

Quick Guide

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



RT Pre-Mix (dN9 Plus)

[Cat. No. BR547-096]

Contents	BR547-096
LyoFACT™ RT Pre-Mix (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
- 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
- RNA 2차 구조를 억제하여 cDNA 합성 효율 우수

RT Reaction Method

First-strand cDNA Synthesis (Reaction vol. 20 μ l)

1. PCR tube에 아래와같이 Mixture를 혼합합니다.

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

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

✓ 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.
- cDNA 합성 후, 뿌옇게 흐려질 수 있으나 제품 성능에 영향이 없으므로 안심 하고 사용하셔도 됩니다.

✓ Storage

- -4±5°C for up to 6 months, or -20±5°C for up to 12 months.
- Store it in an aluminum coated bag and in a dry place.
- Keep the humidity below 65% after opening.

2024. 10. 1 (설명서 개정일)

주의사항.

본 제품은 실험 전문 인력이 사용하도록 한다.

제품보증 및 책임사항

- 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.
- 피부에 접촉 시 : 접촉된 부위를 비누와 물로 충분히 씻을 것.
- 동상의 위험이 있으니 반드시 장갑 착용 후 사용할 것.

사용자 유의사항

- 유효기한이 지난 제품의 사용을 금지한다.
- 냉동 제품을 자주 얼리고 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.

💡 No Amplification

Template

01. Starting template check
농도가 낮거나 quality가 낮은 경우 증폭이 되지 않을 수 있습니다. 다시 추출하거나 사용량을 늘려 재수행합니다.

02. PCR Inhibitor
Template의 purity가 좋지 않은 경우 증폭이 되지 않을 수 있습니다. Template를 DW에 희석하여 PCR하거나 다시 추출하여 수행합니다.

Primer

01. Primer Concentration Check
Primer의 농도가 너무 높거나 낮은 경우 PCR 효율이 감소될 수 있습니다. 적정 농도가 조정하여 사용합니다.

02. Primer design
Primer를 새로 디자인하여 재수행합니다. Primer binding site에 구조(GC-rich contents, 2차구조 등)가 있을 경우 binding site를 변경하여 새로 primer를 design하며, 일반적으로 Primer의 size는 17~25 bp, 증폭 size는 80 ~ 150 bp가 되도록 설계합니다.

03. Primer degraded
Primer를 다시 희석하거나 새로 합성하여 사용합니다.

온도/시간 check

01. 초기 activation 시간 check
자사 Real-Time PCR Master Mix (Pre-Mix)의 Enzyme은 chemical-mediated Hot Start Taq으로 초기 activation 시간을 15 min으로 설정해야 합니다. (Antibody-mediated Hot start Taq은 2min)

02. Annealing Temperature(AT)
 $Tm=(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4, AT=Tm-(4-6^{\circ}C)$ 이 산출법으로 설정 후 에도 PCR이 되지 않으면 AT를 2°C 낮추어 진행합니다. qPCR의 AT는 일반적으로 50 ~ 65°C가 되도록 설정합니다.

💡 NTC (Non-Template Control)

Primer dimer

01. Primer dimer유무 확인
Melting curve 혹은 agarose gel을 확인하여 primer dimer의 유무를 확인하고 결과에 영향을 미칠 경우, 다시 set-up하거나 primer를 새로 design합니다.

Contamination

01. 새로운 시약으로 재수행
02. 반응액은 clean bench에서 진행
03. UDG System
Cross-over contamination 방지를 위한 UDG System이 적용된 제품을 사용합니다.

온도/시간 check

01. Annealing Temperature(AT)
Annealing temperature가 너무 낮을 경우 비특이적인 band가 증폭 될 수 있습니다. AT를 2°C씩 높여 테스트하거나 온도 gradient를 이용하여 최적 AT를 설정합니다.

Primer

01. Primer design
Melting curve / 전기영동을 통해 비특이적인 산물의 증폭여부를 확인합니다. Target gene만 증폭될 수 있도록 primer를 다시 design하여 수행합니다.

02. Primer Concentration
높은 농도의 primer를 사용할 경우 primer dimer가 형성될 수 있습니다. Primer를 serial dilution하여 dimer가 사라지는 농도를 테스트한 후 재수행 합니다.

💡 PCR efficiency above 105 %

Template / Primer

01. Primer dimer 유무 check
02. Non-Specific band 유무 check
Melting curve를 확인하여 primer dimer의 유무를 확인하고 결과에 영향을 미칠 경우 PCR조건을 다시 set-up합니다.

03. Template의 농도 check
Template의 농도를 재확인하고 새로운 샘플로 다시 수행합니다.

💡 PCR efficiency below 90 %

Primer

01. Primer Concentration
Primer의 농도가 너무 높거나 낮은 경우 PCR 효율이 감소될 수 있습니다. 적정 농도가 조정하여 사용합니다.

02. Primer design
Primer를 새로 디자인하여 재수행합니다. Real-Time PCR 전 conventional PCR로 target gene의 amplification 여부를 확인합니다.

Product Size

01. Amplicon size check
Amplicon은 80~150 bp가 되도록 design하는 것을 권장합니다. Amplicon의 size가 작을수록 높은 증폭 효율을 보이며, 500 bp를 초과하지 않도록 합니다.

Extension Time

01. Extension Time check
Extension Time이 짧을 경우 PCR 효율이 감소 될 수 있습니다. 조건 설정 시 Extension Time을 늘려 진행합니다.