

# Quick Guide

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



## FastFACT™

### 2X qPCR Master Mix (Including SYBR®Green I, Low ROX)

[Cat. No. FDQ388-40h]

Contents	FDQ388-40h
FastFACT™ 2X qPCR Master Mix (Included SYBR Green I), Low ROX	1 mL X 4 ea

#### 제품 특징 (Feature)

- Fast qPCR Mixture
- Antibody-mediated Hot-Start PCR enzyme으로 최적화 시킨제품
- 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
Template DNA	- µl
Add D.W to	20 µl

<BIO-RAD 장비>		<ABI 장비>	
95°C	2 min X 1	95°C	2 min X 1
95°C	1-5 sec	95°C	1 sec
AT°C	1-5 sec X 40~50	AT°C	1 sec X 40~50
72°C	1-5 sec	72°C	30 sec

\* 장비마다 설정 할 수 있는 시간이 다를 수 있으므로 장비 특성을 고려하여 설정바랍니다.  
(Template <200 ng)



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.

#### ▶ Tm 값 설정

$$T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$$

$$AT = T_m - (4 \sim 6^\circ C)$$

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

2022.03.25 (설명서 개정일)

## Troubleshooting Guide

- Intercalating dye를 사용한 경우 Amplification curve뿐 아니라 Melting curve를 확인하여 target gene외에 비특이적으로 증폭된 band나 primer dimer가 없는지 확인해야 합니다.
- Real-Time PCR Set up 시 conventional PCR로 target gene의 증폭여부를 먼저 확인합니다.
- 사용하시는 Real-Time PCR장비의 기종에 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 이상이 되어야 합니다.
- Standard curve의 R이 1(최대 0.99)에 가까운지 확인한 후, 샘플간 Ct 값을 비교합니다.



### 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) X 2 + (G+C) X 4, AT=Tm-(4~6°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 / 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 primer가 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 적을수록 높은 증폭 효율을 보이며, 500 bp를 초과하지 않도록 합니다.



## 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.

