

版本号: M16B01V1.0



DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment

TEL: 400-999-6126

WEB: www.abclonal.com.cn

目录号: RK20525

规格: 200 U / 1,000 U / 5,000 U

浓度: 5,000 U/mL

产品组成:

DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	RM20515
10X ABuffer B	RM20126

产品说明

DNA 聚合酶 I, Klenow 片段是大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的水解产物, 具有 DNA 聚合酶活性和 3'-5' 外切酶活性, 但缺失 5'-3' 外切酶活性。Klenow 片段保留了全酶的保真性且不降解扩增产物的 5' 末端。

Klenow 片段适用于 Sanger 法 DNA 测序、补平 5' 粘性末端或外切 3' 粘性末端成为平末端、cDNA 的二链合成以及突变实验的二链合成。

产品来源

缺失 5'-3' 核酸外切酶活性结构域序列的 *E.coli* polA 基因在大肠杆菌中诱导表达并经过分离纯化得到。

活性定义

1 活性单位(U)指在 37°C 30 min 内, 将 10 nmol 脱氧核苷酸掺入到酸不溶性物质所需的酶量。

反应条件

1X ABuffer B, 25°C 反应

1X ABuffer B 组成

10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.9 @ 25°C

保存温度

-20°C

酶存储液

25 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% Glycerol, pH 7.4 @25°C

热失活: 75°C 加热 20 min

理论分子量: 68 kD

5'-3' 核酸外切酶活性: 无

3'-5' 核酸外切酶活性: 有

出错率: 约 18×10^{-6} 碱基

操作说明

使用 DNA 聚合酶 I, Klenow 片段补平 5' 粘性末端或外切 3' 粘性末端成为平末端的操作步骤如下:

1. DNA 溶解到 ABuffer A / B / C / S 或 T4 DNA 连接酶反应缓冲液中, 并补加 dNTPs 到终浓度为 33 μ M, 使最终反应缓冲液浓度为 1X。
2. 在反应体系中, 每微克 DNA 需加入 1 U Klenow 酶, 并充分混匀。
3. 置于 25°C 反应 15 min。
4. 加入终浓度为 10 mM 的 EDTA 或 75°C 加热 20 min 以终止反应。

注意事项

- 升高温度、酶量过多、dNTPs 不足或反应时间过长时, 都会因其 3'-5' 外切酶活性产生带有 5' 粘性末端的扩增产物。
- 当 Klenow 片段用于 Sanger 法 DNA 测序时, 推荐向 5 μ L 反应体系中加入 1 U 的 Klenow 酶。
- 补充 dNTPs 后, Klenow 酶在 1X ABuffer A / B / C / S 和 T4 DNA 连接酶反应缓冲液中均有活性。

质量控制

- ◆ SDS-PAGE 检测蛋白纯度大于 95%。
- ◆ 无 RNA 酶活性。
- ◆ PCR 检测无宿主基因组残留。