

# Klenow Fragment

(Large Fragment *E. coli* DNA Polymerase I)

Code No. 2140A

包装量: 200 U  
浓度: 5 U/ $\mu$ l

## 附带试剂:

10X Klenow Fragment Buffer 1 ml

## 制品说明:

本酶在 DNA 模板和引物存在的条件下, 选择性地催化底物 dNTP 沿 5'  $\rightarrow$  3' 方向合成与模板互补的 DNA<sup>1)</sup>。本酶是从大肠杆菌中纯化得到, 其中克隆了 2/3 的 *E. coli* DNA polymerase I 基因片段 (3' 端计算)。因此具有 3'  $\rightarrow$  5' 外切酶活性但是没有 5'  $\rightarrow$  3' 外切酶活性<sup>2)</sup>。

## 酶贮存溶液:

50 mM	Potassium Phosphate, pH6.5
1 mM	DTT
50%	Glycerol

保存: -20°C

## 起源:

*Escherichia coli* carrying the plasmid which encodes the gene of Klenow fragment

## 活性定义:

以合成的 Poly d (A-T) DNA 为模板/引物, 在 37°C、pH7.4 的条件下, 30 分钟内使 10 nmol 的全核苷酸掺入酸不溶性沉淀物所需要的酶量定义为 1 个活性单位 (unit)。

## 活性定义反应液:

67 mM	potassium phosphate, pH7.4
6.7 mM	MgCl <sub>2</sub>
0.1 mM	DTT
20 $\mu$ M	substrate DNA
33 $\mu$ M	dATP
33 $\mu$ M	[ <sup>3</sup> H] dTTP

## 质量控制:

请查阅各批次 Certificates of Analysis (CoA)。产品 CoA 请在 Takara Bio Inc. 网站中下载：  
[https://catalog.takara-bio.co.jp/search/doc\\_index.php](https://catalog.takara-bio.co.jp/search/doc_index.php)。

## 用途:

1. 双脱氧法 DNA 序列测定 (Sanger 法)<sup>3)</sup>。
2. 双链 DNA 5' 突出末端的平滑化<sup>4)</sup>。
3. 寡核苷酸定向诱变 (Oligonucleotide directed mutagenesis) 中双链 DNA 的合成<sup>5)</sup>。
4. 使用随机引物进行 DNA 标记。

## 使用注意:

1. 本酶有高度稳定性, 稀释时不失活, 但剧烈搅拌会失活。
2. 由于不含有 5'  $\rightarrow$  3' 的外切核酸酶活性, 因此不表现切口平移活性。适合双链 DNA 末端以及缺口 (Gap) 的修复。
3. 与 T4 DNA Polymerase 相比, 对模板高级结构的抵抗性能较好。
4. 由于对 DNA 的亲合性较强, 过量使用易发生凝集作用 (Aggregation) 从而抑制反应进行。
5. 若用于 5' 突出末端的修复时, 补平后有时会多加一个碱基<sup>6)</sup>。
6. 与 *E. coli* DNA Polymerase I 相同, ddNTPs 的掺入不受底物抑制。

## 添附 Buffer 组成 (保存: -20°C) :

10X Klenow Fragment Buffer	
100 mM	Tris-HCl, pH7.5
70 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	DTT

\*本 buffer 可用于标记或末端平滑化等常规实验。与活性定义所用 buffer 组成不同。

## 使用例:

随机引物的标记反应

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/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
灭菌水	up to 14 $\mu$ l

↓  
95°C 保温 3 分钟。

↓  
然后冰中急冷 5 分钟。

↓  
加入 2.5  $\mu$ l 10X Klenow Fragment Buffer。

↓  
加入 2.5  $\mu$ l dNTP (0.2 mM dATP, dGTP, dTTP)。

↓  
加入 5  $\mu$ l 111 TBq/mmol [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP  
(3000 Ci/mmol) (1.85 MBq, 50  $\mu$ Ci)

↓  
加入 1  $\mu$ l Klenow Fragment (2 U/ $\mu$ l), 共 25  $\mu$ l。

↓  
37°C 反应 3 小时。

↓  
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)。

## 参考文献:

- 1) Jacobsen H, Klenow H, and Overgaard-Hansen K. *Eur J Biochem.* (1974) **45**: 623-627.
- 2) Joyce C M, Kelley W S, and Grindley N D F. *J Biol Chem.* (1982) **257**: 1958-1964.
- 3) Sanger F, Nicklen S, and Coulson A R. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1977) **74**: 5463-5467.
- 4) Sambrook J, Fritsch E F, and Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* (1989) 5.40-5.43: Cold Spring Harbor Laboratory.
- 5) Norris K, Norris F, Christiansen L, and Fiil N. *Nucleic Acids Res.* (1983) **11**: 5103-5112.
- 6) Clark J M, Joyce C M, and Beardsley G P. *J Mol Biol.* (1987) **198**: 123-127.

## 注意

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。  
未经 Takara Bio Inc. 书面许可授权或批准, 不得制造、许诺销售、销售、进口 Takara 产品, 或者使用 Takara 产品所有的相关专利及相关商标。  
如果您需要其他用途的许可授权, 请联系我们, 或访问我们网站 [www.takarabio.com](http://www.takarabio.com)。  
您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。  
所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术 (北京) 有限公司翻译制作, 最新版本文件请参考 Takara Bio Inc. 网站。为正确使用 Takara 产品, 您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

v202107Da