

T4 DNA Polymerase

Code No. 2040A **Size:** **100 U**
Conc.: **5 U/ μ l**

Supplied Reagents:

10X T4 DNA Polymerase Buffer **1 ml**
0.1% BSA **1 ml**

Description:

T4 DNA polymerase, which requires template DNA and primer, selectively catalyzes the transfer of complementary dNTPs of the template to the 3'-OH terminus of the primer. This enzyme has 3' → 5' exonucleolytic activity specific for single-stranded DNA 10²- 10³- fold stronger than that of Klenow Fragment, but it does not have 5' → 3' exonuclease activity.

Storage Buffer:

200 mM	Potassium Phosphate, pH 6.5
1 mM	DTT
50%	Glycerol

Storage: -20°C

Source:

Escherichia coli carrying the plasmid containing phage T4 DNA polymerase gene.

Unit definition:

One unit is the amount of the enzyme catalyzing the incorporation of 10 nmol of total nucleotides into acid-insoluble products in 30 min at 37°C and pH 8.8, with activated poly(dA-dT) as the template-primer.

Reaction mixture for unit definition:

67 mM	Tris-HCl, pH 8.8
6.7 mM	MgCl ₂
16.6 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
1 mM	DTT
6.7 μ M	EDTA
0.0167%	bovine serum albumin
7 μ g/ml	activated poly(dA-dT)
330 μ M each	dATP, dTTP
8 μ Ci/ml	[³ H]dTTP

Quality Control Data:

Please see the Certificate of Analysis (CoA) for each lot. You can download the CoA on Takara Bio website.

Applications:

1. Making the termini of DNA fragments blunt-ended.⁴⁾
2. Labeling from the 3'-termini of DNA fragments by replacement synthesis with the use of its strong 3' → 5' exonuclease activity.³⁾
3. Analysis of the starting point of transcription of mRNA by the primer extension method.⁵⁾

Note:

The optimum pH is 8 - 9; at pH 7.5 and 9.7, the activity decreases by 50% . The enzyme requires Mg²⁺ and SH reagents for maximum activity.¹⁾ The enzyme is inhibited when the total ionic strength of the reaction mixture exceeds 100 mM.²⁾ This enzyme tends to be affected by the steric structure of the template DNA, such as in having its polymerase activity activated by the T4 protein coded by gene 32, at which time the 3' → 5' exonuclease activity is completely inhibited.

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

1. 10X T4 DNA Polymerase Buffer
330 mM Tris-acetate, pH 7.9
660 mM Potassium acetate
100 mM Magnesium acetate
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 blunting of the end of double-stranded DNA. White precipitate may be generated when adding 0.1% BSA directly to the supplied buffer. Prepare the reaction mixture (final conc. 0.01% BSA) by adding the reagents in the order given below.
Sterile purified water → supplied buffer → 0.1% BSA → substrate DNA

Application example:

Blunting the termini of DNA fragments

1. Prepare the reaction mixture by combining the followings in a microcentrifuge tube to the total volume of 9 μ l.

Insert DNA with protruding end	> 0.1 pmol
10X T4 DNA Polymerase Buffer	1 μ l
0.1% BSA	1 μ l
1.7 mM dNTP Mixture	1 μ l
Sterile purified water	up to 9 μ l
2. To avoid annealing of the termini of DNA, heat at 70°C for 5 min and place at the 37°C incubation bath.
3. Add 1 μ l of T4 DNA Polymerase (1 U/ μ l : dilute with 1X supplied buffer etc.) and mix gently by pipetting. Avoid vigorous mixing with Vortex mixer.
4. Incubate at 37°C for 5 min.
5. Mix vigorously with a Vortex mixer to inactivate the enzyme. (Almost no enzyme activity remains after Vortex mixing. Place on ice to ensure the inactivation of T4 DNA polymerase and immediately perform the next ligation. If you wish to stop the reaction before ligation, the mixture may be stored at -20°C following phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation.)

References:

- 1) Lehman I R. *Methods in Enzymology*. (1974) **29**: 46-53.
- 2) Goulian M, Lucas Z J, and Kornberg A. *J Biol Chem*. (1968) **243**: 627-638.
- 3) Deen K C, Landers T A, and Berninger M. *Anal Biochem*. (1983) **135**: 456-465.
- 4) Wartell R M, and Reznikoff W S. *Gene*. (1980) **9**: 307-319.
- 5) Hu M C T and Davidson N. *Gene*. (1986) **42**: 21-29.

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 77 565 6972 or from our website at www.takarabio.com. Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements. All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

T4 DNA Polymerase

Code No. 2040A 容量： 100 U
濃度： 5 U/ μ l

添付試薬：

10 × T4 DNA Polymerase Buffer 1 ml
0.1% BSA 1 ml

● 製品説明

T4 DNA Polymerase は、鋳型 DNA およびプライマーを必要とし、鋳型に相補的なデオキシヌクレオチドをプライマーの 3'-OH 末端に順次選択的に付加する反応を触媒する酵素である。本酵素には、Klenow Fragment に比べて約 100 ~ 1,000 倍強い一本鎖 DNA 特異的 3' → 5' exonuclease 活性が含まれているが、5' → 3' exonuclease 活性は持たない。

● 形状

200 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.5)
1 mM DTT
50% グリセロール

● 保存

- 20°C

● 起源

Escherichia coli carrying the plasmid containing phage T4 DNA polymerase gene.

● 活性の定義

活性化ポリ (dA-dT) を鋳型/プライマーとして用い、37°C、pH8.8 において、30 分間に 10 nmol の全ヌクレオチドを酸不溶性沈殿物に取り込む酵素活性を 1 U とする。

● 活性測定用反応液組成

67 mM Tris-HCl (pH8.8)
6.7 mM MgCl₂
16.6 mM (NH₄)₂SO₄
1 mM DTT
6.7 μ M EDTA
0.0167% ウシ血清アルブミン
7 μ g/ml 活性化ポリ (dA-dT)
各 330 μ M dATP, dTTP
8 μ Ci/ml [³H]dTTP

● 品質管理データ

性能試験結果については、各ロットの Certificate of Analysis (CoA) をご覧ください。CoA はタカラバイオウェブサイトからダウンロードできます。

● 用途

1. DNA フラグメントの末端の平滑化。⁴⁾
2. 強力な 3' → 5' exonuclease 活性を利用した、replacement synthesis による DNA フラグメントの 3' 末端からの標識。³⁾
3. プライマー伸長法による mRNA の転写開始点の解析。⁵⁾

● 使用上の注意

本酵素の至適 pH は 8 ~ 9 で、pH7.5 および pH9.7 では 50% の活性となる。活性の発現に Mg²⁺ を要求し、最大活性のためには SH 還元剤を要求する。¹⁾ 反応系全体のイオン強度が 100 mM を超えると阻害される。²⁾ 本酵素は鋳型 DNA の高次構造の影響をうけやすく、T4 gene 32 産物により polymerase 活性は顕著に活性化されるが、3' → 5' exonuclease 活性は完全に阻害される。

● 添付試薬組成 (保存：- 20°C)

1. 10 × T4 DNA Polymerase Buffer
330 mM Tris-acetate (pH7.9)
660 mM 酢酸カリウム
100 mM 酢酸マグネシウム
5 mM DTT

2. 0.1% BSA

このバッファー系は、二本鎖 DNA の末端平滑化を行う実験でより一般的な組成となっており、活性測定系とは異なっている。

本 10 × Buffer に 0.1% ウシ血清アルブミン溶液を直接加えると多量の白沈が生じるので、反応液 (final conc. 0.01% BSA) を調製する際は次の順番で試薬を加える。

滅菌精製水 → 10 × 添付 Buffer → 0.1% BSA → 基質 DNA

● 使用例 末端平滑化

1. マイクロ遠心チューブ内で以下の反応液を調製し、全量を 9 μ l にする。

突出末端インサート DNA	> 0.1 pmol
10 × T4 DNA Polymerase Buffer	1 μ l
0.1% BSA	1 μ l
1.7 mM dNTP Mixture	1 μ l
滅菌精製水	up to 9 μ l

2. DNA の末端のアニーリングを防ぐため、70°C で 5 分間保温した後、37°C の恒温槽に移す。
3. T4 DNA Polymerase (1 U/ μ l : 1 × 添付バッファー等で希釈) を 1 μ l 加え、ピペティングにより穏やかに混和する (この時、ボルテックス等による激しい攪拌は避ける)。
4. 37°C で 5 分間保温する。
5. ボルテックス等で激しく攪拌して酵素を失活させる (ボルテックスによる攪拌で酵素はほとんど失活するが、過剰の反応を避けるために氷水下に置き、すぐ次のライゲーション反応を行う。すぐ次の操作に移らない場合は、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿してから - 20°C で保存する)。

● 参考文献

- 1) Lehman I R. *Methods in Enzymology*. (1974) **29**: 46-53.
- 2) Goulian M, Lucas Z J, and Kornberg A. *J Biol Chem*. (1968) **243**: 627-638.
- 3) Deen K C, Landers T A, and Berninger M. *Anal Biochem*. (1983) **135**: 456-465.
- 4) Wartell R M, and Reznikoff W S. *Gene*. (1980) **9**: 307-319.
- 5) Hu M C T and Davidson N. *Gene*. (1986) **42**: 21-29.

● 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ようご注意ください。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。ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。本データシートに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。