

Quick Guide

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



FastFACT™ 2X qPCR Master Mix

[Cat. No. FDQ301-25h]

Contents	FDQ301-25h
FastFACT™ 2X qPCR Master Mix (For Probe)	0.5 mL X 5 ea

제품 특징 (Feature)

- Fast qPCR Mixture(반응시간 : ~ 45분 이내)
- Antibody-mediated Hot-Start PCR Enzyme으로 최적화 시킨 제품
- Low-copy transcripts 증폭

qPCR Mixture & Cycle

qPCR Mixture (Reaction vol. : 20 µL)	
FastFACT™ 2X qPCR Master Mix	10 µL
Primer F (10 pmole/µL)	1 µL
Primer R (10 pmole/µL)	1 µL
Probe	X µL
Template DNA	- µL
Add D.W to	20 µL

Cycle*	
〈BIO-RAD 장비〉	〈ABI 장비〉
95°C 2 min X 1	95°C 2 min X 1
95°C 1-5 sec } X 40 ~ 50	95°C 1 sec } X 40 ~ 50
AT°C 1-5 sec } X 40 ~ 50	AT°C 1 sec } X 40 ~ 50
72°C 1-5 sec } X 40 ~ 50	72°C 30 sec } X 40 ~ 50

(Template < 200 ng)

Tip.

PCR 수행 시 사용하는 Template의 종류 및 농도, 증폭하고자 하는 Target size, primer의 Tm에 따라 Template의 사용량, Annealing Temperature, Extension time, Cycle 수를 조절해 사용합니다.

▶ 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

2022.03.25 (설명서 개정일)

Troubleshooting Guide

- Intercalating dye를 사용한 경우 Amplification curve뿐 아니라 Melting curve를 확인하여 target gene의 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 기준에 따라 passive reference dye를 적정 농도로 첨가해주세요.
- 농도를 알고 있는 template를 serial dilution하여 primer의 증폭 효율, 재현성, 형광에 대한 dynamic range를 테스트합니다.
- 분석효율은 90~105%, Standard curve로부터 R² value가 >0.98 이상 이 되어야 합니다.
- Standard curve의 R²이 1(최대 0.99)에 가까운 지 확인한 후, 샘플간 Ct값을 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. 반응액 은 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 Enzyme은 chemical-mediated Hot Start Taq으로 초기 activation 시간을 15 min으로 설정해야 합니다.
02. Annealing Temperature(AT)
 $Tm = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$, $AT = Tm - (4 \sim 6 \text{ } ^\circ\text{C})$ 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 / 전기영동 등을 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 테스트 한 후 재수행합니다.

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 PCR건 conventional PCR로 target gene의 amplification 여부를 확인합니다.

Product Size

01. Amplicon size check
Amplicon은 80~150 bp가 되도록 design하는 것을 권장합니다. Amplicon의 size가 적을수록 높은 증폭 효율을 보이며, 500 bp를 초과하지 않도록 합니다.

