

大肠杆菌聚合酶 I 大片段

rp221816

本公司生产的大肠杆菌聚合酶 I 大片段即 Klenow Fragment, 又称 Klenow 片段, Klenow Fragment 保留了 DNA 聚合酶 I 的 5'→3'聚合酶活性和 3'→5'外切酶活性, 但缺少完整的 Klenow 酶的 5'→3'外切酶活性。Klenow Fragment 的 3'→5'外切酶活性保证了其合成 DNA 时的准确性(proofreading)。

来源 (Source)	大肠杆菌重组表达
分子量 (Molecular Weight)	约 68kDa(单体)。
外观 (Appearance)	无菌液体
保存液 (Storage Buffer)	25mM Tris-HCl (pH7.5), 0.1mM EDTA,1mM DTT,50%(v/v) glycerol.
酶浓度 (Enzyme Concentration)	5U/μL
活性定义 (Activity Definition)	37℃ 30 分钟时间内, 催化 10nmol 脱氧核糖核苷酸(dNTPs)掺入到多聚核苷酸中所需的酶量定义为 1 个活性单位。

组分和说明

Component	200U	1KU	5*1KU	Storage
Klenow Fragment(5U/μl)	40μl	200μl	5*200μl	-20℃.Avoid freeze/thaw cycle.
Reaction Buffer(10X)	200μl	1ml	5*1ml	-20℃.Avoid freeze/thaw cycle.

产品应用

双链 DNA 5'突出(5' overhang)末端的补平(fill-in); 双链 DNA 3'突出(3' overhang)末端的打平(也称削平); 5'突出末端的标记; 随机引物法进行 DNA 标记; Sanger 双脱氧法进行 DNA 测序; cDNA 第二链的合成或定点突变反应第二链的合成。

产品优势

对于 5'突出或 3'突出的粘末端都可以催化产生平末端, 用于后续的平端连接。

使用说明

1.双链 DNA 5'突出末端的补平:

a.对于双链 DNA 5'突出末端的补平, 参考下表在冰浴中配制如下反应体系。

Reagent	Volume	Final Concentration
Nuclease-Free Water	(16.6-x)μl	-
dsDNA with 5' Overhang	xμl	~0.5μM or 5-200ng/μl

Reaction Buffer (10X)	2μl	1X
dNTP Mix (2.5mM each)	0.4μl	50μM
Klenow Fragment (5U/μl)	1μl	0.25U/μl
Total Volume	20μl	-

注 1: 按上表设置好反应体系后, 轻轻混匀(可以用移液器吹打混匀或用 Vortex 在最低速度轻轻混匀), 随后离心沉淀液体; 如果同时进行多个反应, 可以把上表中除 dsDNA with 5' overhang 之外的所有溶液和酶提前混合, 分装到各反应管, 最后再加入 dsDNA with 5' overhang。

注 2: dsDNA with 5' Overhang 如果是寡核苷酸, 最终浓度可以约为 0.5μM, 如果是消化后的 DNA 质粒等最终浓度可以约为 5-200ng/μl。

b.反应条件: 37℃孵育 10 分钟。

c.终止反应: 75℃孵育 10 分钟以终止反应。

2.双链 DNA 3'突出末端的打平:

a.具有 3'突出末端的杂交双链 DNA 的退火。将单链 DNA 1 和 DNA 2 等摩尔数混合, 推荐的终浓度为 10μM, 95℃孵育 2min, 然后通过梯度降温至 25℃退火形成具有 3'突出末端的杂交双链 DNA。并按照该产品使用说明进行退火反应(退火后的双链 DNA 推荐在-20℃保存)。

b.对于双链 DNA 3'突出末端的打平, 参考下表在冰浴中配制如下反应体系。

Reagent	Volume	Final Concentration
Nuclease-Free Water	(17-x)μl	-
dsDNA with 3' Overhang	xμl	~0.5μM or 5-200ng/μl
Reaction Buffer (10X)	2μl	1X
Klenow Fragment (5U/μl)	1μl	0.25U/μl
Total Volume	20μl	-

注 1: 按上表设置好反应体系后, 轻轻混匀(可以用移液器吹打混匀或用 Vortex 在最低速度轻轻混匀), 随后离心沉淀液体; 如果同时进行多个反应, 可以把上表中除 dsDNA with 3' overhang 之外的所有溶液和酶提前混合, 分装到各反应管, 最后再加入 dsDNA with 5' overhang。

注 2: dsDNA with 3' Overhang 如果是寡核苷酸, 最终浓度可以约为 0.5μM, 如果是消化后的 DNA 质粒等最终浓度可以约为 5-200ng/μl。

c.37℃孵育 10 分钟。

d.75℃孵育 10 分钟以终止反应。

3. 双链 DNA 5'突出(5'overhang)末端的标记:

a.参考如下表格设置反应体系:

Reagent	Volume
dsDNA with 5' Overhang	10~15μl (0.1~4μg)
Reaction Buffer (10X)	2μl

[α -32P]-dNTP, ~15-30 TBq/mmol(400-800Ci/mmol)	0.74 MBq (20 μ Ci)
或[α -32P]-dNTP, ~110 TBq/mmol(3000Ci/mmol)	2.96 MBq (80 μ Ci)
3 dNTP Mixture (2.5mM each , without the labeled dNTP)	2 μ l
Klenow Fragment	0.2 μ l (1U)
补充无核酸酶的去离子水	至 20 μ l

b.按上述体系配好之后, 轻轻混匀(可以用移液器吹打混匀或用 Vortex 在最低速度轻轻混匀), 随后离心沉淀液体。

c.30℃孵育 15 分钟。

d.75℃孵育 10 分钟终止反应。

保存条件:

长期储存-20℃ (24 个月) ; 避免反复冻融。

注意事项:

- 1.酶使用时宜存放在冰盒内或冰浴上, 使用完毕后宜立即放置于-20℃保存。
- 2.本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 3.为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。