

Klenow Fragment

(*Escherichia coli*)

Klenow Fragment
(*Escherichia coli*)

Großes Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I, das, wie auch das Holoenzym, sowohl die Polymerase_Aktivität als auch die 3'→ 5' Exonuklease-Aktivität besitzt und damit das Korrekturlesen (proofreading) beherrscht.

Artikel Nr.	Größe
E1091-01	200 Einheiten
E1091-02	1 000 Einheiten

Definition der Einheit: Eine Einheit ist die Menge des Enzyms, die erforderlich ist, um 10 nmol Nukleotide in 30 Minuten bei 37°C in die säureunlösliche Form zu überführen.

Lagerbedingungen:
Lagerung bei -20°C

Beschreibung:

- Besitzt keine 5'-Exonuklease-Aktivität (1).
- Ultrareines rekombinantes Enzym.
- Wird eingesetzt zur Dideoxy-Sequenzierung nach der Methode von Sanger (2).
- Geeignet für die Synthese des zweiten DNA-Stranges in der cDNA-Synthese (3).
- Geeignet für 3'-Endemarkierungen und für das Auffüllen von 5'-hervorstehenden klebrigen Enden (protruding sticky ends) (4).

Lagerungspuffer (Storage Buffer):

50 mM Kalium-Phosphat (pH 7.0), 0.25 mM Dithiothreitol und 50 % [v/v] Glycerin.

Reaktionsbedingungen der Qualitätskontrolle:

67 mM Kalium-Phosphat (pH 7.4), 6.7 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, 0.033 mM jeweils von dCTP, dGTP, dTTP und [α -³²P] dATP sowie 4.5 µg aktivierte DNA. Inkubation bei 37°C für 30 Minuten in einem Reaktionsvolumen von 100 µl.

Qualitätskontrolle

Alle Chargen werden auf Endonuklease- und 5'-Exonuklease Aktivitäten geprüft. Typische Präparationen sind zu mehr als 95% rein, wie aufgrund von SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese beurteilt werden kann

Literatur:

1. Joyce, C.M. und Grindley, N.D. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 1830-1834.
2. Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463-5467.
3. Houdebine, L.M. (1976) *Nucleic Acids Res.* 3, 615-630.
4. Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition pp. 5.34, 5.40-5.43 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.*
5. Richardson, C.C., Schildkraut, C.L., Aposhian, H.V. und Kornberg, A. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 222-232.