

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
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, oligo-d(T), gene specific 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

☑ 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.
cDNA 합성 후, 뚜껑에 흐려질 수 있으나 제품 성능에 영향이 없으므로 안심하고 사용하셔도 됩니다.

Expiration Date : -20°C ± 5°C 보관 시 1년

2023. 11. 15 (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.
자극이 지속되면 의사의 진료를 받을 것.
- 피부에 접촉 시 : 접촉된 부위를 비누와 물로 충분히 씻을 것.
자극이 지속되면 의사의 진료를 받을 것.
- 동상의 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.
- 조작성 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

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 D.W에 희석하여 PCR하거나 다시 추출하여 수행합니다.

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.

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) X 2 + (G+C) X 4, AT=Tm-(4~6°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)

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

01. 새로운 시약으로 재수행

02. 반응액은 clean bench에서 진행

03. UDG System
Cross-over contamination 방지를 위한 UDG System이 적용된 제품을 사용합니다.

💡 Non-Specific amplification / Primer dimer

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

01. Primer design
Melting curve / 전기영동을 통해 비특이적인 산물의 증폭 여부를 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 %

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. Template 의 농도 check
Template의 농도를 재확인하고 새로운 샘플로 다시 수행합니다.

💡 PCR efficiency below 90 %

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 건 conventional PCR로 target gene의 amplification 여부를 확인합니다.

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

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