



Antarctic Phosphatase (Pho A)

目录号：CW2967S (1000 U)
CW2967M (5000 U)

保存条件：-20°C

产品内容

Component	CW2967S 1000 U	CW2967M 5000 U
Antarctic Phosphatase, 5 U/ μ L	200 μ L	5 \times 200 μ L
4 \times Pho A Reaction Buffer	1 mL	5 \times 1 mL

产品简介

本产品为热敏磷酸酶，来源于重组*E.coli*菌株，其携带有Pho A基因，具有催化DNA和RNA的5'和3'磷酸单酯的去磷酸化反应。另外，热敏磷酸酶能水解核糖和脱氧核糖核苷三磷酸（NTP和dNTP）。本产品主要应用于DNA和RNA的去磷酸化，防止克隆载体的自连，制备5'末端标记模板，去除PCR产物中的dNTP和焦磷酸盐。

活性定义

将在37°C条件下，30分钟能使1 μ g经HindIII（产生5'突出末端）、HincII（产生平滑末端）或PstI（产生5'凹进末端）消化的pUC19 DNA去磷酸化所需的酶量定义为1个活性单位（U）。去磷酸化标准是指在自连接反应中能抑制>95%的DNA再环化（通过转化*E.coli*细胞来检测）。

质量控制

经SDS-PAGE电泳检测，经考马斯亮蓝染色后分析其纯度大于95%。

使用方法

DNA 5'末端去磷酸化

1. 制备20 μL 的反应体系。

试剂	20 μL 反应体系
DNA	1 pmol DNA 末端 *
4 \times Pho A Reaction Buffer	5 μL
Antarctic Phosphatase, 5 U/ μL	1 μL
dd H ₂ O	up to 20 μL

*1 pmol DNA末端相当于1 μg 3 kb大小的质粒

2. 37°C温育30分钟。
3. 80°C温育20分钟终止反应。

在酶切反应中对DNA 5'末端去磷酸化

1. 在20 μL 体系中酶切1-5 μg 质粒DNA

试剂	20 μL 反应体系
DNA	>>1 μL
酶切反应缓冲液 (4 \times)	5 μL
限制性内切酶	1 μL
dd H ₂ O	up to 20 μL

2. 37°C温育60分钟或根据最适条件进行酶切。
3. 每1 pmol DNA末端 (约3 kb大小的质粒1 μg) 加入1 μL Antarctic Phosphatase和1/4反应体系体积的4 \times Pho A Reaction Buffer, 37°C温育30分钟。
4. 按推荐条件对Antarctic Phosphatase和限制性内切酶用热失活的方法终止反应。

注意: 如果限制性内切酶不能进行热失活, DNA需要纯化后再进行连接反应。

注意事项

1. 热敏磷酸酶与其他碱性磷酸酶相同, 是Zn²⁺和Mg²⁺的依赖酶。酶的活性需要有锌存在。
2. 反应中加入1/4反应体系体积的4 \times Pho A Reaction Buffer, 能够提供足够的Zn²⁺保证酶的活性。
3. 热敏磷酸酶在单价盐离子存在时活性增强。
4. 热敏磷酸酶在金属螯合剂 (如EDTA)、无机磷酸盐及磷酸盐类似物存在时活性被抑制。
5. 热敏磷酸酶在还原剂 (DTT、巯基乙醇) 存在时活性会降低。

本产品仅供科研使用, 请勿用于临床诊断及其它用途