کاربردهای آنزیم ترمینال دئوکسی نوکلئوتیدیل ترانسفراز (TdT)

رحمان امام زاده* و مائده کولانی

ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۱۳

چکیده

آنزیم ترمینال دئوکسی نوکلئوتیدیل ترانسفراز (TdT)، یک DNAپلیمراز از خانواده pol X است که برخلاف دیگر نوکلئوتیدیل ترانسفرازها، بدون نیاز به رشته الگو نوکلئوتیدهای طبیعی و غیرطبیعی را به انتهای ′۳ هیدروکسی DNA تک‌رشته‌ای، دورشته‌ای یا RNA متصل می‌کند. این ویژگی منحصربه‌فرد کاربرد گسترده‌ای در ساخت حسگرهای زیستی دارد. TdT همانند سایر پلیمرازها برای انتقال فسفریل به یون‌های فلزی نیاز داشته و می‌تواند از یون‌هایی Co^{2+}، Mn^{2+}، Zn^{2+}، Mg^{2+} استفاده کند. اهمیت این آنزیم ناشی از کاربردهای وسیع آن در زیست‌پزشکی و زیست‌فناوری است. در زیست‌پزشکی به عنوان نشانگر زیستی در تشخیص و طبقه‌بندی بدخیمی‌های خونی، به‌ویژه لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) و در سنجش TUNEL برای شناسایی آپوپتوز استفاده می‌شود. در زیست‌فناوری، TdT ابزاری کلیدی در برچسب‌گذاریDNA، توسعه آپتامر، سنتز آنزیمی الیگونوکلئوتیدها، طراحی پلی‌نوکلئوتیدها، ساخت نانوساختارهای DNA و توسعه حسگرهای زیستی حساس برای تشخیص پاتوژن‌ها است. نوآوری‌های اخیر نشان‌دهنده استفاده از آن در ذخیره‌سازی داده مبتنی بر DNA و سامانه‌های ترکیبی مانند TdT-CRISPR و نانوذرات عملکردی است. این مطالعه به بررسی خواص بیوشیمیایی، نقش فیزیولوژیکی، کاربردهای تشخیصی و زیست‌فناوری TdT پرداخته و پیشرفت‌های اخیر در مهندسی آنزیم و چشم‌اندازهای آینده را تحلیل می‌کند.

واژگان کلیدی: ترمینال دئوکسی نوکلئوتیدیل ترانسفراز، زیست‌پزشکی، زیست‌فناوری، تشخیص سرطان، نانوفناوریDNA

*نویسنده مسئول، پست الکترونیکیr.emamzadeh@sci.ui.ac.ir

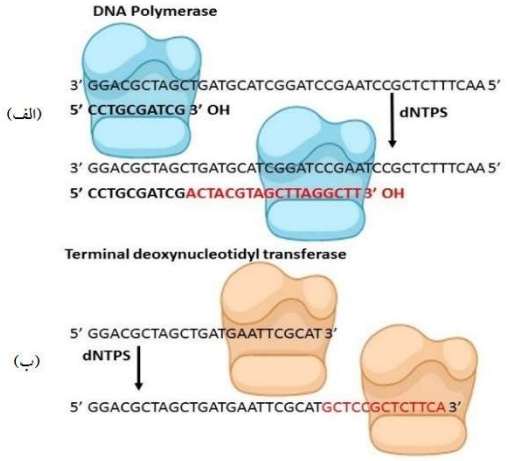
مقدمه

ترمینال دئوکسی نوکلئوتیدیل ترانسفراز (TdT)(Terminal deoxynucleotidyl transferase) با کد آنزیمی EC: 2.7.7.31 یک DNAپلیمراز است که برای اولین بار توسط تیم تحقیقاتی بولوم و پاتر در سال ۱۹۶۰ از غدد تیموس خالص‌سازی شد (۱).

TdT متعلق به خانواده پلیمرازX pol، یک زیرکلاس از ابرخانواده نوکلئوتیدیل ترانسفراز (NT)(Nucleotidyl Transferase (NT) family) است که عمدتا در ترمیم DNA به جای همانندسازی نقش دارند. در این خانواده، pol β، pol λ و pol μ نیز گنجانده شده است (۲). این آنزیم با pol β ٪۲۲ و با pol μ ٪۴۲ توالی همولوگ دارد. با این حال، در خانواده نوکلئوتیدیل ترانسفرازها، تنها TdT می‌تواند اتصال نوکلئوتیدهای طبیعی و غیرطبیعی را به انتهای ′۳-OH، DNA تک‌رشته‌ای،DNA دورشته‌ای و یا RNA، بدون نیاز به رشته‌ی الگو در حضور کوفاکتورهای کاتیونی دوظرفیتی و دئوکسی‌نوکلئوزید تری‌فسفات‌ها (dNTPs) کاتالیز کند (شکل ۱) (۳). این موضوع عمدتا به این دلیل است که TdT حاوی یک ساختار حلقه‌ای می‌باشد که مانع اتصال DNA دورشته‌ای می‌شود. این مزیت منحصر به فرد به طور گسترده‌ای در ساخت حسگرهای زیستی استفاده می‌شود (۴).

TdT مانند تمام پلیمرازها به حضور یک یون فلزی برای

کاتالیز واکنش انتقال فسفریل نیاز دارد. این آنزیم می‌تواند از بسیاری یون‌های فلزی مختلف مانند Co^{2+}، Mn^{2+}، Zn^{2+}، Mg^{2+}استفاده کند (۵). یون‌های فلزی دوظرفیتی به‌طور قابل توجهی بر فعالیت آنزیمی تأثیر می‌گذارند و اثرات متفاوتی بر میل ترکیبی TdT برای آغازگرها و dNTPها دارند (۶).



شکل ۱– مدل‌های ساده شده برای فعالیت DNA پلیمراز وابسته به الگو و مستقل از الگو (الف) بیشترDNAپلیمرازها به DNA دورشته-ای به عنوان سوبسترا نیاز دارند، که در آن رشته '۵→'۳ به‌عنوان آغازگر و رشته مکمل '۳→'۵ به‌عنوان الگو استفاده می‌شود. (ب) ترمینال دئوکسی نوکلئوتیدیل ترانسفراز در توانایی خود برای کاتالیز انتقال فسفوریل در غیاب الگویی که نمی‌تواند در جایگاه فعال آنزیم قرار گیرد منحصر به فرد است.

درحوزه پزشکی، TdT یک نشانگر زیستی مهم برای برخی بدخیمی‌های خونی، به‌ویژه لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Acute lymphoblastic leukemia)(ALL)، و ابزاری برای تشخیص آپوپتوز در سنجش TUNEL است (۷). در زیست‌فناوری، از TdT برای برچسب‌گذاریDNA، توسعه آپتامر، مونتاژ ژن، ساخت نانوساختارهایDNA و سامانه‌های ذخیره‌سازی داده استفاده می‌شود. همچنین نقش مهمی در سنتز الیگونوکلئوتیدهای سفارشی برای درمان‌های نوین، ازجمله آنتی‌سنس و RNAi (RNA Interference)، دارد. توانایی TdT درافزودن نوکلئوتیدهای منفرد یا ایجاد جفت‌بازها با واسطه فلز،آن را به ابزاری ارزشمند برای زیست‌فناوری پیشرفته و نسل جدید فناوری‌های توالی‌یابی تبدیل کرده‌است(۸). با این وجود، چالش‌هایی همچون بهینه‌سازی کارایی، پایداری واختصاصیت سوبسترا باقی است.

این مقاله با بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی، مکانیسم عملکردی و ساختاری TdT آغاز می‌شود و به کاربردهای آن در تشخیص، درمان و زیست‌فناوری می‌پردازد. همچنین نوآوری‌های اخیر، ازجمله ادغام آن در سامانه‌های حسگرزیستی و فناوری‌های ذخیره‌سازیDNA، و چشم‌اندازهای آینده آن در مهندسی مولکولی پیشرفته مورد بحث قرار می‌گیرد.

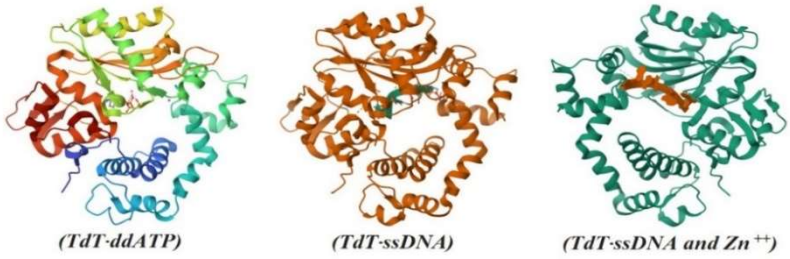
ساختار آنزیم TdT

ساختار کریستالی مرکز کاتالیزوری TdT موش، برای اولین بار در سال ۲۰۰۲، بیش از ۴۰ سال پس از کشف TdT شناسایی شد و نشان داد که TdT یک DNAپلیمراز معمولی β مانند است که به شکل دست بسته قفل شده است (شکل ۲). همچنین این آنزیم دو کمپلکس دوتایی را با توالی آغازگر و نوکلئوتید ورودی تشکیل می‌دهد(۹). اکثر DNAپلیمرازها حاوی زیردامنه‌های حفظ‌شده انگشت، کف دست و انگشت شست هستند که به ترتیب برای تشخیص/اتصال نوکلئوتید، فعالیت کاتالیزوری پلیمراز و اتصال به سوبسترای DNA حیاتی می‌باشند (۱۰).

وجود یک حلقه بلند کمندمانند (lariat)(لوپ۱) در نزدیکی دامنه C–terminal مانع از پذیرش رشته الگو در جایگاه فعال آنزیم می‌شود و به آن امکان می‌دهد بدون الگو، نوکلئوتیدهای تصادفی را به انتهای '۳ رشته پرایمر اضافه کند. این حلقه در DNA پلیمراز β وجود ندارد که به آن اجازه می‌دهد به رشته الگو متصل شود (۱۱).

جایگاه فعال TdT نسبتاً وسیع است و محدودیتی بر روی بخش قند نوکلئوتید ورودی اعمال نمی‌کند. این باعث می-شود که با هر دو قند ریبوز و دی‌اکسی ریبوز به راحتی وارد واکنش شوند (۱۱).

مطالعه کمپلکس آغازگر–TdT نشان می‌دهد که چهار نوکلئوتید آخر در انتهای '۳-OH بدون در نظر گرفتن ماهیت باز با پلیمراز برهمکنش می‌کنند. در محل کاتالیزوری، یون‌های فلزی با اسیدهای‌آمینه آسپارتات حفظ شده و dNTP ورودی هماهنگ می‌شوند و آلفافسفات خود را برای حمله نوکلئوفیلی قرار می‌دهند. عدم وجود برهمکنش‌های خاص بازهای نوکلئوتیدی با TdT، عدم اختصاصیت نسبت به افزودن dNTP را توضیح می‌دهد (۱۲).



شکل۲- ساختار کمپلکس سه‌تایی با استفاده از ساختارهای کریستالی دوتایی موجود از TdTموش، به‌ویژه کدهای شناسایی PDB 1KEJ (TdT·ddATP)، 1KDH (TdT·ssDNA) و 4I28 (TdT·ssDNA and Zn^{2+}).

براساس ساختار کریستالی آنزیم ترمینال دئوکسی نوکلئوتیدیل ترانسفراز (TdT) اسیدهای‌آمینه کلیدی در جایگاه فعال این آنزیم عبارتند از سه آسپارتیک‌اسید محافظت شده (Asp343, Asp345, Asp347) که در دامنه مرکزی پروتئین قرار دارند و نقش کاتالیتیکی دارند. آرژینین ۳۳۶ که به اکسیژن کربونیل گلیسین ۴۵۲ متصل شده و کمک می‌کند تا پیوند سیس (Cis) بین گلیسین ۴۵۲ و سرین ۴۵۳ حفظ شود. این دو اسیدآمینه در محل اتصال نوکلئوتید ورودی قرار دارند (۱۳).

کاربردهای آنزیم TdT

استفاده از این آنزیم به عنوان یک ابزار زیست فناوری و زیست‌پزشکی در حال گسترش است و انتظار می‌رود که در آینده کاربردهای بیشتری پیدا کند. این آنزیم به دلیل ویژگی منحصر به فرد خود در کاتالیز قالب مستقل نوکلئوتیدها بر روی زنجیره الیگونوکلئوتید به ابزاری کلیدی در زمینه‌های مختلفی از جمله زیست‌شناسی مولکولی، نانوفناوری، ذخیره سازی داده‌ها و زیست-حسگرها تبدیل شده است.

هدف درمانی در سرطان

شواهد بالینی نشان دهنده تغییر در فعالیت یا بیان TdT در شروع، پیشرفت سرطان و پاسخ به شیمی‌درمانی می‌باشد. TdT در لوسمی‌های لنفوسیتی حاد سلول‌های B و T (ALL) و لوسمی‌های میلوسیتیک حاد (AML)(Acute Myeloid Leukemia) بیش‌ازحد بیان می‌شود (۱۶). حدود ٪۹۰ بیماران ALL و ٪۲۰ بیماران AML بیان TdT را نشان می‌دهند که بیشتر از لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL)(Chronic Lymphocytic Leukaemia) است (۱۶،۱۷). فعالیت بالای TdT با پیش‌آگهی ضعیف، پاسخ نامطلوب به شیمی‌درمانی و بقای کمتر مرتبط بوده و میزان بهبودی بیماران TdT مثبت نصف بیماران TdT منفی است (۱۸). این موضوع موجب تلاش برای توسعه مهارکننده‌های انتخابی TdTبه‌عنوان داروی ضدلوسمی شده‌است. کوردیسپین (Cordycepin) (۳′-دئوکسی‌آدنوزین) همراه با دئوکسی‌کوفورمایسین (Deoxycoformycin)، مهارکننده آدنوزین‌دآمیناز، علیه لوسمی‌های TdT مثبت سیتوتوکسیک است (۱۹،۲۰). اثر آن ناشی از مهار سنتز DNA تک‌رشته‌ای توسط TdT، توقف گسترش پرایمر و القای آپوپتوز است، اما به دلیل عوارض جانبی ناشی از مهار آنزیم‌های متابولیسم نوکلئوزیدها به‌طور گسترده در شیمی‌درمانی کاربرد ندارد (۲۰). بنابراین، مهارکننده‌های غیربازمانند انتخابی توسعه یافته‌اند. ازجمله، آریل - دی‌کتوهگزنوئیک‌اسیدها(Aryl-diketohexanoic acids) فعالیت TdT و pol λ را بدون عمل به‌عنوان ترمیناتور مهار کرده‌اند و آنالوگ RDS 2119 سمیت سلولی بالاتری علیه رده لوسمی TdT مثبت (Molt4) نسبت به رده HeLa نشان داده‌است (۲۱).

ابزار بیوشیمیایی چندمنظوره

TdT قادر است از طیف وسیعی از آنالوگ‌های نوکلئوتیدی مانند ′۳،′۲- دی دئوکسی نوکلئوتیدها (۲۲)،p- نیتروفنیل‌اتیل‌تری‌فسفات (۲۳)،p-نیتروفنیل‌تری‌فسفات (۲۳)، ′۲-دئوکسی-ال-ریبونوکلئوزید ′۵-تری‌فسفات‌ها (۲۴) و دی‌نوکلئوزید ′۵،′۵-تترافسفات‌ها (۲۵) استفاده کند. این توانایی برای تحمل تغییرات در نوکلئوباز، اساس روش‌های برچسب‌گذاری درون‌تنی وآزمایشگاهی شکستگی‌های DNA دورشته‌ای است. سنجش TUNEL

(TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling) برپایه افزودن dUMP بیوتینیله توسط TdT به انتهای ۳′ DNA تک‌رشته‌ای در محل شکست DNA انجام می‌شود. این dUMP بیوتینیله با آویدین (Avidin) یا استرپتاویدین (Streptavidin) فلورسنت‌دار آشکارسازی شده و امکان اندازه‌گیری کمی و مکانی شکست‌های DNA را فراهم می‌سازد (۲۶). علاوه‌براین، TdT به‌عنوان بیوکاتالیست برای برچسب‌گذاری انتهای۳′ الیگونوکلئوتیدهای سنتزی با نوکلئوتید رادیواکتیو یا پروب‌های فلورسنت کاربرد دارد (۲۷). پرایمرهای نشاندار شده می‌توانند به رشته مکمل آنیل شده و به عنوان سوبستراهای رادیواکتیو جهت پایش فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسم اسیدنوکلئیک مانند اندونوکلئازهای محدودکننده، DNAگلیکوزیلازها و DNAپلیمرازهای وابسته به الگو مورد استفاده قرارگیرند.

تثبیت DNA و سنجش TUNEL

خواص ذاتی TdT امکان توسعه روش‌های ساده برای تثبیت اسیدهای‌نوکلئیک روی بسترهای جامد را فراهم کرده‌است. این روش‌ها عمدتاً برپایه دنباله‌دار کردن انتهای۳′ پرایمرها با نوکلئوتیدهای بیوتینیله مانند biotin-16-dUTP است و پس از افزودن چند نوکلئوتید، قطعات ssDNA یا dsDNA اصلاح شده روی بسترهای پوشش داده‌شده با استرپتاویدین یا از طریق رسوب ایمنی با آنتی‌بادی ضدبیوتین شناسایی می‌شوند (۲۸). چنین رویکردی منجر به توسعه سنجش TUNEL برای تشخیص شکستگی‌های DNA در آپوپتوز شده‌است. درطی آپوپتوز، DNA به واحدهای نوکلئوزومی تقسیم و گروه‌های ۳′-هیدروکسیل آزاد ایجاد می‌شود که TdT آن‌ها را با نوکلئوتیدهای اصلاح شده، عمدتاً dUTP، پر کرده و قطعات حاصل توسط فلوسیتومتری، میکروسکوپ فلورسانس یا روش‌های آنزیمی شناسایی می‌شوند (۲۹،۳۰). علاوه‌براین، TdT می‌تواند بیوتین و فلوروفورها را به انتهای۳′ الیگونوکلئوتیدهای ssDNA اضافه کند؛ به‌طورنمونه، واکنش‌های CuAAC (Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition) به‌عنوان روشی دومرحله‌ای برای اتصال بیوتین به این الیگونوکلئوتیدها معرفی شده‌است (۳۱). همچنین، استفاده از dImTP به‌عنوان سوبسترا در واکنش‌های هموپلیمری با واسطه TdT باعث تثبیت اسیدهای‌نوکلئیک روی بسترهای جامد، بدون اختلال در فعالیت آپتامرها و DNAzymeها می‌شود. این روش‌ها کاربرد گسترده‌ای در تحقیقات مولکولی و توسعه ابزارهای تشخیصی دارند (۳۲،۳۳).

گروه‌های گزارشگر و مقاومت نوکلئازی

برچسب‌گذاری فلورسنت الیگونوکلئوتیدها برای توسعه پلتفرم‌های حسگرزیستی مانند ریزآرایه‌هایDNA اهمیت زیادی دارد (۳۴). این فرآیند به دلیل وابستگی سیگنال فلورسنت به گروه ۳′–OH و نوع dNTP استفاده شده، پیچیده است و برای رفع مشکل از ddNTPs یا ریبونوکلئوتیدها بهره‌گرفته می‌شود (۳۵). مطالعات نشان داده‌اند که TdT آنالوگ‌های نوکلئوتیدی مختلف را می‌پذیرد؛ مثلاً Cy5-UTP تنها درصورت وجود dG در انتهای۳′ پرایمر با کاهش بازدهی برچسب‌گذاری مواجه می‌شود (۳۶). ترکیب نوکلئوتیدهای طبیعی و اصلاح شده نیز در برچسب‌گذاری فلورسنت برای شناسایی هیبریداسیون DNA در تراشه‌ها استفاده شده‌است (۳۷). علاوه‌براین، برچسب‌گذاری رشته‌های اصلی با ddN*TPs و TdT برای ساخت اوریگامی‌های عامل‌دار گزارش شده‌است که در آن رشته‌ها با biotin، digoxigenin یا Texas Redاصلاح می‌شوند (۳۸).

نوکلئوتیدهای مجهز به جایگزین‌های فلورسنت سنتزی، مانند پیرن (pyrene)، نیز سوبسترای مناسبی برای TdT هستند و در واکنش‌های هموپلیمری محصولات حاوی چندین نوکلئوتید اصلاح شده تولید می‌کنند (۳۹). علاوه‌بر برچسب‌های فلورسنت، اسیدهای‌نوکلئیک می‌توانند با برچسب‌های الکتروشیمیایی نیز نشاندار شوند که مزایایی چون حساسیت بالا و سازگاری با سیستم‌های کوچک دارند (۴۰). به‌طورنمونه، Hocek و همکاران از نوکلئوزید تری‌فسفات‌های دارای گروه‌های آمینو و نیتروبنزیل برای تولید دم‌های الکتروشیمیایی استفاده کرده و $dG^{NO2}TP$ را بهترین سوبسترا معرفی کردند (۴۱). همچنین، dNTPهای اصلاح شده با وینیل امکان افزودن گروه‌های عاملی از طریق واکنش thiol-ene را فراهم کرده‌اند (۴۲). فروسن (Ferrocene) نیز به عنوان برچسب ردوکس توسط TdT برای نشاندارسازی DNA به‌کار رفته‌است (۴۳). درنهایت، نوکلئوتیدهای اصلاح شده‌ای مانند (BNA/LNA–′۴,′۲) با افزایش مقاومت ssDNA به اگزونوکلئاز و اندونوکلئاز، در توسعه الیگونوکلئوتیدهای درمانی کاربرد یافته‌اند (۴۴).

کونژوگه‌های DNA–پروتئین

ترکیب قابلیت برنامه‌ریزی توالی DNA با خصوصیات زیستی پروتئین‌ها منجربه توسعه ابزارهایی مانند کونژوگه‌ها ی DNA–پروتئین شده‌است. این کونژوگه‌ها امکان ساخت ریزآرایه‌های پروتئینی، زیست‌حسگرها، سنجش‌های ایمونولوژیک و نانوساختارها را فراهم می‌کنند. دراین رویکرد، DNA به‌عنوان لنگر (Anchor) عمل کرده و پروتئین‌ها را روی تراشه تثبیت می‌کند. برای حفظ ساختار و عملکرد پروتئین، استفاده از فرآیندهای آنزیمی ملایمی چون TdT مناسب است. به‌عنوان نمونه، در یک پروتکل دومرحله‌ای، TdT نوکلئوتیدهای اصلاح شده حاوی سوبستراهای ZGln-Gly از MethylThioglycolate (MTG) را در پرایمر DNA وارد کرده و سپس اتصال DNAاصلاح شده با آلکالین‌فسفاتازباکتریایی (BAP) (Bacterial Alkaline Phosphatase) انجام می‌شود که امکان ترکیب آپتامر ضدترومبین با BAP را فراهم می‌سازد (۴۵).

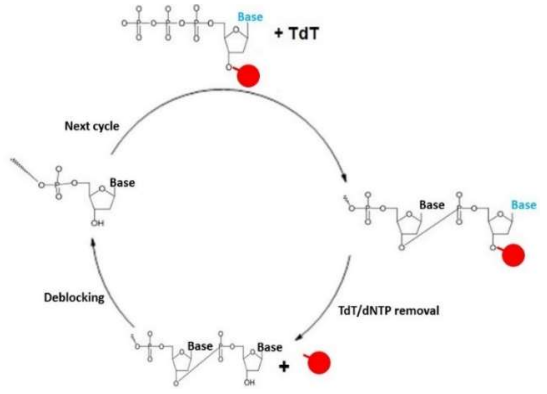
علاوه‌براین، گروه‌های واکنشی می‌توانند از طریق TdT به DNA وارد شوند تا کونژوگاسیون مستقیم با پروتئین‌ها انجام گیرد. اگزانین (oxanine) به‌عنوان سوبسترای مناسب TdT به دلیل واکنش‌پذیری انتخابی با تیول‌ها و آمین‌های اولیه شناخته شده‌است؛ تری‌فسفات اگزانین سنتز شده و با پلی‌آمین‌هایی مانند اسپرمین (Spermine) جفت می‌شود. همچنین، آنالوگ ddCTP دارای گروه maleimide درموقعیت ۴ نوکلئوباز سنتز و توسط TdT وارد DNA شده‌است؛ این استراتژی برای کونژوگاسیون DNA به مولکول‌های تیول‌دار و اتصال پپتید NLS (Nuclear Localization Signal) به DNA به‌کار رفته و در تقویت خاموش‌سازی ژن مؤثر بوده‌است (۴۶،۴۷).

سنتز آنزیمی الیگونوکلئوتید

سنتز آنزیمی DNA بدون الگو با TdT به‌طور معمول منجربه تولید محصولات ناهمگن می‌شود، اما استفاده از آنالوگ‌های dNTP با گروه‌های مسدودکننده ′۳–O (ترمیناتورهای برگشت‌پذیر) امکان توقف موقت طویل‌سازی و ادامه پس از حذف گروه محافظ را فراهم می‌سازد (۴۸). این رویکرد به‌ویژه درNGS کاربرد دارد (۴۹).

Mathews و همکاران ′۲–دئوکسی‌ریبونوکلئوزید تری‌فسفات‌های فوتوشکافت‌پذیر (photocleavable) شامل ′۳–O-(۲–نیتروبنزیل) و ′۳–O-(۵،۴–دی‌متوکسی–۲–نیتروبنزیل) را طراحی کردند که گروه محافظ آنها با تابش نور فرابنفش (۳۶۵ نانومتر) حذف می‌شود و بدین‌ترتیب سنتز ادامه می‌یابد (۴۹،۵۰). گروه‌های دیگری مانند 2-(cyanoethoxy)methyl (CEM) که با TBAF (Tetrabutylammoniumfluorid) حذف می‌شود، و ′۳–ONH_2 که به‌سادگی با نیتریت‌سدیم جدا می‌شود نیز برای این منظور معرفی شده‌اند (۵۰،۵۱).

روش جدید TdT-dNTP، نیاز به گروه مسدودکننده ′۳–O را حذف کرده و در آن نوکلئوتید به TdT متصل می‌شود؛ پس از حذف کونژوگه با DTT (Dithiothreitol) یا UV، طویل‌سازی ادامه یافته و بازدهی بالای ٪۹۷,۷ در سنتز الیگونوکلئوتیدهای کوتاه گزارش شده‌است (۵۱). همچنین، Jensen و همکاران رویکرد Free-Running Synthesis را معرفی کردند که در آن TdT اجازه افزودن یک نوکلئوتید را داده، سپس واکنش متوقف و dNTPهای آزاد شسته می‌شوند؛ با افزودن نوکلئوتید جدید، سنتز ادامه می‌یابد (طرح ۱). این روش تولید ssDNAهای بسیار طویل (<۸۰۰۰ نوکلئوتید) را ممکن ساخته که در ذخیره‌سازی اطلاعات DNA کاربرد دارد (۵۲،۵۳).



طرح ۱– نمایش چرخه سنتز الیگونوکلئوتید DNA مستقل از الگو با استفاده از پلیمراز TdT.

درمجموع، این استراتژی‌ها ابزارهای نوینی برای سنتز دقیق و بدون الگوی DNA ارائه می‌دهند که در تحقیقات ژنتیکی، ذخیره‌سازی اطلاعات و تولید مواد نوین اهمیت دارند.

تشکیل جفت‌بازها به واسطه فلز

واردسازی یون‌های فلزی به اسیدهای‌نوکلئیک رویکردی جذاب برای بهبود انتقال بار در DNA دورشته‌ای، سنجش زیستی آلاینده‌های فلزی و توسعه نانومواد است (۵۴). علاوه بر جفت‌بازهای فلزی حاصل از نوکلئوبازهای طبیعی، نوکلئوتیدهای سنتزی لیگاند می‌توانند برای افزایش تنوع و انتخاب یون در DNA وارد شوند (۵۶). بیشتر سیستم‌های گزارش شده بر سنتز فاز جامد نوکلئوزیدهای سنتزی متکی‌اند که محدودیت‌هایی در گروه‌های عاملی وطول توالی دارند (۵۶). اخیراً ترکیب آنزیمی نوکلئوتیدهای اصلاح شده به‌عنوان روشی جایگزین برای ساخت جفت‌بازهای فلزی پیشنهاد شده‌است (۵۷،۵۸). در این راستا، DNA دورشته‌ای حاوی آنالوگ هیدروکسی‌پیریدینون (hydroxypyridinone) با افزودن Cu^{2+}پایدارتر می‌شود ($\Delta Tm = 13°C$ per modification) (۵۹). این ویژگی‌ها برای تولید اورهنگ‌های وابسته به TdT و تشکیل مجموعه‌های DNA دورشته‌ای در حضور Cu^{2+} استفاده شدند. کاهش غلظت Mg^{2+} نیز با جلوگیری از تاخوردگی نامطلوب نوکلئوتیدهای اصلاح شده، کارایی پلیمریزاسیون را بهبود می‌دهد (۵۹،۶۰). ترکیب Cu^{2+} با dsDNA اصلاح شده مونتاژ دورشته‌ای از طریق جفت‌باز فلزی را ممکن می‌سازد که با EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) جدا می‌شود. تاکنون تنها نوکلئوتیدهای اصلاح شده با هیدروکسی‌پیریدینون (۵۹) و ایمیدازول (Imidazole) (۶۱،۶۲) به‌عنوان سوبسترا برای TdT بررسی شده‌اند، اما انتظار می‌رود این رویکرد گسترش یابد (۶۳).

برچسب‌گذاری RNA

TdT به‌عنوان DNAپلیمراز وابسته به DNA بیشترین کارایی را در افزودن dNMPها به DNA دارد و می‌تواند تا ۵ ریبونوکلئوتید (rNMP) را به انتهای ۳' پرایمرهای ssDNA اضافه کند، قبل از اینکه تغییر ساختاری از B-DNA به A-DNA واکنش را متوقف کند (۶۴). به همین دلیل، TdT با آغازگرهای RNA ضعیف عمل می‌کند (۶۵). Rosemeyer و همکاران نشان دادند که biotin-16-dUTP و dig-11-dUTP برای سنتز غیررادیواکتیو الیگونوکلئوتیدهای RNA قابل استفاده هستند (۶۶،۶۷). در واکنش‌های هموپلیمری با TdT، چهارنوکلئوتید dig-modified و پنج آنالوگ بیوتینی به انتهای ۳' یک سوبسترای ۲۵ نوکلئوتیدی RNA اضافه شد، اما وقتی آغازگر RNA ساختار ساقه–حلقه با overhang بلند داشت، هیچ واکنش هموپلیمری مشاهده نشد.

Winz و همکاران امکان استفاده از TdT برای افزودن نوکلئوتیدهای حاوی آزید به انتهای ۳' RNA و سپس برچسب‌گذاری با فلوروفورها از طریق CuAAC را بررسی کردند، اما تری‌فسفات‌های تغییریافته در موقعیت‌های C2، C3 و C8 توسط TdT پذیرفته نشدند. درمقابل، با استفاده از پلی(A)پلیمراز (PAP)(Poly(A) polymerase) مخمر، اکثر rN*TPها به‌طور کارآمد اضافه شدند (۶۸،۶۹). این یافته‌ها نشان می‌دهند که برای واکنش‌های مؤثر روی RNA به TdT مهندسی‌شده یاپلیمرازهای مرتبط نیاز است (۶۵).

ذخیره‌سازی داده‌های DNA

استفاده از DNA به‌عنوان ابزار ذخیره‌سازی اطلاعات از چند دهه پیش آغاز شده و پیشرفت‌های اخیر این حوزه را به فناوری عملی و آینده‌دار تبدیل کرده‌است (۷۰). سیستم‌های ذخیره‌سازی مبتنی بر DNA طول عمر بیشتر و ظرفیت ذخیره‌سازی بالاتری نسبت به روش‌های سنتی دارند و آنزیم TdT برای سنتز رشته‌های DNA در این کاربرد به‌کار گرفته شده‌است (۷۱،۷۲).

درسال ۲۰۱۸، تیم دانشکده پزشکی هاروارد روش سنتز آنزیمی de novo با گسترش هموپلیمری کوتاه برای ذخیره‌سازی داده‌ها معرفی کرد و با افزودن آنزیم آپیراز (Apyrase)(AP) فعالیت TdT را کنترل نمود تا نوکلئوزید تری‌فسفات‌ها به پیش‌سازهای مونو و دی‌فسفات غیرفعال تبدیل شوند (۷۳). درسال ۲۰۲۰، Lee و همکاران روش سنتز آنزیمی چندگانه DNA با استفاده‌ازcage Co^{2+} برای لیتوگرافی بدون ماسک (MasklessLithography) ارائه دادند، که با کنترل یون‌های Co^{2+} امکان رمزگذاری ۱۲ توالی DNA منحصربه‌فرد و ایجاد سیگنال روشن فراهم شد (۷۴).

اخیراً، Bhan و همکاران سیستم ساده‌ای معرفی کردند که تنها با TdT سیگنال‌های محیطی را به DNA منتقل می‌کند. در این روش ثبت بدون الگو به نام TURTLES (TdT-based Untemplated Recording of Temporal Local Environmental Signal)(ثبت سیگنال‌های محیطی محلی زمانی)، سیگنال‌های فیزیولوژیکی با وضوح بالا ذخیره می‌شوند و امکان تبدیل سیگنال‌های بیولوژیکی به

الکتریکی را فراهم می‌آورند (۷۵). به‌طورکلی، استفاده از TdT در ذخیره‌سازی اطلاعات DNA پتانسیل تبدیل آن به جایگزینی برای سیستم‌های سنتی ذخیره‌سازی داده‌ها را نشان می‌دهد.

نانوفناوری DNA

با افزایش علاقه به توسعه مواد زیستی نوین در زیست‌پزشکی، DNA به‌عنوان واحد ساختمانی چندمنظوره برای ساختارهای فوق‌مولکولی مانند DNAاوریگامی، نانوساختارهایDNA وهیدروژل‌های مبتنی برDNA شناخته شده‌است (۷۶،۷۷). استفاده از آنزیم‌هایی مانند TdT در سنتز نانوساختارهایDNA برای تولید اشکال پیچیده‌تر، افزایش عملکرد و مهندسی دقیق این ساختارها اهمیت یافته‌است (۷۷).

محققان به خودآرایی هیدروژل‌های DNA با استفاده از واحدهای ساختمانی DNA پلیمریزه آنزیمی پرداخته‌اند تا تعداد موتیف‌های واحدساز DNA مورد نیاز کاهش یابد (۷۸). در این مطالعه، موتیف DNA به شکل X و TdT برای طویل‌سازی واحدهای ساختمانی DNA و هیبریداسیون بین واحدهای دوگانه با دم‌های DNA پلیمریزه شده توسط TdT استفاده شد که در نهایت منجر به تشکیل ژل شد.

درسال ۲۰۲۱، Yang و همکاران روش‌هایی برای عامل‌دار کردن DNA اوریگامی معرفی کردند تا مجموعه‌ای از برس‌های مبتنی بر پلی‌نوکلئوتیدها تولید شود و از آن‌ها در کشت سلول‌های سه‌بعدی و چاپ زیستی سه‌بعدی بهره‌برداری گردد (۷۹). به‌طورکلی، TdT نقش کلیدی در طراحی دقیق نانوساختارهایDNA دارد و امکان مهندسی کنترل شده این ساختارها را فراهم می‌کند.

حسگرزیستی

آنزیم TdT به دلیل توانایی منحصربه‌فرد خود در افزودن تصادفی dNTPها به انتهای ssDNA OH-۳′، درحسگرهای زیستی کاربرد گسترده‌ای یافته‌است و برای تقویت سیگنال‌ها و شناسایی مولکول‌های هدف به‌کار می‌رود (جدول۱). برای مثال، دم‌های پلیdA تولید شده توسط TdT برای تشخیص آنزیم‌های بالینی مانند uracil-(UDG) DNA glycosylase (۸۰)، DAM methylase (۸۱)، و polynucleotide kinase (۸۲) استفاده شده‌اند.

روش‌های مبتنی بر TdT همچنین برای تشخیص microRNAها، ازجمله miRNA-21 به‌عنوان نشانگر زیستی سرطان‌ها، توسعه یافته‌اند (۸۳). در زمینه تشخیص اگزوزوم‌ها، فناوری‌های TdT برای شناسایی اگزوزوم‌های مرتبط با سرطان کولورکتال (Colorectal Cancer CRC) به‌کار رفته‌اند (۸۴). این آنزیم همچنین در شناسایی عوامل بیماری‌زا مانند باکتری‌های*E. Coli* و *Salmonella*، ویروس‌های SARS-CoV-2 و هپاتیتC و لیپوپلی‌ساکاریدها استفاده شده‌است (۸۵)، و در تشخیص DNA توموری گردش‌کننده (۸۶) و سلول‌های توموری (۸۷) نیز کاربرد دارد.

ویژگی برجسته TdT توانایی آن در تقویت عملکرد سایر فناوری‌های سنسینگ است؛ به عنوان مثال، حساسیت حسگرهای DNAzyme مبتنی بر G-quadruplex/hemin با TdT افزایش یافته‌است (۸۸). همچنین TdT در ترکیب با سنسورهای آپتامر برای تشخیص موادی مانند میکروسیستین (Microcystin) و سلول‌های سرطانی کولورکتال استفاده شده‌است (۸۸).

این کاربردها نشان می‌دهند که TdT نه تنها در توسعه حسگرهای‌زیستی مؤثر است، بلکه پتانسیل استفاده در حسگری‌های پیشرفته و محیط‌های in vivo را نیز دارد. هر چند چالش‌هایی در پیاده‌سازی این فناوری‌ها وجود دارد، TdT می‌تواند تحولی بزرگ در فناوری‌های سنسینگ زیستی ایجاد کند.

آپتامرهای تولید شده توسط آنزیم (EGA)(Enzyme-Generated Aptamers)

از آنزیم TdT برای غربالگری آپتامرها استفاده می‌شود (۵). در یک مطالعه، کتابخانه‌هایی با اندازه‌های مختلف نوکلئوتید ایجاد شد و با تنظیم غلظت آغازگر و زمان واکنش، آپتامرهایی تولید گردید که اتصال آن‌ها به پروتئین‌های مدل، مانند ترومبین(Thrombin)انسانی و لاکتوفرین (Lactoferrin) انسانی به‌طورمؤثری افزایش یافت. این روش به نام "آپتامرهای تولید شده با آنزیم" یا EGA شناخته می‌شود و امکان تولید EGAهایی با اتصال نانومولاری پایین در یک مرحله را فراهم می‌آورد.

این روش همچنین اجازه می‌دهد آپتامرها براساس اندازه و توالی غربال شوند و برای شناسایی هدف در

پلی‌نوکلئوتیدهای بزرگ‌تر استفاده شوند. با الهام از تولید پلیمرهای قالب مولکولی (MIPs)(Molecularly Imprinted Polymers)، نشان داده‌شد که پروتئین هدف می‌تواند به‌عنوان الگو در طی سنتز EGAها با کمک TdT به‌کار رود و EGAهایی تولید شوند که بین لاکتوفرین انسان و گاو تمایز قائل می‌شوند (۸۹). این پیشرفت، کاربرد جذابی در توسعه آپتامرها ایجاد کرده و می‌تواند پیچیدگی، هزینه و زمان روش‌های کلاسیک SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) را به‌طور قابل توجهی کاهش دهد (۹۰).

جدول۱- حسگرهای زیستی مبتنی بر TdT (۵)

آنالیت‌ها	**سیگنال خروجی**
آنالیت‌های مبتنی بر آنزیم	
اوراسیل-DNA گلیکوزیلاز (UDG)	فلوروفور/کوئنچر
پلی‌نوکلئوتید کیناز (T4 PNK)	فلوروفور/کوئنچر
DAMمتیلاز	فلوروفور/کوئنچر
آنالیت‌های مبتنی برmicroRNA	**سیگنال خروجی**
microRNA-21 microRNA-162a	فلورسانس فوتوالکتروشیمیایی
پاتوژن‌ها و آنالیت‌های اگزوزوم‌ها	**سیگنال خروجی**
E. coli	پلاسمونیک/رامان
سالمونلا	رنگ سنجی
ویروس هپاتیت C	الکتروشیمیایی
کووید ۱۹	الکتروشیمیایی
میکروسیستین	الکتروشیمیایی
اگزوزوم‌های سلول‌های سرطانی	رنگ‌سنجی/سنجش آپتامر جاذب متصل به آنزیم
مولکول‌های کوچک و پروتئین‌ها	**سیگنال خروجی**
آمپی‌سیلین	فوتوالکتروشیمیایی (PEC)
کانامایسین	رنگ‌سنجی
ترومبین	فلورسانس الکتروشیمیایی/فلورسانس
یون‌های پتاسیم	فلورسانس

جهت‌گیری و نوآوری‌های آینده

با توجه به ویژگی‌های منحصربه‌فرد TdT در افزودن تصادفی نوکلئوتیدها، تحقیقات آینده بر بهبود کارایی و گسترش کاربردهای این آنزیم متمرکز خواهدبود. در زیست‌پزشکی، تمرکز بر توسعه روش‌های تشخیص دقیق و درمان هدفمند سرطان‌ها، به‌ویژه لوسمی‌ها، خواهدبود. هم‌زمان، گسترش کاربرد TdT در زیست‌فناوری—مانند طراحی نانوساختارهایDNA و سیستم‌های ذخیره‌سازی داده‌های مولکولی—افق‌های جدیدی برای تولید حسگرهای زیستی و ابزارهای پایش سلولی ایجاد می‌کند.

نوآوری‌های آینده می‌تواند شامل ترکیب TdT با فناوری‌های نوین مانند ویرایش ژنوم و نانوذرات برای افزایش اختصاصیت و کارایی باشد. همچنین، پژوهش بیشتر در تنظیم فعالیت و پایداری TdT، امکان استفاده گسترده‌تر در شرایط آزمایشگاهی و صنعتی را فراهم می‌کند. درنهایت، گسترش مطالعات مکانیسم عملکرد TdT، راه را برای بهبود روش‌های تشخیصی و درمانی و ایجاد ابزارهای پیشرفته‌تر در زیست‌فناوری هموار خواهدکرد.

نتیجه‌گیری

آنزیم ترمینال‌دئوکسی‌نوکلئوتیدیل‌ترانسفراز (TdT) به دلیل توانایی سنتز DNA بدون نیاز به الگو، ابزاری کلیدی در زیست‌پزشکی و زیست‌فناوری است. کاربردهای آن شامل تشخیص و درمان سرطان‌ها، توسعه نانوساختارهایDNA، سنتز الیگونوکلئوتیدهای هدفمند و ایجاد سیستم‌های ذخیره‌سازی داده‌های مولکولی می‌شود. TdT با افزودن تصادفی نوکلئوتیدها به انتهای DNA، نقش مهمی در تولید نشانگرها، زیست‌حسگرها و بهبود روش‌های پایش مولکولی دارد. برای بهره‌برداری کامل از پتانسیل آن، بهبود پایداری، کارایی و تنظیم فعالیت در شرایط مختلف ضروری است. ترکیب TdT با فناوری‌های پیشرفته مانند ویرایش ژن و نانوذرات افق‌های جدیدی در درمان هدفمند و پایش زیستی ایجاد می‌کند. این مقاله با مرور ساختار، مکانیسم وکاربردهای TdT اهمیت آن را در زیست‌پزشکی و زیست‌فناوری برجسته کرده و مسیرهای نوآورانه‌ای برای تحقیقات آینده پیشنهاد می‌دهد.

منابع

1. Bollum, F. J. (1960). Calf thymus polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 235(8), 2399-2403.
2. Yamtich, J., &Sweasy, J. B. (2010). DNA polymerase family X: function, structure, and cellular roles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(5), 1136–1150.
3. Krayevsky, A. A., Victorova, L. S., Arzumanov, A. A., &Jasko, M. V. (2000). Terminal deoxynucleotidyl transferase: catalysis of DNA (oligodeoxynucleotide) phosphorylation. *Pharmacology & Therapeutics*, 85(3), 165-173.
4. McElhinny, S. A. N., et al. (2005). A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Molecular Cell*, 19(3), 357-366.
5. Ashley, J., Potts, I. M., &Olorunniji, F. J. (2023). Applications of Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Enzyme in Biotechnology. *ChemBioChem*, 24(5), e202200510.
6. Roychoudhury, R., Jay, E., & Wu, R. (1976). Terminal labeling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Nucleic Acids Research*, 3(4), 863-878.
7. Chang, L. M., &Bollum, F. J. (1990). Multiple roles of divalent cation in the terminal deoxynucleotidyltransferase reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 265(29), 17436-17440.
8. Kuznetsova, A. A., Tyugashev, T. E., Alekseeva, I. V., Timofeyeva, N. A., Fedorova, O. S., &Kuznetsov, N. A. (2022). Insight into the mechanism of DNA synthesis by human terminal deoxynucleotidyltransferase. *Life Science Alliance*, 5(12).
9. Zhang, C., et al. (2025). Terminal deoxynucleotidyl transferase: Properties and applications. *Engineering Microbiology*, 5(1), 100179.
10. Delarue, M., et al. (2002). Crystal structures of a template-independent DNA polymerase: murine terminal deoxynucleotidyltransferase. *The EMBO Journal*, 21(3), 427-439.
11. Rothwell, P. J., & Waksman, G. (2005). Structure and mechanism of DNA polymerases. In *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 71, pp. 401-440). Elsevier.
12. Gouge, J., Rosario, S., Romain, F., Beguin, P., &Delarue, M. (2013). Structures of the catalytic intermediates deoxynucleotidyltransferase: dynamical aspects of the two-metal ion mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 425(22), 4334-4352.
13. Yang, H., Zhu, L., Wang, X., Song, Y., Dong, Y., & Xu, W. (2024). Extension characteristics of TdT and its application in biosensors. *Critical Reviews in Biotechnology*, 44(6), 981-995.
14. Greaves, M., Paxton, A., Janossy, G., Pain, C., Johnson, S., & Lister, T. A. (1980). Acute lymphoblastic leukaemia associated antigen. III. Alterations in expression during treatment and in relapse. *Leukemia Research*, 4, 1–14.
15. Kung, P. C., Long, J. C., McCaffrey, R. P., Ratliff, R. L., Harrison, T. A., & Baltimore, D. (1978). Terminal deoxynucleotidyl transferase in the diagnosis of leukemia and malignant lymphoma. *American Journal of Medicine*, 64, 788–794.
16. Venditti, A., Del Poeta, G., Buccisano, F., Tamburini, A., Aronica, G., Bruno, A., Cox-Froncillo, M. C., Maffei, L., Simone, D. M., Papa, G., &Amadori, S. (1997). Biological pattern of AML-M0 versus AML-M1: response. *Blood*, 89, 345–346.
17. McCaffrey, R., Bell, R., Lillquist, A., Wright, G., Baril, E., &Minowada, J. (1983). Selective killing of leukemia cells by inhibition of TdT. *Haematology and Blood Transfusion*, 28, 24–27.
18. Spigelman, Z., Duff, R., Beardsley, G. P., Broder, S., Cooney, D., Landau, N. R., Mitsuya, H., Ullman, B., & McCaffrey, R. (1988). 2′,3′-Dideoxyadenosine is selectively toxic for TdT-positive cells. *Blood*, 71, 1601–1608.

19. Kodama, E. N., McCaffrey, R. P., Yusa, K., &Mitsuya, H. (2000). Antileukemic activity and mechanism of action of cordycepin against terminal deoxynucleotidyl transferase-positive (TdT+) leukemic cells. *Biochemical Pharmacology*, 59, 273–281.

20. Plunkett, W., & Gandhi, V. (2001). Purine and pyrimidine nucleoside analogs. *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers*, 19, 21–45.

21. Locatelli, G. A., Di Santo, R., Crespan, E., Costi, R., Roux, A., Hubscher, U., Shevelev, I., Blanca, G., Villani, G., Spadari, S., & Maga, G. (2005). Diketo hexenoic acid derivatives are novel selective non-nucleoside inhibitors of mammalian terminal deoxynucleotidyl transferases, with potent cytotoxic effect against leukemic cells. *Molecular Pharmacology*, 68, 538–550.

22. Ono, K. (1990). Inhibitory effects of various 2′,3′-dideoxynucleoside 5′-triphosphates on the utilization of 2′-deoxynucleoside 5′-triphosphates by terminal deoxynucleotidyltransferase from calf thymus. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1049, 15–20.

23. Arzumanov, A. A., Victorova, L. S., Jasko, M. V., &Yesipov, D. S. (2000). Terminal deoxynucleotidyl transferase catalyzes the reaction of DNA phosphorylation. *Nucleic Acids Research*, 28, 1276–1281.

24. Sosunov, V. V., Santamaria, F., Victorova, L. S., Gosselin, G., Rayner, B., &Krayevsky, A. A. (2000). Stereochemical control of DNA biosynthesis. *Nucleic Acids Research*, 28, 1170–1175.

25. Krayevsky, A. A., Victorova, L. S., Arzumanov, A. A., &Jasko, M. V. (2000). Terminal deoxynucleotidyl transferase: catalysis of DNA (oligodeoxynucleotide) phosphorylation. *Pharmacology & Therapeutics*, 85, 165–173.

26. Steensma, D. P., Timm, M., &Witzig, T. E. (2003). Flow cytometric methods for detection and quantification of apoptosis. *Methods in Molecular Medicine*, 85, 323–332.

27. Gorczyca, W., Gong, J., &Darzynkiewicz, Z. (1993). Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Research*, 53, 1945–1951.

28. Leduc, F., Faucher, D., Nkoma, G. B., Gregoire, M. C., Arguin, M., Wellinger, R. J., &Boissonneault, G. (2011). Genome-wide mapping of DNA strand breaks. *PLoS One*, 6(10), e22558.

29. Darzynkiewicz, Z., Galkowski, D., & Zhao, H. (2008). Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods (San Diego, Calif.)*, 44(3), 250–254.

30. Mo, R., Jiang, T. Y., DiSanto, R., Tai, W. Y., & Gu, Z. (2014). ATP-triggered anticancer drug delivery. *Nature Communications*, 5, 10.

31. Winz, M. L., Linder, E. C., Andre, T., Becker, J., &Jaschke, A. (2015). Nucleotidyl transferase assisted DNA labeling with different click chemistries. *Nucleic Acids Research*, 43, e80.

32. Modesti, M. (2018). A pinch of RNA spices up DNA repair. *Science*, 361, 1069–1070.

33. Röthlisberger, P., Levi-Acobas, F., Sarac, I., Baron, B., England, P., Marliere, P., Herdewijn, P., &Hollenstein, M. (2017). On the enzymatic incorporation of an imidazole nucleotide into DNA. *Chemical Communications*, 53, 13031–13034.

34. Heller, M. J. (2002). DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 4, 129–153.

35. Guerra, C. E. (2006). Analysis of oligonucleotide microarrays by 3′ end labeling using fluorescent nucleotides and terminal transferase. *Biotechniques*, 41, 53–56.

36. Tjong, V., Yu, H., Hucknall, A., Rangarajan, S., &Chilkoti, A. (2011). Amplified on-chip fluorescence detection of DNA hybridization by surface-initiated enzymatic polymerization. *Analytical Chemistry*, 83, 5153–5159.

37. Jahn, K., Torring, T., Voigt, N. V., Sorensen, R. S., Kodal, A. L. B., Andersen, E. S., Gothelf, K. V., &Kjems, J. (2011). Functional patterning of DNA origami by parallel enzymatic modification. *Bioconjugate Chemistry*, 22, 819–823.

38. Cho, Y. J., & Kool, E. T. (2006). Enzymatic synthesis of fluorescent oligomers assembled on a DNA backbone. *ChemBioChem*, 7, 669–672.

39. Hebert, N. E., &Brazill, S. A. (2003). Microchip capillary gel electrophoresis with electrochemical detection for the analysis of known SNPs. *Lab on a Chip*, 3, 241–247.

40. Horakova, P., Macickova-Cahova, H., Pivonkova, H., Spacek, J., Havran, L., Hocek, M., &Fojta, M. (2011). Tail-labelling of DNA probes using modified deoxynucleotide triphosphates and terminal deoxynucleotidyl transferase. Application in electrochemical DNA hybridization and protein-DNA binding assays. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 9, 1366–1371.

41. Slavickova, M., Pohl, R., &Hocek, M. (2016). Additions of thiols to 7-vinyl-7-deazaadenine nucleosides and nucleotides. Synthesis of hydrophobic derivatives of 2′-deoxyadenosine, dATP and DNA. *The Journal of Organic Chemistry*, 81, 11115–11125.

42. Anne, A., Blanc, B., &Moiroux, J. (2001). Synthesis of the first ferrocene-labeled dideoxynucleotide and its use for 3′-redox end-labeling of 5′-modified single-stranded oligonucleotides. *Bioconjugate Chemistry*, 12, 396–405.

43. Singh, S. K., Nielsen, P., Koshkin, A. A., &Wengel, J. (1998). LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chemical Communications*, 455–456.

44. Gu, R. P., Oweida, T., Yingling, Y. G., Chilkoti, A., &Zauscher, S. (2018). Enzymatic synthesis of nucleobase-modified single-stranded DNA offers tunable resistance to nuclease degradation. *Biomacromolecules*, 19, 3525–3535.

45. Bernardinelli, G., &Högberg, B. (2017). Entirely enzymatic nanofabrication of DNA-protein conjugates. *Nucleic Acids Research*, 45(18), e160.

46. Jang, E. K., Ki, M. R., & Pack, S. P. (2017). Design of reactive-end DNA oligomers via incorporation of oxanine into oligonucleotides using terminal deoxynucleotidyl transferase. *Process Biochemistry*, 62, 99–105.

47. Ikeda, Y., Kawahara, S., Yoshinari, K., Fujita, S., &Taira, K. (2005). Specific 3′-terminal modification of DNA with a novel nucleoside analogue that allows a covalent linkage of a nuclear localization signal

and enhancement of DNA stability. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 6(2), 297–303.

48. Jensen, M. A., & Davis, R. W. (2018). Template-independent enzymatic oligonucleotide synthesis (TiEOS): Its history, prospects, and challenges. *Biochemistry*, 57(12), 1821–1832.

49. Mathews, A. S., Yang, H., &Montemagno, C. (2017). 3′-O-Caged 2′-deoxynucleoside triphosphates for light-mediated, enzyme-catalyzed, template-independent DNA synthesis. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, 71, 13.17.1–13.17.38.

50. Hutter, D., Kim, M. J., Karalkar, N., Leal, N. A., Chen, F., Guggenheim, E., Visalakshi, V., Olejnik, J., Gordon, S., & Benner, S. A. (2010). Labeled nucleoside triphosphates with reversibly terminating aminoalkoxyl groups. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 29(11), 879–895.

51. Palluk, S., Arlow, D. H., de Rond, T., Barthel, S., Kang, J. S., Bector, R., Baghdassarian, H. M., Truong, A. N., Kim, P. W., Singh, A. K., Hillson, N. J., &Keasling, J. D. (2018). De novo DNA synthesis using polymerase-nucleotide conjugates. *Nature Biotechnology*, 36(7), 645–650.

52. Jensen, M. A., Griffin, P., & Davis, R. W. (2018). Free-running enzymatic oligonucleotide synthesis for data storage applications. *bioRxiv*. https://doi.org/10.1101/355719

53. Erlich, Y., & Zielinski, D. (2017). DNA Fountain enables a robust and efficient storage architecture. *Science (New York, N.Y.)*, 355(6328), 950–954.

54. Jash, B., & Müller, J. (2017). Metal-mediated base pairs: From characterization to application. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 23(68), 17166–17178.

55. Scharf, P., & Müller, J. (2013). Nucleic acids with metal-mediated base pairs and their applications. *ChemPlusChem*, 78, 20–34.

56. Röthlisberger, P., &Hollenstein, M. (2018). Aptamer chemistry. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 134, 3–21.

57. Kaul, C., Müller, M., Wagner, M., Schneider, S., & Carell, T. (2011). Reversible bond formation enables the replication and amplification of a crosslinking salen complex as an orthogonal base pair. *Nature Chemistry*, 3(10), 794–800.

58. Röthlisberger, P., Levi-Acobas, F., Sarac, I., Marlière, P., Herdewijn, P., &Hollenstein, M. (2017). On the enzymatic incorporation of an imidazole nucleotide into DNA. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 15(20), 4449–4455.

59. Kobayashi, T., Takezawa, Y., Sakamoto, A., &Shionoya, M. (2016). Enzymatic synthesis of ligand-bearing DNAs for metal-mediated base pairing utilising a template-independent polymerase. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 52(19), 3762–3765.

60. Takezawa, Y., Kobayashi, T., &Shionoya, M. (2016). The effects of magnesium ions on the enzymatic synthesis of ligand-bearing artificial DNA by template-independent polymerase. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 906.

61. Röthlisberger, P., Levi-Acobas, F., Sarac, I., Marliere, P., Herdewijn, P., &Hollenstein, M. (2018). Incorporation of a minimal nucleotide into DNA. *Journal of Inorganic Biochemistry*. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.1011.1009

62. Röthlisberger, P., Levi-Acobas, F., Sarac, I., Baron, B., England, P., Marlière, P., Herdewijn, P., &Hollenstein, M. (2017). Facile immobilization of DNA using an enzymatic his-tag mimic. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 53(97), 13031–13034.

63. Takezawa, Y., Yoneda, S., Duprey, J. H. A., Nakama, T., &Shionoya, M. (2016). Metal-responsive structural transformation between artificial DNA duplexes and three-way junctions. *Chemical Science*, 7(5), 3006–3010.

64. Boulé, J. B., Rougeon, F., & Papanicolaou, C. (2001). Terminal deoxynucleotidyl transferase indiscriminately incorporates ribonucleotides and deoxyribonucleotides. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 31388–31393.

65. Randrianjatovo-Gbalou, I., Rosario, S., Sismeiro, O., Varet, H., Legendre, R., Coppée, J. Y., Huteau, V., Pochet, S., &Delarue, M. (2018). Enzymatic synthesis of random sequences of RNA and RNA analogues by DNA polymerase theta mutants for the generation of aptamer libraries. *Nucleic Acids Research*, 46(12), 6271–6284.

66. Anhäuser, L., &Rentmeister, A. (2017). Enzyme-mediated tagging of RNA. *Current Opinion in Biotechnology*, 48, 69–76.

67. Rosemeyer, V., Laubrock, A., &Seibl, R. (1995). Nonradioactive 3′-end-labeling of RNA molecules of different lengths by terminal deoxynucleotidyltransferase. *Analytical Biochemistry*, 224(1), 446–449.

68. Custer, T. C., & Walter, N. G. (2017). In vitro labeling strategies for in cellulo fluorescence microscopy of single ribonucleoprotein machines. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 26(7), 1363–1379.

69. Winz, M. L., Samanta, A., Benzinger, D., &Jäschke, A. (2012). Site-specific terminal and internal labeling of RNA by poly(A) polymerase tailing and copper-catalyzed or copper-free strain-promoted click chemistry. *Nucleic Acids Research*, 40(10), e78.

70. Panda, D., Molla, K. A., Baig, M. J., Swain, A., Behera, D., & Dash, M. (2018). DNA as a digital information storage device: hope or hype? *3 Biotech*, 8(5), 1–9.

71. Hao, Y., Li, Q., Fan, C., & Wang, F. (2021). Data storage based on DNA. *Small Structures*.

72. Song, L.-F., Deng, Z.-H., Gong, Z.-Y., Li, L.-L., & Li, B.-Z. (2021). Large-scale de novo oligonucleotide synthesis for whole-genome synthesis and data storage: Challenges and opportunities. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9.

73. Lee, H. H., Kalhor, R., Goela, N., Bolot, J., & Church, G. M. (2019). Terminator-free template-independent enzymatic DNA synthesis for digital information storage. *Nature Communications*, 10(1), 1–12.

74. Lee, H., Wiegand, D. J., Griswold, K., Punthambaker, S., Chun, H., Kohman, R. E., & Church, G. M. (2020). Photon-directed multiplexed enzymatic DNA synthesis for molecular digital data storage. *Nature Communications*, 11(1), 1–9.

75. Bhan, N., Callisto, A., Strutz, J., Glaser, J., Reza Kalhor, Boyden, E. S., Church, G., &Kording, K., Keith, E. J., Tyo, E. (2021). Recording temporal signals with minutes resolution using enzymatic DNA synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 143(40), 16630–16640.

76. Zhang, Y., Zhu, L., Tian, J., Zhu, L., Ma, X., He, X., Huang, K., Ren, F., & Xu, W. (2021). Adv. Sci., 8, 1–28.

77. Keller, S., & Marx, A. (2011). The use of enzymes for construction of DNA-based objects and assemblies. *Chemical Society Reviews*, 40(12), 5690–5697.

78. Xiang, B., He, K., Zhu, R., Liu, Z., Zeng, S., Huang, Y., Nie, Z., & Yao, S. (2016). Self-assembled DNA hydrogel based on enzymatically polymerized DNA for protein encapsulation and enzyme/DNAzyme hybrid cascade reaction. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(35), 22801–22807.

79. Yang, Y., Lu, Q., Huang, C. M., Qian, H., Zhang, Y., Deshpande, S., Arya, G., Ke, Y., &Zauscher, S. (2021). Programmable site-specific functionalization of DNA origami with polynucleotide brushes. *AngewandteChemie International Edition*, 60, 23241–23247.

80. Du, Y.-C., Wang, S.-Y., Wang, Y.-X., Ma, J.-Y., Wang, D.-X., Tang, A.-N., & Kong, D.-M. (2021). Terminal deoxynucleotidyl transferase combined CRISPR-Cas12a amplification strategy for ultrasensitive detection of uracil-DNA glycosylase with zero background. *Biosensors and Bioelectronics*, 171, 112734.

81. Chen, X., Cao, G., Wang, X., Ji, Z., Xu, F., Huo, D., Luo, X., & Hou, C. (2020). Terminal deoxynucleotidyl transferase induced activators to unlock the trans-cleavage of CRISPR/Cpf1 (TdT-IU-CRISPR/Cpf1): An ultrasensitive biosensor for Dam MTase activity detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 163, 112271.

82. Du, Y.-C., Wang, S.-Y., Li, X.-Y., Wang, Y.-X., Tang, A.-N., & Kong, D.-M. (2019). Terminal deoxynucleotidyl transferase-activated nicking enzyme amplification reaction for specific and sensitive detection of DNA methyltransferase and polynucleotide kinase. *Biosensors and Bioelectronics*, 145, 111700.

83. Yan, Y., Zhao, H., Fang, Y., Ma, C., & Chen, J. (2022). Label-free miRNA-21 analysis based on strand displacement and terminal deoxynucleotidyl transferase-assisted amplification strategy. *Biosensors*, 12(5), 328.

84. Huang, Z., Lin, Q., Ye, X., Yang, B., Zhang, R., Chen, H., Weng, W., & Kong, J. (2020). Terminal deoxynucleotidyl transferase based signal amplification for enzyme-linked aptamer-sorbent assay of colorectal cancer exosomes. *Talanta*, 218, 121089.

85. Deng, Y., Peng, Y., Wang, L., Wang, M., Zhou, T., Xiang, L., Yang, J., & Li, G. (2022). Target-triggered cascade signal amplification for sensitive electrochemical detection of SARS-CoV-2 with clinical application. *Analytica Chimica Acta*, 1208, 339846.

86. Wang, M., Yin, H., Zhou, Y., Han, J., He, T., Cui, L., & Ai, S. (2018). Photoelectrochemical biosensor for microRNA detection based on multiple amplification strategies. *Microchimica Acta*, 185(5), 257.

87. Zheng, J., Shi, H., Wang, M., Duan, C., Huang, Y., Li, C., Xiang, Y., & Li, G. (2019). Homogenous electrochemical method for ultrasensitive detection of tumor cells designed by introduction of poly(A) tails onto cell membranes. *Analytical Chemistry*, 92(2), 2194–2200.

88. Liu, Z., Liu, T., Tao, C., Chen, X., Huang, J., Wang, F., & Wang, J. (2020). Amplified analysis of DNA or proteins by TdT-generated DNAzyme. *Analytical Sciences*, 36(7), 835–840.

89. Vacacela, J., Schaap-Johansen, A.-L., Manikova, P., Marcatili, P., Prado, M., Sun, Y., & Ashley, J. (2022). The protein-templated synthesis of enzyme-generated aptamers. *AngewandteChemie International Edition*, 61(17), e202201061.

90. Klingler, C., Ashley, J., Shi, K., Stiefvater, A., Kyba, M., Sinnreich, M., Aihara, H., &Kinter, J. (2020). DNA aptamers against the DUX4 protein reveal novel therapeutic implications for FSHD. *The FASEB Journal*.

Applications of Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Enzyme

Koulani M. and Emamzadeh R.

Department of Cellular and Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Biosciences and Technology, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran.

Abstract

Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) is a DNA polymerase of the pol X family that, unlike other nucleotidyl transferases, binds natural and unnatural nucleotides to the 3′-hydroxy end of single-stranded, double-stranded DNA or RNA without the need for a template strand. This unique feature has wide application in the construction of biosensors. Like other polymerases, TdT requires metal ions for phosphoryl transfer and can use ions such as Co^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, and Mg^{2+}. The importance of this enzyme stems from its wide applications in biomedicine and biotechnology. In biomedicine, it is used as a biomarker in the diagnosis and classification of hematological malignancies, especially acute lymphoblastic leukemia (ALL), and in the TUNEL assay to detect apoptosis. In biotechnology, TdT is a key tool in DNA labeling, aptamer development, enzymatic synthesis of oligonucleotides, polynucleotide design, fabrication of DNA nanostructures, and development of sensitive biosensors for pathogen detection. Recent innovations indicate its use in DNA-based data storage and hybrid systems such as TdT-CRISPR and functional nanoparticles. This review provides a comprehensive overview of the biochemical properties, physiological roles, diagnostic significance, and biotechnological applications of TdT, while highlighting recent advances in enzyme engineering and future research directions.

Keywords: Terminal deoxynucleotidyl transferase, Biomedicine, Biotechnology, Cancer detection, DNA nanotechnology