Quick Guide

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

BIOFACT
BIOFACTORY

BioFACT™

2X Real-Time PCR Master Mix ⓐ
(Including SFCgreen® I in mixture, High ROX)

[Cat. No. DQ353-40h]

Contents	DQ353-40h
2X Real-Time PCR Master Mix (Including SFCgreen® I in mixture, High ROX)	1 ㎖ x 4 ea

제품 특징 (Feature)

- SFCgreen® I으로 정확하고 민감도 높은 결과
- Low PCR inhibition by fluorescent dye
- Outstanding photo-stability, Excellent Thermal stability
- Mixture 내에 SFCgreen® I 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 & EvaGreen™ (Intercalating dye)
- High ROX Passive Reference Dye included

PCR Mixture & Cycle

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

Cycle*

[2-Step cycling protocol]

Temp.	Time	Cycles
95 ℃	2 min	X 1
95 ℃	20 sec	X 30~50
Anneal & Extension	40 sec	

[3-Step cycling protocol]

Temp.	Time	Cycles
95 ℃	2 min	X 1
95 ℃	20 sec	X 30~50
AT	20-40 sec	
72 ℃	0.5-1 min/kb	

(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, Annealing Temperature, Extension time, *Taq*의 양, Cycle 수, 5X Band Helper™ 양을 조절해 사용합니다.

▶ Tm값 설정

Tm = 4 x (G+C) + 2 x (A+T)

AT = Tm - (4 ~ 6 ℃)

Expiration Date : -20 ± 5 ℃ 보관 시 1년

BIOFACT
BIOFACTORY

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

2022. 03. 10 (설명서 개정일)

Troubleshooting Guide

- Intercalating dye를 사용한 경우 Amplification curve뿐 아니라 Melting curve를 확인하여 target gene외에 비특이적으로 증폭된 band나 primer dimer가 없는지 확인해야합니다.
- Real-Time PCR Set up 시 conventional PCR로 target gene의 증폭여부를 먼저 확인합니다.
- 사용하시는 Real-Time PCR장비의 기종에 따라 passive reference dye를 적정 농도로 첨가 해주세요.
- 농도를 알고 있는 template를 serial dilution하여 primer의 증폭 효율, 재현성, 형광에 대한 dynamic range를 테스트합니다.
  분석효율은 90~105%, Standard curve로부터 R^2 value가 >0.98 이상이 되어야 합니다.
- Standard curve의 R^2이 1(최대 0.99)에 가까운지 확인한 후, 샘플간 Ct 값을 비교합니다.

NTC (Non-Template Control)

Primer dimer

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

Contami-nation

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 재수행입니다. 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 *Taq*으로 초기 activation 시간을 15 min으로 설정해야 합니다.

02. Annealing Temperature(AT)
Tm=(A+T) X 2 + (G+C) X 4, AT=Tm-(4~6℃) 이 산출법으로 설정 후에도 PCR이 되지 않으면 AT를 2℃ 낮추어 진행합니다.
qPCR의 AT는 일반적으로 50 ~ 65 ℃가 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℃T씩 높여 테스트하거나 온도 gradient를 이용하여 최적 AT를 설정합니다.

Primer

01. Primer design
Melting curve / 전기영동을 통해 비특이적인 산물의 증폭여부를 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.

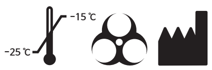
02. Primer design
Primer를 새로 디자인하여 재수행합니다.
Real-Time PCR 전 conventional PCR로 target gene의 amplification 여부를 확인합니다.

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 감소 될 수 있습니다. 조건 설정 시 Extension Time을 늘려 진행합니다.



BIOFACT
BIOFACTORY