

ExCell Bio

Klenow (3'-5'exo-) 酶

User Manual

Catalog Number MB000-1551

MB000-1552

MB000-1553

MB000-1554



产品概述

Klenow (3'-5'exo-) 酶是DNA聚合酶I的大片段。该酶具有5' -3'聚合酶活性,但是缺乏3'-5'外切和5' -3'外切核酸酶活性。该酶3'-5'外切酶活性因活性位点突变而缺失。

含有突变的大肠杆菌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

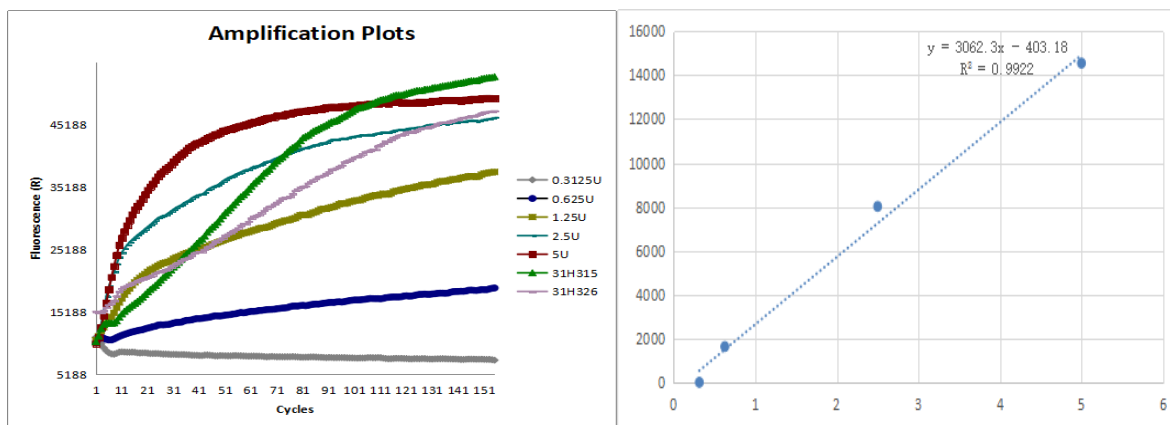
酶储存液	25 mM Tris-HCl (pH 7.4@ 25°C), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT ,50%(v/v) Glycerol
10x 酶反应液	100 mM Tris-HCl (pH 7.9 , @25°C), 500 mM NaCl, 100 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT
纯度	经过 SDS-PAGE 和考马氏亮蓝染色, 灰度扫描分析, 纯度大于 95%。
核酸外切酶活性	在 50μl 反应体系中, 200U 的本酶和 1μg λ DNA-Hind III 在 37°C 下温浴 4 小时后, DNA 的电泳谱带没有明显的涂抹和降解现象。
核酸内切酶活性	在 50μl 反应体系中, 50 个活性单位的该酶与 1μg ø x174 RFI 型 DNA 37°C 温浴 4 小时, 电泳显示小于 10% 的 RFI 型 DNA 变为 RFII 型。
大肠杆菌基因组残留	采用 QPCR 方法, 以 16S RNA 的保守序列进行扩增, 测得 5 U 中的大肠杆菌基因组残留小于 1 个拷贝。
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

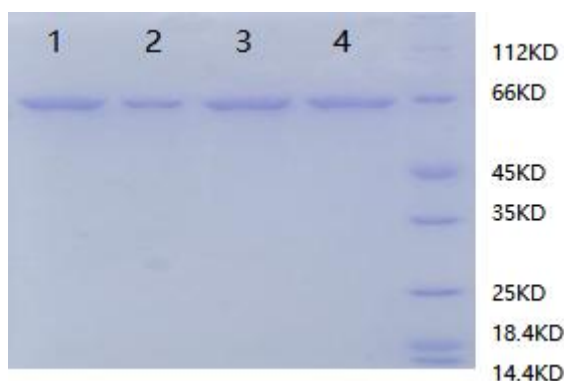
1. 活力测定



Klenow(3'-5' exo-)(批号: 31H315)和(批号: 31H326)活力测定扩增曲线和标准曲线

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 Klenow (3'-5'exo-) 酶做系列稀释, 在反应体系中加入 0.25-2U 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. 纯度测定



(1, 2 为批号: 31H315)和(3, 4 为批号: 31H326)

两批次的半成品经过 SDS-PAGE 电泳 (10%),考马氏亮蓝染色, 灰度扫描分析, 纯度大于 95%

产品应用

用随机引物制备探针;

双链DNA 5'突出末端补平或标记;

双脱氧法DNA序列测定 (Sanger法)

CDNA或诱变反应中第二链的合成。


产品规格

	货号	规格
1	MB000-1551	100U
2	MB000-1552	200U
3	MB000-1553	1,000U
4	MB000-1554	5,000U


产品组分及储存条件

货号	规格	组分	
		Klenow (3'-5'exo-) 酶	10× Reaction Buffer
MB000-1551	100U	1 管	0.2 mlx1 管
MB000-1552	200U	1 管	0.5 mlx1 管
MB000-1553	1,000U	1 管	1 mlx1 管
MB000-1554	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
H2O	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 μ l
dNTP (0.2 mM dATP,dGTP,dTTP)	2.5 μ l
111TBq/mmol [α - ³² P]dCTP (3000 Ci/mmol)	5 μ l
Klenow (3'-5'exo ⁻) (5 U/ μ l)	1 μ l
Total volume	25 μ 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. Klenow (3'-5'exo⁻) 酶因为缺失 3'-5'外切酶活性，此活性是去除非模板 3'突出端所必须的，所以该酶不适宜用于 3'突出端切除产生平末端的削平反应。
2. 双脱氧法 DNA 序列测定时，建议在每 5 μ l 的反应体系中加入 1 单位的 Klenow (3'-5'exo⁻) 酶。
3. 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）。
4. 75 °C 加热 20 分钟可以失活。