

AMV Reverse Transkriptase Native (Avian Myeloblastosis Virus)

AMV Reverse Transkriptase Native (Avian Myeloblastosis Virus)

Artikel Nr.	Größe
E1372-01	500 Einheiten
E1372-02	2 500 Einheiten

Definition der Einheit:

Eine Einheit ist die Menge des Enzyms, das erforderlich ist, um 1 nmol dTTP in 10 Minuten bei 37°C in säureunlösliche Form (4) zu überführen.

Lagerbedingungen:

Lagerung bei -20°C

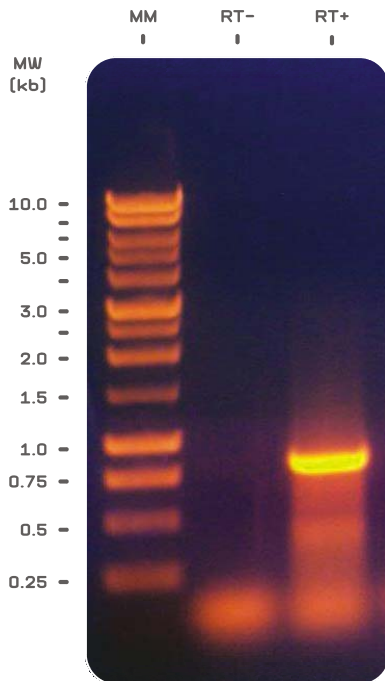


Abb. 1: RT-PCR eines Genfragmentes von *Sus scrofa* Arginase I. Reverse Transkription erfolgte mit nativer AMV Reverse Transkriptase aus totaler RNA (isoliert aus Lebergewebe mit dem GeneMatrix Universal RNA Kit, Best. Nr. E3598).

M - Perfect TM Plus 1 kb DNA Leiter (Best.Nr. E3131).

RT- - RT- PCR direkt aus gereinigter RNA ohne cDNA Synthese mit AMV-RT (Negativkontrolle).

RT+ - RT-PCR nach cDNA Synthese mit AMV-RT.

AMV Reverse Transkriptase (Avian Myeloblastosis Virus; Myeloblastose - Vogelvirus) ist eine RNA-abhängige DNA Polymerase aus dem Myeloblastose-Vogelvirus, die einen komplementären DNA-Strang in Gegenwart eines Primers synthetisiert.

Beschreibung:

- Das Protein liegt in nativer, natürlicher Konformation vor und besitzt eine höhere Sensivität und Spezifität im Vergleich zu AMV Reverser Transkriptase rekombinanten Ursprunges.
- Enthält RNase H Aktivität, die für cDNA Synthese und isothermische RNA-Amplifikation notwendig ist. RNase H ist spezifisch für DNA / RNA - Hybridmoleküle und greift einzelsträngige RNA-Moleküle nicht an.
- Synthetisiert zu einer RNA-Vorlage ("Template") einen komplementären DNA Strang.
- Aktiv in einem breiten Temperaturbereich zwischen 37°C bis 65°C. Höhere Temperaturen können Problemen aufgrund komplexer RNA-Sekundärstrukturen entgegenwirken.
- Kann verwendet werden, um markierte Proben für Hybridisierungen vorzubereiten.
- Ideal für den Gebrauch in RT-PCR (besonders für GC-reiche Vorlagen mit starken Sekundärstrukturen), für RAMP, NASBA, cDNA-Bibliotheken und Dideoxy-DNA Sequenzierung (1, 2, 3).

Reaktionsprotokoll - Reverse Transkription mit AMV RT:

Dieser Reaktionsansatz ist ausreichend für die Synthese von cDNA aus geringen RNA Mengen. Aus 5 ng bis 5 µg RNA können cDNA Fragmente einer Länge bis zu 10 kb synthetisiert werden.

- Vorbereitung des **RNA-Mix**: 100 ng totale RNA werden mit 1 µl eines reversen DNA Primers (10 µM) und 2 µl eines 10 mM dNTP Mix in einem Gesamtvolumen von 14 µl gemischt.
- Optionaler Schritt: Der RNA-Mix wird für 5 min auf 65°C erhitzt und für weitere 5 min auf Eis gekühlt.*
- Vorbereitung des **RT-Mix**: Mischung von 4 µl des 5x RT buffer, 0,5 µl RNase Inhibitor 30 U/µl (Best.Nr. E4210), 1 µl 100 mM DTT und 0,5 µl AMV Native Reverse Transcriptase (10 U /µl).
- 6 µl **RT-Mix** wird zu 14 µl **RNA-Mix** zugefügt. Das Gesamtvolumen beträgt 20 µl.
- Die Reaktion wird zunächst für 15 min bei 42°C, anschließend für 45 min bei 50°C inkubiert. Alternativ kann die zweite Inkubation zwischen 42°C und 60°C durchgeführt werden.
- 0,5-2 µl der RT-Reaktion werden als Kopiervorlage ("Template") für eine Standard PCR mit 20-40 Zyklen eingesetzt.

* Der Erhitzungsschritt auf 65°C und das anschließende Abkühlen sind optional. Mit diesem Schritt können bei schwierigen RNA-Vorlagen oder im Falle von starken Sekundärstrukturen deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden. Bei allen übrigen RNA-Vorlagen verändert sich die Reaktionseffizienz nicht und dieser Schritt kann ausgelassen werden.

5 x Reaktionspuffer (Reaction Buffer):

250 mM Trisacetat (pH 8.4), 375 mM Kaliumacetat, 40 mM Magnesiumacetat und Stabilisatoren.

Lagerungspuffer (Storage Buffer):

200 mM Kalium-Phosphat (pH 7.2), 2 mM Dithiothreitol, 0,2 % [v/v] Triton X-100 und 50 % (v/v) Glycerin.

Reaktionsbedingungen der Qualitätskontrolle:

50 mM Tris-HCl (pH 8.3 bei 22°C), 6 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, 40 mM KCl, 0,5-mM [³H]dTTP, poly(rA)·(dT)₅₀ in einem Reaktionsvolumen von 50 µl.

Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf Endonuklease-, Exonuklease-, unspezifische RNase sowie einzel- und doppelsträngige DNase- Aktivitäten geprüft.

Literatur:

1. Goodman, H.M. und MacDonald, R.J. (1979) *Methods Enzymol.* 68, 75-90.
2. Naylor, L.H und van de Sande, J.H. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14, 5939.
3. Zagursky, R.J., Baumeister, K., Lomax, N. und Berman, M.L. (1985) *Gene Anal. Techn.* 2, 89-94.
4. Houts, G.E., Masakau, M., Ellis, C., Beard, D. und Beard, J.W. (1979) *J. Virol.* 29, 517-522.