

**SureFast® Master Probe PLUS (100 Reakt.)**

Art. Nr. F4007-2 (5\*100 Rkt.)

Januar 2017

**Beschreibung**

Der SureMaster Probe PLUS Kit dient der spezifischen Detektion von PCR-Amplifikaten mittels Sondentechnologie in der real-time PCR. Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle (PLUS) ausgestattet und für ein Endvolumen von 25 µl ausgelegt. Es sind alle notwendigen Reagenzien mit Ausnahme der Primer, der Sonde (Empfehlung Reporter FAM, Quencher TAMRA oder Dark-Quencher) und der DNA für das spezifische Nachweissystem enthalten. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens zwei Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 522 nm und 553 nm detektieren können (z. B. Roche LightCycler® 480, Rotor-Gene Q, BioRad CFX96, Agilent MxSeries etc.), verwendet werden.

**Nachweisgrenze**

Das System der internen Amplifikationskontrolle wurde synthetisch hergestellt und entspricht keiner bekannten natürlichen Sequenz. Unter Umständen kann es jedoch zu einer so weitgehenden Übereinstimmung von Sequenzabschnitten des verwendeten Nachweissystems mit dem internen Amplifikationskontrollsystem kommen, so dass die Nachweisgrenze beeinflusst wird.

Die Nachweisgrenze des Verfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

**Kit-Inhalt und Lagerung**

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Probe Mix	1 x 1400 µl	Gelb
2	PCR Water	1 x 950 µl	Weiß
3	Taq Polymerase	1 x 11 µl	Rot

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -20°C zu lagern.

**Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien**

- Real-time PCR Gerät mit zwei Detektionskanälen 522 nm und 553 nm
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Spezifische Primer, Sonde, DNA

**Protokoll**

## 1. Herstellen des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Folgende Kontrollen werden empfohlen: Positivkontrolle, Negativkontrolle und Extraktionskontrolle. Der Master-Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle pro Reaktion. Desweiteren wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, vortexen und zentrifugieren.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10%)
SureMaster Probe PLUS Reaction Mix	12,5 µl	137,5 µl
Primer 1*	1,7 µl	18,7 µl
Primer 2*	1,7 µl	18,7 µl
Sonde*	0,6 µl	6,6 µl
PCR Water	3,4 µl	37,4 µl
Taq Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>
Volumen DNA	5 µl	

\* Empfehlung Konzentration: 5 pmol/µl

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

## 2. Geräteeinstellungen

	<b>Blockcycler</b>	<b>Rotor-Gene Q</b>
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	5 min, 95°C 45	1 min, 95°C 45
Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	15 sec, 95°C 30 sec, 50-65°C*	10 sec, 95°C 15 sec, 50-65°C*
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase  Reporter Dye 1 (522 nm): FAM Reporter Dye 2 (553 nm): VIC (interne Amplifikationskontrolle) Quencher Dye: TAMRA oder BHQ  Passive Reference: none	Detection: End of extension phase Reporter Dye 1: Green Reporter Dye 2: Yellow (interne Amplifikationskontrolle)
Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: <a href="http://www.congen.de/unternehmen/download">http://www.congen.de/unternehmen/download</a>		

\* Bei niedrigen Annealingtemperaturen ist die Wahrscheinlichkeit von Wechselwirkungen der Oligonukleotide mit dem internen Amplifikationskontrollsystem höher. Wir empfehlen deshalb Annealingtemperaturen um 60°C.

## 3. Herstellen des PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß (Gefäße/Platten).
- Verschließen der Negativkontrolle (Die Negativkontrolle besteht nur aus dem Master-Mix).
- Pipettieren von 5 µl der Proben-DNA in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
- Kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäße mit wenigen Umdrehungen pro Minute.
- Reaktionsgefäße in das PCR Gerät einsetzen und die PCR entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

**Interpretation der Ergebnisse**

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

Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Eine Probe wird **positiv** bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im Nachweis-System (FAM) zeigt. Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. Bei einem **negativen** Ergebnis einer Probe muss die zugehörige Inhibitionskontrolle **positiv** sein. Andernfalls sind in der Probe PCR-Inhibitoren vorhanden. In diesem Fall kann keine Aussage getroffen werden. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe muss verbessert werden.

**Technischer Support**

Fragen zur Durchführung und Auswertung bitte per E-Mail an [info@congen.de](mailto:info@congen.de).

**Description**

The SureMaster Probe PLUS Kit can be used for the specific detection of PCR products based on probe technology. Each reaction contains an internal amplification control (PLUS). The kit is optimized for detection of PCR products in a final volume of 25 µl. The reaction mix includes all necessary reagents except to the specific primer, probe (recommendation reporter FAM, quencher TAMRA or dark-quencher) and DNA for the detection system. The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments, equipped for detection of two fluorescence emissions at 522 nm and 553 nm at the same time (e.g. Roche LightCycler® 480, Rotor-Gene Q, BioRad CFX96, Agilent MxSeries etc.).

**Limit of Detection**

The internal amplification control system is a synthetic one. There are no comparable natural sequences known. It is possible that parts of the sequences used in the detection system are conforming to the sequence of the internal control system. In this case the detection limit of the detection system will be influenced. The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

**Kit components and storage**

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Probe Mix	1 x 1400 µl	Yellow
2	PCR Water	1 x 950 µl	White
3	Taq Polymerase	1 x 11 µl	Red

Store all reagents at -20°C and protected from light.

**Additionally required equipment and materials**

- Real-time PCR instrument with two detection channels (522 nm, 553 nm)
- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foils)
- Pipettes with filter tips
- Specific primer, probe, DNA

**Protocol**

## 1. Preparation of the master-mix

Calculate the total number of reactions needed (samples and control reactions). Recommended control reactions: negative control, positive control and extraction control. The master-mix contains an internal amplification control per reaction.

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 by vortexing and centrifuge before opening and use.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components for master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
SureMaster Probe PLUS Reaction Mix	12.5 µl	137.5 µl
Primer 1*	1.7 µl	18.7 µl
Primer 2*	1.7 µl	18.7 µl
Probe*	0.6 µl	6.6 µl
PCR Water	3.4 µl	37.4 µl
Taq Polymerase	0.1 µl	1.1 µl
<b>Total volume</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>
Volume DNA	5 µl	

\*Recommendation concentration: 5 pmol/µl

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

2. Setup

	<b>Blockcycler</b>	<b>Rotor-Gene Q</b>
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	5 min, 95°C 45	1 min, 95°C 45
Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	15 sec, 95°C 30 sec, 50-65°C*	10 sec, 95°C 15 sec, 50-65°C*
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase  Reporter Dye 1 (522 nm): FAM Reporter Dye 2 (553 nm): VIC (internal amplification control) Quencher Dye: TAMRA or BHQ  Passive Reference: none	Detection: End of extension phase Reporter Dye 1: Green Reporter Dye 2: Yellow (internal amplification control)
Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage: <a href="http://www.congen.de/en/company/downloads">http://www.congen.de/en/company/downloads</a>		

\*Interactions of the oligonucleotides from the detection system and the internal amplification control are higher in the case of low annealing temperatures. We recommend using annealing temperatures of about 60°C.

3. Preparation of the PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells.
- Close the tube of the negative control (the negative control is ready for PCR without any addition).
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes and close them.
- Centrifuge all tubes/plates shortly at low speed.
- Place tubes/plates into the PCR instrument and start the run according to the setup.

**Interpretation of results**

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

The control reactions need to give the correct results.

A sample is stated **positive**, if the sample DNA shows amplifications in the detection system (FAM).

A sample is stated **negative**, if the sample DNA shows no amplification in the detection system. In case of a **negative** result the inhibition control of the sample must be **positive**. Is this not the case the sample contains PCR-inhibiting substances. Under these circumstances an evaluation of the samples is not possible. DNA isolation and purification for the sample needs to be improved.

**Technical Support**

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