



# AMV Reverse Transkriptase (Rekombinant)

## AMV Reverse Transkriptase (Rekombinant)

Artikel Nr.	Größe
E1371-01	500 Einheiten
E1371-02	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

**5 x Reaktionspuffer (Reaction Buffer):**  
250 mM Tris-Azetat (pH 8.4), 375 mM Kalium-Azetat, 40 mM Magnesium-Azetat und Stabilisatoren.

### Reaktionsbedingungen der Qualitätskontrolle:

50 mM Tris-HCl (pH 8.3 bei 22°C), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM KCl, 1 mM Dithiothreitol, 0,2 mM poly(rA)-(dT)<sub>50</sub>, 0,5 mM [<sup>3</sup>H]dTTP in einem Reaktionsvolumen von 50 µl.

**AMV Reverse Transkriptase (Avian Myeloblastosis Virus; Myeloblastose - Vogelvirus) ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Sie beginnt bei einem kurzen DNA-Fragment (Primer) und synthetisiert, von diesem Primer ausgehend, einen komplementären DNA-Strang. AMV-RT benutzt entweder RNA oder einzelsträngige DNA als Vorlage (Template).**

### Beschreibung:

- Das Enzym wird aus einer rekombinanten Quelle gereinigt (dem einzigen tatsächlich auf das Myeloblastose-Vogelvirus zurückzuführenden Klon).
- Enthält RNA - und DNA-abhängige DNA Polymerase und RNase H Aktivität. RNase H ist spezifisch für DNA / RNA - Hybridmoleküle und greift einzelsträngige RNA-Moleküle nicht an.
- Die RNase H Aktivität kann über ein breites Temperaturspektrum geregelt werden.
- Exprimiert als ein sehr stabiles Polymer mit hoher Aktivität.
- Bemerkenswert robust in der cDNA Synthese und RT-PCR.
- Kann cDNA in einem breiten Temperaturrahmen synthetisieren.
- Ideal für den Gebrauch in RT-PCR, cDNA Bibliotheken, RAMP, NASBA und Didesoxy-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 20µl.
- 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.

### Qualitätskontrolle:

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.