

Klenow Fragment

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

Code No. 2140A **Size :** **200 U**
sConc. : **5 U/ μ l**

Supplied Reagent:
10X Klenow Fragment Buffer **1 ml**

Description:
Klenow fragment, which requires template DNA and primer for its function, selectively catalyzes the transfer of dNTPs to the 3'-OH terminus of the primer that is complementary to the template.¹⁾ This enzyme is purified from *E. coli* cells in which the 3'-end two-thirds of the *E. coli* DNA polymerase I gene (Klenow fragment) is cloned. Thus, it has 3' → 5' exonuclease activity but not 5' → 3' exonuclease activity of intact DNA polymerase I.²⁾

Storage Buffer:
50 mM Potassium Phosphate (pH 6.5)
1 mM DTT
50% Glycerol

Storage: -20°C

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

Unit definition:
One unit is the amount of the enzyme catalyzing the incorporation of 10 nmol of total nucleotides into acid-insoluble products in 30 minutes at 37°C and pH 7.4, with poly d (A-T) as the template-primer.

Reaction mixture for unit definition:
67 mM potassium phosphate (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

Quality Control Data:
Please see the Certificate of Analysis (CoA) for each lot. You can download the CoA on Takara Bio website.

Applications:

- For dideoxy sequencing by the Sanger method.³⁾
- Blunting of 5'-protruding termini.⁴⁾
- Synthesis of double-stranded DNA during oligonucleotide-directed mutagenesis.⁵⁾
- Labeling with random primers.

Composition of Supplied Reagents (Store at -20°C):

10X Klenow Fragment Buffer
100 mM Tris-HCl (pH 7.5)
70 mM MgCl₂
1 mM DTT

- * This buffer is available for general applications, eg. labeling, or blunting of termini. The composition is different from that of the reaction mixture for unit definition.

Application Example:

Random Primer Labeling Prepare the mixture by combining the followings:

• Template DNA	25 ng
• Random primer (6 - 9 mer) (1 nmol/ μ l)	2 μ l
• Sterile purified water	up to 14 μ l
Heat at 95°C for 3 min	
Rapid cooling for 5 min	
← Add 10X 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	

Take some portion of the reactant to use as probes for hybridization. (When necessary, remove unused labeled dCTP through gel filtration or ethanol precipitation.)

Note:

The enzyme is highly stable, and is not inactivated by dilution, but it may become inactive after being stirred strongly. It does not have nick translation activity because it lacks 5' → 3' exonuclease activity. For the same reason, it is suitable for the filling-in of gaps and for the repair of the termini of double-stranded DNA. This enzyme can incorporate ddNTPs without being inhibited by its own substrate, which *E. coli* DNA polymerase I is. This enzyme is less inhibited by the steric structure of the template DNA than is T4 DNA polymerase. Because it has a very strong affinity for DNA, an excess may inhibit the reaction because of aggregation of DNA and the enzyme. When blunting 5'-protruding termini, this enzyme may add extra one base after filling.⁶⁾

References:

- Jacobsen H, Klenow H, and Overgaard-Hansen K. *Eur J Biochem.* (1974) **45**: 623-627.
- Joyce C M, Kelley W S, and Grindley N D F. *J Biol Chem.* (1982) **257**: 1958-1964.
- Sanger F, Nicklen S, and Coulson A R. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1977) **74**: 5463-5467.
- Sam Brock J, Fritsch E F, and Maniatis T. *In Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* (1989) 5.40-5.43: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Norris K, Norris F, Christiansen L, and Fili N. *Nucleic Acids Res.* (1983) **11**: 5103-5112.
- Clark J M, Joyce C M, and Beardsley G P. *J Mol Biol.* (1987) **198**: 123-127.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from Takara Bio Inc.

If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 565 6972 or from our website at www.takarabio.com.

Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements.

All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

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
・ 減菌精製水	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	2.5 μ l
(0.2 mM dATP, dGTP, dTTP)	
← Add 111 TBq/mmol [α - ³² P] dCTP	5 μ l
(3,000 Ci/mmol) (1.85 MBq, 50 μ Ci)	
← 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、ニックトランスレ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 塩基余分に附加する場合がある。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。