

# Quick Guide

Beyond the PCR technology, BIOFACT promises the progress for your research.



## BioFACT™ 2X Real-Time PCR Master Mix (h) (With EvaGreen™)

[Cat. No. DQ371-40h]

Contents	DQ371-40h
2X Real-Time PCR Master Mix	1 mL x 4 ea
20X EvaGreen™	0.5 mL X 1 ea

### 제품 특징 (Feature)

- 높은 감도와 안정성을 가진 EvaGreen™
- Quantification of target DNA using Real-Time PCR
- Hot start activity : Yes (Chemically-modified Hot start)
- High Resolution Melting(HRM)분석
- qPCR을 이용한 application
- ROX reference dye가 포함되어 있지 않음

### PCR Mixture & Cycle

PCR Mixture (Reaction vol. : 20 μl)	
2X Real-Time PCR Master Mix	10 μl
Primer F (10 pmole/μl)	1 μl
Primer R (10 pmole/μl)	1 μl
Template DNA	- μl
20X EvaGreen™	1 μl
Add D.W to	20 μl

  

Cycle*	
[2-Step cycling protocol]	[3-Step cycling protocol]
95 °C 15 min X 1	95 °C 15 min X 1
95 °C 20 sec X 30~50	95 °C 20 sec X 30~50
Anneal & Extension 40 sec X 30~50	AT 20-40 sec X 30~50
	72 °C 0.5-1 min/kb X 30~50

(Template <200 ng)

\*일반적으로 반응 시간이 짧은 2-step cycling protocol을 이용하여 PCR을 수행하며, 필요 시 3-step cycling protocol으로 반응합니다. 3-step 조건은 primer의 Tm값이 낮거나, template의 농도가 낮은 경우, 혹은 높은 증폭효율을 원하시는 경우 등 2-step조건이 적합하지 않은 경우에 이용합니다.



Tip.

PCR 수행 시 사용하는 Template의 종류 및 농도, 증폭하고자 하는 target size, primer의 Tm에 따라 template의 사용량, AT, Extension time, Taq의 양, Cycle 수, 5X Band Helper™ 양을 조절해 사용합니다.

사용하시는 Real-Time PCR 기종에 따라 Reference dye를 넣어주세요.

### ▶ Tm값 설정

$$Tm = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$$

$$AT = Tm - (4 \sim 6 \text{ } ^\circ\text{C})$$

Expiration Date : -20 ± 5 °C 보관 시 1년 6개월



Please contact us, if you have any question and need help.  
T)1670-5695 www.bio-ft.com info@bio-ft.com

2022. 03. 23 (설명서 개정일)

### Troubleshooting Guide

- Intercalating dye를 사용한 경우 Amplification curve뿐 아니라 Melting curve를 확인하여 target gene 외에 비특이적으로 증폭된 band나 primer dimer가 없는지 확인해야 합니다.
- Real-Time PCR Set up 시 conventional PCR로 target gene의 증폭 여부를 먼저 확인합니다.
- 사용하지는 Real-Time PCR 장비의 기종에 따라 passive reference dye를 적정 농도로 첨가해주세요.
- 농도를 알고 있는 template를 serial dilution하여 primer의 증폭 효율, 재현성, 형광에 대한 dynamic range를 테스트합니다.  
분석 효율은 90~105%, Standard curve로부터 R² value가 >0.98 이상이 되어야 합니다.
- Standard curve의 R²이 1(최대 0.99)에 가까운지 확인한 후, 샘플간 Ct값을 비교합니다.

### NTC (Non-Template Control)

Primer dimer

**01. Primer dimer 유무 확인**  
Melting curve 혹은 agarose gel을 확인하여 primer dimer의 유무를 확인하고 결과에 영향을 미칠 경우, 다시 set-up하거나 primer를 새로 design합니다.

Contamination

**01. 새로운 시약으로 재수행**  
**02. 반응액은 clean bench에서 진행**  
**03. UDG System**  
Cross-over contamination 방지를 위한 UDG System이 적용된 제품을 사용합니다.



### No Amplification

Template

**01. Starting template check**  
농도가 낮거나 quality가 낮은 경우 증폭이 되지 않을 수 있습니다. 다시 추출하거나 사용량을 늘려 재수행합니다.  
**02. PCR Inhibitor**  
Template의 purity가 좋지 않은 경우 증폭이 되지 않을 수 있습니다. Template를 D.W에 희석하여 PCR하거나 다시 추출하여 수행합니다.

Primer

**01. Primer Concentration Check**  
Primer의 농도가 너무 높거나 낮은 경우 PCR 효율이 감소될 수 있습니다. 적정 농도가 조정하여 사용합니다.  
**02. Primer design**  
Primer를 새로 디자인하여 재수행합니다. Primer binding site에 구조(GC-rich contents, 2차구조 등)가 있을 경우 binding site를 변경하여 새로 primer를 design하며, 일반적으로 Primer의 size는 17~25 bp, 증폭 size는 80 ~ 150 bp가 되도록 설계합니다.  
**03. Primer degraded**  
Primer를 다시 희석하거나 새로 합성하여 사용합니다.

온도/시간 check

**01. 초기 activation 시간 check**  
자사 Real-Time PCR Master Mix (Pre-Mix)의 Enzyme은 chemical-mediated Hot Start Taq으로 초기 activation 시간을 15 min으로 설정해야 합니다.  
**02. Annealing Temperature(AT)**  
 $Tm = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$ ,  $AT = Tm - (4 \sim 6 \text{ } ^\circ\text{C})$  이 산출법으로 설정 후에도 PCR이 되지 않으면 AT를 2°C 낮추어 진행합니다.  
qPCR의 AT는 일반적으로 50 ~ 65 °C가 되도록 설정합니다.



### Non-Specific amplification / Primer dimer

온도/시간 check

**01. Annealing Temperature(AT)**  
Annealing temperature가 너무 낮을 경우 비특이적인 band가 증폭될 수 있습니다. AT를 2°C씩 높여 테스트하거나 온도 gradient를 이용하여 최적 AT를 설정합니다.

Primer

**01. Primer design**  
Melting curve / 전기영동을 통해 비특이적인 산물의 증폭 여부를 확인합니다. Target gene만 증폭될 수 있도록 primer를 다시 design하여 수행합니다.  
**02. Primer Concentration**  
높은 농도의 primer를 사용할 경우 primer dimer가 형성될 수 있습니다. Primer를 serial dilution하여 dimer가 사라지는 농도를 테스트한 후 재수행 합니다.



### PCR efficiency above 105 %

Template / Primer

**01. Primer dimer 유무 check**  
**02. Non-Specific band 유무 check**  
Melting curve를 확인하여 primer dimer의 유무를 확인하고 결과에 영향을 미칠 경우 PCR조건을 다시 set-up합니다.  
**03. Template 의 농도 check**  
Template의 농도를 재확인하고 새로운 샘플로 다시 수행합니다.



### PCR efficiency below 90 %

Primer

**01. Primer Concentration**  
Primer의 농도가 너무 높거나 낮은 경우 PCR 효율이 감소될 수 있습니다. 적정 농도가 조정하여 사용합니다.  
**02. Primer design**  
Primer를 새로 디자인하여 재수행합니다. Real-Time PCR 전 conventional PCR로 target gene의 amplification 여부를 확인합니다.

Product Size

**01. Amplicon size check**  
Amplicon은 80~150 bp가 되도록 design하는 것을 권장합니다. Amplicon의 size가 작을수록 높은 증폭 효율을 보이며, 500 bp를 초과하지 않도록 합니다.

Extension Time

**01. Extension Time check**  
Extension Time이 짧을 경우 PCR 효율이 감소될 수 있습니다. 조건 설정 시 Extension Time을 늘려 진행합니다.

