

Klenow Fragment, exo-

REF: EG26110S

储存条件

-20℃保存 2 年

产品组成

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

产品简介

Klenow Fragment, exo-, 是在大肠杆菌聚合酶 I 大片段 (Klenow Fragment) 基础上进一步突变去除了 3'→5' 外切酶活性的突变体。与大肠杆菌聚合酶 I 相比, Klenow Fragment, exo- 仅保留了 5'→3' 聚合酶活性, 缺失 5'→3' 外切酶活性和 3'→5' 外切酶活性。此外, Klenow Fragment, exo- 具有一定的链置换活性。Klenow Fragment, exo- 适用于随机引物法进行 DNA 标记、Sanger 法 DNA 测序、cDNA 的第二链合成等。由于 Klenow Fragment, exo- 缺少外切酶活性, 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, 而用于连接反应。

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. 使用随机引物进行 DNA 标记;
3. 用随机引物制备探针;
4. 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, exo- 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 转变成缺失或线性状态。

DNase 活性

37℃ 下, 在 20 μl 反应体系中将 5 U Klenow Fragment, exo- 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, exo- 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

末端加 A

① 在冰上配制以下反应体系:

试剂	使用量
DNA	1~5 μg (100~1000 bp)
10× Cut Buffer G	5 μl
dATP (10 mM)	0.5 μl
Klenow Fragment, exo- (5 U/μl)	3 μl
ddH ₂ O	Up to 50 μl

- 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 30 min;
- ④ 75℃ 孵育 10 min 终止反应。

注意事项

1. Klenow Fragment, exo- 缺少外切酶活性, 不能用于生成平末端的实验。
2. 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。
3. Klenow Fragment, exo- 在限制性内切酶、PCR 和 RT 缓冲液中均有活性。
4. 本产品仅作科学研究使用, 不得用于其它用途。
5. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并佩戴一次性手套操作。