

Seebio® 牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP) 产品说明书

Seebio® Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIAP) Product Information

【产品名称】

Seebio® 牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP)

Seebio® Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIAP)

【产品编码】

ECE0159A

【包装规格】

产品货号	组份名称及包装规格
ECE0159A-1000U	牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP) : 1×30U/μl 10× CIAP Buffer: 1×1ml CIAP 终止液: 1×1ml

【产品基本信息】

碱性磷酸酶能够催化 DNA、RNA 以及核糖和脱氧核糖核苷三磷酸中 5'-磷酸基团的水解。本酶单体分子量约 62kDa, 以二聚体形式存在于水溶液中, 是一种含 Zn²⁺ 的糖蛋白金属酶。

【产品用途】

1. 去除线性化克隆载体 DNA 两端的磷酸基团, 防止其重新环化连接;
2. 去除 DNA、RNA 5' 或 3' 末端的磷酸基团, 以便后续用 [³²P]ATP 和 T4 多核苷酸激酶进行标记;
3. 对 5' 突出端、5' 凹陷端和平末端均有效, 但不能催化磷酸二酯、磷酸三酯的水解。

【组成成分】

1. 酶保存液: 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM MgCl₂, 0.1mM ZnCl₂, 50mM KCl 和 50% 甘油。
2. 10×CIAP Buffer: 500mM Tris-HCl (pH 9.0, 25°C), 10mM MgCl₂。
3. CIAP 终止液: 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA (pH 7.5), 200mM NaCl, 0.5% SDS。

【产品特点 and 优势】

1. 本酶通过 CHO 重组表达制备, 高纯度;
2. 无核酸内切酶、DNase 和 RNase 污染。

【酶活定义】

1 个活性单位 (U): 在 37°C、pH9.8 条件下, 1 分钟内水解对硝基苯磷酸盐 (p-nitrophenylphosphate) 生成 1μmol 对硝基苯酚 (p-nitrophenol) 所需的酶量。

【应用举例】

A. 5' 突出端脱磷

1. 实验前需准备的试剂

- ① 10mM Tris-HCl (pH 8.0)
 - ② TE-饱和酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1)
 - ③ 氯仿: 异戊醇 (24:1)
 - ④ 7.5M ammonium acetate (pH 5.5)
 - ⑤ 100% 和 70% 的乙醇
 - ⑥ TE 缓冲液: 10mmol/L Tris-HCl, 0.1 mmol/L EDTA
2. 按照 1pmol DNA 末端脱磷需要 0.01U 的 CIAP, 用 1×CIAP 反应缓冲液稀释足够用的 CIAP 至终浓度为 0.01U/μl。(1μg 的 1kb DNA 含有 1.52pmol DNA, 含末端 3.03pmol)。

3. 如果 DNA 浓度较低, 可使用 2 倍体积的乙醇将去磷酸化的 DNA 片段沉淀下来, 并将沉淀溶解在 40μl 的 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 中, 并配制如下反应液:

DNA (最多 10pmol 的 5' 末端)	40μl
10×CIAP Buffer	5μl
CIAP 稀释液 (0.01U/μl)	5μl

4. 将反应液于 37°C 孵育 30min。
5. 在反应液中加入 5μl 的 CIAP 稀释液 (0.01U/μl), 于 37°C 再孵育 30min。
6. 在反应液中加入 300μl 的 CIAP 终止液 (可选)。
7. 加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1), 颠倒充分混匀。
8. 室温 16000×g 离心 5min, 使水相和有机相充分分离, 小心吸出上层水相并将转移至新试管。

9. 同上，用酚/氯仿/异戊醇再抽提 1 次，收集上清。
10. 上清用等体积的氯仿/异戊醇（24:1）抽提 1 次。
11. 将抽提上清移入新的离心管中，加入 0.5 倍体积的 7.5M 醋酸铵（pH5.5），混合均匀。
12. 加入 2 倍混合液体积的无水乙醇，充分混匀，于 -20°C 过夜，或 -70°C 30 min，或干冰中 5min。
13. 12000g，4°C 离心 15min，使 DNA 充分沉淀。
14. 除去上清，离心管倒置于纸巾上吸干。
15. 用 0.5ml 4°C 预冷的 70% 的乙醇洗涤沉淀 1 次。
16. 按步骤 13 和 14 干燥沉淀或使用真空浓缩机。
17. 用 TE 重悬 DNA，4°C 保存备用，或 -20°C 保存。

B. 5'凹陷端或平末端脱磷

当使用 5'凹陷或平末端 DNA 片段作为底物时，在 37°C 下孵育 15 分钟，然后在 56°C 下孵育 15 分钟。接着加入第二份 CIAP，重复上述两个温度下的孵育操作。较高温度可确保了凹陷末端的可及性。

C. 其它

未述及的分子生物学技术可参照相关文献实施，例如：
Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

【储存条件和有效期】

-20°C 储存，有效期 24 个月。避免多次冻融。

【注意事项】

1. 本酶的最适 pH 会随底物浓度高低发生变化，高浓度底物时的最适 pH 约为 10；低浓度底物时约为 8，且特异性有所降低。
2. 苯酚处理可完全灭活酶活性，
3. 本品仅供科研用途，不作为药物、诊断或其它用途。
4. 使用前应穿实验服并配戴一次性手套或外科手术用手套。

【技术支持服务】

您若有疑问或反馈，请联系：

Tel: [021-50272981*6217](tel:021-50272981*6217) 或 Email: market@seebio.cn

西宝生物二维码

