

cloned

Terminal Deoxynucleotidyl Transferase

Code No.2230A

Size: 300 units

Shipping at -20°C

Store at -20°C

Supplied: 5 × TdT Buffer 1 ml

Reagents: 0.1% BSA 1 ml

Lot No.

Concentration: units/ μl

Volume: μl

Expiry Date:

Description :

Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) does not need a template for its reaction, and catalyzes the incorporation of deoxynucleotides into the 3'-OH termini of single- or double-stranded DNA.¹ It requires an oligodeoxynucleotide of at least three bases as primer.

Storage Buffer:

60 mM	Potassium Phosphate, pH7.2
150 mM	KCl
1 mM	DTT
50%	Glycerol

Source :

E. coli carrying the plasmid which encodes the gene of terminal deoxynucleotidyl transferase

Properties :

- Molecular weight: 60,000
- Optimum pH: 7.2
- Cofactor: This product requires divalent ion of Mg^{2+} , Mn^{2+} or Co^{2+} .
- Substrate specificity

Nucleotide analogs (5-methyl-dCTP, 6-O-methyl-dGTP etc.) can be used as a substrate.

Dideoxythymidine triphosphate and cordycepin triphosphate become terminator.

Unit definition :

One unit is the amount of the enzyme that incorporates 1 nmol of [3H] dATP into acid-insoluble product in 1 hour at 37°C at pH7.2, with calf thymus DNA that is treated with DNase and heat-denatured (activated calf thymus DNA) as initiator.

Reaction mixture for unit definition:

100 mM	Sodium cacodylate, pH7.2
8 mM	MgCl_2
0.1 mM	DTT
0.024%	bovine serum albumin
160 $\mu\text{g/ml}$	activated calf thymus DNA
0.5 mM	[^3H] dATP

Purity :

Nuclease activity is not detected in either of the following cases, as judged from the agarose gel electrophoresis pattern:

1. After incubation of 1 μg of λ DNA-*Hind* III fragments with 15 units of this enzyme for 16 hours at 37°C .
2. After incubation of 1 μg of supercoiled pBR322 DNA with 15 units of this enzyme for 16 hours at 37°C .
3. After incubation of 1 μg of 16s, 23s-rRNA with 15 units of this enzyme for 5 hours at 37°C .

Applications:

- Tailing reactions to add complementary homopolymer tails to vectors and cDNA, such as in the Okayama-Berg method.³
- Labelling the 3'-ends of DNA fragments using dNTP or ddNTP.

Composition of Supplied Reagents (Store at -20°C):

1. 5X TdT Buffer
500 mM HEPES, pH7.2
40 mM MgCl_2
0.5 mM DTT
2. 0.1% BSA

The supplied buffer has the different composition from that used for unit definition. The supplied buffer has the general composition to be applicable to addition of deoxynucleotide to 3'-OH terminus of DNA.

Application example:

Homopolymeric tailing with dGTP

1. Prepare the following reaction mixture.

DNA	4 - 5 pmol (3'-termini)
5X TdT Buffer	10 μl
0.1% BSA	5 μl
dGTP	0.05-0.5 mM (final)
TdT	10 - 15 U
Sterilized distilled water	
Total	50 μl

2. Incubate the mixture at 37°C for 30 min
3. Add 5 μl of 5 M NaCl and 1 μl of 0.5 M EDTA (pH8.0).
4. Extract DNA with 50 μl of phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) and precipitate DNA with chilled ethanol.

Note :

The reaction is affected by the kinds of bases added (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), the kinds of divalent cations in the buffer (Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+}), and the terminal structure of DNA (3'-protruding -OH end, blunt end, 3'-recessed -OH end).²⁾ Thus, it is necessary to find the optimum conditions for each reaction.

The optimal molar ratio of dNTPs and DNA when there are 15-40 nucleotides is 20:1 with 3'-protruding -OH ends, and 100:1 with 3'-recessed -OH ends.

References:

- 1) Bollum, F.J. (1974) in *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.), **10**, 145-171
- 2) Deng, G. and Wu, R. (1983) *Methods in Enzymology*, **100**, 96-116.
- 3) Okayama, H. and Berg, P. (1982) *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 161-170.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from TAKARA BIO INC. If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 543 7247 or from our website at www.takara-bio.com.

cloned

Terminal Deoxynucleotidyl Transferase

Code No.2230A

Size: 300 units

Shipping at -20°C

Store at -20°C

Supplied: 5 × TdT Buffer 1 ml

Reagents: 0.1% BSA 1 ml

Lot No.

濃度: (英文面をご覧ください。)

容量: (英文面をご覧ください。)

品質保証期限: (英文面をご覧ください。)

● 製品説明

Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) は反応に鋳型を必要とせず、一本鎖または二本鎖 DNA の 3'-OH 末端にデオキシヌクレオチドを重合する反応を触媒する¹⁾。プライマーとなるには最低3塩基以上のオリゴデオキシヌクレオチドが必要である。

● 形状

60 mM	リン酸カリウム, pH7.2
150 mM	KCl
1 mM	DTT
50%	グリセロール

● 起源

E. coli carrying the plasmid which encodes the gene of terminal deoxynucleotidyl transferase

● 一般的性質

分子量	60,000
至適 pH	pH7.2
補因子	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ 等の二価イオンのうちいずれかを要求する。
その他	ヌクレオチドアナログ (5-methyl-dCTP, 6-O-methyl-dGTP 等) も基質となり得る。ジデオキシチミジン3リン酸やコルディセピン3リン酸はターミネーターとなる。

● 活性の定義

DNase 処理後、熱変性仔牛胸腺 DNA (活性化仔牛胸腺 DNA) をインシエーターとして用い、37°C、pH7.2 において1時間に1 nmol の [³H] dATP を酸不溶性沈殿物に取り込む酵素活性を1Uとする。

● 活性測定用反応液組成

100 mM	カコシル酸ナトリウム, pH7.2
8 mM	MgCl ₂
0.1 mM	DTT
0.024%	ウシ血清アルブミン
160 μg/ml	活性化仔牛胸腺 DNA
0.5 mM	[³ H] dATP

● 純度

- 15 U の本酵素と、1 μg の λ DNA-Hind III 分解物とを 37°C、16 時間反応させても、DNA の電気泳動パターンに変化はおこらない。
- 15 U の本酵素と、1 μg の supercoiled circular (RFI) pBR322 DNA を 37°C、16 時間反応させても、DNA の電気泳動パターンに変化はおこらない。
- 15 U の本酵素と、1 μg の 16S および 23S rRNA とを 37°C、5 時間反応させても、RNA の電気泳動パターンに変化は起こらない。

● 用途

- Okayama-Berg 法によるベクター cDNA に相補的なホモポリマーの付加³⁾
- dNTP または ddNTP による DNA の 3' 末端標識

● 添付試薬組成 (保存: -20°C)

- 5 × TdT Buffer
500 mM HEPES, pH7.2
40 mM MgCl₂
0.5 mM DTT

- 0.1% BSA (別添)

添付バッファの組成は活性測定系とは異なりますが、DNA の 3' 末端への塩基の付加反応に一般的な組成となっています。

● 使用例 (dGTP を用いたホモポリマーの Tailing 反応)

- 次の反応液を調製する。

DNA	4 ~ 5 pmol (3' 末端)
5 × TdT Buffer	10 μl
0.1% BSA	5 μl
dGTP	0.05 ~ 0.5 mM (final)
TdT	10 ~ 15 U
滅菌蒸留水	
Total	50 μl

- 37°C、30 min. インキュベートする。
- 5 μl の 5 M NaCl、1 μl の 0.5 M EDTA (pH8.0) を加える。
- フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) 50 μl で抽出し、エタノール沈殿させる。

● 使用上の注意

TdT は Okayama-Berg 法をはじめとして、ベクターと cDNA に相補的なホモポリマーを付加する反応に広く用いられている²⁾。この場合の反応条件は、付加する塩基の種類 (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)、バッファ中の二価イオンの種類 (Mn²⁺, Co²⁺, Mg²⁺)、および付加される DNA の末端構造 (突出 3'-OH 末端、平滑末端、陥没 3'-OH 末端) 等に影響され、状況に応じた最適条件を見つけることが必要である。

また、15 ~ 40 base のヌクレオチドを付加する最適条件は、突出 3'-OH 末端の場合 dNTP と DNA のモル比が 20 : 1、陥没 3'-OH 末端の場合、100 : 1 である。

● 参考文献

- Bollum, F.J. (1974) in *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.), **10**, 145-171
- Deng, G. and Wu, R. (1983) *Methods in Enzymology*, **100**, 96-116.
- Okayama, H. and Berg, P. (1982) *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 161-170.

● 注意

本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないでください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。

v201011Da

製品についての
技術的なお問い合わせ先

TaKaRa テクニカルサポートライン

Tel 077-543-6116
Fax 077-543-1977