

**CONGEN**

# **SureCycle®**

Art. No. F4001  
260 rxn

## **User Manual** **System Verification**



**April 2026**

 **Inhalt**

1.	Allgemeines .....	4
1.1	Verwendungszweck .....	4
1.2	Beschreibung .....	4
1.3	Kit-Inhalt und Lagerung .....	5
1.4	Zusätzlich benötigte Geräte und Materialien .....	5
1.5	Vorsichtsmaßnahmen .....	5
1.6	Geräteeinstellungen .....	6
1.7	Detektionskanaleinstellungen .....	6
2	Protokoll .....	7
2.1	Empfohlenes Pipettierschema zur System-Verifizierung .....	7
2.2	Herstellen des Master-Mix .....	8
2.3	Herstellen des real-time PCR-Mix .....	8
3	Auswertung der Ergebnisse .....	8
3.1	SureCycle® Profil 1 Denaturierung .....	8
3.1.1	Denaturierungs-System (VIC-Kanal) .....	8
3.1.2	Annealing-System (FAM-Kanal) .....	10
3.2	SureCycle® Profil 2 Annealing .....	11
3.2.1	Annealing-System (FAM-Kanal) .....	11
3.2.2	Denaturierungs-System (VIC-Kanal) .....	13
4	Weitere Informationen .....	13
4.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel .....	13
4.2	Technischer Support .....	13
4.3	Symbolerklärungen und Hinweise .....	13



## **Content**

1	General Information .....	14
1.1	Intended Use.....	14
1.2	Description .....	14
1.3	Kit components and storage .....	15
1.4	Additionally required equipment and materials .....	15
1.5	Precautions for users .....	15
1.6	Setup.....	16
1.7	Detection channel Set-up .....	16
2	Protocol .....	17
2.1	Recommended pipetting scheme for system verification .....	17
2.2	Preparation of the master-mix .....	18
2.3	Preparation of the real-time PCR mix.....	18
3	Interpretation of results .....	18
3.1	SureCycle® profile 1 Denaturation .....	18
3.1.1	Denaturation system (VIC channel).....	18
3.1.2	Annealing system (FAM-channel) .....	20
3.2	SureCycle® Profile 2 Annealing.....	21
3.2.1	Annealing system (FAM-channel) .....	21
3.2.2	Denaturation system (VIC-channel).....	23
4	Further Information .....	23
4.1	Product Information.....	23
4.2	Technical Support .....	23
4.3	Explanation of Symbols .....	23

## **1. Allgemeines**

### **1.1 Verwendungszweck**

SureCycle® eignet sich zur Routineüberprüfung der real-time PCR in allen Laboratorien. Besonders Laboratorien, die eine ständige Kontrolle ihrer Prüfmittel benötigen (ISO 15189 und 9001, GMP und GLP) verfügen mit SureCycle® über ein zuverlässiges und schnelles Prüfverfahren. Das Kit ist ausgelegt für die Überprüfung der Eignung des gewählten Plastikmaterials und insbesondere zur Überprüfung der korrekten Temperatursteuerung von Thermocyclern.

### **1.2 Beschreibung**

Die real-time Polymerase Ketten Reaktion (PCR) ist ein etabliertes Verfahren zum empfindlichen und spezifischen Nachweis von DNA-Abschnitten. Das Anwendungsgebiet reicht von der klinischen Infektionsdiagnostik über den Nachweis von Pathogenen in Lebensmitteln bis hin zur forensischen Analytik. Jede PCR-Reaktion ist im Wesentlichen über die Primer Sequenz und ein PCR-Protokoll mit spezifischen Temperatur- und Zeitintervallen definiert. Der Nachweis ist daher abhängig von der korrekten Temperatursteuerung des verwendeten Thermocyclers. Zur Vermeidung von falsch positiven oder von falsch negativen Ergebnissen ist eine Kontrolle der korrekten Temperatursteuerung der verwendeten Geräte unerlässlich.

Beim SureCycle®-System handelt es sich um eine thermosensitive Duplex real-time PCR. Die Thermosensitivität des Verfahrens wird über die Instabilisierung der Primerbindungen erreicht. Die Bindung der Primer an den komplementären Strang wird destabilisiert und die Annealing- und Denaturierungsreaktion wird somit temperatursensitiv. Ein solches System reagiert sehr empfindlich auf das sogenannte 'overshooting' von Thermocyclern. Der Test ist ebenso sensitiv gegenüber einer unzureichenden Denaturierung der doppelsträngigen DNA (dsDNA), verursacht durch eine zu niedrige Denaturierungstemperatur ('undershooting'). Beides, 'overshooting' bei der Annealingtemperatur und 'undershooting' bei der Denaturierungstemperatur reduzieren die Effizienz der PCR.

Zur Überprüfung der korrekten Temperatur während der Annealing- und Denaturierungsreaktion, werden zwei Thermalprofile verwendet: SureCycle® Profil 1 Denaturation und SureCycle® Profil 2 Annealing.

Mit dem Profil 1 wird die optimale Denaturierungstemperatur programmiert, sowie eine suboptimale Annealing-Temperatur.

In dem Profil 2 wird nun umgekehrt die optimale Annealing-Temperatur überprüft, sowie eine suboptimale Denaturierungs-Temperatur.

Das Verfahren kann mit allen gängigen real-time PCR-Geräten, die mindestens die zwei Reporterfarbstoffe FAM und VIC/HEX gleichzeitig detektieren können, verwendet werden. Die interne technische Geräteverifizierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Bio-Rad CFX96, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio Molecular Systems MIC, Agilent AriaDx sowie am Agilent Mx3005P.

**1.3 Kit-Inhalt und Lagerung**

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	4 x 1400 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 200 µl	Dunkelrot

**Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei – 28°C bis – 16 °C zu lagern. Die Taq Polymerase kann bei mehrfacher Verwendung am selben Tag bei +2 bis +8°C gelagert werden.**

**Hinweis: Die Taq Polymerase kann in gefrorenem oder nicht gefrorenem Zustand vorliegen. Dies hat keinen Einfluss auf die Qualität der Taq Polymerase oder die Performance der real-time PCR.**

**1.4 Zusätzlich benötigte Geräte und Materialien**

- Real-time PCR-Gerät mit zwei Detektionskanälen (510 nm und 580 nm)
- Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

**1.5 Vorsichtsmaßnahmen**

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem Laborpersonal durchzuführen.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Während des Umgangs mit Proben Einmalhandschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In den Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften

**1.6 Geräteeinstellungen**

	<b>SureCycle® Profil 1 Denaturierung</b>	<b>SureCycle® Profil 2 Annealing</b>
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	1 min, 95°C 45	1 min, 95°C 45
Denaturation	15 sec, <b>95°C</b>	15 sec, <b>92°C</b>
Annealing/Extension	30 sec, <b>63°C</b>	30 sec, <b>60°C</b>
Cooling	10 sec, 40 °C	10 sec, 40 °C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

**1.7 Detektionskanaleinstellungen**

Für zusätzliche Informationen wird auf die jeweilige Cycler-Bedienungsanleitung verwiesen.

<b>Real-time PCR-Gerät</b>	<b>Detektionskanal</b>	<b>Quencher</b>	<b>Bemerkung</b>
<b>Agilent Mx3005P</b>	FAM	+	
	HEX	+	
<b>Agilent AriaDx/Mx</b>	FAM	+	
	HEX	+	
<b>Applied Biosystems 7500</b>	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	VIC	None	
<b>Bio-Rad CFX96/ Dx/Opus</b>	FAM	+	Baseline Einstellungen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Baseline subtracted curve fit</li> <li>• Apply fluorescence drift correction</li> </ul>
	VIC / HEX	+	
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	green	+	<b>Ignore cycles before</b> , wenn zu Beginn des Laufs eine signifikante Abweichung in der Grundlinie vorliegt. Siehe Seite 47 Bedienungsanleitung des Cyclers, Abschnitt 12.1.2 Parameter der Cycling-Analyse.
	yellow	+	
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	green	+	<b>Achtung:</b> Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein.
	yellow	+	
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	533-580	+	
<b>Roche cobas® z 480 Analyzer</b>	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	540-580	+	

## 2 Protokoll

### 2.1 Empfohlenes Pipettierschema zur System-Verifizierung

#### Blockcycler:

Zur Überprüfung des real-time PCR-Gerätes wird empfohlen 4 x 4 wells der Eckpositionen (rot markiert), sowie 4 wells in der Mitte der Platte (rot markiert) je SureCycle® Profil zu belegen (siehe Abbildung 1).

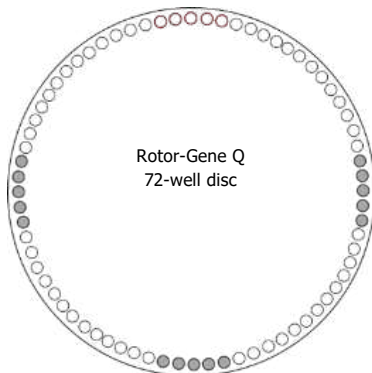
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Abbildung 1: Pipettierschema für Blockcycler im 96-well Format**

#### Rotorcycler:

Es wird empfohlen 20 Reaktionen je SureCycle® Profil zu pipettieren. Davon werden 5 Reaktionen als Referenzreaktionen (Position 1-5, rot markiert) verwendet.

Als Beispiel wird im Folgenden der Qiagen Rotor-Gene Q (72-well disc) dargestellt. Die Reaktionsverteilung für andere Rotorcycler, wie Bio Molecular Systems MIC und RIDA®CYCLER, kann entsprechend der 48-Reaktionen Belegung angepasst werden.



**Abbildung 2: Pipettierschema für Rotorcycler am Beispiel der 72-well disc, Qiagen Rotor-Gene Q**

## 2.2 Herstellen des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen, ist entsprechend der empfohlenen Plattenbelegung für 20 Reaktionen je SureCycle® Profil zu berechnen (siehe 2.1.).

Des Weiteren wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, mischen und zentrifugieren.

### Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 20 Reaktionen:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	20 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
Reaction Mix	19,3 µl	424,6 µl
Taq Polymerase	0,7 µl	15,4 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>440 µl</b>

**Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.**

## 2.3 Herstellen des real-time PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß. Verschließen der Gefäße.
- Kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäße mit wenigen Umdrehungen pro Minute.
- Reaktionsgefäße in das real-time PCR Gerät einsetzen und entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

# 3 Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analyse Software der jeweiligen real-time PCR-Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Eine Reaktion wird als **positiv** bewertet, wenn eine Amplifikation im Kanal stattgefunden hat.

Eine Reaktion wird als **negativ** bewertet, wenn keine Amplifikation im Kanal stattgefunden hat.

## 3.1 SureCycle® Profil 1 Denaturierung

### 3.1.1 Denaturierungs-System (VIC-Kanal)

Das SureCycle® Profil 1 Denaturierung erfolgt mit der optimalen Denaturierungstemperatur von 95°C und der suboptimalen Annealing-/Extensionstemperatur von 63°C. In diesem Fall werden für das Denaturierungs-System (VIC-Kanal) positive Ergebnisse erwartet.

Im FAM-Kanal überprüft das System das korrekte Annealing/Extension. Da es sich um die suboptimale Temperatureinstellung handelt, sollte keine Amplifikation stattfinden und dementsprechend negative Ergebnisse erhalten werden.

**Blockcycler**

Als Soll-Wert wird der Mittelwert der Referenzreaktionen (Mittelwert Cp D6/D7/E6/E7, rot markiert) berechnet. Der Sollbereich der Kontrollreaktionen beträgt **±2 Cp** der Referenzreaktionen.

Befinden sich die Cp-Werte aller Kontrollreaktionen innerhalb dieses Soll-Bereiches, gilt die Verifizierung des real-time PCR-Gerätes als bestanden.

Befinden sich ein oder mehrere Cp-Werte aller anderen Kontrollreaktionen außerhalb dieses Soll-Bereiches, ist die Verifizierung nicht bestanden.

Ergibt sich eine Abweichung des Cp-Wertes einer Kontrollreaktion von dem Soll-Bereich, sollte eine vollständige Überprüfung aller Wells erfolgen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>26,8</b>	<b>26,6</b>									<b>26,8</b>	<b>26,4</b>
<b>B</b>	<b>26,8</b>	<b>26,8</b>									<b>26,9</b>	<b>26,7</b>
<b>C</b>												
<b>D</b>						26,9	27,0					
<b>E</b>						27,0	27,0					
<b>F</b>												
<b>G</b>	<b>26,7</b>	<b>26,8</b>									<b>26,8</b>	<b>26,7</b>
<b>H</b>	<b>26,6</b>	<b>26,8</b>									<b>26,6</b>	<b>26,7</b>

**Abbildung 3: Beispielauswertung SureCycle® Profil 1 Denaturierung, VIC-Kanal**

Mittelwert D6/D7/E6/E7: **27,0**

Soll-Bereich ±2 Cp: **25,0 – 29,0**

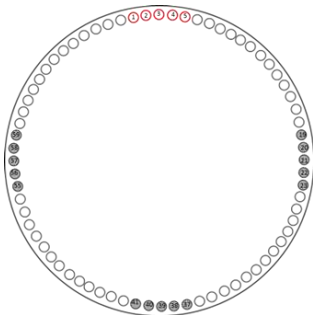
**Rotorcycler**

Als Soll-Wert wird der Mittelwert der Referenzreaktionen (Mittelwert Cp Position 1-5, rot markiert) berechnet. Der Sollbereich der Kontrollreaktionen beträgt **±2 Cp** der Referenzreaktionen.

Befinden sich die Cp-Werte aller anderen Kontrollreaktionen innerhalb dieses Soll-Bereiches, gilt die Verifizierung des real-time PCR-Gerätes als bestanden.

Ergibt sich eine Abweichung des Cp-Wertes einer oder mehrerer Kontrollreaktion von dem Soll-Bereich, ist die Verifizierung nicht bestanden.

Als Beispiel wird im Folgenden der Qiagen Rotor-Gene Q (72-well disc) dargestellt. Die Reaktionsverteilung für andere Rotorcycler, wie Bio Molecular Systems MIC und RIDA®CYCLER, kann entsprechend der 48-Reaktionen Belegung angepasst werden.



**Abbildung 4: Beispielauswertung SureCycle® Profil 1 Denaturierung, VIC-Kanal**

Mittelwert Pos. 1-5: **27,0** Soll-Bereich ±2 Cp: **25,0 – 29,0**

**Tabelle 1: Interpretation der Ergebnisse des SureCycle® Profil 1 Denaturierung (VIC-Kanal)**

VIC-Kanal Denaturierungs-System		Ergebnis	Konsequenz für weitere Analysen
Referenz-reaktion	Kontroll-reaktion		
positiv	Cp innerhalb Soll-Bereich	korrekt	Real-time PCR Gerät zeigt keine Temperaturfehler
positiv	Cp außerhalb Soll-Bereich	inkorrekt	Denaturierungstemperatur zu niedrig → potenziell falsche PCR-Ergebnisse
negativ	negativ	inkorrekt	Denaturierungstemperatur zu niedrig → potenziell falsche PCR-Ergebnisse

**3.1.2 Annealing-System (FAM-Kanal)**

Für die Auswertung sollten nur negative Ergebnisse vorliegen.

Sind alle Reaktionen negativ, gilt die Verifizierung des real-time PCR-Gerätes als bestanden.

Liegen positive Cp-Werte für die Kontroll- oder Referenzreaktionen vor, müssen diese Ergebnisse anhand Tabelle 2 genauer bewertet werden.

**Tabelle 2: Interpretation der Ergebnisse des SureCycle® Profil 1 Denaturierung (FAM-Kanal)**

FAM-Kanal Annealing-System		Ergebnis	Konsequenz für weitere Analysen
Referenz-reaktion	Kontroll-reaktion		
negativ	negativ	korrekt	Real-time PCR-Gerät zeigt keine Temperaturfehler
positiv	negativ	inkorrekt	Annealingtemperatur zu niedrig → potenziell falsche PCR-Ergebnisse
positiv	positiv	inkorrekt	Annealingtemperatur zu niedrig → potenziell falsche PCR-Ergebnisse
negativ	positiv	inkorrekt	Annealingtemperatur zu niedrig → potenziell falsche PCR-Ergebnisse

**3.2 SureCycle® Profil 2 Annealing**

**3.2.1 Annealing-System (FAM-Kanal)**

Das SureCycle® Profil 2 Annealing erfolgt mit der suboptimalen Denaturierungstemperatur von 92°C und der optimalen Annealing-/Extensionstemperatur von 60°C. In diesem Fall werden im Denaturierungs-System (VIC-Kanal) negative Ergebnisse erwartet.

Im FAM-Kanal überprüft das System das korrekte Annealing/Extension. Da es sich um die optimale Temperatureinstellung handelt, sollte eine Amplifikation stattfinden und dementsprechend positive Ergebnisse erhalten werden.

**Blockcycler**

Als Soll-Wert wird der Mittelwert der Referenzreaktionen (Mittelwert Cp D6/D7/E6/E7, rot markiert) berechnet. Der Sollbereich der Kontrollreaktionen beträgt **±2 Cp** der Referenzreaktionen.

Befinden sich die Cp-Werte aller Kontrollreaktionen innerhalb dieses Soll-Bereiches, gilt die Verifizierung des real-time PCR-Gerätes als bestanden.

Befinden sich ein oder mehrere Cp-Werte aller anderen Kontrollreaktionen außerhalb dieses Soll-Bereiches, ist die Verifizierung nicht bestanden.

Ergibt sich eine Abweichung des Cp-Wertes einer Kontrollreaktion von dem Soll-Bereich, sollte eine vollständige Überprüfung aller wells erfolgen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>26,8</b>	<b>26,6</b>									<b>26,8</b>	<b>26,4</b>
<b>B</b>	<b>26,8</b>	<b>26,8</b>									<b>26,9</b>	<b>26,7</b>
<b>C</b>												
<b>D</b>						<b>26,9</b>	<b>27,0</b>					
<b>E</b>						<b>27,0</b>	<b>27,0</b>					
<b>F</b>												
<b>G</b>	<b>26,7</b>	<b>26,8</b>									<b>26,8</b>	<b>26,7</b>
<b>H</b>	<b>26,6</b>	<b>26,8</b>									<b>26,6</b>	<b>26,7</b>

**Abbildung 5: Beispielauswertung SureCycle® Profil 2 Annealing, FAM-Kanal**

Mittelwert D6/D7/E6/E7: **27,0**

Soll-Bereich **±2 Cp: 25,0 – 29,0**

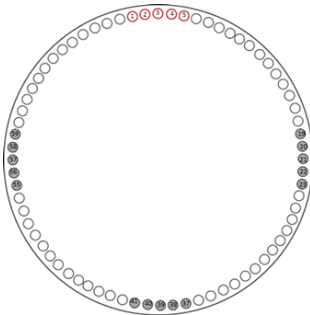
**Rotorcycler**

Als Soll-Wert wird der Mittelwert der Referenzreaktionen (Mittelwert Cp Positionen 1-5, rot markiert) berechnet. Der Sollbereich beträgt  $\pm 2$  Cp der Referenzreaktionen.

Befinden sich die Cp-Werte aller Kontrollreaktionen innerhalb dieses Soll-Bereiches, gilt die Verifizierung des real-time PCR-Gerätes als bestanden.

Ergibt sich eine Abweichung des Cp-Wertes einer oder mehrere Kontrollreaktion von dem Soll-Bereich, ist die Verifizierung nicht bestanden.

Als Beispiel wird im Folgenden der Qiagen Rotor-Gene Q (72-well disc) dargestellt. Die Reaktionsverteilung für andere Rotorcycler, wie Bio Molecular Systems MIC und RIDA®CYCLER, kann entsprechend der 48-Reaktionen Belegung angepasst werden.



**Abbildung 6: Beispielauswertung SureCycle® Profil 2 Annealing, FAM-Kanal**

Mittelwert Pos. 1-5: **27,0** Soll-Bereich  $\pm 2$  Cp: **25,0 – 29,0**

**Tabelle 3: Interpretation der Ergebnisse des SureCycle® Profil 2 Annealing (FAM-Kanal)**

FAM-Kanal Annealing-System			
Referenz- reaktion	Kontroll- reaktion	Ergebnis	Konsequenz für weitere Analysen
positiv	Cp innerhalb Soll-Bereich	korrekt	Real-time PCR Gerät zeigt keine Temperaturfehler
positiv	Cp außerhalb Soll-Bereich	inkorrekt	Annealing-Temperatur zu hoch → potenziell falsche PCR-Ergebnisse
negativ	negativ	inkorrekt	Annealing-Temperatur zu hoch → potenziell falsche PCR-Ergebnisse

### 3.2.2 Denaturierungs-System (VIC-Kanal)

Für die Auswertung sollten nur negative Ergebnisse vorliegen.

Sind alle Reaktionen negativ, gilt die Verifizierung des real-time PCR-Gerätes als bestanden.

Liegen positive Cp-Werte für die Kontroll- oder Referenzreaktionen vor, müssen diese Ergebnisse anhand Tabelle 4 genauer bewertet werden.

**Tabelle 4: Interpretation der Ergebnisse des SureCycle® Profil 2 Annealing (VIC-Kanal)**

VIC-Kanal Denaturierungs-System		Ergebnis	Konsequenz für weitere Analysen
Referenz-reaktion	Kontroll-reaktion		
negativ	negativ	korrekt	Real-time PCR Gerät zeigt keine Temperaturfehler
positiv	positiv/negativ	inkorrekt	Denaturierungstemperatur zu hoch → unkritisches Verhalten, falsch positive Ergebnisse sind nicht zu erwarten
negativ	positiv	inkorrekt	Denaturierungstemperatur zu hoch → unkritisches Verhalten, falsch positive Ergebnisse sind nicht zu erwarten

## 4 Weitere Informationen

### 4.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: [www.congen.de/unternehmen/download](http://www.congen.de/unternehmen/download))
- Produktbegleitende Unterlagen (Download: [www.congen.de/eifu/](http://www.congen.de/eifu/))

### 4.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden Sie sich bitte per E-Mail an [info@congen.de](mailto:info@congen.de).

### 4.3 Symbolerklärungen und Hinweise



Chargennummer



Artikelnummer



Verwendbar bis



Anzahl Tests



Lagertemperatur



Hersteller

## **1 General Information**

### **1.1 Intended Use**

The SureCycle®-Kit is intended to use for real-time PCR routine control in all laboratories. Especially laboratories which need a constant control concerning their testing devices (DIN EN ISO 15189 and DIN EN ISO 9001, GMP and GLP) may use the SureCycle®-Kit as a reliable and fast verification method.

The kit is designed to control compatibility of the selected plastic material and to verify the correct temperature control of the thermocycler.

### **1.2 Description**

The real-time Polymerase chain reaction (PCR) is an established method for the specific and sensitive detection of DNA. The area of use spans the clinical infection diagnostics to the analysis of pathogens in food as well as forensics. Each PCR-reaction basically is defined by the primer sequence and the PCR protocol with specific temperature and time intervals. The detection is therefore dependent to the correct temperature system of the thermocycler in use. To prevent false positive or false negative results, the control and verification of the correct temperature system is obligatory.

The SureCycle®-System is a thermosensitive duplex real-time PCR. The temperature sensitivity of the system results from the instability of the primer binding. Binding of the primer to the complementary chain is being destabilized and thereby the annealing- and denaturation reaction become temperature sensitive. Such a system is reacting very sensitively to 'overshooting' of thermocyclers. The test is equally sensitive regarding the inadequate denaturation of double-stranded DNA (dsDNA) due to a too-low denaturation temperature ('undershooting'). Both, 'overshooting' and 'undershooting', of denaturation temperature reduces the efficiency of the PCR.

To control the correct temperature during the annealing- and denaturation reactions, two thermal profiles are used: SureCycle® Profile 1 Denaturation and SureCycle® Profile 2 Annealing.

With Profile 1 an optimal denaturation temperature is programmed, as well as a suboptimal annealing temperature.

Using Profile 2 the opposite situation is evaluated, here the optimal annealing temperature and the suboptimal denaturation temperature is performed.

The real-time PCR assay can be performed with commonly used real-time PCR instruments, equipped for the detection of two fluorescence emissions at the channels FAM and VIC/HEX at the same time.

The internal technical verification of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, Bio Molecular Systems MIC, Agilent AriaDx and Agilent MX3005P.

### 1.3 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	4 x 1400 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 200 µl	Dark Red

**Store all reagents at –28°C to -16°C and protected from light. The Taq Polymerase can be stored at +2 to +8°C for multiple use on the same day.**

**Note: The Taq Polymerase may be in a frozen or unfrozen state. This does not affect the quality of the Taq Polymerase or the performance of the real-time PCR.**

### 1.4 Additionally required equipment and materials

- real-time PCR instrument with two detection channels (510 nm and 580 nm)
- real-time PCR consumable (plates, tubes, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

### 1.5 Precautions for users

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- This test must only be performed by laboratory personnel trained in molecular biology methods.
- Strictly follow the working instructions.
- When handling samples, wear disposable gloves. After finishing the test, wash your hands.
- Do not smoke, eat or drink in areas where samples or test reagents are being used.
- Do not use the kit after the expiration date.
- All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulation for disposal.

**1.6 Setup**

	<b>SureCycle® Profile 1 Denaturation</b>	<b>SureCycle® Profile 2 Annealing</b>
Initial Denaturation (HOLD)	1 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	45	45
Denaturation	15 sec, <b>95°C</b>	15 sec, <b>92°C</b>
Annealing/Extension	30 sec, <b>63°C</b>	30 sec, <b>60°C</b>
Cooling	10 sec, 40 °C	10 sec, 40 °C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

**1.7 Detection channel Set-up**

**For additional details see cyler operating instructions for real-time PCR device.**

<b>Real-time PCR device</b>	<b>Detection channel</b>	<b>Quencher</b>	<b>Note</b>
<b>Agilent Mx3005P</b>	FAM	+	
	HEX	+	
<b>Agilent AriaDx / Mx</b>	FAM	+	
	HEX	+	
<b>Applied Biosystems 7500</b>	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	VIC	None	
<b>Bio-Rad CFX96 /Dx/Opus</b>	FAM	+	Baseline Settings: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Baseline subtracted curve fit</li> <li>• Apply fluorescence drift correction</li> </ul>
	VIC / HEX	+	
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	green	+	<b>Ignore cycles before</b> , if there is a significant deviation in the baseline at the start of the run. Please see page 45 of the cyler operating instructions, section
	yellow	+	
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	green	+	<b>Note:</b> Please use only 0.1 ml reaction tube. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	yellow	+	
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	533-580	+	
<b>Roche cobas® z 480 Analyzer</b>	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	540-580	+	

## 2 Protocol

### 2.1 Recommended pipetting scheme for system verification

**Blockcyler:**

For verification of the real-time PCR instrument it is recommended to pipette 4 x 4 wells in the corner positions (highlighted in red) and 4 wells in the center (highlighted in red) per each SureCycle® profile (see figure 1).

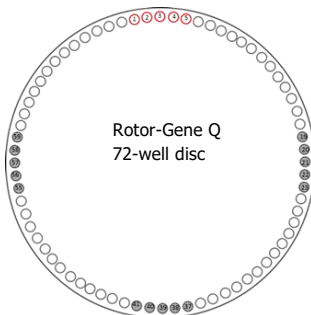
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			/	/	/	/	/	/	/	/		
B			/	/	/	/	/	/	/	/		
C	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
D	/	/	/	/	/			/	/	/		
E	/	/	/	/	/			/	/	/		
F	/	/	/	/	/			/	/	/		
G			/	/	/	/	/	/	/	/		
H			/	/	/	/	/	/	/	/		

**Figure 1: Blockcyler pipetting scheme in 96-well format**

**Rotorcyler:**

It is recommended to pipette 20 reactions per SureCycle®. 5 reactions should be used as reference reactions (see figure 2, position 1-5, highlighted in red).

In the figure below the Qiagen Rotor-Gene Q (72-well disc) is represented as an example. The positioning for use with a different rotor size (Bio Molecular Systems MIC, RIDA®CYCLER) can be adjusted according to the reactions.



**Figure 2: Rotorcyler pipetting scheme for e.g. 72-well disc, Qiagen Rotor-Gene Q**

## 2.2 Preparation of the master-mix

The total number of reactions needed for the PCR should be calculated according to the recommended plate set-up with 20 reactions per SureCycle® profile (see 2.1).

It is also recommended to prepare the master-mix with 10 % additional volume in order to compensate reagent loss. Allow the reagents to thaw, mix and centrifuge before opening and use.

### Example for the calculation and preparation of 20 reactions:

Components of the master-mix	Amount per reaction	20 reactions (with 10 % excess)
Reaction Mix	19.3 µl	424.6 µl
Taq Polymerase	0.7 µl	15.4 µl
<b>Total volume</b>	<b>20 µl</b>	<b>440 µl</b>

**Mix each master-mix well and centrifuge shortly before use.**

## 2.3 Preparation of the real-time PCR mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells and close them.
- Centrifuge all tubes/plates shortly at low speed.
- Place tubes/plates into the real-time PCR instrument and start run according to the setup.

# 3 Interpretation of results

The evaluation has to be made according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer.

A reaction is evaluated as **positive**, if an amplification is shown in the respective channel.

A reaction is evaluated as **negative**, if no amplification is shown in the respective channel.

## 3.1 SureCycle® profile 1 Denaturation

### 3.1.1 Denaturation system (VIC-channel)

The SureCycle® Profile 1 Denaturation takes place with an optimal denaturation temperature at 95°C and suboptimal Annealing/Extension temperature of 63°C. In this case positive results are to be expected for the Denaturation system (VIC-channel).

The FAM-channel controls the correct Annealing/Extension. Since the temperature setting is suboptimal, no amplification should occur and hence negative results are to be expected.

**Blockcycler**

The target value is calculated with the mean value of the reference reactions (Mean value D6/D7/E6/E7, highlighted in red). The target range of control reactions is defined as  $\pm 2$  Cp of the reference reactions. The real-time PCR instrument passed the verification, if Cp-values of all control reactions are within the target range.

The real-time PCR instrument did not pass the verification, if one or more Cp-values of control reactions are out of the target range.

In case there is a Cp-value deviation of a control reaction from the target range, a complete inspection of all wells should be performed.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	26.8	26.6									26.8	26.4
B	26.8	26.8									26.9	26.7
C												
D						26.9	27.0					
E						27.0	27.0					
F												
G	26.7	26.8									26.8	26.7
H	26.6	26.8									26.6	26.7

**Figure 3: Example calculation SureCycle® Profile 1 Denaturation, VIC-channel**

Mean value D6/D7/E6/E7: **27.0** Target range  $\pm 2$  Cp: **25.0 – 29.0**

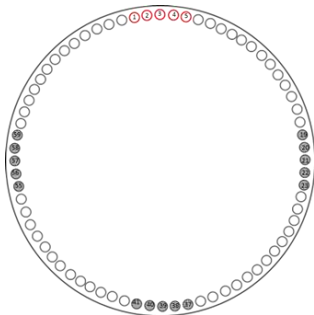
**Rotorcycler**

The target value is calculated with the mean value of the reference reactions (Mean value Position 1-5, highlighted in red). The target range of control reactions is defined as  $\pm 2$  Cp of the reference reactions.

The real-time PCR instrument passed the verification, if Cp-values of all control reactions are within the target range.

The real-time PCR instrument did not pass the verification, if one or more Cp-values of control reactions are out of the target range.

In the figure below the Qiagen Rotor-Gene Q (72-well disc) is represented as an example. The positioning for use with a different rotor size (Bio Molecular Systems MIC, RIDA®CYCLER) can be adjusted according to the reactions.



**Figure 4: Example calculation SureCycle® Profile 1 Denaturation, VIC-channel**

Mean value Pos. 1-5: **27.0** target-range  $\pm 2$  Cp: **25.0-29.0**

**Table 1: Results Interpretation of SureCycle® Profile 1 Denaturation (VIC-channel)**

<b>VIC-channel Denaturation-System</b>			
<b>Reference reaction</b>	<b>Control reaction</b>	<b>Result</b>	<b>Consequence for further analysis</b>
positive	Cp within target range	correct	Real-time PCR instrument temperature system works correctly
positive	Cp out of target range	incorrect	
negative	negative	incorrect	Denaturation temperature too low → potential false PCR-results

**3.1.2 Annealing system (FAM-channel)**

All results should be negative.

The real-time PCR instrument passed the verification, if all reactions are negative.

In case control or reference reactions show positive Cp-values, the results have to be interpreted according to table 2.

**Table 2: Results Interpretation of SureCycle® Profile 1 Denaturation (FAM-channel)**

<b>FAM-channel Annealing-System</b>			
<b>Reference reaction</b>	<b>Control reaction</b>	<b>Result</b>	<b>Consequence for further analysis</b>
negative	negative	correct	Real-time PCR instrument temperature system works correctly
positive	negative	incorrect	
positive	positive	incorrect	
negative	positive	incorrect	

**3.2 SureCycle® Profile 2 Annealing**

**3.2.1 Annealing system (FAM-channel)**

The SureCycle® Profile 2 Annealing takes place with a suboptimal denaturation temperature at 92°C and the optimal Annealing/Extension temperature at 60°C. In this case negative results are to be expected for the Denaturation system (VIC-channel).

The FAM-channel controls the correct Annealing/Extension. Since the temperature setting is optimal, amplification should occur and hence positive results are to be expected.

**Blockcycler**

The target value is calculated with the mean value of the reference reactions (Mean value D6/D7/E6/E7, highlighted in red). The target range of control reactions is defined as  $\pm 2 C_p$  of the reference reactions.

The real-time PCR instrument passed the verification, if  $C_p$ -values of all control reactions are within the target range.

The real-time PCR instrument did not pass the verification, if one or more  $C_p$ -values of control reactions are out of the target range.

In case there is a  $C_p$ -value deviation of a control reaction from the target range, a complete inspection of all wells should be performed.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	26.8	26.6									26.8	26.4
<b>B</b>	26.8	26.8									26.9	26.7
<b>C</b>												
<b>D</b>						26.9	27.0					
<b>E</b>						27.0	27.0					
<b>F</b>												
<b>G</b>	26.7	26.8									26.8	26.7
<b>H</b>	26.6	26.8									26.6	26.7

**Figure 5: Example calculation SureCycle® Profile 2 Annealing, FAM-channel**

Mean value D6/D7/E6/E7: **27.0** Target-range  $\pm 2 C_p$ : **25.0-29.0**

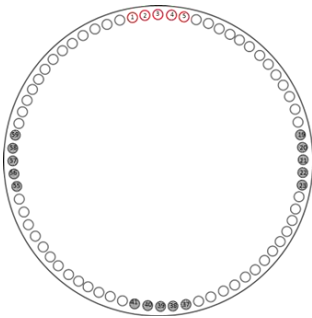
**Rotorcycler**

The target value is calculated with the mean value of the reference reaction (Mean value Position 1-5, highlighted in red). The target range of control reactions is defined as  $\pm 2 C_p$  of the reference reactions.

The real-time PCR instrument passed the verification, if  $C_p$ -values of all control reactions are within the target range.

The real-time PCR instrument did not pass the verification, if one or more  $C_p$ -values of control reactions are out of the target range.

In the figure below the Qiagen Rotor-Gene Q (72-well disc) is represented as an example. The positioning for use with a different rotor size (Bio Molecular Systems MIC, RIDA®CYCLER) can be adjusted according to the reactions.



**Figure 6: Example calculation SureCycle® Profile 2 Annealing, FAM-channel**

Mean value Pos. 1-5: **27.0** target-range  $\pm 2 C_p$ : **25.0-29.0**

**Table 3: Result Interpretation of SureCycle® Profile 2 Annealing (FAM-channel)**

FAM-channel Annealing-System			
Reference reaction	Control reaction	Result	Consequence for further analysis
positive	$C_p$ within target range	correct	Real-time PCR instrument temperature system works correctly
positive	$C_p$ out of target range	incorrect	
negative	negative	incorrect	Annealing temperature too low → potential false PCR-results

**3.2.2 Denaturation system (VIC-channel)**

All results should be negative.

The real-time instrument passed the verification, if all reactions are negative.

In case control or reference reactions show positive Cp-values, the results have to be interpreted according to table 4.

**Table 4: Result Interpretation of SureCycle® Profile 2 Annealing (VIC-channel)**

FAM-channel Denaturation-System		Result	Consequence for further analysis
Reference reaction	Control reaction		
negative	negative	correct	Real-time PCR instrument temperature system works correctly  Denaturation temperature too high → uncritical, false PCR-results are not to be expected
positive	positive/negative	incorrect	
negative	positive	incorrect	Denaturation temperature too high → uncritical, false PCR-results are not to be expected

**4 Further Information**

**4.1 Product Information**

- Detailed information about setup of several real-time PCR devices (Download: [www.congen.de/en/company/downloads](http://www.congen.de/en/company/downloads))
- Product-related documents (Download: [www.congen.de/en/eifu/](http://www.congen.de/en/eifu/)) (Download:

**4.2 Technical Support**

For further questions please send an e-mail to [info@congen.de](mailto:info@congen.de).

**4.3 Explanation of Symbols**



Lot number



Article number



Expiry date



Number of Tests



Storage temperature



Manufacturer