

产品组分

组分名称	组分目录号	浓度	规格-1 200 U	规格-2 1,000 U	规格-3 5,000 U
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	RM20515	5,000 U/mL	40 μ L	200 μ L	1 mL
10X ABuffer B	RM20126	10X	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL $\times$ 4

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。

保存温度

-20°C

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

酶储存液

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

热失活

75°C, 20 min

理论分子量

68 kD

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

- 1、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。
- 2、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。
- 3、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。