

Quick Guide

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



SimpleWay™ 2X PCR Master Mix III

[Cat. No. SW331-25h]

Contents	SW331-25h
SimpleWay™ 2X PCR Master Mix III	0.5 mL x5 EA

Description

SimpleWay™ 2X PCR Master Mix III is genomic DNA 추출 없이 시료 자체를 바로 Master Mix에 넣어 증폭이 가능하도록 고안된 제품입니다. (PLB를 이용한 gDNA 추출 샘플에서도 사용이 가능합니다.) 다량의 시료를 간편하고 신속하게 PCR 증폭할 수 있으며, sample에 포함된 PCR Inhibitor 물질의 영향을 최소화시켜 증폭 효율을 높였습니다.

제품 특징 (Feature)

- No genomic DNA Preparation
- Rapid PCR
- PCR inhibition 최소화
- Low Handling error

Preparation

1. Sample(Fresh한 샘플 권장)
 - Plant leaf(Seed)를 자르기 위해 Harris Uni-Core punch(또는 Harris Micro Punch)를 사용하거나, 깨끗한 가위를 준비합니다.
 - Plant leaf: 0.5 ~ 2.0 mm 크기로 잘라서 1 ~ 3 disc를 사용합니다. (1.0 mm 크기로 1 disc 사용을 권장합니다.)

Protocol

1. 채취된 샘플을 SimpleWay™ 2X PCR Master Mix III가 포함된 PCR mixture에 넣습니다.
 - 샘플은 PCR volume의 10%(v/v)를 초과하지 않도록 해야 합니다.
 - GC contents가 많거나 복잡한 2차 구조를 가진 유전자는 5X Band Helper™를 사용하도록 합니다.
2. 조심스럽게 mix한 후, PCR을 수행합니다.

PCR Mixture & Cycle

PCR Mixture(Reaction Vol. 50 µL)	Cycle
SimpleWay™ 2X Direct Master Mix 25 µL	95 °C 2 min X 1
Primer Mixture (10 pmole/µL) 2 µL	95 °C 20 sec X 30 ~50
Template DNA 1 ~ 5 µL	AT 20-40 sec X 30 ~50
5X Band Helper™ 0 ~ 20 µL	72 °C 1 min/kb X 30 ~50
Add D.W to 50 µL	72 °C 5 min X 1
	8 °C ∞

5X Band Helper™ 사용 예

Reaction mixture (conc. of 5X Band Helper™)	SW331-25h (OX)	Mix A (0.5X)	Mix B (1X)
2X Taq PCR Master Mix	25 µL	25 µL	25 µL
5X Band Helper™ (별도구매)	0 µL	5 µL	10 µL
Primer F (10 pmole/µL)	2 µL	2 µL	2 µL
Primer R (10 pmole/µL)	2 µL	2 µL	2 µL
Template DNA	- µL	- µL	- µL
Add D.W to	50 µL	50 µL	50 µL

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.)

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. 2Kb 이하 gene 증폭 시 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. 28 (설명서 개정일)

주의사항.

본 제품은 실험 전문 인력이 사용하도록 한다.

제품보증 및 책임사항

- 제품의 유효기간은 구입일로부터 1년6개월이다.
- 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.
- 조작은 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. 50 µL 기준 dNTP (each 10mM) 1 µL를 사용합니다.

Enzyme 농도 Check: Reaction Vol. 50 µL 기준 1.25 Unit을 사용합니다.
Band Helper™ 농도 조절: DNA 구조적인 문제 시 Final OX-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™ - OX ~ 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 예도 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 1~2 min/kb

Template primer check
01. Primer degradation check
 Primer dilution 후 4°C에서 경기간 보관 시 분해되어 PCR에 영향을 줄 수 있습니다. 새로 dilution하거나 재작하여 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 예도 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.

