

Quick Guide

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



BioFACT™ 2X RT Pre-Mix

[Cat. No. BR441-096]

Contents	BR441-096
BioFACT™ 2X RT Pre-Mix	96 tube 8strip x 12ea

제품 특징 (Feature)

- Thermostable and RNase H variant of M-MLV RTase(RNase H⁻)
- Synthesize cDNA at 42 °C ~ 50 °C
- Especially the highest activity at 50 °C
- Synthesis of long length cDNA (< 14 kb)
- Synthesis primer : random primer, oligo-d(T), gene specific primer
- RNA 2차 구조를 억제하여 cDNA 합성 효율 우수

RT Reaction Method

First-strand cDNA Synthesis (Reaction vol. 20 μl)

1. PCR tube에 아래와같이 Mixture를 혼합 합니다.

RNA	Total RNA 10 ng ~ 5 ug , mRNA 1 ng ~ 0.5 ug	- μl
Primer	Oligo (dT) 20 : 50 uM	1 μl
	Random Hexamer : 50 uM	
	Sequence -Specific Primer : 15 ~ 20 uM	
	2X RT Pre-Mix	10 μl
	RNase-free Water	- μl
	Total Volume	20 μl

2. 상온에서 5min incubation 합니다.

3. 50°C 에서 30min 반응 시킵니다.

→ Optional ; oligo (dT)12~18 mer인 경우는 42 °C(또는 50 °C)를 추천하며, 비특이적 반응을 줄이기 위해서는 50 °C 반응을 권장합니다.

→ 1 kb 이상의 cDNA 산물을 합성할 경우 30 min 이상 반응을 권장합니다.

4. 95 °C 5 min으로 heating하여 RTase Inactivation합니다.

5. PCR Reaction



Tip.
RT 효율이 감소할 수 있으므로 제품 보관은 항상 -20°C 를 유지합니다. cDNA 합성은 PCR 기기 또는 Lid-heating이 가능한 Heating block에서 수행하시길 권장합니다. 특히 50 °C 에서 RT 반응을 수행 시 Water bath 등의 사용은 반응액을 증발시켜 cDNA 합성 효율을 저하시킬 수 있습니다.

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



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

2022. 05. 16 (설명서 개정일)



주의사항.

본 제품은 실험 전문 인력이 사용하도록 한다.

제품보증 및 책임사항

- 제품의 유효기간은 구입일로부터 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 경각 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 template 대신 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 μl를 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

$T_m = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$, $AT = T_m - (4 \sim 6^\circ C)$ 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 적정 시간보다 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

$T_m = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$, $AT = T_m - (4 \sim 6^\circ C)$ 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.

