

Bacterial Alkaline Phosphatase

产品编号	产品名称	包装
D7031S	Bacterial Alkaline Phosphatase	50U
D7031M	Bacterial Alkaline Phosphatase	250U

产品简介:

- Bacterial Alkaline Phosphatase, 即细菌碱性磷酸酶, 简称BAP, 是碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台表达、纯化获得的一种可以非特异性催化几乎所有的磷酸单酯去磷酸化和降解ATP的焦磷酸键的一种新型碱性磷酸酯酶。在碧云天的各种内切酶和几乎所有的PCR缓冲液中可达到100%活性, 30分钟内即可完成各种类型的DNA和RNA 5'末端的去磷酸化, 其在37-65°C温度范围内都具有较高活性[1]。
- 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'末端的去磷酸化(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Bacterial 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: 底物广谱**, 可以非特异性催化几乎所有的磷酸单酯的去磷酸化; **热稳定性好**, 65°C仍可以保持活性一个小时, 即使在含有螯合剂和100°C加热的条件下也只是暂时失活, 必须进行苯酚处理才能使其完全失活; **兼容性好**, 在各种内切酶和几乎所有PCR缓冲液中可达到100%活性, 可以和质粒DNA的内切酶消化同时进行; **操作简单**, 对于5'或3'突出末端、平端等各种DNA的去磷酸化采用完全相同的操作步骤。
- **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的同时进行内切酶消化和去除5'末端磷酸基团; 通过5'末端脱磷, 为5'末端磷酸放射性标记准备模板; 去除DNA、RNA 5'或3'末端的磷酸基团; 用于磷酸化蛋白丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸残基的去磷酸化。
- **来源**: 纯化自携带编码*phoA*基因的*E.coli*重组菌株。
- **酶活性定义**: One unit is the amount of the enzyme that produces 1μmol of *p*-nitrophenol per minute at 25°C and pH8.0, with *p*-nitrophenyl phosphate as the substrate. 如果按照One unit hydrolyzes 1 nmol of ATP in 30 min at 37°C来定义本产品的酶活力, 本产品的1个活力单位就相当于大约1000个活力单位, 即本产品的包装相当于大约50kU和200kU。
- **纯度**: 不含DNA外切酶和内切酶, 不含RNA酶。
- **酶储存溶液**: 50mM Tris-HCl (pH8.0 at 25°C), 100mM KCl, 1mM MgSO₄, 50% (v/v) glycerol.
- **BAP Reaction Buffer (10X)**: 500mM Tris-HCl (pH9.0 at 25°C), 10mM MgCl₂.
- **失活或抑制**: 在含有螯合剂的情况下, 100°C加热可以使Bacterial Alkaline Phosphatase暂时失活, 待温度降至室温又可以恢复酶活性; 苯酚可以使其完全失活; 无机磷酸盐对Bacterial Alkaline Phosphatase具有明显的抑制作用。
- 碧云天Bacterial Alkaline Phosphatase酶活性检测结果参考图1。

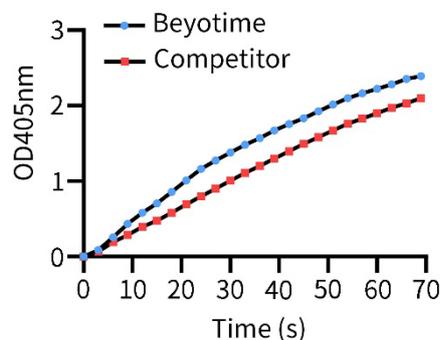


图1. 碧云天Bacterial Alkaline Phosphatase (D7031)酶活性检测结果结果图。在100μl反应体系中, 加入1μl Bacterial Alkaline Phosphatase以及99μl反应液(1mM *p*-nitrophenyl phosphate, 1M Tris-HCl, pH 8.0 at 25°C), 混匀后室温反应70秒, 每隔3秒测定一次OD405nm的吸光值。如图所示, 本产品(Beyotime)与T公司(Competitor)有相似的酶活性。实际效果会因样品种类、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

➤ 碧云天Bacterial Alkaline Phosphatase对酶切后的载体进行脱磷处理可以大大提高克隆的阳性率参见图2。

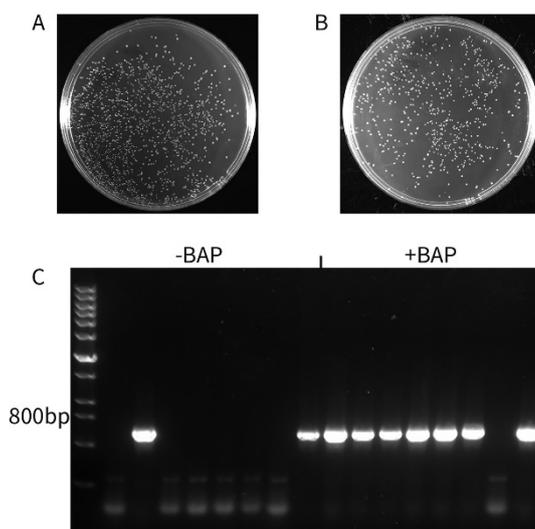


图2. 碧云天生产的Bacterial Alkaline Phosphatase (D7031)对单酶切后的质粒进行脱磷酸处理后可以大幅提高克隆的阳性比例。BsaI酶切后的pU6-gRNA-Cas9-T2A-mOrange2质粒不使用(A)或使用(B)本产品进行脱磷处理30分钟，柱纯化后和BsaI酶切后的400bp长度PCR产物用T4 DNA Ligase (D7006)进行连接，接着转化DH5α感受态并进行LB平板涂板后的克隆生长情况。C. 从以上两种平板中各挑取8个单克隆、进行菌落PCR的实验结果。实际效果会因样品种类、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D7031S-1	Bacterial Alkaline Phosphatase (0.5U/μl)	100μl
D7031S-2	BAP Reaction Buffer (10X)	0.4ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7031M-1	Bacterial Alkaline Phosphatase (0.5U/μl)	500μl
D7031M-2	BAP Reaction Buffer (10X)	2ml
—	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：

Reagent	Volume	Concentration
Ultrapure Water	(16-x)μl	-
Restriction Endonuclease's Reaction Buffer (10X)	2μl	1X
Substrate DNA	xμl	0.05μg/μl
Restriction Endonuclease	1μl	-
Bacterial Alkaline Phosphatase	1μl	0.025U/μl

b. 按上述体系配制完成后，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。

c. 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Bacterial Alkaline Phosphatase。内切酶消化6-16小时后，再加入Bacterial Alkaline Phosphatase 37°C孵育30分钟。内切酶消化时间比较长，可以大大减少载体自连出现的机率。

d. 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：

a. 参考如下表格设置去磷酸化反应：

Reagent	Volume	Concentration
Ultrapure Water	(43-x) μ l	-
BAP Reaction Buffer (10X)	5 μ l	1X
Substrate DNA or RNA	x μ l	0.02-0.4 μ M
Bacterial Alkaline Phosphatase	2 μ l	0.02U/ μ l

b. 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。

c. 37-65°C孵育30分钟。

d. 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37-65°C孵育30分钟。

3. 蛋白去磷酸化：

a. 参考如下表格设置去磷酸化反应：

Reagent	Volume	Concentration
Ultrapure Water	(40-x) μ l	-
BAP Reaction Buffer (10X)	5 μ l	1X
Substrate protein	x μ l	0.02-0.2 μ g/ μ l
Bacterial Alkaline Phosphatase	5 μ l	0.05U/ μ l

b. 按上述体系配制完成后，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。

c. 37-65°C孵育60分钟。

注意：酶的最佳用量、孵育温度和最佳孵育时间需根据特定蛋白自行进行优化。

4. 其它用途请参考上述用途或碱性磷酸酶的相关文献资料进行。

参考文献：

1. Green MR, Sambrook J. Cold Spring Harb Protoc. 2020. 2020(8):100768.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D0033	PCR纯化试剂盒/DNA纯化试剂盒	50次
D0041S	BeyoMag™磁珠法PCR/DNA纯化试剂盒	50次
D0041M	BeyoMag™磁珠法PCR/DNA纯化试剂盒	200次
D0043S	BeyoMag™磁珠法DNA凝胶回收试剂盒	50次
D0043M	BeyoMag™磁珠法DNA凝胶回收试剂盒	200次
D0056	DNA凝胶回收试剂盒	50次
D7001S	超快速DNA连接试剂盒	100次
D7001M	超快速DNA连接试剂盒	500次
D7001FT	超快速DNA连接试剂盒(试用装)	10次
D7002FT	快速DNA连接试剂盒(试用装)	10次
D7002	快速DNA连接试剂盒	100次
D7003	快速DNA连接试剂盒	500次
D7006	T4 DNA Ligase	40,000U
D7008	T4 DNA Ligase	20,000U
D7009S	Instant T4 DNA Ligase	40kU
D7009M	Instant T4 DNA Ligase	200kU
D7027	BeyoAP Alkaline Phosphatase	200U
D7028S	Antarctic Phosphatase (Thermosensitive)	1000U
D7028M	Antarctic Phosphatase (Thermosensitive)	5000U
P0321S	碱性磷酸酶检测试剂盒	100次
P0321M	碱性磷酸酶检测试剂盒	500次