 µl)** of sample or control to each well for a final reaction volume of 20 µl. Seal plate and centrifuge.

**Start run**

## 9. Typical Results



**Figure 1.** Left Amplification not visible. Center Melting curves. Right 484E has a melting point of 53°C (± 2)°C, 484K has a Tm of 56°C (± 2)°C. Positive control is a mixture 484Q and 484K

## 10. Reading the Results

Use the Second Derivative Maximum method (Automated (F" max). View results in the 530 channel. The negative control (NTC) must show no signal. For the melting curve analysis use 'Tm calling'.

Channel 530 Amplification	Channel 530 Melting analysis	Channel 530 NTC Control	Result
Not relevant	Not relevant	Negative / no peak	No virus amplified / not detectable
Invisible	Tm ~ 51.0°C*	Negative	SARS Spike 484Q (not ZA variant)
Invisible	Tm ~ 53.1°C*	Negative	SARS Spike 484E (not ZA variant)
Invisible	Tm ~ 56.3°C*	Negative	SARS Spike 484K (poss. ZA variant)
Not relevant	Not relevant	Positive	Contamination Repeat experiment

Tm values shift depending on the instrument, speed of heating, mastermix, salt contents and detection format.

\* Temperatures with 1step RT pol. 90-9999-96 are 3-4°C higher Positive control is a mixture 484Q and 484K

## 11. References

Genomic characterisation of emergent SARS-CoV-2 lineage in UK defined by novel set of spike mutations. Rambaut et al., 2020 [www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-brief-rapid-increase-sars-cov-2-variant-united-kingdom](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-brief-rapid-increase-sars-cov-2-variant-united-kingdom)  
 Circulating SARS-CoV-2 spike var. N439K maintains fitness while evading antibody-mediated immunity. Thomson et al., 2020  
 Mutations in SARS-CoV-2 spike protein and RNA pol. are associated with COVID-19 mortality risk. Hahn et al., 2020

## 12. Multiplex PCR Compatibility

This SNP assay can be combined with 51-0776-96 SARS E+N and either EAV spiked extraction control or UBC human mRNA extraction control or with the complete kit 60-0770-96 Sarbecovirus E+N+UBC.

### Multiplex PCR and Instrument Compatibility

Color Comp 40-0320 mandatory only for Multiplex PCR using more channels


500	530	580	610	640	660
	SNP				
SarbecoV	SNP	UBC mRNA			
SarbecoV	SNP				UBC
SarbecoV	SNP				EAV
	SNP	SARS N	SARS E		UBC

480 II	z 480	LC96	LC2.0	Nano
X	X	X	X	X
X	X	X		
X	X	X		
X	X	X		
X	X	X		

Table 3

## 13. Version History

V210101	Release version	2020-12-31
V210122	8.2.2 Positive control included 8. Short PCR 12. Multiplex 10. Tm values for 1-step RT polymerase 90-9999-96	2021-01-22

Certificate of Analysis (CoA)						
Lot n° 5005 Expiry : YYYY-MM-DD						
	<b>484E</b>	<b>484K</b>	<b>484Q</b>		<b>PC</b>	<b>passed</b>
<b>Tm range Measured</b>	53-55°C	56-59°C	48-51°C	<b>Cp range</b>	-	✓
<b>Signal level Measured</b>	2-10	2-10	2-10			✓
<b>Negatives</b>	<b>10/10</b>					✓
<p><b>Note:</b> Cp (crossing point) values collected with pDNA (single target PCR). Fluorescence (FL) levels depend on instrument settings and may vary. The Cp values will vary from instrument to instrument by up to 2 cycles, while the distance between two dilution steps should be relative constant (<math>\Delta</math>Cp).</p>						
<b>DOM (manufactured):</b> YYYY-MM-DD			<b>QC Acceptance:</b> YYYY-MM-DD			
<p>We, the undersigned, certify that the product designated above has been obtained in accordance with the rules of production and quality control.</p>						
<b>Name(s) :</b>						
<i>Name1</i>			<i>Name2</i>			

**TIB MOLBIOL** Syntheselabor GmbH | Eresburgstr. 22-23 | D-12103 Berlin | Germany  
 Tel. +49 30 78 79 94 55 | FAX +49 78 79 94 99 | dna@tib-molbiol.de | WWW.TIB-MOLBIOL.COM  
 Geschäftsführer (CEO): Olfert Landt | Register HRB 93163 B | Registergericht Berlin Charlottenburg