

# Quick Guide

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



## BioFACT™ OneStep RT-PCR Kit (h)

[Cat. No. BR861-050, BR861-100, BR861-10h]

Contents	BR861-050	BR861-100	BR861-10h
OneStep RT-PCR Enzyme Mix	0.1 mL	0.1 mL x 2 ea	0.1 mL x 20 ea
5X OneStep qRT-PCR Reaction Buffer	0.3 mL	0.3 mL x 2 ea	0.3 mL x 20 ea
5X Band Helper™	0.3 mL	1.0 mL	1.0 mL x 10 ea
RNase-Free Water	1.0 mL	1.0 mL	1 mL x 10 ea

### 제품 특징 (Feature)

- BioFACT™ RTase 와 H-Star Taq 으로 RT와 PCR이 한번에 되도록 최적화 시킨 Kit
- Thermostable한 RTase로 cDNA 합성의 높은 효율성
- Hotstart PCR Enzyme으로 높은 특이성
- Low-copy transcripts 증폭
- Synthesis gene size : < 1Kb PCR

### RT-PCR Mixture & Cycle

RT- PCR Mixture (Reaction vol. : 30 µl)	
5X OneStep RT-PCR Reaction Buffer	6 µl
Primer F (10 pmole/µl)	1 µl
Primer R (10 pmole/µl)	1 µl
Template RNA	- µl
OneStep RT-PCR Enzyme Mix	2 µl
5X Band Helper™	1~6 µl
Add RNase-free Water to	30 µl

  

Cycle	
50 °C 30min	X 1
95 °C 15min	X 1
95 °C 20 sec	X 35~40
AT 40 sec	
72 °C 1 min/kb	
72 °C 5 min	X 1
8 °C ∞	

(Template <300 ng)

### 5X Band Helper™ 사용 예

Reaction Mixture (conc. of 5X Band Helper™)	Mix I (0 X)	Mix II (0.5 X)	Mix III (1 X)
5X OneStep RT-PCR Reaction Buffer	6 µl	6 µl	6 µl
Primer F (10 pmole/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Primer R (10 pmole/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Template RNA	- µl	- µl	- µl
OneStep RT-PCR Enzyme Mix	2 µl	2 µl	2 µl
5X Band Helper™	0 µl	3 µl	6 µl
Add RNase-free Water to	30 µl	30 µl	30 µl



### 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

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

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

Expiration Date : -20 ± 5 °C 보관 시 1년 6개월



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

2018.02.25 (설명서 개정일)



### 주의사항.

본 제품은 실험 전문 인력이 사용하도록 한다.

#### 제품보증 및 책임사항

- 제품의 유효기간은 구입일로부터 1년 6개월이다.
- 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 접촉시 : 접촉된 부위를 비누와 물로 충분히 씻을 것.  
자극이 지속되면 의사의 진료를 받을 것.
- 동상의 위험이 있으니 반드시 감광 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.
- 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 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. 50µl 기준 dNTP (each 10mM) 1µl 를 사용합니다.

**Enzyme 농도 Check:** Reaction Vol. 50µl 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**  
 $Tm = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$ ,  $AT = Tm - (4 \sim 6^\circ\text{C})$  이 산출법으로 설정 후 예도 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,  $Pfu_{II}$ 는 1~2 min/kb



#### template Primer Check

- 01. Primer degradation check**  
Primer dilution 후 4°C에서 경기간 보관 시 분해되어 PCR에 영향을 줄 수 있습니다. 새로 dilution하거나 재작하여 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 Enzyme 양을 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**  
 $Tm = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$ ,  $AT = Tm - (4 \sim 6^\circ\text{C})$  이 산출법으로 설정 후 예도 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 추가한다.**
- 03. Hot Start Enzyme을 사용하여 PCR을 진행한다.**

