



- [Start](#)
- [Wissen](#)
  - [Specials](#)
  - [Hintergrund](#)
  - [Rankings](#)
  - [Stichwort des Monats](#)
  - [Wirkstoff des Monats](#)
  - [Journalclub](#)
  - [Karriere](#)
  - [Firmenportraits](#)
  - [Online Artikel](#)
- [Methoden & mehr](#)
- [Stellen](#)
- [Meinung](#)
  - [Forscheressays](#)
  - [Schöne Biologie](#)
  - [Buchbesprechungen](#)
  - [Erlebnisse einer TA](#)
  - [Jungforscherin](#)
  - [Wissenschaftsnarr](#)
- [Termine](#)
  - [Vorträge](#)
  - [Kongresse](#)
  - [Schulungen](#)
- [Spaß](#)
  - [Lab Files](#)
  - [Forscher Ernst](#)
  - [Laborkatastrophen](#)
  - [Kennen Sie ihn/sie?](#)
  - [Lab Cooking](#)
- [Archiv](#)
  - [Online Artikel](#)
  - [ePaper](#)
  - [Ansichten eines Profs](#)
  - [Seltsame Lebewesen](#)
- [Service](#)
  - [Suche](#)
  - [Kontakt](#)
  - [Impressum](#)
  - [Abo](#)
  - [Shop](#)
  - [f+r internet agentur](#)
- [Mediadaten](#)

## Molekulare Transkriptoren Produktübersicht: cDNA-Synthese-Kits

[Alle Produkte im Überblick](#)



Noch basieren die meisten cDNA-Synthese-Kits auf Reversen Transkriptasen aus Retroviren. Das könnte sich aber bald ändern.



Reverse Trankriptasen, die so exakt arbeiten wie einst die Transkriptoren in mittelalterlichen Klöstern, gibt es leider nicht – Alternativen zu den sehr schlampigen Abschreibern aus Retroviren aber schon. Foto: Library of Congress

Würde man eine Rangliste der wichtigsten Enzyme aufstellen, die Biowissenschaftler bei ihrer täglichen Arbeit einsetzen, läge die Reverse Transkriptase (RT) mit Sicherheit auf einem der vordersten Plätze. Das 1970 von David Baltimore und Howard Martin Temin unabhängig voneinander im Rous-Sarkom-Virus beziehungsweise im Myoblastose-Virus von Affen entdeckte Enzym ist der Hauptbestandteil unzähliger cDNA-Synthese-Kits. Molekularbiologen verwenden diese wie geschnitten Brot, um RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben, die sie für verschiedene Standard-Techniken, etwa qPCR, Microarrays, RNA-Sequenzierung oder die cDNA-Klonierung benötigen.

cDNA-Synthese-Kits enthalten zumeist die Reverse Transkriptase des Affen-Myoblastom-Virus (AVM-RT) oder die des Maus-Leukämie-Virus (MMLV-RT). In der Regel füllen die Hersteller jedoch keine nativen Enzyme in die Reaktionsgefäße sondern rekombinante Varianten, die geringere Fehlerraten, niedrigere Temperaturoptima, reduzierte RNase H-Aktivitäten sowie höhere Kopiergeschwindigkeiten als die Wildformen aufweisen.

### Phantasieenzyme

So verbergen sich hinter Phantasienamen wie Superscript, Monsterscript, GoScript, Thermoscript, Affinityscript oder Rocketscript nichts anderes als aufgepeppte Versionen der MMLV-RT. Im Gegensatz zu den nativen Enzymen sind diese auch bei Temperaturen knapp über 50 °C aktiv und arbeiten wesentlich exakter. Einige rekombinante MMLV-RT erreichen inzwischen Fehlerraten von eins zu 60.000, sie bauen also im Schnitt erst im Abstand von etwa 60.000 Nukleotiden jeweils eine falsche Base ein. Bei den Wildtyp-RTs sieht es wesentlich finsterner aus. Die AVM-RT schlampt bereits nach jedem 1.500 Nukleotid. Etwas besser schneidet die MMLV-RT ab, deren Fehlerrate bei etwa einer Mutation pro 30.000 Basen liegt. Aber auch unter den kommerziellen, rekombinanten RTs finden sich Kandidaten, die es beim Kopieren nicht ganz so genau nehmen. Wer möglichst exakte cDNA-Kopien der isolierten RNA erhalten will, sollte sich deshalb die Fehlerraten der einzelnen Reversen Transkriptasen genauer anschauen.

Einfache Standard-cDNA-Synthese-Kits sind in der Regel für die Erststrang-cDNA-Synthese ausgelegt. Hierzu enthalten sie neben der RT und einem passenden Puffer, Zufalls-Hexamere sowie Oligo (dT)-Nukleotide, die als Primer für die RT dienen. Zufalls-Hexamere binden wahllos auf der extrahierten RNA, um die cDNA-Synthese zu initiieren, Oligo(dT)-Nukleotide hybridisieren dagegen mit den polyA-Schwänzen eukaryotischer mRNAs.

### Zurückgebogenes 3'-Ende

Etwas mehr Aufwand erfordert die Synthese des zweiten cDNA-Strangs. Bei der ältesten hierzu verwendeten Technik, der Hairpin-Primer-Synthese, nutzt man eine kurze Haarnadelschleife am 3'-Ende des cDNA-Strangs als Primer. Die Haarnadel entsteht durch die RNase H-Aktivität der eingesetzten AVM-RT. Diese baut die RNA-Vorlage parallel zur Neusynthese der cDNA bis zum 5'-Ende ab, wodurch sich das 3'-Ende des neusynthetisierten cDNA-Strangs in einer Schleife zurückbiegen und vorübergehend mit sich selbst hybridisieren kann. Die zugegebene DNA Polymerase I verwendet die Haarnadelschleife anschließend als Primer, um den zweiten cDNA-Strang herzustellen. Mit einer S1 Nuklease hydrolysiert man zu guter Letzt die Haarnadelschleife und erhält schließlich eine doppelsträngige cDNA. Diese Methode ist einfach durchzuführen, das Resultat ist aber ziemlich unberechenbar, da die Hybridisierung der zurückgebogenen Haarnadelschleife und damit der Startpunkt der cDNA-Zweitstrang-Synthese vom Zufall abhängt. Zudem opfert man bei der Hydrolyse der Haarnadel einen Teil der Sequenz.

Hiroto Okayama und Paul Berg von der Stanford University entwickelten deshalb Anfang der achtziger Jahre eine cDNA-Zweitstrang-Synthese ohne Hairpin-Primer, die kurze Zeit später von Ueli Gubler und Beth Hoffmann in den Laboren von Hoffman LaRoche in den USA weiter perfektioniert wurde. Auf diesem sogenannten Gubler-Hoffman-Verfahren basieren noch immer viele Zweitstrang-cDNA-Synthese-Kits. Okayama und Berg hatten die Idee, statt des Haarnadel-Primers eingekerbte (Nicked) RNA als Primer zu verwenden, die sie nach der Erststrang-Synthese durch E. coli-RNase H erzeugten. Ausgehend von den Nicked-RNA-Primern startet die zugesetzte DNA-Polymerase I die Synthese des zweiten cDNA-Strangs und entfernt gleichzeitig die RNA-Vorlage.

### Umständliche Klonierung

Die Klonierung der so erzeugten cDNA ist aber aufwendig und erfordert spezielle Plasmide als Klonierungsvektoren. Um dies zu vermeiden, kombinierten Gubler und Hoffman die Synthese des cDNA-Erststrangs über Oligo(dT)-Primer mit der Nick Translation des cDNA-Zweitstrangs durch Polymerase I. Im Gegensatz zu Okayama und Berg „verarzteten“ sie die noch verbliebenen Brüche in dem neusynthetisierten cDNA-Zweitstrang jedoch mit einer DNA-Ligase. Hierdurch erhielten sie eine durchgängig doppelsträngige cDNA, die sie in beliebige Vektoren klonieren konnten.

Eine weitere beliebte cDNA-Synthesemethode ist die von Alex Chenchik Ende der neunziger Jahre in den Laboren der Firma Clontech entwickelte SMART-PCR. Ausgangspunkt ist auch hier die Erststrang-Synthese mit einem modifizierten oligo(dT)-Primer. Dieser beherbergt neben den T's die Schnittstelle des Restriktionsenzym SfiIB, die als „Ankerplatz“ für die Primer im abschließenden PCR-Schritt dient. Als Reverse Transkriptase verwendet man eine MMLV-RT, die aufgrund ihrer Terminalen Transferase-Aktivität einige Cytosin-Basen an das 3'-Ende der synthetisierten cDNA anhängt. Chenchiks Trick bestand darin, dem Reaktionsansatz ein zweites Oligo zuzufügen, das ein SfiIB-Motif am 5'-Ende sowie eine kurze Serie von Ribo-Guaninen am 3'-Ende trägt. Das Guanin-Ende dieses SMART-Oligos hybridisiert mit den Cytosinen der neusynthetisierten cDNA und gestattet der MMLV-RT, die Vorlage zu wechseln (Template Switch). Die Reverse Transkriptase „hüpft“ von der ursprünglichen RNA-Template auf das SMART-Oligo und transkribiert dessen Sequenz, inklusive des SfiIB-Motifs, bis ans 5'-Ende weiter.

Der Rest ist dann nur noch Routine: Zunächst hydrolysiert man die RNA-Vorlage mit NaOH. Anschließend führt man mit Anker-Primern, die an die SfiIB-Sequenzen binden, eine Long-Distance-PCR durch, um schlussendlich doppelsträngige cDNA zu erhalten. Wer will, kann diese mit Hilfe der SfiIB-Schnittstelle ohne großen Aufwand in eine cDNA-Bibliothek klonieren.

An den hohen Fehlerraten und der langsamen Synthesegeschwindigkeit der aus Retroviren gewonnenen Reversen Transkriptasen ändern aber auch die ausgefeiltesten cDNA-Syntheseprotokolle wenig. Dazu wären Reverse Transkriptasen nötig, die von vorneherein genauer transkribieren. Und die gibt es tatsächlich in Form von Gruppe II Intron-Reversen Transkriptasen. Gruppe II Introns sind Retrotransposons, die

hauptsächlich in Bakterien, Pilzen und Pflanzen vorkommen. Sie bestehen aus einer Intron RNA mit autokatalytischer Ribozym-Aktivität und einer von der Intron-RNA kodierten Reversen Transkriptase. Gemeinsam bilden diese ein Ribonukleinprotein, das in den genannten Organismen für das sogenannte Retrohoming verantwortlich ist. Beim Retrohoming wird die Gruppe II Intron RNA mit Hilfe der Ribozym-Aktivität in einen DNA-Strang eingesetzt und anschließend von der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

Im Gegensatz zu Reversen Transkriptasen aus Retroviren, bei denen Kopierfehler zur Überlebensstrategie des Virus zählen, müssen Gruppe II Intron-Reverse Transkriptasen äußerst akkurat arbeiten, um eine möglichst exakte cDNA-Kopie des RNA-Introns herzustellen. Da sie darüber hinaus auch keine Probleme mit Sekundärstrukturen in der RNA-Vorlage haben, bei hohen Temperaturen von 80 °C aktiv sind und zudem keine RNase H-Aktivität aufweisen, sind sie eigentlich perfekte Kandidaten für cDNA-Synthese-Kits. Dazu müssten sie sich jedoch als funktionsfähige rekombinante Proteine in *E. coli* oder einem anderen Wirt exprimieren lassen – und das gelang lange Zeit gar nicht oder nur mit bescheidenem Erfolg.

Vor drei Jahren kam der RNA-Spezialist Alan Lambowitz von der University of Texas jedoch auf die Idee Gruppe II Intron-Reverse Transkriptasen am N-Terminus über einen „starr“ Linker mit dem als Löslichkeits-Tag fungierenden Protein MalE zu fusionieren, um sie so während der Expression in *E. coli* vor dem Verklumpen zu schützen (Mohr *et al.*, RNA 19: 958-970).

### Fusionsprotein mit starrem Linker

Da die fusionierten Reversen Transkriptasen (MalE-RT) von Lambowitz tatsächlich auch beim Retrohoming in dem Bakterium *Geobacillus stearothermophilus* funktionierten haken seine Mitarbeiter natürlich nach und untersuchten ihre Eignung für die cDNA-Synthese. Dazu führten sie zunächst Reverse Transkriptase-Assays mit den Fusionsproteinen sowie der kommerziellen MMLV-Reversen Transkriptase, Superscript III durch. Die Resultate dieser Experimente sprechen für sich: Die Fehlerrate der Fusionsproteine ist zwei bis viermal niedriger als bei Superscript III, die Aktivität dagegen bis zu sechsmal höher.

Ein ähnlich klares Ergebnis ergab auch die Analyse einer RNA-Seq-Bibliothek, bei der die Synthese des ersten cDNA-Strangs entweder mit der MalE-RT oder der Superscript III durchgeführt wurde. Im ersten Fall deckten die erhaltenen Reads alle zu erwartenden mRNA-Längen gleichmäßig ab, die MalE-RT hatte die mRNAs also weitgehend vom 3'-Ende bis zum 5'-Ende vollständig transkribiert. In der Superscript III-Bibliothek waren hingegen die 3'-Enden der mRNAs deutlich überrepräsentiert – was darauf hindeutet, dass Superscript III die Transkription immer wieder vorzeitig abgebrochen hatte.

### Wechsel der RNA-Vorlage

Das ist aber noch nicht alles: Gruppe II Intron-Reverse Transkriptasen verfügen auch über eine Template-Switch-Aktivität, mit der sie vom 3'-Ende der ersten RNA-Vorlage auf das 3'-Ende einer zweiten springen können. Ähnlich wie bei der SMART-Technik kann man so spezielle Adapter, Primer-Bindungsstellen oder Barcodes ohne zusätzliche Zwischenschritte an die cDNA-Enden anhängen.

Da Gruppe II Intron Reverse Transkriptasen andere Reaktionsbedingungen benötigen als Reverse Transkriptasen aus Retroviren, kann man sie in den cDNA-Synthese-Kits jedoch nicht einfach gegen diese austauschen. Ein erster RNA-Seq-Kit, der auf der Template Switching-Aktivität der Gruppe II Intron-Reverse Transkriptase basiert, ist aber bereits auf dem Markt.

[Alle Produkte im Überblick](#)



(Erstveröffentlichung: H. Zähringer, *Laborjournal* 06/2016, Stand: Mai 2016, alle Angaben ohne Gewähr)

## [Newsletter abonnieren](#)

[Impressum](#) | [Datenschutz](#) | [Haftungsausschluß](#)

© 1996-2020 Redaktionelle Inhalte: LJ-Verlag GmbH & Co. KG, Freiburg, Design und Programmierung: f+r internet agentur, Freiburg,  
Bilder und Grafiken - wenn nicht anders gekennzeichnet - bei den jeweiligen Autoren und Fotografen.