

Alkaline Phosphatase (Fast)

REF: MN005

储运条件

-20°C 保存。

产品组成

组分/规格	MN005S-300 U	MN005M-1000 U
Alkaline Phosphatase (Fast) (1 U/ul)	300ul	1ml
10× AP Buffer	1ml	2× 1ml

产品简介

Alkaline Phosphatase (Fast) (简称: Fast AP) 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 分钟,该酶即可使所有类型 DNA 的末端去磷酸化。由于该酶在 FastCut 酶切 Buffer 中具有 100%活性,且失活条件为 80°C 温育 20 分钟,因此与 FastCut 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, Fast AP 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

核酸内切酶残留测试

37°C 条件下,将 10 U Fast AP 加入到 1 μg pUC19 DNA 中温育 4 h,未检测出由共价闭环状 DNA 转变为带有缺口的 DNA。

核酸外切酶残留测试

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。

蓝白斑测试

室温条件下,使用 30 U 的 Fast T4 DNA Ligase 连接 pUC57 DNA/HindIII, pUC57 DNA/PstI 及 pUC57 DNA/SmaI 消化产物 1 h,然后用 E.coli XL1-Blue 感受态细胞转化连接产物,检测到少于 1% 的白斑。

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 ug
10× FastCut Buffer	2ul
FastCut 限制性内切酶	1ul
Fast AP	1U (1ul)
ddH ₂ O	To 20 ul

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 充分混匀并分离, 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 ug
10× AP Buffer	2ul
Fast AP	1U (1ul)
ddH ₂ O	To 20 ul

② 充分混匀并分离, 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×FastCut Buffer	2ul
磷酸化蛋白质	2~4 ug (终浓度 0.1~0.2 mg/ml)
Fast AP	10U (10ul)
ddH ₂ O	To 20 ul

② 充分混匀并分离, 37°C 温育 1h。

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 Fast AP 的使用量以及最佳温育时间。

注意事项

与 Fast AP 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。

