

# Klenow片段 (3'→5'exo<sup>-</sup>)

组分	#M0211	#M0212
Klenow片段 (3'→5'exo <sup>-</sup> ) (5 U/μl)	40 μl	40 μl×5
10× Klenow (3'→5'exo <sup>-</sup> )缓冲液	1.5 ml	1.5 ml×5

**概述:** Klenow片段 (3'→5'exo<sup>-</sup>) 是大肠杆菌DNA聚合酶I的蛋白水解物。该酶保留了DNA聚合酶活性但失去了5'→3'核酸外切酶活性。该酶经突变 (D355A, E357A) 去除了其3'→5'核酸外切酶活性<sup>(1)</sup>。

**来源:** 重组*E. coli*菌株, 该菌株的质粒上携带有*E. coli*的polA基因的片段, 该基因经突变 (D355A, E357A), 以密码子324为起始位点。

**应用:**

1. 随机引物探针的合成。
2. 双脱氧法DNA序列测定 (Sanger法)<sup>(2)</sup>。
3. 合成cDNA第二条链<sup>(3)</sup>。

Klenow Fragment (3'→5'exo <sup>-</sup> ) (5,000 U/ml)	0.04 ml
10×Klenow (3'→5'exo <sup>-</sup> ) Buffer	1.5 ml

**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片段 (3'→5'exo<sup>-</sup>) 反应缓冲液, 添加dNTPs (不随酶附赠), 37°C温育。

**1×Klenow片段 (3'→5'exo<sup>-</sup>) 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片段 (3'→5'exo<sup>-</sup>) 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。

**DNA序列测定:** 如果用双脱氧法进行DNA序列测定 (Sanger等), 建议在每5 μl反应体系中加入1 U的Klenow片段 (3'→5'exo<sup>-</sup>)。

**热失活:** 75°C温育20分钟即可失活。

## 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。

**核酸外切酶活性:** 50 μl反应体系中, 50 U本酶与1 μg的Hind III消化的λDNA于37°C温育4小时, 电泳条带无明显变化。

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

## 注意事项:

由于去除了3'→5'核酸外切酶活性, 该酶无法切除3'突出末端, 不宜用于末端平齐化反应。

## 参考文献:

1. Derbyshire, V. et al. (1988) *Science*, 240, 199-201.
2. Sanger, F. et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467.
3. Gubler, U. (1987) *Methods Enzymol*, 152, 330-335.

## 应用:

### A. 放射性随机引物标记DNA。

1. 反应体系配制:

DNA模板	10 μl (100 ng)
10×Klenow片段 (3'→5'exo <sup>-</sup> ) 反应缓冲液	5 μl
7.5 A <sub>260</sub> units/ml (125 μM) 6 bp随机引物	10 μl
水	至40 μl

# Klenow片段 (3' → 5' exo<sup>-</sup>)

2. 反应混合物沸水浴5-10分钟后冰上冷却。

3. 加入：

3种dNTP混合物 (每种0.33 mM, 不含标记的dNTP)	3 μl (终浓度0.02 mM)
[α- <sup>32</sup> P]-dNTP, ~110 TBq/mmol (3000 Ci/mmol)	1.85 MBq (50 μCi)
Klenow片段 (3' → 5' exo <sup>-</sup> )	1 μl (5 U)
水	至50 μl

4. 混合物37°C静置10分钟。

5. 加入4 μl 0.25 mM dNTP混合物, 混匀后37°C孵育5分钟。

6. 加入1 μl 0.5 M EDTA (pH 8.0) 终止反应。

7. 取1 μl反应产物检测标记物掺入效率。

8. 用Sephadex G-50或Bio-Gel P-60纯化反应产物。

## B. 非放射性随机引物标记DNA。

1. 反应体系配制：

DNA模板	10 μl (100 ng-1 μg)
10×Klenow片段 (3' → 5' exo <sup>-</sup> ) 反应缓冲液	5 μl
7.5 A <sub>260</sub> units/ml (125 μM) 6 bp随机引物	10 μl
水	至39 μl

2. 反应混合物沸水浴5-10分钟后冰上冷却。

3. 加入：

3种dNTP混合物 (每种0.33 mM, 不含dTTP)	5 μl (终浓度0.1 mM)
dTTP (1 mM)	3.25 μl (终浓度0.065 mM)
Klenow片段 (3' → 5' exo <sup>-</sup> )	1 μl (5 μl)
Biotin-11-dUTP* (1 mM)	1.75 μl
总体积	50 μl

4. 反应混合物37°C孵育1小时。

5. 加入1 μl 0.5 M EDTA (pH 8.0) 终止反应。

6. 取1 μl反应产物检测标记物掺入效率。

7. 用Sephadex G-50或Bio-Gel P-60纯化反应产物。

[\*]: Fluorescein-12-dUTP、Aminoallyl-dUTP或DIG-dUTP也适用上述操作方法。