

# Quick Guide

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



**LYOFACT™** [Lyophilized Type]

## OneStep qRT-PCR Pre-Mix (h)

[Cat. No. RQ501-096]

Contents	RQ501-096
• OneStep qRT-PCR Pre-Mix	Lyophilized PCR Tube(8 Strip x 12 EA) - Clear Tube

### Product Feature

- All components : Reverse Transcriptase, H-Star Taq polymerase, dNTP's, enhancer and stabilizer
- Simple, and fast setting up procedure for high yield and repeatable results
- Optimized and ready-to-use mixture of all components for a successful qRT-PCR
- M-MLV(Recombinant) : RNase H<sup>+</sup> activity
- Hot start activity : Yes(Chemical-mediated)
- Application : Gene expression analysis, Real-time quantification of RNA target, RNA virus research, Molecular diagnosis etc.

### PCR Mixture & Cycle

qRT-PCR Mixture (Reaction vol. : 20 µl)	
Lyophilized qRT-PCR Pre-Mix(Clear Tube)	1 tube
Primer F (10 pmole/µl)	1 µl
Primer R (10 pmole/µl)	1 µl
Probe or Intercalating Dye	x µl
Template RNA	< 200 ng
Add DEPC D.W	to 20 µl

  

Cycle*	
[Probe Type PCR Condition]	[Intercalating Type PCR Condition]
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 } x35 ~ 45	AT 20-40 sec } x35 ~ 45
	72°C 1min/kb
	Melting Analysis Step
	(Template <200 ng)

### Tip.

PCR 수행 시 사용하는 Template의 종류 및 농도, 증폭하고자 하는 target size, primer의 Tm에 따라 template의 사용량, AT, Extension time, Taq의 양, Cycle 수, 5X Band Helper<sup>™</sup> 양을 조절해 사용합니다.

### Tm값 설정

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

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

### Storage

- 4°C for up to 6 months, or -20°C for up to 12 months.
- Store at -20°C/4°C in an aluminium coated bag or on another dry place; humidity < 65% when sealing is opened.



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

2020. 10. 27 (Manual Ver.)

### 주의사항.

본 제품은 실험 전문 인력이 사용하도록 한다.

### 제품보증 및 책임사항

- 제품의 유효기간은 구입일로부터 1년이다.
- 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

- 유효기간이 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.

### 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 넣어준다.  
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 사용시 먼저 check해 주세요.

**Band Helper<sup>™</sup> 농도 조절 :** DNA/RNA 구조적인 문제로 증폭이 잘 되지 않을 경우, Final 0X~2X 로 조절하여 사용합니다.  
(Band Helper<sup>™</sup>는 별매입니다.)

### Low yield or No Band

**Starting Template Problems Check**  
01. Template 사용량 check  
Starting RNA의 integrity, purity, 농도, 보관상태를 확인해야 합니다. 필요하다면 Stock template로부터 새로 희석하여 사용하도록 합니다. Template 사용량은 최종 PCR vol.의 10%를 초과하지 않도록 합니다. 적정량보다 초과 사용 시 substrate inhibition 작용으로 인해 target DNA를 생성하는 데 문제가 발생할 수 있습니다.

**온도/시간 Check**  
01. Annealing Temperature(AT) check  
 $Tm = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$ ,  $AT = Tm - (4 \sim 6^\circ C)$  이 산출법으로 설정 후에도 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.

**Template Primer Check**  
01. Primer degradation check  
Primer dilution 후 4°C에서 장기간 보관 시 분해되어 PCR에 영향을 줄 수 있습니다. 새로 dilution하거나 제작하여 사용합니다.  
02. Starting template check  
보관상태가 불량하거나 농도가 낮은 경우, quality가 낮은 경우 문제가 발생할 수 있습니다. 새로 추출하거나 사용량을 늘립니다.

### Smear Band

- 농도 Check**  
01. 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 PCR 합니다.
- 온도/시간 Check**  
01. Annealing Temperature(AT) check  
 $Tm = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$ ,  $AT = Tm - (4 \sim 6^\circ C)$  이 산출법으로 설정 후에도 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 PCR 한다.  
02. Band Helper<sup>™</sup>를 첨가한다.  
03. Premature cDNA 합성이 이루어지지 않도록 RT-PCR condition은 ice 에서 수행하도록 합니다.

