

Klenow Fragment, Exo- K747451

储存条件

储存在-20℃条件下，避免反复冻融。

产品说明书

本公司生产的 Klenow Fragment, Exo-，即没有外切酶活性的 Klenow 片段，是大肠杆菌聚合酶 I (E.coli. DNA polymerase I)的大片段(Large Fragment)缺失了外切酶活性的突变体。Klenow Fragment, Exo-保留了 DNA 聚合酶 I 的 5'→3'聚合酶活性，但缺少完整的 Klenow 酶的 5'→3' 和 3'→5'外切酶活性。

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/ μ L
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

K747451	Component	200U	1KU	5*1KU	Storage
K747451A	Klenow Fragment, Exo- (5 U/μl)	40μl	200μl	5*200μl	-20℃. Avoid freeze/thaw cycle.
K747451B	Reaction Buffer(10X)	200μl	1ml	5*1ml	-20℃. Avoid freeze/thaw cycle.

产品应用

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 测序等。

产品优势

由于 Klenow Fragment, Exo-没有外切酶活性，其在末端补平时经常会在 3'末端额外加上 1 个或多个核苷酸，因此不能用于产生平末端而用于后续的连接。

使用说明

1. 随机引物法进行 DNA 标记:

a. 参考如下表格设置反应体系:

Reagent	Volume
DNA 10 μ l	(100ng)
Reaction Buffer (10X)	5 μ l
125 μ M random decamer or hexamer primer	10 μ l
补充无核酸酶的去离子水	至 40 μ l
混匀后沸水浴孵育 5-10 分钟, 立即置于冰浴冷却。进行后续步骤前离心沉淀液	
3 dNTP Mixture (0.25mM each , without the labeled dNTP)	4 μ l
[α -32P]-dNTP, ~110 TBq/mmol (3000Ci/mmol)	1.85MBq (50 μ Ci)
Klenow Fragment, Exo-	1 μ l (5U)
补充无核酸酶的去离子水	至 50 μ l

b. 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。

c. 对于 random decamer primer, 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟; 对于 random hexamer primer, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟。

d. 加入 4 μ l 0.25mM dNTP, 混匀后 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟。

e. 加入 1 μ l 0.5M EDTA, pH8.0 终止反应。

f. 取 1 μ l 上述液体用于检测标记的效率。

g. 用 Sephadex G-50 或 Bio-Gel P-60 或其它适当试剂盒纯化标记好的探针。

2. 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
Digested DNA	10~15 μ l (0.1~4 μ g)
Reaction Buffer (10X)	2 μ l
[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, Exo-	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 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟。

d. 75 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟终止反应。

3.双链 DNA 5'突出末端的补平:

a.对于双链 DNA 5'突出(5' overhang)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) μ l	-
dsDNA with 5' Overhang	x μ l	\sim 0.5 μ M or 5-200ng/ μ l
Reaction Buffer (10X)	2 μ l	1X
dNTP Mix (2.5mM each)	0.4 μ l	50 μ M
Klenow Fragment, Exo- (5U/ μ l)	1 μ l	0.25U/ μ l
Total Volume	20 μ l	-

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0.5 μ M, 如果是消化后的DNA质粒等最终浓度可以约为 5-200ng/ μ l。

b.37 $^{\circ}$ C孵育 10 分钟。

c.75 $^{\circ}$ C孵育 10 分钟以终止反应。

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 $^{\circ}$ C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。