



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
 订货热线: 400-168-3301或800-8283301
 订货e-mail: order@beyotime.com
 技术咨询: info@beyotime.com
 网址: http://www.beyotime.com

Klenow Fragment, Exo-

产品编号	产品名称	包装
D7039	Klenow Fragment, Exo-	100U

产品简介:

- Klenow Fragment, Exo-, 即没有外切酶活性的Klenow片段, 是大肠杆菌聚合酶I (E.coli DNA polymerase I)的大片段(Large Fragment)缺失了外切酶活性的突变体。Klenow Fragment, Exo-保留了DNA聚合酶I的5'→3' 聚合酶活性, 但缺少完整的Klenow酶的5'→3' 和3'→5'外切酶活性。
- **特点:** 由于Klenow Fragment, Exo-没有外切酶活性, 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后续的连接。
- **用途:** 5'突出末端的标记; 随机引物法进行DNA标记; Sanger双脱氧法进行DNA测序等。
- **来源:** 由大肠杆菌表达, 表达基因的来源为突变的 polA 基因片段。
- **分子量:** 约68kDa(单体)。
- **活性定义:** 37°C 30分钟内, 催化10nmol脱氧核糖核苷酸(dNTPs)掺入到多聚核苷酸中所需的酶量定义为1个活性单位。
- **酶活性检测条件:** 67mM potassium phosphate (pH7.4), 6.7mM MgCl₂, 1mM 2-mercaptoethanol, 0.033mM dATP, 0.033mM dTTP, 0.4MBq/ml [³H]-dTTP, 62.5μg/ml poly(dA-dT)•poly(dA-dT)。
- **纯度:** 不含DNA内切酶, 不含RNase。
- **酶储存溶液:** 25mM Tris-HCl (pH7.5), 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 50% (v/v) glycerol。
- **Reaction Buffer (10X):** 500mM Tris-HCl (pH8.0 at 25°C), 50mM MgCl₂, 10mM DTT。
- **缓冲液兼容性:** 在碧云天的内切酶反应缓冲液1X O、1X R、1X Y、2X Y中的活性为100%, 在1X B、1X G中的活性为100%; 在碧云天的Taq、Pfu DNA polymerase和M-MuLV反应缓冲液中的活性为100%。
- **失活或抑制:** 75°C加热10分钟或加入适量EDTA均可导致Klenow Fragment, Exo-失活。金属离子螯合剂, 无机焦磷酸盐(Pi), 大剂量的无机磷酸盐(Pi)均对Klenow Fragment, Exo-有抑制作用。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7039-1	Klenow Fragment, Exo- (5U/μl)	100U
D7039-2	Reaction Buffer (10X)	0.3ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存。

注意事项:

- 酶使用时宜放在冰盒内或冰浴上, 使用完毕后宜立即放置于-20°C保存。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 随机引物法进行DNA标记:

a. 参考如下表格设置反应体系:

DNA	10μl(100ng)
Reaction Buffer (10X)	5μl
125μM random decamer or hexamer primer	10μl
补充无核酸酶的去离子水	至40μl
混匀后沸水浴孵育5-10分钟, 立即置于冰浴冷却。进行后续步骤前离心沉淀液	
3 dNTP Mixture (0.25mM each, without the labeled dNTP)	4μl
[α- ³² P]-dNTP, ~110 TBq/mmol (3000Ci/mmol)	1.85MBq (50μCi)
Klenow Fragment, Exo-	1μl (5U)

补充无核酸酶的去离子水	至50 μ l
-------------	-------------

- b. 按上表设置好反应体系后，轻轻混匀(可以用移液器吹打混匀或用 Vortex 在最低速度轻轻混匀)，随后离心沉淀液体。
- c. 对于 random decamer primer, 37°C 孵育 5 分钟；对于 random hexamer primer, 37°C 孵育 10 分钟。
- d. 加入 4 μ l 0.25mM dNTP, 混匀后 37°C 孵育 5 分钟。
- e. 加入 1 μ l 0.5M EDTA, pH8.0 终止反应。
- f. 取 1 μ l 上述液体用于检测标记的效率。
- g. 用Sephadex G-50或Bio-Gel P-60或其它适当试剂盒纯化标记好的探针。

2. 双链DNA 5'突出(5' overhang)末端的标记:

- a. 参考如下表格设置反应体系:

Digested DNA	10~15 μ l(0.1~4 μ g)
Reaction Buffer (10X)	2 μ l
[α - ³² P]-dNTP, ~15-30 TBq/mmol(400-800Ci/mmol)	0.74 MBq(20 μ Ci)
或 [α - ³² P]-dNTP, ~110 TBq/mmol(3000Ci/mmol)	2.96 MBq(80 μ Ci)
3 dNTP Mixture (2.5mM each , without the labeled dNTP)	2 μ l
Klenow Fragment, Exo-	0.2 μ l (1U)
补充无核酸酶的去离子水	至20 μ l

- b. 按上述体系配好之后，轻轻混匀(可以用移液器吹打混匀或用 Vortex 在最低速度轻轻混匀)，随后离心沉淀液体。
- c. 30°C 孵育 15 分钟。
- d. 75°C孵育10分钟终止反应。

3. 其他用途可以参考上述用途或适当的文献资料进行。

Version 2016.11.02