

# DNA聚合酶 I (Klenow) 大片段

组分	#M0021	#M0022
DNA聚合酶I (Klenow) 大片段 (5 U/μl)	40 μl	40 μl×5
10× Klenow 缓冲液	1.5 ml	1.5 ml×5

**概述:** DNA聚合酶I (Klenow) 大片段是大肠杆菌DNA聚合酶I的蛋白水解物, 该酶具有DNA聚合酶活性和3'→5'核酸外切酶活性, 但失去了5'→3'核酸外切酶活性, 该酶不会降解5'末端DNA, 同时保留了高保真的聚合酶活性<sup>(1)</sup>。

**来源:** 来源于重组*E.coli*菌株, 该菌株含有DNA聚合酶I (Klenow) 大片段的表达载体。

**应用<sup>(2)</sup>:**

1. 双脱氧法DNA序列测定 (Sanger法)。
2. 5'突出末端的补平, 形成平末端。
3. 3'突出末端的切除, 形成平末端。
4. 合成cDNA第二条链。
5. 随机引物的标记。

**贮存溶液:** 25 mM Tris-HCl (pH 7.4 @ 25°C), 0.1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 50%甘油 (V/V)。

**反应条件:** 1×Klenow反应缓冲液, 添加dNTPs (不随酶附赠), 37°C温育。

**1×Klenow反应缓冲液:** 10 mM Tris-HCl (pH 7.9 @ 25°C), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT。

**活性定义:** 1单位指在37°C条件下, 反应30分钟能使10 nmol的dNTPs掺入酸不溶性沉淀物所需的酶量。

**活性检测条件:** 1×Klenow反应缓冲液中加入33 μM dNTPs包括[<sup>3</sup>H]-dTTP和70 μg/ml热变性鲑鱼精DNA。

**热失活条件:** 75°C加热20分钟失活。

## 质量控制检测:

**核酸内切酶活性:** 50 μl反应体系中, 50 U本酶与1 μg的pUC19质粒于37°C温育4小时, <10%的pUC19质粒由超螺旋变为缺刻状态。

**纯度:** 经SDS-PAGE (考马斯亮蓝染色) 检测其纯度大于95%。

## 注意事项:

使用时宜存放在冰盒或冰浴上, 使用完毕后立即放置于-20°C保存。

## 参考文献:

1. Jacobsen, H. et al. (1974). The N-terminal amino-acid sequences of DNA polymerase I from *Escherichia coli* and of the large and the small fragments obtained by a limited proteolysis. *Eur. J. Biochem.* 45, 623-627.
2. Sambrook, J. et al. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (3<sup>rd</sup> ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

## 应用:

**Klenow催化5'突出末端的补平。**

1. 反应体系配制:

线性DNA	10-15 μl (0.1-4 μg)
10× 反应缓冲液	2 μl
dNTPs, 每种2 mM	0.5 μl (终浓度0.05 mM)
Klenow (5 U/μl)	0.2-1 μl (1-5 U)
水	至20 μl

2. 充分混匀后37°C孵育10分钟。
3. 75°C加热20分钟终止反应。