天净沙系列

CAT#:930828

低温运输，-20℃保存

天净沙

DNA 去磷酸化试剂盒

DNA Dephosphorylating Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是基于碱性磷酸酶的核酸去磷酸试剂盒。它具有下列特点：

1. 可以去除 DNA、RNA 和 dNTP 的磷酸基团。
2. 用于克隆载体去磷酸化时，可以有效防止载体自连。
3. 可用于测序或 SNP 分析前除去 PCR 反应中 dNTP 和焦磷酸盐。
4. T4 PNK 标记 5′ DNA 末端前，用来去除 DNA 靶分子的磷酸基团。
5. 模板可以是单链 DNA，也可以是双链 DNA；既可以是平末端，也可以是 5′端突出或 3′端突出的粘性末端。
6. 在几乎所有限制性内切酶反应缓冲液中均有活性，故可以跟限制性内切酶酶切反应同步进行，减少操作步骤。
7. 去磷酸化处理后的反应液不需要纯化，灭活酶后可直接用于后续的连接反应和标记反应。
8. 65℃15 分钟的热处理可以使酶不可逆地彻底灭活，不用担心残留的活性影响后续的实验。
9. 本产品足够 20 次 20 μL 体系的去磷酸化实验。
10. 本产品仅供科研使用。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成份	编号	规格	包装
10×去磷酸化缓冲液	930828a	50 μL	0.5 mL 蓝盖管
0.5 U/μL 细菌碱性磷酸酶	930828b	20 μL	0.5 mL 紫盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 本色管
使用手册	930828sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期为 12 个月。

自备试剂

DNA 片段

使用方法

特别注意：

由于 dNTP 和 ATP 也是细菌碱性磷酸酶的底物，所以如果 DNA 溶液中含有大量的 dNTP（比如 PCR 产物中）或 ATP，而目的是去除 DNA 溶液的磷酸基团，最好先将其去除，否则它们会耗掉大量的细菌碱性磷酸酶活性，降低 DNA 去磷酸化效率。

一、去磷酸化反应（以纯化的 DNA 片段为例）

1、在微量离心管中配制下列反应液（20 μL）：

成分	用量
胶回收的 DNA 片段	1 pmol(相当于 1 μg 3Kb 的线状质粒)
10×去磷酸缓冲液	2 μL

细菌碱性磷酸酶	0.5 μL
超纯水到	20 μL

2、建议在 37℃反应 30 分钟（对平末端、5′端突出或 3′端突出的 DNA 片段均采用此保温条件）。

3、65℃反应 15 分钟变性细菌碱性磷酸酶。

4、DNA 片段可以直接用于连接。

二、限制性酶切反应中的同步去磷酸化

5、本细菌碱性磷酸酶在几乎所有限制性内切酶的缓冲液中都有活性，故所以可以按 1 ug 3 Kb 长度的 DNA 加 1 μL 细菌碱性磷酸酶的比例（对应的是 DNA 末端数量）直接加到限制性内切酶的反应液中。反应液中最好不含 dNTP 和 ATP。

6、加热灭活限制性内切酶和细菌碱性磷酸酶(灭活条件根据限制性内切酶不同而不同，但不能低于 65℃，时间不能短于 15 分钟，否则不能灭活细菌碱性磷酸酶)。灭活后的样品可以直接用于后续实验。

7、如果不能采取加热灭活限制性内切酶和细菌碱性磷酸酶，则需酚/氯仿抽提去除酶。具体操作如下(本试剂盒不提供相关试剂，需要从本公司另购相关试剂，下列操作仅供参考):

附：酚/氯仿抽提去除酶步骤:

1、在反应液中加入超纯水使体积变成 100 μL，以免纯化过程中 DNA 丢失。如果有必须，可以加入和 4 μL 核酸助沉剂提高回收效率。

2、加入 100 μL 酚/氯仿/异戊醇 25：24：1 混合液震荡半分钟混匀，室温 12000×g 心管中。离心 3 分钟，转移上清到新离心管中。

3、加 0.1 倍体积（即 10 μL）的 3 M 乙酸钠溶液（pH 5.2)。

4、再加入 2.5 倍体积（即 250 μL）的无水乙醇。

5、混匀后 12000×g 4℃离心 10 分钟，小心弃上清。

6、加入 1 mL 70%乙醇，短暂离心 3 分钟后小心弃上清。

7、短暂离心 5 秒，吸弃残留液体（约 30-50 μL)。

8、室温放置 2 分钟干燥后加入适量的超纯水溶解 DNA,立即使用或放-20℃长期保存。

关联产品	DNA 磷酸化试剂盒