

Quick Guide

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



BioFACT™ 2X OneStep RT-PCR Master Mix (h)

[Cat. No. BR331-10h, BR331-50h]

Contents	BR331-10h	BR331-50h
2X OneStep RT-PCR Master Mix (with dye)	1.0 mL	1.0 mL x 5 ea

제품 특징 (Feature)

- BioFACT™ RTase 와 H-Star Taq 으로 RT와 PCR이 한번에 되도록 최적화 시킨 RT-PCR Mixture
- Thermostable한 RTase로 cDNA 합성의 높은 효율성
- Hotstart PCR Enzyme으로 높은 특이성
- Low-copy transcripts 증폭
- Synthesis gene size : < 1Kb PCR

RT-PCR Mixture & Cycle

RT- PCR Mixture (Reaction vol. : 30 µl)	
2X OneStep RT-PCR Master Mix	15 µl
Primer F (10 pmole/µl)	1 µl
Primer R (10 pmole/µl)	1 µl
Template RNA	- µl
Add RNase-free Water to	30 µl

Cycle		
50 °C	30min	X 1
95 °C	15min	X 1
95 °C	20 sec	} X 35~40
AT	40 sec	
72 °C	1 min/kb	
72 °C	5 min	
8 °C	∞	

(Template < 300 ng)

5X Band Helper™ 사용 예

Reaction Mixture (conc. of 5X Band Helper™)	Mix I (0 X)	Mix II (0.5 X)	Mix III (1 X)
2X OneStep RT-PCR Master Mix	15 µl	15 µl	15 µl
Primer F (10 pmole/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Primer R (10 pmole/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Template RNA	- µl	- µl	- µl
5X BandHelper™	0 µl	3 µl	6 µl
Add RNase-free Water to	30 µl	30 µl	30 µl



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 .



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

$$AT = Tm - (4 \sim 6 \text{ } ^\circ\text{C})$$

Expiration Date : -20± 5 °C 보관 시 6개월



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

2022. 05. 16 (설명서 개정일)



주의사항.

본 제품은 실험 전문 인력이 사용하도록 한다.

제품보증 및 책임사항

- 제품의 유효기간은 구입일로부터 **6개월**이다.
- 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.
- 조작성 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 (30 ~ 35 cycles)
10 ng ~ 50 ng (30 ~ 40 cycles)
- Bacterial genomic DNA : 10 ng ~ 50 ng (30 ~ 35 cycles)
1 ng ~ 5 ng (30 ~ 40 cycles)
- Plasmid and Lamda DNA : 1 ng ~ 5 ng (30 ~ 40 cycles)



Troubleshooting Guide

(주) 바이오팩트 사용 시 먼저 check해 주세요.

dNTP 농도 Check : (주) 바이오팩트 dNTP Mix의 농도는 each 10mM입니다 .
Reaction Vol. 50 µl 기준 dNTP (each 10mM) 1 µl 를 사용합니다 .

Enzyme 농도 Check : Reaction Vol. 50 µl 기준 1.25 Unit을 사용합니다 .
Band Helper™ 농도 조절 : DNA 구조적인 문제 시 Final 0X-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™

- 온도 / 시간 check**
01. Annealing Temperature(AT) check
Tm=(A+T) X 2 + (G+C) X 4, AT=Tm-(4~6°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 1~2min/kb

- template Primer Check**
01. Primer degradation check
Primer dilution 후 4°C에서 장기간 보관 시 분해되어 PCR에 영향을 줄 수 있습니다. 새로 dilution하거나 재제작하여 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) X 2 + (G+C) X 4, AT=Tm-(4~6°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 PCR한다 .
02. Band Helper™를 첨가한다 .
03. Hot Start Enzyme를 사용하여 PCR을 진행한다 .

