

Klenow Fragment

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

Code No. 2140A 容量: 200 U
濃度: 5 U/ μ l

添付試薬: 10 × Klenow Fragment Buffer 1 ml

●製品説明

Klenow Fragment は、鋳型、プライマー (DNA、RNA とともに可) 存在下で dNTP を基質とし、鋳型に相補的な DNA を 5' → 3' 方向に合成する酵素である。本酵素は *E. coli* DNA Polymerase I の構造遺伝子 pol A の開始コドンから下流約 1,000 bp までを欠失させたものをクローニングした大腸菌より生産している。そのため、3' → 5' exonuclease 活性は含まれるが、5' → 3' exonuclease 活性は全く含まれない。

●形状

50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.5)
1 mM DTT
50% グリセロール

●保存 - 20°C

●起源

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

●活性の定義

ポリ d (A-T) 合成 DNA を鋳型/プライマーとして用い、37°C、pH7.4 において 30 分間に 10 nmol の全ヌクレオチドを酸不溶性沈殿物に取り込む酵素活性を 1 U とする。

●活性測定用反応液組成

67 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)
6.7 mM MgCl₂
0.1 mM DTT
20 μ M substrate DNA
33 μ M dATP
33 μ M [³H] dTTP

●品質管理データ

性能試験結果については、各ロットの Certificate of Analysis (CoA) をご覧ください。CoA はタカラバイオウェブサイトからダウンロードできます。

●用途

1. dideoxy 法によるシーケンシング (Sanger 法)³⁾
2. 5' 突出末端の末端平滑化⁴⁾
3. Oligonucleotide directed mutagenesis における二本鎖 DNA 合成⁵⁾
4. ランダムプライマーを用いたラベリング反応

●添付試薬組成 (保存: - 20°C)

10 × Klenow Fragment Buffer
100 mM Tris-HCl (pH7.5)
70 mM MgCl₂
1 mM DTT

※ このバッファーはラベリング反応や末端平滑化などの実験でより一般的な組成となっており、活性測定系とは異なっている。

●使用例

ランダムプライマーを用いたラベリング反応

・ 鋳型 DNA	25 ng
・ random primer (6 ~ 9 mer) (1 nmol/ μ l)	2 μ l
・ 滅菌精製水	up to 14 μ l
— Heat at 95°C for 3 min.	
— Rapid cooling for 5 min.	
← Add 10 × Klenow Fragment Buffer	2.5 μ l
← Add dNTP mixture (0.2 mM dATP, dGTP, dTTP)	2.5 μ l
← Add 111 TBq/mmol [α - ³² P] dCTP (3,000 Ci/mmol) (1.85 MBq, 50 μ Ci)	5 μ l
← Add Klenow Fragment (2 U/ μ l)	1 μ l
	Total 25 μ l
— Incubate at 37°C for 3 hr.	
— Incubate at 65°C for 5 min.	

そのまま適量をハイブリダイゼーションプローブ液として用いる (必要ならば、ゲルろ過あるいはエタノール沈殿で未反応の標識 dCTP を除去する)。

●使用上の注意

1. 希釈による失活はないが、強く攪拌すると失活することがある。
2. 5' → 3' exonuclease 活性が含まれないため、ニクトランジェーション活性を示さない。同様の理由から、二本鎖 DNA の末端およびギャップの修復に適している。
3. *E. coli* DNA polymerase I と同じく、ddNTP を阻害されることなく取り込む。
4. T4 DNA Polymerase に比べて、鋳型 DNA の高次構造に対しても抵抗性が高い。
5. DNA に対する親和性が強く、過剰に用いると aggregation が起こり、反応が阻害されることがある。
6. 5' 突出末端の修復に用いると、filling 後に 1 塩基余分に付加する可能性がある。⁶⁾

●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. *in 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

本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。本データシートに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。