

Alkaline Phosphatase (Fast)

REF: EG15208S

储运条件

-20°C

产品组成

组分	规格
Alkaline Phosphatase (Fast) (1 U/μl)	1000 μl
10× AP Buffer	2×1 ml

产品简介

Alkaline Phosphatase (Fast) 可催化 DNA、RNA 以及核苷酸 5' 端和 3' 端磷酸基团的水解，也能够去除蛋白磷酸基团，但不能催化磷酸二脂及磷酸三脂的水解。在 37°C 的条件下作用 10 min，该酶即可使所有类型 DNA 的末端去磷酸化。由于该酶在 CutOne® 酶切 Buffer 中具有 100% 活性，且失活条件为 80°C 温育 20 min，因此与 LightiNing® 快速内切酶进行“酶切 - 去磷酸化”反应时，可在同管内完成，大大简化了实验流程。

酶活单位定义

37°C 条件下，Alkaline Phosphatase 缓冲液环境中，10 min 内能够将 1 μg 线性化 pUC57 DNA 的 5' 末端去磷酸化所需要的酶量定义为 1 个活性单位 (U)。

质量控制

核酸内切酶残留检测

将酶液与超螺旋质粒 DNA 在 37°C 温育 4 h，通过 DNA 电泳检测质粒无变化。

核酸外切酶残留检测

将酶液与双链 DNA 底物在 37°C 温育 16 h，通过 DNA 电泳检测双链 DNA 底物无变化。

宿主检测

将酶液中残留的核酸经 E.coli 16S rDNA 特异性的 Taq Man qPCR 检测，E.coli 基因组残留低于 10 拷贝。

使用方法

1. 质粒载体线性化与去磷酸化同步反应流程

① 于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量
质粒 DNA ^a	1 μg
10× CutOne® Buffer	2 μl
LightNing® 限制性内切酶	1 μl
Alkaline Phosphatase (Fast)	1 U (1 μl)
ddH ₂ O	To 20 μl

a. 为了保证去磷酸化的效率，质粒 DNA 应不含 RNA 和基因组 DNA 污染。

② 充分混匀并瞬离，37°C 温育 15~30 min。

注：如果延长温育时间，可能产生星号活性。

③ 80°C 温育 20 min，以终止反应。

2. 核苷酸去磷酸化的实验流程

该方案适用于去除 DNA 的 3' 和 5' 端磷酸基团。

① 于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量
线性 DNA	1 μg
10× AP Buffer	2 μl
Alkaline Phosphatase (Fast)	1 U (1 μl)
ddH ₂ O	To 20 μl

② 充分混匀并瞬离，37°C 温育 10 min。

③ 80°C 温育 20 min，以终止反应。

3. 蛋白质去磷酸基团的实验流程

① 于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量
10× AP Buffer	2 μl
磷酸化蛋白质	2~4 μg (终浓度 0.1~0.2 mg/ml)
Alkaline Phosphatase (Fast)	10 U (10 μl)
ddH ₂ O	To 20 μl

② 充分混匀并瞬离，37°C 温育 1 h；

③ 添加 EDTA 至 50 mM 的终浓度，或者添加钒酸钠 (Na₃VO₄) 至 10 mM 的终浓度，以终止反应。

注：以上为蛋白质去磷酸基团的反应体系和实验流程的举例，实验时请根据具体底物类型调整 Alkaline Phosphatase 的使用量以及最佳温育时间。

注意事项

与 Alkaline Phosphatase 结合的 DNA 在琼脂糖凝胶中可能会出现条带偏移或弥散，为避免此现象，可在样品中加入混有 SDS 的 6× Loading Buffer，先在 80°C 温育 20 min，冰浴降温后再进行电泳。