

# Quick Guide

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



## BioFACT™

### 2X Real-Time PCR Master Mix (a) (Including EvaGreen™ in mixture, Low ROX)

[Cat. No. DQ376-40h]

Contents	DQ376-40h
2X Real-Time PCR Master Mix, Low ROX (Including EvaGreen™ in mixture)	1 mL x 4 ea

#### 제품 특징 (Feature)

- EvaGreen™으로 정확하고 민감도 높은 결과
- Low PCR inhibition by fluorescent dye
- Mixture 내에 EvaGreen™ dye가 포함되어있어 간편하게 사용이 가능
- Quantification of target DNA using Real-Time PCR
- **Hot start activity : Yes (Antibody-mediated Hot start)**
- qPCR을 이용한 application
- Wavelength similar to SYBR®Green I (Intercalating dye)
- Low ROX Passive Reference Dye included

#### 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
Add D.W to	20 µl

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

\*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.



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

Mixture 내에 Intercalating dye가 포함되어 있으므로 보관 시 빛에 노출되지 않도록 주의합니다.

반복적인 Freezing and thawing은 증폭 효율을 감소시킬 수 있으므로 aliquot하여 보관, 사용합니다.

Expiration Date : -20 ± 5 °C 보관 시 1년



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 gene에 비특이적으로 증폭된 band나 primer dimer가 없는지 확인해야 합니다.
- Real-Time PCR Set up 시 conventional PCR로 target gene의 증폭 여부를 먼저 확인합니다.
- 사용하시는 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 R<sup>2</sup> value가 >0.98 이상이 되어야 합니다.
- Standard curve의 R<sup>2</sup>이 1(최대 0.99)에 가까울수록 확인한 후, 샘플간 Ct 값을 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 Enzyme는 chemical-mediated Hot Start Taq으로 초기 activation 시간을 15 min으로 설정해야 합니다.  
02. Annealing Temperature(AT)  
Tm=(A+T)X2+(G+C)X4, AT=Tm-(4~6°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. Template의 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.

