



For research use only

ISO9001

Reverse Transcription Master Premix (5x)

| 제 품 명 | 용 량 | Cat. No. | 비 고 |
|-------------------------------------|--------|----------|--|
| Reverse Transcription Master Premix | 0.2 ml | EBT-1531 | Contain random hexamer, 5x ready-to-use mix |
| (5x, M-MLV-RT, RNase H-) | 0.2 ml | EBT-1532 | Contain oligo d(T) ₁₅ , 5x ready-to-use mix |
| | 0.2 ml | EBT-1533 | No primer contained, 5x ready-to-use mix |

제품설명:

Reverse Transcription Master Premix는 RNA 시료의 역전사 반응에 필요한 M-MLV reverse transcriptase (RNase H⁻ 포함), dNTP, 완충용액, 그리고 primer를 모두 포함하고 있어 RNA 시료의 첨가만으로 일차 cDNA 합성을 할 수 있도록 만든 제품입니다. 본 제품은 5x 농축용액으로 제조되어 판매되며 최종 반응부피의 1/5 부피만큼을 반응에 넣어 사용하시면 됩니다. 0.2 ml로 제공되므로 20 µl 표준반응을 50회 수행할 수 있는 제품입니다.

본 제품에는 제품에 따라 cDNA 합성 primer로서 random hexamer (EBT-1531)와 oligo d(T)₁₅ (EBT-1532)를 포함하고 있어 별도의 cDNA 합성 primer를 첨가해 줄 필요가 없는 제품과 primer를 포함하지 않아 사용자께서 임의의 primer를 사용하실 수 있도록 한 제품 (EBT-1533)으로 구분하여 제공되고 있습니다.

본 제품에 첨가된 M-MLV reverse transcriptase는 RNase H 활성이 없는 중합효소로서 RNase H 활성을 갖는 효소에 비해 더 긴 size (<10 kbp)의 cDNA 합성에 최적의 조건을 제공합니다. RNA 시료를 제외한 모든 성분을 포함하고 있기 때문에 pipetting 오류에 의한 시료간 오차를 줄일 수 있는 장점이 있으며, 항상 동일한 조건에서 cDNA 합성을 할 수 있는 장점이 있습니다.

응용분야:

First strand cDNA synthesis from total RNA or polyA⁺ RNA, Primer extension, RT-PCR.

품질검사:

DNA 중합활성 시험, exo/endonuclease 오염 시험, 안정성 시험.

보관방법:

-20°C에서 보관할 경우 1년간 안정함.

반응 전 필수 주의 사항:

- 합성된 cDNA는 RT-PCR 또는 cDNA library 제조에 사용할 수 있습니다.
- cDNA 합성에 사용할 RNA 시료의 정제도 및 품질은 cDNA 합성에 지대한 영향을 미치며 RNA 품질에 문제가 있는 경우 합성 반응은 일어나지 않을 수 있습니다. Agarose 전기영동을 통해 합성 전 RNA 시료의 품질을 반드시 확인해 봐야 합니다. 260/280nm 파장에서의 비율은 1.5 이상 2.0 이하의 RNA를 사용해야 하며 agarose 전기영동 후 28S 와 18S ribosomal RNA의 비율이 2:1이어야 합니다.
- 장기 보관된 RNA의 경우에 RNA의 품질이 떨어질 수 있으며, RNA 시료에 오염된 미량의 alcohol, salt, chaotropic agent, phenol 등은 효소의 활성을 떨어뜨릴 수 있습니다.
- 합성에 사용할 RNA의 양은 total RNA 시료이며 20 µl 반응인 경우, 100 ng에서 1 µg이 적당하며 더 많은 RNA가 사용될 경우 합성이 저해될 수 도 있습니다.

표준실험방법:

- 1.1 µg의 total RNA 또는 100 ng의 polyA⁺ RNA 시료를 ≤16 µl의 nuclease-free water에 준비합니다.
2. RNA 시료를 70°C에서 5분간 반응하여 RNA 시료의 이차구조를 없애 줍니다.
3. Tube를 즉시 얼음 위에 놓고 식혀준 후 짧게 원심분리를 하여 증발되거나 벽면에 묻은 용액을 모아줍니다.

*주의사항 : Primer가 포함되어 있지 않은 제품을 사용할 경우에는 RNA 시료의 열처리 전에 합성에 사용할 primer를 적합한 농도로 미리 첨가해야 합니다 (10-20 pmol/rxn). Random hexamer 또는 oligo d(T) primer가 포함된 제품을 사용하는 경우에는 별도의 primer 첨가가 필요하지 않습니다.

4. 다음과 같이 20 µl의 PCR 혼합용액을 조제합니다 :

Reverse Transcription Master Premix, 5x : 4 µl
Denatured RNA sample : 16 µl

* 주의사항 : 반응용액의 최종부피에 따라 첨가되는 Master Premix의 부피는 달라지며 최종 부피를 기준으로 1/5 만큼을 첨가하면 됩니다.

5. 혼합액을 잘 섞어준 후 37°C 또는 42°C에서 1시간 동안 반응을 시킵니다.
6. 반응 후 혼합액을 94°C에서 5분간 반응한 후 얼음 위에서 식혀주고 -20°C에 보관합니다.

PCR 반응:

1. 다음과 같이 20 µl의 PCR 혼합용액을 조제합니다 :

| | |
|------------------------|-------------|
| 10x PCR Buffer | 2 µl |
| dNTP mix (2.5 mM each) | 1.6 µl |
| Primers (10 pmol/µl) | 0.5 µl each |
| cDNA by RT reaction | 0.1-1 µl |
| Taq (5 unit/µl) | 0.2 µl |

최종부피가 20 µl가 되도록 증류수를 첨가합니다.

2. 다음과 같이 PCR 반응을 합니다.

| PCR 조건 | (100bp - 1kb) | (1-3kb) |
|----------------------|---------------|---------|
| 94°C | 5 min | 5 min |
| 94°C | 30 sec | 30 sec |
| 50-60°C ^a | 30 sec | 30 sec |
| 72°C | 45 sec | 1.5 min |
| 72°C ^b | 5 min | 5 min |

x 25-40

위의 PCR 반응조건은 사용하는 DNA 증폭효소의 특성에 따라 달라질 수 있는 내용이며 일반적인 Taq polymerase를 이용한 표준반응만을 예시하고 있습니다. DNA 중합효소 제품의 사용방법을 따르길 권장드립니다.

- a. 최적의 annealing 온도는 사용하는 primer 쌍의 melting point에 의해 결정됩니다.
- b. 최종 72°C 반응은 TA cloning 목적이 아닌 이상 생략되어도 무방합니다.
- c. PCR cycle 수는 RNA 시료에 존재하는 표적 RNA의 copy 수에 따라 달라집니다. 적은 양으로 존재하는 유전자를 증폭하기 위해서는 더 많은 cycle 수를 설정해야 하며 이는 사용자께서 결정해야 하는 내용입니다.