

Tth Reverse Transkriptase

(*Thermus thermophilus*)

Tth Reverse Transkriptase (*Thermus thermophilus*)

Thermus thermophilus Reverse Transkriptase katalysiert die reverse Transkription von RNA zu cDNA bei erhöhten Temperaturen in Anwesenheit von Mn^{2+} und katalysiert in der Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen die Polymerisation von DNA.

Artikel Nr.	Größe
E1374-01	100 Einheiten
E1374-02	500 Einheiten

Definition der Einheit: Eine Einheit ist die Menge des Enzyms, die erforderlich ist, um 1 nmol dTTP in 10 Minuten bei 50°C in die säureunlösliche Form (4) zu überführen.

Lagerbedingungen:
Lagerung bei -20°C

Beschreibung:

- Geeignet für die Synthese von DNA bei hohen Temperaturen (2).
- Synthetisiert cDNA aus RNA (3).
- Reverse Transkriptase-Aktivität bei Hochtemperaturen (3).
- Minimiert Probleme, die durch starke sekundäre Strukturen der RNA verursacht werden.
- Kann für effiziente PCR aus DNA verwendet werden, die problematische sekundäre Strukturen enthält.
- Anwendbar in RT-PCR; dasselbe Enzym wird sowohl für die reverse Transkription als anschließend auch zur Amplifikation des erhaltenen cDNA-Templates verwendet werden (3).
- Widerstandsfähig gegen Hemmstoffe der Amplifikation, die in Template-DNA aus problematischen Präparationen enthalten sein können (4,5).

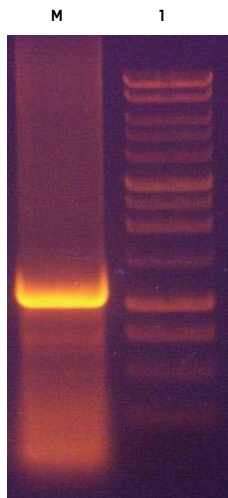


Abb. RT-PCR unter Verwendung von Tth Reverse Transkriptase

M – Perfect Plus 1 kb DNA Ladder (EURx Cat.No. E3131)

1 – 1137 nt Fragment von *Sus scrofa* Arginase, transkribiert und amplifiziert mit Tth Reverse Transkriptase. Ausgangsmaterial: Totale RNA, isoliert aus Leber unter Verwendung des EURx Universal RNA Purification Kit (Best. Nr. E3598)

Hinweis:

Die Enzyme Tth Reverse Transkriptase (EURx Cat. No. 1374) und Tth DNA Polymerase (EURx Cat.No. E1115) sind identisch. Allerdings enthalten beide Packungen unterschiedliche Mengen des Enzyms. Dem zugrunde liegen unterschiedliche Definitionen der Einheit für beide Enzymaktivitäten: Während die Definition der Einheit in Packung Nr. E 1374 auf die RT-Aktivität des Enzyms abstellt, bezieht sich die entsprechende Definition in Packung Nr. E1115 auf die DNA-Polymerase Aktivität des Enzyms. Weiterhin enthält Packung Nr. E1374 alle notwendigen Puffer für RT-PCR Reaktionen (sowohl für den RT als auch für den PCR-Teil des Protokolls). Packung Nr. E1115 beinhaltet lediglich Puffer für PCR / DNA-Polymerase Reaktionen.

Tth – RT-PCR, Beispiel-Protokoll

RT:

Komponente	Endkonzentration / -menge	Volumen je Reaktion
10 x Tth RT Puffer	1 x	1 x
dNTP Mix (5 mM je dNTP)**	0,25 mM	1 µl*
Reverser Primer (10 µM)	20 pmol	2 µl*
1 x Tth RT (5 U /µl)	0,25 U/µl	1 µl
MnCl ₂ (50 mM)	2 mM	0,8 µl
Template RNA	5 ng – 1 µg	Variable @ 20 µl
H ₂ O		@ 20 µl

Inkubation für 3 min bei 53°C (Primer-Annealing, die genaue Inkubationstemperatur ist Primer-abhängig). Anschließend 10 – 20 min bei 70°C inkubieren. Danach 80 µl PCR-Mix zufügen.

PCR:

Komponente	Endkonzentration / -menge	Volumen je Reaktion
EGTA	0,75 mM	1,2 µl
10 x Puffer Pol A	1 x	8 µl
dNTP Mix (5 mM je dNTP)**	0,2 mM	3,2 µl*
Vorwärts-Primer (10 µM)	80 pmol	8 µl*
Reverser Primer (10 µM)	100 pmol	10 µl*
MgCl ₂	2 mM	3,2 µl
H ₂ O		@ 80 µl

*je nach Konzentration der Stammlösung. ** z.B. dNTP Mix (5 mM je dNTP), Best.Nr. E2800

Gesamtes Reaktionsvolumen 100 µl. Das PCR-Programm sollte an die verwendeten Primer und die DNA-Vorlage (Template) angepasst werden. Da Tth Reverse Transkriptase nach Zugabe von Mg^{2+} -Ionen DNA-Polymerase Aktivität besitzt, ist es nicht notwendig, eine zusätzliche DNA Polymerase hinzuzufügen. Die Polymerisations-Temperatur beträgt 72°C.

Bitte berücksichtigen Sie, dass die Prozessivität der Tth DNA Polymerase niedrig ist. Amplikons von 2 kb Länge können amplifiziert werden, aber geeigneter sind Zielfragmente unterhalb einer Größe von 1 kb. Bedingt durch die Gegenwart von Mn^{2+} -Ionen, besitzt die Polymerase im Vergleich zu einer Zweischritt RT eine erhöhte Fehlerrate (1).

Lagerungspuffer (Storage Buffer):

50 mM Tris-HCl (pH 7.5 bei 22°C), 5 mM Dithiothreitol, 0,1 mM EDTA, 50% [v/v] Glycerin und Stabilisatoren.

10 x Reaktionspuffer:

670 mM Tris-HCl (pH 8.9 at 22°C), 166 mM Ammoniumsulfat, 0,1% Tween™20.

Reaktionsbedingungen der Qualitätskontrolle:

40 mM Tris-HCl (pH 8,5 bei 22°C), 1 mM MnCl₂, 1 mg/ml Rinderserum-Albumin, 10 mM Dithiothreitol, 0,5 mM (α -³²P) dTTP und 0,4 mM poly(A)-(dT)₅₀. Inkubation bei 50°C für 10 Minuten in einem Reaktionsvolumen von 50 µl.

Qualitätskontrolle:

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

Literatur:

1. Mulder, I. et al. (1994) *Journal of Clinical Microbiology* 32, 292-300.
2. Wang, A. M., Doyle, M.V. und Mark, D.F. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 9717-9721.
3. Myers, T. W., Gelfand, D. H. (1991) *Biochemistry* 30, 7661-7666.
4. Kather, H. L., Schwartz, I. (1994) *Biotechniques* 16, 84-92.
5. Poddar, S. K., Sawyer, M. H., Connor, J. D. (1998) *J. Med. Microbiol.* 47, 1131-1135.