

ExCell Bio

Klenow 酶

User Manual

Catalog Number MB000-1561
 MB000-1562
 MB000-1563
 MB000-1564



产品概述

Klenow 酶是 DNA 聚合酶 I 的大片段。该酶具有 5' -3'聚合酶活性和 3'-5'外切核酸酶活性，但是缺乏 5' -3'外切核酸酶活性。

含有大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段的重组表达质粒，经过原核表达纯化制成，分子量为 70KDa，N 端含有 6 个 His。

技术参数

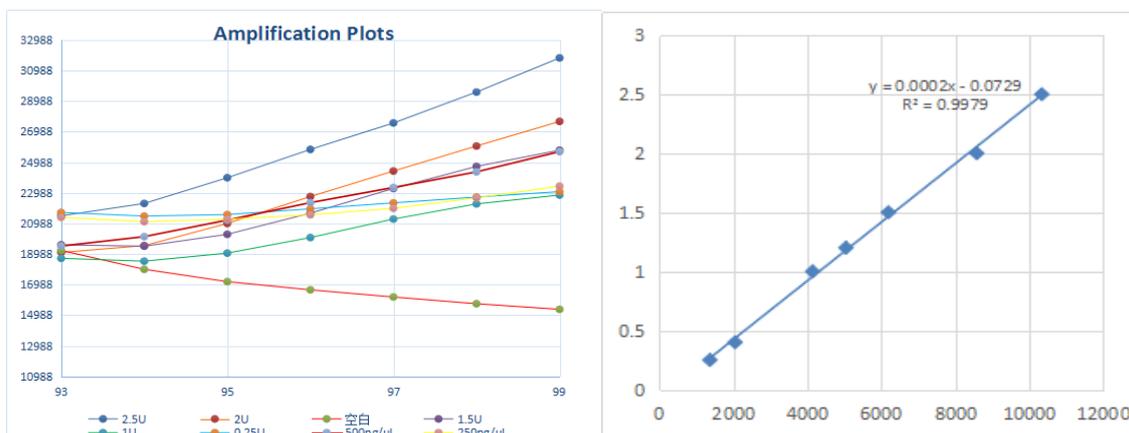
酶储存溶液	25 mM Tris-HCl (pH 7.4@ 25°C), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT ,50%(v/v) Glycerol.
10x 酶反应液	100 mM Tris-HCl (pH 7.9 , @25°C), 500 mM NaCl, 100 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT
纯度	经过 SDS-PAGE 和考马氏亮蓝染色, 灰度扫描分析, 纯度大于 95%。
核酸内切酶活性	50 个活性单位的该酶与 1 μ g ϕ x174 RFI 型 DNA 37°C 温浴 4 小时, 转变成 RFII 型的比例小于 10%。
活性单位浓度	5,000 U/ml

活性分析

1个活性单位是指在37°C，30分钟内将10 nmol dNTPS掺入到酸不溶性沉淀物所需要的酶量

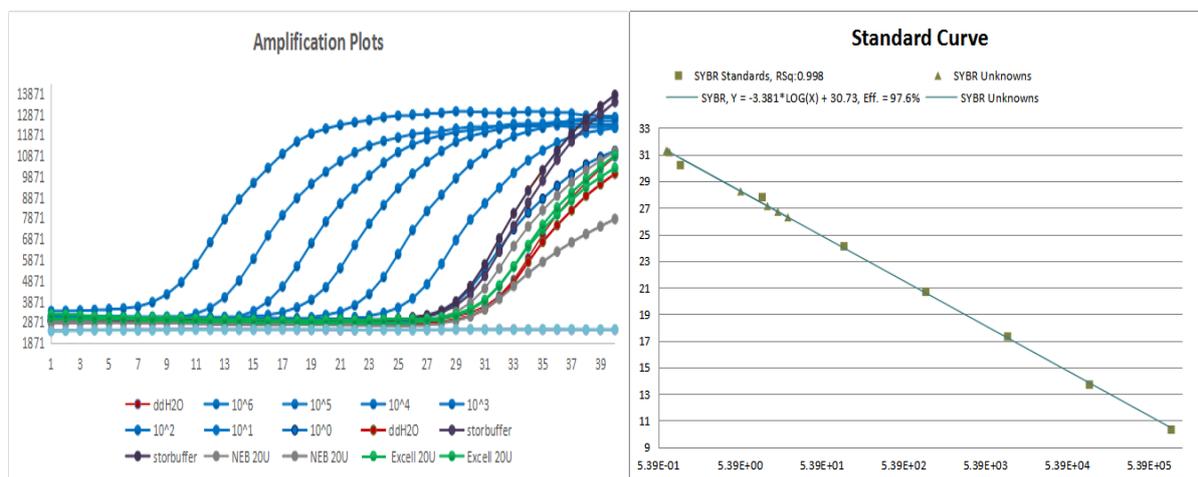
相关数据

1. 活力测定



采用特定的模板和单引物进行扩增,将国外著名品牌公司的酶做系列稀释,在反应体系中加0.25-2.5 U 的酶,在反应的起始阶段其荧光增量与酶量呈现出线性关系,本公司生产的酶与国外著名品牌公司的酶比活力相当。

2. 大肠杆菌基因组残留



Sample	CT	Mean CT	Copy
DDH20	31.9303	31.88168	0.1699
	31.8329		
Reaction Buffer	29.8788	29.8788	0.7052
	29.4150		
NEB	30.2603	30.2603	0.5377
	31.5999		
Excell	31.0975	31.0975	0.2966
	31.2455		

采用 QPCR 方法, E.coli 基因组 DNA (gDNA) 做系列稀释, 做标准曲线, 测量成品中 1 μ l 酶液中含有的大肠杆菌基因组残留拷贝数, 根据 CT 与拷贝数的关系, 得出 1 μ l 酶液中含有的大肠杆菌基因组残留拷贝数小于 1 个拷贝。

产品应用

双链 DNA 5'突出末端补平;

3'突出端切除形成平末端;

随机引物进行 DNA 标记;

cDNA 第二链的合成;

双脱氧法 DNA 序列测定 (Sanger 法)。

产品规格

	货号	规格
1	MB000-1561	100U
2	MB000-1562	200U
3	MB000-1563	1,000U
4	MB000-1564	5,000U

产品组分及储存条件

货号	规格	组分	
		Klenow 酶	10× Reaction Buffer
MB000-1561	100U	1 管	0.2 mlx1 管
MB000-1562	200U	1 管	0.5 mlx1 管
MB000-1563	1,000U	1 管	1 mlx1 管
MB000-1564	5,000U	1 管	1 mlx5 管

-20°C条件下运输和保存。

实验流程

以随机引物制备探针反应为例

(1) 在微量离心管中配制下列反应液

Template DNA	25 ng
随机引物(6-9 mer)(1 nmol/μl)	2 μl
H ₂ O	Up to 14 μl

(2) 95°C 反应 3 min, 然后冰上冷却 5min。

(3) 再加入以下反应体系

10x Reaction Buffer	2.5 μ l
dNTP (0.2 mM dATP,dGTP,dTTP)	2.5 μ l
111TBq/mmol [α - ³² P]dCTP (3000 Ci/mmol)	5 μ l
Klenow (3'-5'exo ⁻) (5 U/ μ l)	1 μ l
Total volume	25 μ l

(4) 37°C 反应 3 小时, 之后 65°C 加热 5 分钟, 反应液可直接作为杂交探针溶液使用 (如有必要, 可以通过凝胶过滤或乙醇沉淀的方法, 除去未反应的标记的 dCTP)

注意事项

1. 双脱氧法 DNA 序列测定时, 建议在每 5 μ l 的反应体系中加入 1 单位的 Klenow 酶。
2. 由于不含有 5'-3'的外切核酸酶活性, 因此不可以用于切口平移标记探针。
3. 在 DNA 5'突出末端补平或 3'突出端切除形成平末端时建议 1 μ g DNA 加入 1 单位的酶, 25°C 温浴 15 分钟, 再 75 °C 加热 20 分钟终止反应, 当提高温度, 增加酶量, 没有添加 dNTPS 或延长温浴时间均会由于 3'-5'外切核酸酶活性而导致末端缺陷。
4. 可以用于双链 DNA 末端以及缺口 (Gap) 的修复。
5. 若用于 5'突出末端的修饰时, 补平后有时会多加一个碱基 (通常是 A 碱基)
6. 75 °C 加热 20 分钟可以失活。