

Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75)

Code No. 2120A Size: 50 U
 Conc.: 0.5 U/ μ l

Supplied Reagent:
10X Alkaline Phosphatase Buffer 1 ml

Description :

Bacterial alkaline phosphatase nonspecifically catalyzes the dephosphorylation of almost all phosphate monoesters, but it does not degrade diphosphate or triphosphate linkages.²⁾ This enzyme also degrades the pyrophosphate linkage of ATP.

Storage buffer :

50 mM	Tris-HCl, pH 8.0
100 mM	KCl
1 mM	MgSO ₄
50%	Glycerol

Storage: -20°C

Source : *Escherichia coli* C75¹⁾

Unit definition : One unit is the amount of the enzyme that produces 1 μ mol of *p*-nitrophenol per minute at 25°C and pH 8.0, with *p*-nitrophenyl phosphate as the substrate.

Reaction mixture for unit definition :

1 M	Tris-HCl, pH 8.0
1 mM	<i>p</i> -nitrophenyl phosphate

Quality Control Data :

Please see the Certificate of Analysis (CoA) for each lot. You can download the CoA on Takara Bio website.

Note :

This enzyme is very stable, and requires Zn²⁺ for its activity. It becomes temporarily inactive after incubation at 100°C in the presence of a chelating reagent, but recovers its activity when returned to room temperature. Therefore, treatment with phenol is required for inactivation at least twice after reaction.³⁾ Its optimum pH is 8.0, and the enzyme is activated by alcohol compounds such as Tris.

Applications :

1. Treatment before the 5'-termini of DNA (or RNA) are labelled.
2. Dephosphorylation of vector DNA to prevent its self-ligation before ligation with T4 DNA Ligase.

Composition of supplied reagent (Store at -20°C) :

10X Alkaline Phosphatase Buffer	
500 mM	Tris-HCl, pH 9.0
10 mM	MgCl ₂

The supplied buffer gives the different composition from that used for the unit definition. The supplied buffer has the general composition to be applicable to the experiment using Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75).

Application example :

Dephosphorylation of DNA

Prepare the reaction mixture by combining the following in a 1.5 ml tube to a total volume of 50 μ l.

DNA fragment in TE Buffer	1 - 20 pmol
Bacterial Alkaline Phosphatase (0.5 U/ μ l)	1 - 2 μ l
10X Alkaline Phosphatase Buffer	5 μ l
Sterile purified water	up to 50 μ l

- Incubate at 37 - 65°C for 30 min
 - Phenol/ Chloroform/ Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) extraction (2 times)
 - Chloroform/ Isoamyl alcohol (24 : 1) extraction
 - ← Add 2.5 μ l of 3 M NaCl (final conc. 150 mM)
 - Ethanol precipitation (Add 125 μ l (x 2.5 volume) of chilled ethanol, leave at -20°C for 30 - 60 min, and centrifuge.)
 - Wash the DNA pellet with 200 μ l of 70% chilled ethanol, and dry it.
- ↓
Dissolve in TE Buffer (< 20 μ l)

References :

- 1) Nakata A, Yamaguchi M, Izutani K, and Amemura M. *J Bacteriol.* (1978) **134**: 287-294.
- 2) Reid T W and Wilson I B. *The Enzymes.* (1971) **3**: 373-416.
- 3) Maxam A M and Gilbert W. *Methods in Enzymology.* (1980) **65**: 499-560.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from Takara Bio Inc. If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 565 6972 or from our website at www.takarabio.com. Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements. All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75)

Code No. 2120A 容量： 50 U
濃度： 0.5 U/ μ l

添付試薬：

10 × Alkaline Phosphatase Buffer 1 ml

● 製品説明

本酵素は全てのリン酸モノエステル結合を加水分解するが、ほとんどすべてのリン酸ジエステルおよびリン酸トリエステル結合は分解しない。²⁾ また、ATP等のピロリン酸結合も分解する。²⁾

● 形状

50 mM	Tris-HCl, pH8.0
100 mM	KCl
1 mM	MgSO ₄
50%	Glycerol

● 保存

− 20°C

● 起源

Escherichia coli C75¹⁾

● 活性の定義

p-nitrophenyl phosphate を基質として、25°C、pH8.0において、1分間に1 μ molの *p*-nitrophenol を遊離させる酵素活性を1 Uとする。

● 活性測定用反応液組成

1 M	Tris-HCl, pH8.0
1 mM	<i>p</i> -nitrophenyl phosphate

● 品質管理データ

性能試験結果については、各ロットの Certificate of Analysis (CoA) をご覧ください。CoAはタカラバイオウェブサイトからダウンロードできます。

● 使用上の注意

非常に安定性の高い酵素で、酵素1分子に2分子のZn²⁺が含まれる金属タンパク質である。キレート剤存在下100°Cの加熱で一時的に失活するが、室温に静置すれば活性の復活があるので、失活させるには少なくとも2回のフェノール処理が必要である。³⁾ 至適pHは8付近であり、Tris等のアルコール化合物で活性化される。

● 用途

1. DNA (あるいはRNA) の5'末端標識のための前処理
2. T4 DNA Ligaseによるライゲーションの際に、プラスミドのself-ligationを防ぐための脱リン酸化処理

● 添付試薬組成 (保存：− 20°C)

10 × Alkaline Phosphatase Buffer	
500 mM	Tris-HCl, pH9.0
10 mM	MgCl ₂

このバッファー系は、Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75) を用いる実験でより一般的な組成となっており、活性測定系とは異っている。

● 使用例 脱リン酸化反応

マイクロチューブ内に以下の反応液を調製し、全量を50 μ lとする。

DNA fragment in TE Buffer	1 ~ 20 pmol
Bacterial Alkaline Phosphatase (0.5 U/ μ l)	1 ~ 2 μ l
10 × Alkaline Phosphatase Buffer	5 μ l
滅菌精製水	up to 50 μ l

- 37 ~ 65°Cで30分間インキュベートする。
- フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) で抽出する (2回)。
- クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) で抽出する。
- ← 2.5 μ lの3 M NaClを加える (終濃度150 mM)。
- エタノール沈殿 (2.5倍量の冷エタノールを加え、− 20°Cで30 ~ 60分間保冷後、遠心分離)
- 沈殿を200 μ lの70%冷エタノールで洗浄後、乾燥
- TE Buffer (20 μ l以下) に溶解

● 参考文献

- 1) Nakata A, Yamaguchi M, Izutani K, and Amemura M. *J Bacteriol.* (1978) **134**: 287-294.
- 2) Reid T W and Wilson I B. *The Enzymes.* (1971) **3**: 373-416.
- 3) Maxam A M and Gilbert W. *Methods in Enzymology.* (1980) **65**: 499-560.

● 注意

本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。本データシートに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

v202107Da