

Klenow Fragment (exo-) 说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

描述:

Klenow 片段 (3' → 5' exo-) 是 DNA 聚合酶 I 的 N 末端截短物，它保留了 DNA 聚合酶活性，但失去了 5' → 3' 核酸外切酶活性。该酶进一步经突变 (D355A, E357A) 去除了其 3' → 5' 的核酸外切酶活性。因此该 DNA 聚合酶无任何外切酶活性，仅包含了 DNA 聚合酶活性，广泛用于标记探针制备、cDNA 第二条链的合成等建库试验。

组分

名称	1000U
Klenow Fragment(exo-) (5 U/μl)	200 μl
10×Klenow Buffer	1 ml

单位定义

一个活力单位即在 37° C 条件下, 30 分钟内催化 10 nmol dNTP 的掺入反应成为酸不溶性物质所需的酶量。

10×Klenow Buffer: 500 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 25 ° C), 50mM MgCl₂, 10 mM DTT. 该酶兼容 PCR Buffer 和内切酶 Buffer。

应用:

- (1) 用随机引物制备探针
- (2) 随机引物法标记 (3) cDNA 第二条链的合成
- (4) 该酶不能用于产物平端不齐

失活: 75° C, 20min 失活。

储存: -20°C 可保存 3 年。

随机引物生物素标记反应

1. 按以下组分配制反应液

<u>10×Klenow Buffer</u>	<u>5 μl</u>
<u>模板 DNA</u>	<u>0.1~2 μg</u>
<u>dATP dCTP dGTP (2 mM each)</u>	<u>0.5 μl</u>
<u>Biotin-dUTP or dATP(2 mM)</u>	<u>0.5 μl</u>
<u>random hexamer(125 μM)</u>	<u>10 μl</u>
<u>ddH₂O</u>	<u>Up to 50 μl</u>

95° C 5min 冰上放置 5min。

2. 聚合反应

加入 1 μ l Klenow Fragment(exo-), 混合均匀。37° C 反应 15min, 75° C 20min 失活。