

# Quick Guide

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



## BioFACT™ [UDG System] 2X Real-Time PCR Master Mix (a) (Including SFCgreen® I in mixture, Low ROX)

[Cat. No. DQ357-40h]

Contents	DQ357-40h
2X Real-Time PCR Master Mix (Including SFCgreen® I in mixture), Low ROX	1 mL x 4 ea

For Research Use Only. Not for use in diagnostics procedures.

### Product Description

- SFCgreen® I dye detects double-stranded DNA, no specific probes are required
- Low PCR inhibition by fluorescent dye
- Outstanding photo-stability, Excellent Thermal stability
- Premixed components stored at 2~8°C significantly reduce assay setup time
- Quantification of target DNA using Real-Time PCR
- Hot start activity: Yes (Antibody-mediated Hot start)
- Wavelength similar to SYBR® Green I & EvaGreen™ (Intercalating dye)
- Low ROX Passive Reference Dye included
- dUTP significantly reduces carryover contamination when used in conjunction with uracil-DNA glycosylase

### Protocol

- Thaw BioFACT™ 2X A-Star Real-Time PCR Master Mix, template DNA, primers and D.W on ice. Mix each solution well.
- Mix the reaction mix thoroughly, and centrifuge briefly to collect solutions at the bottom of PCR tube or plates, and then store on ice protected from light.

Reagent	Final Conc.	PCR Vol. (20 µL)
2X Real-Time PCR Master Mix	1X	10 µL
Primer F (10 pmole/µL)	5 ~ 10 pmol	0.5 ~ 1 µL
Primer R (10 pmole/µL)	5 ~ 10 pmol	0.5 ~ 1 µL
Template DNA	Variable	Variable
Add D.W to	20 µL	20 µL

- Perform qPCR reaction using the following cycling program :

Steps	Temp.	Time	Cycles
UDG activation	50°C	3 min	1
Initial activation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	30 ~ 45
Annealing	AT	15 sec	
Extension	72°C	30 sec	
[Melting Analysis]			

- Place the PCR tubes or plates in the qPCR cyclers, and start the cycling program.
- After the reaction is completed, perform analysis.

### Suitable Sample Material

All kinds of sample material suited for PCR amplification can be used. Please ensure the samples are suitable in terms of purity, concentration and DNA integrity. Always run at least one negative control with the sample. To prepared a negative-control, replace the test sample with RNase/DNase free water.

### Application

- Detection and quantification of targets DNA and cDNA
- Gene expression analysis
- Microbial detection
- Low copy gene detection

### Kit Storage

BioFACT™ 2X A-Star Real-Time PCR Master Mix (Including SFCgreen® I in mixture) should be stored at -20°C on arrival. Repeated freeze/thawing will not compromise the performance of the product.

Expiration Date : -20 ± 5 °C 보관 시 1년



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

2022. 03. 14 (설명서 개정일)

### 주의사항.

본 제품은 실험 전문 인력이 사용하도록 한다.

#### 제품보증 및 책임사항

- 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 장갑 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.

### 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. (Antibody-mediated Hot start Taq은 2min)
- 02. Annealing Temperature(AT)**  
 $Tm=(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$ ,  $AT=Tm-(4-6^\circ C)$  이 산출법으로 설정 후 예도 PCR이 되지 않으면 AT를 2°C 낮추어 진행합니다. qPCR의 AT는 일반적으로 50 ~ 65 °C가 되도록 설정합니다.

### 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. 반응액은 clean bench에서 진행
03. UDG System  
Cross-over contamination 방지를 위한 UDG System이 적용된 제품을 사용합니다.

### 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 / 전기영동을 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 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 감소될 수 있습니다. 조건 설정 시 Extension Time을 늘려 진행합니다.

