

# Quick Guide

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



## LYOFACT™ Fast RT Pre-Mix (dT18 Plus)

[Cat. No. BR556-096]

Contents	BR556-096
LyoFACT™ Fast RT Pre-Mix (dT18 Plus)	96 Tube (8 Strip x 12 EA)

### ✓ 제품특징(Feature)

- Lyophilized Type 제품으로, RT에 필요한 모든 성분이 미리 분주되어 있어 편리하며, 실험 시 오염 가능성 최소화
- Oligo dT18 포함
- 고순도의 MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) RTase mutant
- Synthesize cDNA at 37°C, 15 min
- RNA 2차 구조를 억제하여 cDNA 합성 효율 우수

### RT Reaction Method

First-strand cDNA Synthesis (Reaction vol. 20 μl)

1. Ice에서 PCR tube에 아래와같이 Mixture를 혼합합니다.

RNA	Total RNA 10 ng ~ 5 μg mRNA 1 ng ~ 0.5 μg	- μl
RNase free water	to	20 μl

2. 37°C에서 15 min간 반응 시킵니다.

3. 85°C 5 sec간 heating하여 RTase Inactivation 합니다.

4. PCR Reaction을 수행합니다.

### ✓ Tip.

RT 효율이 감소할 수 있으므로 제품 보관은 항상 -20°C를 유지합니다.  
cDNA 합성은 PCR 기기 또는 Lid-heating이 가능한 Heating block에서  
수행하시길 권장합니다.

### ✓ Storage

- 4±5°C for up to 6 months, or -20±5°C for up to 12 months.
- Store it in an aluminum coated bag and in a dry place.
- Keep the humidity below 65% after opening.

2025. 12. 08 (설명서 개정일)

### ✓ 주의사항.

본 제품은 실험 전문 인력이 사용하도록 한다.

#### 제품보증 및 책임사항

- 설명서에 나온 치침에 따라 제품을 사용하였을 경우에만 모든 제품의 결과를 보증한다.
- 실험자의 잘못된 사용이나 부주의로 인해 문제가 발생하였을 경우에는 교환이 되지 않는다.

#### 안전경고 및 응급조치 요청

- 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 얼리고 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.W.에 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 design하여, 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 시간은 15 min으로 설정해야 합니다. (Antibody-mediated Hot start Taq은 2min)

##### 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 AT은 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 PCR 조건을 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.

#### 온도/시간 check

##### 01. Annealing Temperature(AT)

Annealing temperature가 너무 낮을 경우 비특이적인 band가 증폭 될 수 있습니다. AT를 2°C 씩 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

Melting curve를 확인하여 primer dimer의 유무를 확인하고 결과에 영향을 미칠 경우 PCR 조건을 다시 set-up합니다.

##### 03. Template 의 농도 check

Template의 농도를 재확인하고 새로운 샘플을 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 PCR은 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.

