

Klenow Fragment

REF: EG26109S

储存条件

-20℃保存 2 年

产品组成

组分	规格
Klenow Fragment (5 U/μl)	40 μl
10× Cut Buffer G	1.25 ml

产品简介

Klenow Fragment, 是大肠杆菌聚合酶 I (*E.coli* DNA polymerase I) 的大片段 (Large Fragment), 在大肠杆菌中表达纯化后获得。与大肠杆菌聚合酶 I 相比, Klenow Fragment 缺失了 5'→3' 外切酶活性, 但保留了 DNA 聚合酶 I 的 5'→3' 聚合酶活性和 3'→5' 外切酶活性。因此, Klenow Fragment 保留了聚合酶 I 的聚合保真度的同时不会降解 DNA 的 5' 末端, 适用于 Sanger 法 DNA 测序、cDNA 的第二链合成等。

活性定义

1 单位是指在 37℃ 条件下, 30 分钟能使 10 nmol 的 dNTP 掺入酸不溶物所需的酶量。

产品应用

1. Sanger 法 DNA 测序;
2. 双链 DNA 5' 突出末端的补平;
3. 双链 DNA 3' 突出末端的削平;
4. 使用随机引物进行 DNA 标记;
5. 寡核苷酸定向诱变中双链 DNA 的合成;
6. cDNA 第二链的合成或定点突变反应第二链的合成等。

质量控制

蛋白纯度

经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 蛋白纯度不低于 95%。

非特异性内切酶活性

37℃ 下, 在 20 μl 反应体系中将 5 U Klenow Fragment 与 200 ng 超螺旋质粒 DNA 共同温育 4 h, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 少于 20% 的质粒 DNA 转变成缺刻或线性状态。

DNase 活性

37℃ 下, 在 20 μl 反应体系中将 5 U Klenow Fragment 与 15 ng 双链 DNA 片段共同温育 16 h, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 双链 DNA 片段无变化。

RNase 活性

37℃ 下, 在 10 μl 反应体系中将 5 U Klenow Fragment 与 500 ng RNA 共同温育 1 h, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 超过 90% 的 RNA 保持完整。

宿主 DNA 残留

采用中国药典 2025 版四部通则 3407 外源性 DNA 残留量测定法第三法定量 PCR 法, 本品中大肠杆菌宿主细胞 DNA 残留量低于 1 拷贝 /5 U。

使用方法

5' 突出末端补平

① 在冰上配制以下反应体系:

试剂	使用量
DNA	0.1~4 μg
10× Cut Buffer G	2 μl
dNTP (2.5 mM)	0.4 μl
Klenow Fragment (5 U/μl)	0.2~1 μl ^a
ddH ₂ O	Up to 20 μl

a. 酶量过高会抑制反应。

- ② 轻柔吸打或轻弹管壁以混匀, 然后瞬时离心收集挂壁液滴;
- ③ 37℃ 孵育 10 min;
- ④ 75℃ 孵育 10 min 终止反应。

注意事项

1. 由于酶的 3'→5' 核酸外切酶活性, 升高反应温度、加入过量的酶、未加入 dNTP 或反应时间过长皆可导致凹陷末端的形成。
2. 剧烈振荡会使酶失去活性。
3. 金属离子螯合剂、无机焦磷酸盐、高浓度的无机磷酸盐对酶有抑制作用。
4. Klenow Fragment 在限制性内切酶、PCR 和 RT 缓冲液中均有活性。
5. 本产品仅作科学研究使用, 不得用于其它用途。
6. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并佩戴一次性手套操作。