

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:130828-20  
低温运输, -20℃保存

**TIANDZ**

**DNA 去磷酸化试剂盒**

**DNA Dephosphorylating Kit**

**使用手册 V1.1**

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>分子克隆时，载体的自连极大降低了连接效率，如果对载体 DNA 两个 5' 端的 -PO<sub>4</sub> 基团进行去磷酸化处理，则可以抑制自连反应。此外在进行 DNA 5' 端标记前，也需要将其本来的 -PO<sub>4</sub> 基团去除以便加上标记基团。本公司开发的 DNA 去磷酸化产品就是针对这一目的而开发。它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 把 DNA 5' 端的 -PO<sub>4</sub> 基团变成 -OH 基团，使其丧失连接能力。</li> <li>2. 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。</li> <li>3. 处理后的核酸纯化后可以直接用于连接反应和标记反应。</li> <li>4. 本产品足够 20 次 20<math>\mu</math>L 体系的去磷酸化实验</li> <li>5. 本产品仅供科研使用。</li> </ol>																		
<p><b>规格及成分</b></p>		<table border="1"> <thead> <tr> <th>成 份</th> <th>编 号</th> <th>塑料袋包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>10<math>\times</math> 去磷酸缓冲液</td> <td>130828a</td> <td>50 <math>\mu</math>L (紫盖)</td> </tr> <tr> <td>碱性磷酸酶</td> <td>130828b</td> <td>10 <math>\mu</math>L (红盖)</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>100935</td> <td>1 mL (蓝盖)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>130828sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>	成 份	编 号	塑料袋包装	10 $\times$ 去磷酸缓冲液	130828a	50 $\mu$ L (紫盖)	碱性磷酸酶	130828b	10 $\mu$ L (红盖)	超纯水	100935	1 mL (蓝盖)	使用手册	130828sc	1 份		
成 份	编 号	塑料袋包装																	
10 $\times$ 去磷酸缓冲液	130828a	50 $\mu$ L (紫盖)																	
碱性磷酸酶	130828b	10 $\mu$ L (红盖)																	
超纯水	100935	1 mL (蓝盖)																	
使用手册	130828sc	1 份																	
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>低温运输，-20<math>^{\circ}</math>C 保存，有效期为 12 个月。</p>																		
<p><b>自备试剂</b></p>	<p>DNA 片段</p>																		
<p><b>使用方法</b></p>	<p>注意：dNTP 和 ATP 也是碱性磷酸酶的底物，所以如果 DNA 溶液中有 dNTP (比如 PCR 产物中) 和 ATP，一定要先将其去除，否则它们会耗掉大量的碱性磷酸酶活性，降低 DNA 去磷酸化效率。</p> <p><b>一、纯化 DNA 片段的去磷酸化</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 在微量离心管中配制下列反应液 (20<math>\mu</math>L):</li> </ol> <table border="1" data-bbox="518 1563 1326 1883"> <thead> <tr> <th>成 分</th> <th>用 量</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>胶回收的 DNA 片段</td> <td>1 pmol (相当于 1<math>\mu</math>g 3Kb 的线状质粒)</td> </tr> <tr> <td>10<math>\times</math> 去磷酸缓冲液</td> <td>2 <math>\mu</math>L</td> </tr> <tr> <td>碱性磷酸酶</td> <td>0.5 <math>\mu</math>L</td> </tr> <tr> <td>超纯水到</td> <td>20 <math>\mu</math>L</td> </tr> </tbody> </table> <ol style="list-style-type: none"> <li>2. 建议在 37<math>^{\circ}</math>C 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)。</li> <li>3. 65<math>^{\circ}</math>C 反应 5 分钟变性碱性磷酸酶。</li> <li>4. DNA 片段可以直接用于连接。</li> </ol>				成 分	用 量	胶回收的 DNA 片段	1 pmol (相当于 1 $\mu$ g 3Kb 的线状质粒)	10 $\times$ 去磷酸缓冲液	2 $\mu$ L	碱性磷酸酶	0.5 $\mu$ L	超纯水到	20 $\mu$ L					
成 分	用 量																		
胶回收的 DNA 片段	1 pmol (相当于 1 $\mu$ g 3Kb 的线状质粒)																		
10 $\times$ 去磷酸缓冲液	2 $\mu$ L																		
碱性磷酸酶	0.5 $\mu$ L																		
超纯水到	20 $\mu$ L																		

	<p><b>二、限制性酶切反应的同步去磷酸化</b></p> <p>5、本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，所以可以按 1ug 3Kb DNA 加 1μL 碱性磷酸酶的比例直接加到限制性内切酶的反应液中（反应液中不能含 dNTP 和 ATP）。</p> <p>6、加热灭活限制性内切酶和碱性磷酸酶（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 5 分钟，否则不能灭活碱性磷酸酶）。灭活后的样品可以直接用于后续实验。</p> <p>7、如果不能采取加热灭活限制性内切酶和碱性磷酸酶，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)：</p> <p><b>附：酚/氯仿抽提去除酶步骤：</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1、在反应液中加入超纯水使体积变成 100μL，以免纯化过程中 DNA 丢失。如果有必须，可以加入和 4μL 核酸助沉剂提高回收效率。</li> <li>2、加入 100μL 酚/氯仿/异戊醇 25: 24: 1 混合液震荡半分钟混匀，室温 12000g 离心 3 分钟，转移上清到新离心管中。</li> <li>3、加 0.1 倍体积（即 10μL）的 3 M 乙酸钠溶液（pH 5.2）。</li> <li>4、再加入 2.5 倍体积（即 250μL）的无水乙醇。</li> <li>5、混匀后 12000g 4℃离心 10 分钟，小心弃上清。</li> <li>6、加入 1mL 70%乙醇，短暂离心 3 分钟后小心弃上清。</li> <li>7、短暂离心 5 秒，吸弃残留液体（约 30-50μL）。</li> <li>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。</li> </ol>
<p><b>关联产品</b></p>	<p>DNA 磷酸化试剂盒 (CAT: 130813)</p>

