

Quick Guide

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



LYOFACT™ RT Pre-Mix (dT18/dN9 Plus)

[Cat. No. BR548-096]

Contents	BR548-096
RT Pre-Mix(dT18/dN9 Plus)	96 Tube (8 Strip x 12 EA)

☑ 제품특징 (Feature)

- Lyophilized Type 제품으로, RT에 필요한 모든 성분이 미리 분주되어 있어 편리하며, 실험 시 오염가능성 최소화
- Oligo dT18, Random Primer(dN9) 포함
- 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 혼합합니다.

RNA	Total RNA 10 ng ~ 5 ug, mRNA 1 ng ~ 0.5 ug	- μl
RNase free water	to	20 μl

2. 상온에서 5 min incubation 합니다.

3. 42 ~ 50°C 에서 1 hr 반응 시킵니다.
→ 비특이적 반응을 줄이기 위해서는 50°C 반응을 권장합니다.

4. 95°C 5 min간 heating하여 RTase Inactivation 합니다.

5. PCR Reaction

☑ Application.

- Synthesize First-Strand cDNA
- cDNA Libraries
- Primer Extension
- Gene Expression
- RNA Quantification

☑ 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 1년

2019. 07. 05 (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.
- 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 사용시 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~2X 로 조절하여 사용합니다.

💡 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
Tm=(A+T) X 2 + (G+C) X 4, AT=Tm-(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, 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. Template 농도 check
Template를 serial 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) X 2 + (G+C) X 4, AT=Tm-(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 Enzyme를 사용하여 PCR을 진행한다.