

Quick Guide

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



BioFACT™ 2X Pfu PCR Master Mix 2

[Cat. No. PD302-50h(with dye), PD307-50h(w/o dye)]

Contents	PD302-50h	PD307-50h
2X Pfu PCR Master Mix 2 (0.5X Band Helper™)	1 mL x 5 ea (with dye)	1 mL x 5 ea (w/o dye)

제품 특징 (Feature)

- Source : *Pyrococcus furiosus*
- 5' → 3' exonuclease activity : No
- 3' → 5' exonuclease activity (fidelity) : Yes
- Amplification size : < 3 kb PCR
- Hot start activity : No
- A tailing : No
- Error rate : 1 - 2 bp 이하 error / 10⁶ bp

PCR Mixture & Cycle

PCR Mixture	Reaction Vol. 20 µl	Reaction Vol. 50 µl
2X Pfu PCR Master Mix 2	10 µl	25 µl
Primer F (10 pmole/µl)	1 µl	2 µl
Primer R (10 pmole/µl)	1 µl	2 µl
Template DNA	- µl	- µl
Add D.W to	20 µl	50 µl

Cycle*		
[3-Step cycling protocol]		
95 °C	2 min	X 1
95 °C	20 sec	} X 25~40
AT	20-40 sec	
72 °C	2 min/kb	} X 1
72 °C	5 min	
8 °C	∞	

(Template <200 ng)

5X Band Helper™ : PCR 증폭용 Additives로 High G+C contents 또는 secondary structure 구조를 지닌 template의 증폭에 매우 효과적입니다 . (단, Fidelity기능이 있는 PCR enzyme 사용 시에는 mutation의 위험이 있을 수 있으므로 최소량의 사용을 권장합니다 .)

5X Band Helper™ 사용 예

Reaction Mixture (conc. of 5X Band Helper™)	Mix I (0X)	Mix II (0.5X)	Mix III (1.0X)	Mix IV (1.5X)	Mix V (2.0X)
2X Pfu PCR Master Mix 5 (conc. of 5x Band Helper™)	25 µl (0x)	25 µl (0.5 x)	25 µl (1.0 x)	25 µl (1.5 x)	25 µl (2.0 x)
Primer F (10 pmole/µl)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Primer R (10 pmole/µl)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Template DNA	- µl	- µl	- µl	- µl	- µl
Add D.W to	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

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 .

3 kb 이상 증폭 시 BioFACT™ Lamp Pfu DNA Polymerase의 사용을 권장합니다 .

▶ 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

2021.04.26 (설명서 개정일)

주의사항.

본 제품은 실험 전문 인력이 사용하도록 한다.

제품보증 및 책임사항

- 제품의 유효기간은 구입일로부터 **1년6개월**이다.
- 설명서에 나온 지침에 따라 제품을 사용하였을 경우에만 모든 제품의 결과를 보증한다.
- 실험자의 잘못된 사용이나 부주의로 인해 문제가 발생하였을 경우에는 교환이 되지 않는다.

안전경고 및 응급조치 요령

- 눈, 호흡기, 피부 접촉을 피한다.
- 눈에 들어갔을 때 : 흐르는 물로 눈을 씻을 것.
 자극이 지속되면 의사의 진료를 받을 것.
- 피부에 접촉 시 : 접촉된 부위를 비누와 물로 충분히 씻을 것.
 자극이 지속되면 의사의 진료를 받을 것.
- 동상의 위험이 있으니 반드시 경각 착용 후 사용할 것.

사용자 유의사항

- 유효기한이 지난 제품의 사용을 금지한다.
- 냉동 제품을 자주 열고 녹이는 과정을 반복할 경우, 활성이 저하될 수 있으므로 주의한다.
 필요한 경우, 일정량을 분주하여 보관, 사용하도록 한다.
- 조작성 정해진 순서에 따라 정확히 하여야 하며, 키트는 개봉 후 즉시 사용한다.
- 분리된 검체 DNA/RNA 상태에 따라 상이한 결과를 보일 수 있다.
- 오염된 검체는 부정확한 결과를 나타낼 수 있으므로 주의한다.

알림.

- Genomic DNA / Plasmid DNA / Total RNA는 사용하는 Primer의 종류에 따라 다양한 농도로 사용할 수 있다.
- NTC (Non-Template Control)을 이용하여 실험 환경내의 오염을 확인하도록 한다.
 * 실험의 마지막 단계에서 적정량의 DNA / RNA template를 넣어 준다 . NTC에는 template대신 RNase / DNase free water를 넣어 Negative control로 사용한다 .

참고사항.

Template 종류에 따른 사용량 (PCR Cycles)

- Animal genomic DNA : 50 ng ~ 200 ng (25 ~ 35 cycles)
 10 ng ~ 50 ng (25 ~ 40 cycles)
- Bacterial genomic DNA : 10 ng ~ 50 ng (25 ~ 35 cycles)
 1 ng ~ 5 ng (25 ~ 40 cycles)
- Plasmid and Lamda DNA : 1 ng ~ 5 ng (25 ~ 40 cycles)



Troubleshooting Guide

(주) 바이오팩트 사용 시 먼저 check해 주세요.

- dNTP 농도 Check**: (주) 바이오팩트 dNTP Mix의 농도는 each 10mM입니다.
 Reaction Vol. 50µl 기준 dNTP (each 10mM) 1µl 를 사용합니다 .
- Enzyme 농도 Check**: Reaction Vol. 50µl 기준 1.25 Unit을 사용합니다 .
- Band Helper™ 농도 조절**: DNA 구조적인 문제 시 Final 0X~2X로 조절하여 사용합니다 .

Low yield or No Band

- 농도 check**
01. dNTP 농도 check
 적정량보다 초과 사용 시 substrate inhibition 작용으로 인해 target DNA를 생성하는 데 문제가 발생할 수 있습니다 .
02. Band Helper™ : 0X ~ 2X 농도 조절합니다 .

- 온도/시간 check**
01. Annealing Temperature(AT) check
 $Tm = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$, $AT = Tm - (4 \sim 6 \text{ } ^\circ\text{C})$ 이 산출법으로 설정 후 에도 PCR이 되지 않으면 AT를 2°C 낮추어 진행합니다 .
02. Pre-denaturation 온도 및 시간 (제품 Protocol 참조)
03. Extension time Check
 일반적으로 0.5~1 min/kb로 설정 . 단, Pfu는 1~2min/kb

- Template primer check**
01. Primer degradation check
 Primer dilution 후 4°C에서 장기간 보관 시 분해되어 PCR에 영향을 줄 수 있습니다. 새로 dilution하거나 제작하여 사용합니다.
02. Starting template check
 보관상태가 불량하거나 농도가 낮은 경우, quality가 낮은 경우 문제가 발생할 수 있습니다 . 새로 prep하거나 사용량을 늘립니다 .

Smear Band

- 농도 check**
01. Enzyme 농도 check
 Reaction Vol. 50 µl 기준 1.25 Unit을 사용하며 , 계속 smear될 경우 Enzyme 양을 줄여가며 reaction합니다 .
02. dNTP 농도 check
 Long PCR일 경우 적게 사용 시 smear될 수 있습니다 .
03. Template 농도 check
 Template를 dilution하여 사용합니다 .

- PCR condition check**
01. Extension time Check
 Extension time이 적정시간보다 길 경우 , target size보다 긴 단편들이 형성되어 smear될 수 있습니다 .
02. Cycle number check
 cycle 수를 줄여서 PCR합니다 .

- 온도/시간 check**
01. Annealing Temperature(AT) check
 $Tm = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$, $AT = Tm - (4 \sim 6 \text{ } ^\circ\text{C})$ 이 산출법으로 설정 후 에도 PCR이 되지 않으면 AT를 2°C 낮추어 진행합니다 .
02. Pre-denaturation 온도 및 시간 (제품 Protocol 참조)

Non-Specific Band

- Try**
01. Annealing Temperature(AT)를 높여 PCR합니다 .
02. Band Helper™를 첨가합니다 .
03. Hot Start Enzyme를 사용하여 PCR을 진행합니다 .

