

Quick Guide

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



BioFACT™ RT Kit (M-MLV, RNase H⁻)

[Cat. No. BR122-10k, BR123-10k]

Contents	BR122-10k	BR123-10k
BioFACT™ RTase(200 U/μl)	10,000 U	10,000 U
5 X RT Reaction Buffer (Included Each 10 mM dNTP Mix)	200 μl	200 μl
8 mM DTT	50 μl	50 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	50 μl	w/o
RNase-free water	1 ml	1 ml

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 RNA와 Primer를 아래 농도로 혼합 합니다 .

RNA	Total RNA 10 ng ~ 5 ug , mRNA 1 ng ~ 0.5 ug
Primer	Oligo (dT) 20 : 50 uM Random Hexamer : 50 uM Sequence -Specific Primer : 15 ~ 20 uM

2. 혼합 된 RNA와 Primer를 65°C, 5 min heating하고, ice에 옮깁니다 .

3. 아래와 같이 혼합 합니다 .

Pre-heating product (RNA & Primer)	- μl
5X RT Reaction Buffer (Included dNTP mix)	4 μl
8 mM DTT	1 μl
BioFACT™ RTase (200 U/μl)	1 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl) : Optional	1 μl
RNase-free water to	20 μl

4. 50 °C에서 30 min간 반응시킵니다.
→ 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.

5. 95°C, 5 min 으로 heating하여 RTase Inactivation 합니다 .

Tip.

RT 효율이 감소할 수 있으므로 제품 보관은 항상 -20°C 를 유지합니다 . cDNA 합성은 PCR 기기 또는 Lid-heating이 가능한 Heating block에서 수행 하시길 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 6개월



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

2016. 04. 01 (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 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 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 Unit 을 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
 $T_m = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$, $AT = T_m - (4-6^\circ C)$ 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 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
 $T_m = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$, $AT = T_m - (4-6^\circ C)$ 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 .

