

# Quick Guide

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



## BioFACT™ 2X Pfu PCR Pre-Mix

[Cat. No. PD401-096, PD401-480(with dye)]

Contents	PD401-096	PD401-480
2X Pfu PCR Pre-Mix (w/o Band Helper™)	96 tube (8 strip x 12)	480 tube (8 strip x 60)

(Dye가 포함되지 않은 Pre-Mix를 원할 경우 별도 문의 바랍니다.)

### 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 error / 10<sup>6</sup> bp

### PCR Mixture & Cycle

PCR Mixture (Reaction vol. : 30 µl)	
2X Pfu PCR Pre-Mix	15 µl
Primer F (10 pmole/µl)	1 ~ 2 µl
Primer R (10 pmole/µl)	1 ~ 2 µl
Template DNA	- µl
Add D.W to	30 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 .) ※별도 구매



### 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 .

3Kb 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. 05. 03 (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 접촉시 : 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 열리고 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 사용시 먼저 check해주세요.

**dNTP 농도 Check**: (주) 바이오팩트 dNTP Mix의 농도는 each 10mM입니다.  
Reaction Vol. 50µl 기준 dNTP (each 10mM) 1µl을 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

- |                              |  |
|------------------------------|--|
| <b>농도 check</b>              | <b>01. dNTP 농도 check</b><br>적정량보다 초과 사용 시 substrate inhibition 작용으로 인해 target DNA를 생성하는 데 문제가 발생할 수 있습니다 .<br><b>02. Band Helper™</b> - 0X ~ 2X 농도 조절합니다 .   |
| <b>온도/시간 check</b>           | <b>01. Annealing Temperature(AT) check</b><br>Tm=(A+T) X 2 + (G+C) X 4, AT=Tm-(4~6°C) 이 산출법으로 설정 후 에도 PCR이 되지 않으면 AT를 2°C 낮추어 진행합니다 .<br><b>02. Pre-denaturation 온도 및 시간 (제품 Protocol 참조)</b><br><b>03. Extension time Check</b><br>일반적으로 0.5~1 min/kb로 설정 . 단, Pfu는 1~2min/kb |
| <b>Template primer check</b> | <b>01. Primer degradation check</b><br>Primer dilution 후 4°C에서 장기간 보관 시 분해되어 PCR에 영향을 줄 수 있습니다. 새로 dilution하거나 제작하여 사용합니다.<br><b>02. Starting template check</b><br>보관상태가 불량하거나 농도가 낮은 경우, quality가 낮은 경우 문제가 발생할 수 있습니다 . 새로 prep하거나 사용량을 늘립니다 .                              |



#### Smear Band

- |                            |   |
|----------------------------|---|
| <b>농도 check</b>            | <b>01. Enzyme 농도 check</b><br>Reaction Vol. 50µl 기준 1.25 Unit을 사용하며 , 계속 smear될 경우 Enzyme 양을 줄여가며 reaction합니다 .<br><b>02. dNTP 농도 check</b><br>Long PCR일 경우 적게 사용 시 smear될 수 있습니다 .<br><b>03. Template 농도 check</b><br>Template를 dilution하여 사용합니다 . |
| <b>PCR condition check</b> | <b>01. Extension time Check</b><br>Extension time이 적정시간보다 길 경우 , target size보다 긴 단편들이 형성되어 smear될 수 있습니다 .<br><b>02. Cycle number check</b><br>cycle 수를 줄여서 PCR합니다 .  |
| <b>온도/시간 check</b>         | <b>01. Annealing Temperature(AT) check</b><br>Tm=(A+T) X 2 + (G+C) X 4, AT=Tm-(4~6°C) 이 산출법으로 설정 후 에도 PCR이 되지 않으면 AT를 2°C 낮추어 진행합니다 .<br><b>02. Pre-denaturation 온도 및 시간 (제품 Protocol 참조)</b>   |



#### Non-Specific Band

- |            |   |
|------------|---|
| <b>Try</b> | <b>01. Annealing Temperature(AT)를 높여 PCR합니다 .</b><br><b>02. Band Helper™를 첨가합니다 .</b><br><b>03. Hot Start Enzyme를 사용하여 PCR을 진행합니다 .</b> |
|------------|---|

