

# 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

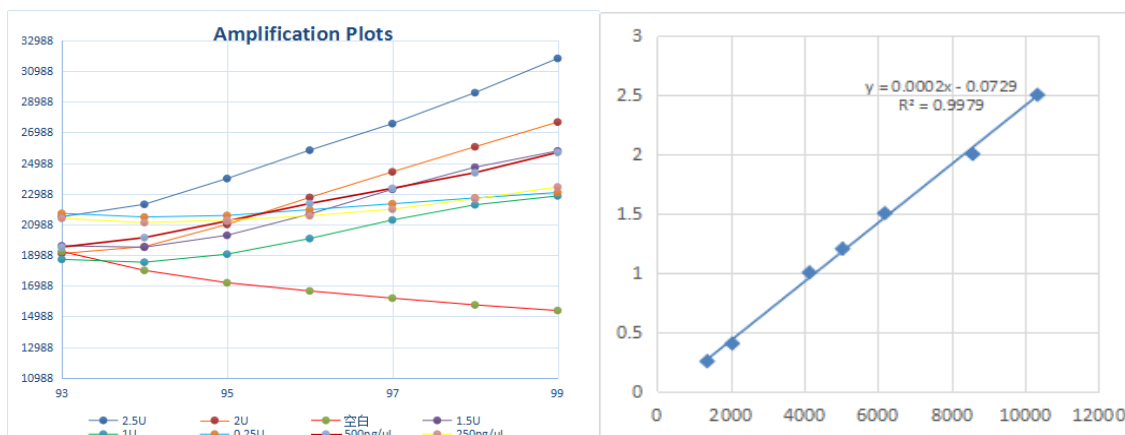
酶储存溶液	25 mM Tris-HCl (pH 7.4@ 25°C), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT ,50%(v/v) Glycerol.
10x 酶反应液	100 mM Tris-HCl (pH 7.9 , @25°C), 500 mM NaCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM DTT
纯度	经过 SDS-PAGE 和考马氏亮蓝染色, 灰度扫描分析, 纯度大于 95%。
核酸内切酶活性	50 个活性单位的该酶与 1μg øx174 RFI 型 DNA 37°C 温浴 4 小时, 转变成 RFII 型的比例小于 10%。
活性单位浓度	5,000 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

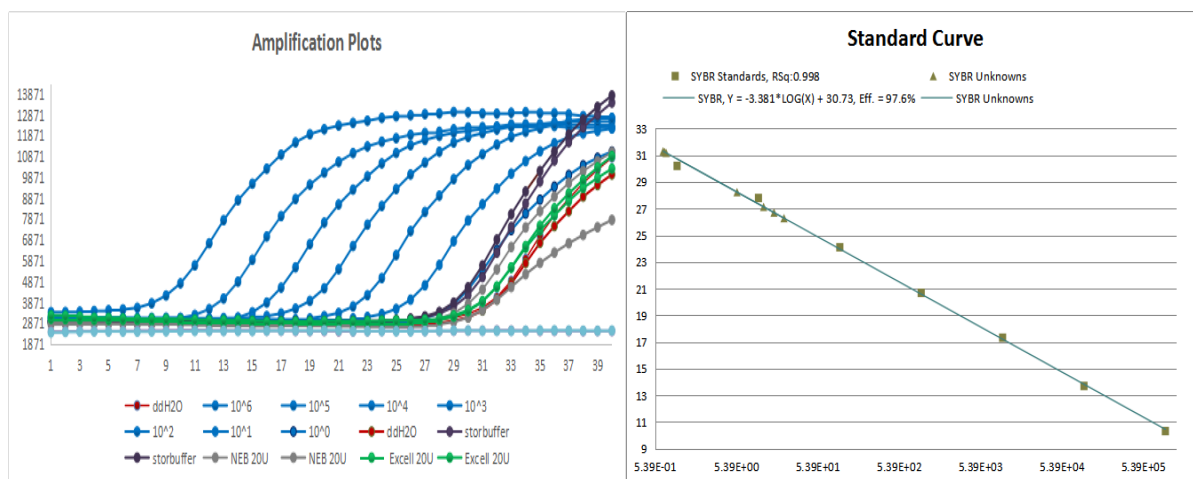
## 相关数据

### 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
DDH <sub>2</sub> O	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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 <sub>2</sub> 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 $\mu$ l
dNTP (0.2 mM dATP,dGTP,dTTP)	2.5 $\mu$ l
111TBq/mmol [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dCTP (3000 Ci/mmol)	5 $\mu$ l
Klenow (3'-5'exo <sup>-</sup> ) (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Total volume	25 $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\mu$ 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。