



碧云天网站



微信公众号

碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology

订货热线: 400-168-3301或800-8283301

订货e-mail: order@beyotime.com

技术咨询: info@beyotime.com

网址: http://www.beyotime.com

BeyoAP Alkaline Phosphatase

产品编号	产品名称	包装
D7027	BeyoAP Alkaline Phosphatase	200U

产品简介:

- BeyoAP Alkaline Phosphatase, 即BeyoAP碱性磷酸酶, 是一种热敏感的, 可以催化DNA、RNA、核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸水解释放5'或3'末端磷酸基团的酶, 也可以脱去蛋白质丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基上的磷酸基团。BeyoAP Alkaline Phosphatase是一种新型碱性磷酸酯酶, 在碧云天的各种内切酶和PCR缓冲液中可保持100%活性, 对于各种类型的DNA 5'末端去磷酸化均可在37°C孵育10分钟即可完成, 并且75°C孵育5分钟即可完全失活。
- 碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, AP/ALP/AKP/ALKP/ALPase/Alk Phos)常被称作碱性磷酸酯酶(EC 3.1.3.1), 是一类水解酶, 通过水解磷酸单酯将底物分子上的磷酸基团除去, 并生成磷酸根离子和自由的羟基, 其去磷酸化作用的底物包括核苷酸、蛋白质和生物碱等, 并在碱性条件下最为有效。该酶是一组同功酶的统称。常见的小牛肠碱性磷酸酶(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, CIAP/CIP)被广泛用于二抗等的标记最终用于蛋白和核酸等的检测, 也常用于DNA或RNA 5'和3'末端去磷酸化(去单磷酸化), 特别是质粒的5'末端去磷酸化以避免质粒自连等。
- 经限制性内切酶酶切的质粒5'端带有磷酸基团, 在进行基因克隆时为避免质粒自连, 可以使用BeyoAP Alkaline Phosphatase去除5'末端磷酸基团。脱去5'末端磷酸基团的质粒不能发生自连。
- **特点: 快速去磷酸化**, 只需37°C孵育10分钟即可; **快速失活**, 75°C孵育5分钟即可完全失活; **使用方便**, 在各种内切酶和PCR缓冲液中保持100%活性, 可以和质粒DNA的消化同时进行; **操作步骤简单**, 对于5'或3'突出末端、平端等各种DNA的脱磷酸化采用完全相同的操作步骤; **可直接用于连接反应**, 经BeyoAP Alkaline Phosphatase脱磷, 并75°C孵育5分钟失活后可直接用于后续的连接反应。
- **用途**: 通过去除载体或DNA片段5'末端的磷酸基团, 防止载体或DNA片段自连; 质粒DNA的同时内切酶消化和脱磷; 通过5'末端脱磷, 为5'末端磷酸化放射性标记准备模板; 去除DNA、RNA 5'或3'末端的磷酸基团; 用于蛋白质丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸残基的去磷酸化。
- **来源**: 大肠杆菌表达, 表达基因为一种细菌碱性磷酸酯酶基因。
- **酶活性定义**: 37°C 10分钟内, 催化1 μ g 线性化的pUC19 DNA 5'末端脱磷所需的酶量定义为一个活力单位。
- **纯度**: 不含DNA外切酶和内切酶, 不含RNA酶。
- **酶储存溶液**: 20mM HEPES-NaOH (pH7.4), 1mM MgCl₂, 0.1mM ZnCl₂, 0.1% Triton X-100, 50% (v/v) glycerol。
- **Reaction Buffer (10X)**: 100mM Tris-HCl (pH8.0 at 37°C), 50mM MgCl₂, 1M KCl, 0.2% Triton X-100, 10mM 2-mercaptoethanol, 1mg/ml BSA。
- **失活或抑制**: 75°C加热5分钟可以使BeyoAP Alkaline Phosphatase失活。金属离子螯合剂对BeyoAP Alkaline Phosphatase有抑制作用。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7027-1	BeyoAP Alkaline Phosphatase (1U/ μ l)	200U
D7027-2	Reaction Buffer (10X)	0.5ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存。

注意事项:

- 酶使用时宜存放在冰盒内或冰浴上, 使用完毕后宜立即放置于-20°C保存。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 质粒DNA同时进行内切酶消化和5'末端脱磷:

a. 参考如下表格设置去磷酸化反应:

质粒DNA	1 μ g
内切酶的Reaction Buffer (10X)	2 μ l

补充无核酸酶的去离子水	至18 μ l
内切酶	1 μ l
BeyoAP Alkaline Phosphatase (1U/ μ l)	1 μ l

- 按上述体系配好之后，轻轻混匀(可以用移液器吹打混匀或用 Vortex 在最低速度轻轻混匀)，随后离心沉淀液体。
- 37°C 孵育 60 分钟。**注意：**如果质粒 DNA 消化和脱磷后用于后续的连接反应，推荐先参考上表进行内切酶消化，但不加入 BeyoAP Alkaline Phosphatase。内切酶消化 6-16 小时后，再加入 BeyoAP Alkaline Phosphatase 37°C 孵育 10 分钟。内切酶消化时间比较长，可以大大减少自连克隆出现的几率。
- 75°C 加热 5 分钟或根据内切酶失活的其他条件进行酶的失活。
- 后续可以使用酚氯仿抽提、乙醇沉淀等方法纯化已消化并且脱磷酸化的 DNA，也可以使用适当的 DNA 纯化试剂盒进行纯化。DNA 纯化试剂盒(D0033)可以向碧云天订购；如果切出的片段大于 50bp，通常需要进行 DNA 凝胶电泳和切胶回收。DNA 凝胶回收试剂盒(D0056)可以向碧云天订购。

2. DNA、RNA的5'或3'末端脱磷

- 参考如下表格设置去磷酸化反应：

待脱磷的DNA或RNA	1-5 μ g (up to 10pmol termini)
Reaction Buffer (10X)	2 μ l
补充无核酸酶的去离子水	至19 μ l
BeyoAP Alkaline Phosphatase (1U/ μ l)	1 μ l

- 按上述体系配好之后，轻轻混匀(可以用移液器吹打混匀或用 Vortex 在最低速度轻轻混匀)，随后离心沉淀液体。
- 37°C 孵育 10 分钟。
- 75°C 加热 5 分钟失活 BeyoAP Alkaline Phosphatase。
- 后续可以使用酚氯仿抽提、乙醇沉淀等方法纯化已消化并且脱磷酸化的 DNA，也可以使用适当的 DNA 纯化试剂盒进行纯化。DNA 纯化试剂盒(D0033)可以向碧云天订购；如果切出的片段大于 50bp，通常需要进行 DNA 凝胶电泳和切胶回收。

说明：上述脱磷反应可以用于 5'或 3'突出的 DNA，也可以用于平末端 DNA，反应条件相同，即均为 37°C 孵育 10 分钟。

3. 蛋白去磷酸化

- 参考如下表格设置去磷酸化反应：

待去磷酸化的蛋白	1-10 μ g
Reaction Buffer (10X)	5 μ l
补充无核酸酶的去离子水	至45 μ l
BeyoAP Alkaline Phosphatase (1U/ μ l)	5 μ l

- 按上述体系配好之后，轻轻混匀(可以用移液器吹打混匀或用 Vortex 在最低速度轻轻混匀)，随后离心沉淀液体。
- 37°C 孵育 60 分钟。
- 加入 EDTA 至终浓度为 50mM 或加入钒酸钠至终浓度为 10mM 以终止去磷酸化反应。

注意：酶的最佳用量和 37°C 的最佳孵育时间需根据特定蛋白自行进行优化。

- 其他用途请参考上述用途或碱性磷酸酶的相关文献资料进行。

Version 2016.07.28