

Quick Guide

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



BioFACT™ OneStep Multi-Star qRT-PCR Kit (For Probe) (h)

[Cat. No. RQ811-050, RQ811-100]

Contents	RQ811-050	RQ811-100
OneStep Multi-Star qRT-PCR Enzyme Mix	0.1 mL	0.2 mL
5X OneStep qRT-PCR Reaction Buffer	0.25 mL	0.5 mL
RNase-Free Water	1 mL	1 mL

제품특징 (Feature)

- Thermostable한 BioFACT™ RTase 와 Hot Start PCR 기능을 가진 H-Star Taq 으로 Multiplex qRT-PCR이 되도록 최적화시킨 Kit
- Sequence specific probe에 적합
- Quantification of target RNA using Real-Time PCR
- 다양한 진단 키트에 사용되는 probe용 mixture
- Genotyping, Diagnosis에 활용

PCR Mixture & Cycle

PCR Mixture (Reaction vol. : 20 µL)	
5X OneStep qRT-PCR Reaction Buffer	4 µL
Primer F (10 pmole/µL)	1 µL
Primer R (10 pmole/µL)	1 µL
Probe (variable 2 ~ 4 pmole/µL)	1 µL
Template RNA	- µL
Onestep qRT-PCR Enzyme Mix	2 µL
Add RNase-free Water to	20 µL

Cycle*	
[2-Step cycling protocol]	[Reverse Transcription]
50 °C 30 min X 1	• ThermoStable M-MLV RTase (RNase H ⁻)
95 °C 15 min X 1	• cDNA 합성 : < 14 Kb
95 °C 20 sec X 30~50	• Primer : Gene Specific Primer
Anneal & Extension 40 sec X 30~50	• 합성시간 :
72 °C 5 min X 1	[Real-Time PCR]
8 °C ∞	• H-Star Taq DNA Polymerase
	• 증폭길이 : < 1 Kb
	• Hot Start : Yes (Pre-denaturation 15 min)
	• A-tailing : Yes

(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.

▶ Tm값 설정
 $Tm = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$
 $AT = Tm - (4 \sim 6 ^\circ C)$

Expiration Date : -20°C ± 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

2020. 04. 20 (설명서 개정일)

주의사항.

본 제품은 실험 전문 인력이 사용하도록 한다.

제품보증 및 책임사항

- 제품의 유효기간은 구입일로부터 1년이다.
- 설명서에 나온 지침에 따라 제품을 사용하였을 경우에만 제품의 품질을 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 씻는다.
자극이 지속되면 의사의 진료를 받는다.
- 피부에 접촉했을 때 : 접촉된 부위를 비누와 물로 충분히 씻는다.
자극이 지속되면 의사의 진료를 받는다.
- 동상의 위험이 있으니 반드시 장갑 착용 후 사용한다.

사용자 주의사항

- 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 경해진 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
 $Tm = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$, $AT = Tm - (4 \sim 6^\circ C)$ 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. 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 제작하여 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 Enzyme양을 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
 $Tm = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$, $AT = Tm - (4 \sim 6^\circ C)$ 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 PCR한다.
 - 02. Band Helper™를 첨가한다.
 - 03. Hot Start Enzyme를 사용하여 PCR을 진행한다.

