

# Quick Guide

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



## LYOFACT™ [Lyophilized Type] OneStep RT-PCR Pre-Mix (h)

[Cat. No. BR531-096]

Contents	BR531-096
OneStep RT-PCR Pre-Mix with dye	Lyophilized PCR Tube (0.2 ml) (8 Strip x 12 EA)

### Product Feature

- Preloaded lyophilisates containing 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, RNA virus research  
Molecular diagnosis

### PCR Mixture & Cycle

RT-PCR Mixture (Reaction vol. : 30 µl)	
Lyophilized OneStep RT-PCR Pre-Mix	1 tube
Primer F (10 pmole/µl)	1 µl
Primer R (10 pmole/µl)	1 µl
Template RNA	< 200 ng
Add DEPC D.W	to 30 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 25 ~ 40	AT 20-40 sec } X 25 ~ 40
72°C 5 min X 1	72°C 1min/Kb
8°C ∞	72°C 5 min X 1
	8°C ∞

(Template <200 ng)

### Multiple band are observed from the RT-PCR reaction

- The primer sequence is not specific to the desired target.
- The annealing temperature is no optimal.
- The T<sub>m</sub> value of the primers is low
- Number of cycles is too high.
- Genomic DNA contamination-indicated by higher molecular weight product than expected.
- Multiple cDNA products may be obtained from multigene families or alternatively spliced genes.

### Storage

- 4°C for up to 6 months, or -20°C for up to 12 months.
- Store at 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

2019. 09. 16 (설명서 개정일)

### 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.
- 통상의 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.
- 조작용 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) 1µl 를 사용하십시오.
- Enzyme 농도 Check: Reaction Vol. 50 µl 기준 1.25 Unit을 사용하십시오.
- Band Helper™ 농도 조절: DNA 구조적인 문제 시 Final 0X~2X 로 조절하여 사용하십시오.

### Low yield or No Band

- Pure template quality
  - 01. DNA purity check  
DNA template의 260/280 ratio를 통한 DNA 순도를 측정하여 1.8 ~ 2.0 범위의 DNA를 사용하도록 합니다.
- 온도/시간 check
  - 01. Annealing Temperature(AT) check  
T<sub>m</sub>=(A+T) X 2 + (G+C) X 4, AT=T<sub>m</sub>-(4~6°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, P<sub>fu</sub>는 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 사용하십시오.
  - 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. Template 농도 check  
Template를 serial dilution하여 사용하십시오.

- 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  
T<sub>m</sub>=(A+T) X 2 + (G+C) X 4, AT=T<sub>m</sub>-(4~6°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. [별도 구매, Cat. No. BB741-10H]
  - 03. Hot Start Enzyme을 사용하여 PCR을 진행한다.

