

**EcDNApolI KF (exo-)**

**目录号: AE0603**

**使用前请仔细阅读说明书**

## 产品说明

Klenow fragment (exo-) of EcDNApolI (EcDNApolI KF (exo-)) 是 *E. coli* DNA polymerase I 的 Klenow 片段截短体，保留了聚合酶活性，但失去了 5'→3' 核酸外切酶活性，并且点突变 (D355A, E357A) 消除了 3'→5' 核酸外切酶活性。

本公司 EcDNApolI KF (exo-) 是在大肠杆菌中重组表达，并多步纯化制备的重组酶。

## 活性定义

1 单位指在温度为 37°C, 1× EcDNApolI KF(exo-) 反应缓冲体系的反应条件下, 30 min 内将 10 nmol dNTP 掺入酸不溶性物质所需的酶量。

## 活性测定条件

50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, pH 8.0 at 25 °C, 37°C 温育。

浓度: 5U/μl

保存条件: -20°C 保存

## 特点

- 3'→5' 核酸外切酶活性缺失
- 中等链置换活性
- 热失活 75°C×20min

## 适用范围

- 使用随机引物生成探针
- 随机启动标记
- Sanger 双脱氧法 DNA 测序
- 第二链 cDNA 合成
- 突变方案中的第二链合成

## 产品包装规格及组成

Component	AE0603A	AE0603B
EcDNApolI KF (exo-)	200U	1kU
10× EcDNApolI KF (exo-) Buffer	0.2ml	1.0ml

## 质量控制

相关测试表明无外源内切、外切脱氧核糖核酸酶、RNase 污染。PCR 方法检测无宿主残余 DNA。

## 酶贮存缓冲液

25 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% Glycerol, pH 7.4 @ 25°C。

## 注意事项

- Klenow 片段 (3'→5' exo-) 由于缺少 3'→5' 核酸外切酶活性，不适合具有 3' 单链突出端 DNA 生成平末端。
- 当补充 dNTPs 时，Klenow 片段 (3'→5' exo-) 在所有四种昂酶 Buffer A-D 中都具有活性
- 当使用 Klenow 片段 (3'→5' exo-) 进行 Sanger 双脱氧 DNA 进行测序时，酶使用量建议为 1 单位/5μl 反应体积。

## 应用实例

### 1. 随机引物生物素标记反应

1) 按下表配制反应体系

反应组分	ul
10× Buffer	5
模板 DNA	100ng-2μg
dATP dCTP dGTP (2 mM each)	0.5
Biotin-dUTP or dTTP(2 mM)	0.5
random hexamer (125 μM)	10
* EcDNApolI KF (exo-)	1
H <sub>2</sub> O	Variable
总体积	20

2) 再加入酶之前，先在 95°C 加热 5min，冰上放置 5min

3) 聚合反应：加入 1μl EcDNApolI KF (exo-)，混合均匀。

4) 37°C 反应 15min，75°C 保温 20min 失活酶。

按需进行后续实验。

\*切记在加热之前不要加入 EcDNApolI KF (exo-)，待步骤 2) 加热退火完成后，再在步骤 3) 中加入酶。

**警告：本产品仅限科研实验使用，临床应用安全性和有效性未鉴定，不可用于医疗临床诊断。**