

Quick Guide

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



BioFACT™

2X OneStep qRT-PCR (h) Master Mix (For Probe), Low ROX

[Cat. No. RQ323-10h]

Contents	RQ323-10h
2X OneStep qRT-PCR Master Mix Low ROX (For Probe)	1.0 mL X 1 ea

제품 특징 (Feature)

- BioFACT™ RTase 와 H-Star Taq 으로 RT와 PCR이 한번에 되도록 최적화 시킨 qRT-PCR Mixture
- Thermostable한 RTase로 cDNA 합성의 높은 효율성
- Hot-start PCR Enzyme으로 높은 특이성
- Low-copy transcripts 증폭
- Low ROX Reference Dye 포함

qRT-PCR Mixture & Cycle

qRT- PCR Mixture (Reaction vol. : 20 μL)	
2X OneStep qRT-PCR Master Mix	10 μL
Primer F (10 pmole/μL)	1 μL
Primer R (10 pmole/μL)	1 μL
Probe (variable 2 ~ 4 pmole/μL)	- μL
Template RNA	- μL
Add RNase free water to	20 μL

Cycle*	
[2-Step cycling protocol]	[3-Step cycling protocol]
50°C 30 min X 1	50°C 30 min X 1
95°C 15 min X 1	95°C 15 min X 1
95°C 20 sec	95°C 20 sec
Anneal & Extension 40 sec } X 30~50	ATC 40 sec } X 30~50
72°C 5 min X 1	72°C 1 min/kb } X 30~50
16°C ∞	72°C 5 min X 1
	16°C ∞

(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

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

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

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

2023. 03.06 (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.
- 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.



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 재수행입니다. 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) X 2 + (G+C) X 4, AT=Tm-(4~6°C) 이 산출법으로 설정 후 에도 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.