

Alkaline Phosphatase (Calf intestine)

Code No. 2250A **Size:** **1,000 U**
Conc.: **30 U/ μ l**

Supplied Reagents:
10X Alkaline Phosphatase Buffer 1 ml

Description :

This enzyme is a dimer made of subunits each with the molecular weight of 50,000. Its active form is as a metalloenzyme of glycoprotein containing Zn^{2+} . It degrades almost all phosphate monoesters in the same way as the enzyme from *E. coli*, but it does not degrade diphosphate or triphosphate linkages.

Storage buffer :

10 mM	Tris-HCl, pH 8.0
1 mM	MgCl ₂
50 mM	KCl
0.1 mM	ZnCl ₂
50%	Glycerol

Storage: -20°C

Source :

Yeast carrying the plasmid which encodes the gene of calf intestine alkaline phosphatase.

Unit definition :

One unit is the amount of the enzyme that produces 1 μ mol of *p*-nitrophenol per minute at 37°C and pH 9.8, with *p*-nitrophenyl phosphate as the substrate.

Reaction mixture for unit definition :

1 M	diethanolamine, pH 9.8
0.5 mM	MgCl ₂
15 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 :

The optimum pH of this enzyme is near 10 when the concentration of the substrate is high. At low substrate concentrations, the optimum pH is near 8 and the specific activity is less than that at high substrate concentration. This enzyme is quite stable under proper storage conditions. It is irreversibly inactivated (99% or more) after being heated at 65°C for 30 minutes in the presence of a chelating reagent. However, inactivation may not be sufficient, depending on the conditions. For complete inactivation, treatment with phenol is desirable.

Applications :

Dephosphorylation of 5'-terminal phosphate groups from DNA fragments.

Composition of Supplied Reagent :

10X Alkaline Phosphatase Buffer (Store at -20°C)
500 mM Tris-HCl, pH 9.0
10 mM MgCl₂

The above buffer has a general composition applicable to experiments using Alkaline Phosphatase (Calf intestine). It is different from reaction mixture for unit definition.

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
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (30 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 or 50°C for 30 min
Or incubate at 37°C for 15 min and then incubate at 50°C for 15 min *1
- Phenol/ Chloroform/ Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) extraction (2 times) *2
- 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)

- * 1 Single strand DNA and DNAs with 5'-protruding ends can be dephosphorylated at 37°C. But those with blunt or 3'-protruding ends should be incubated at a higher temperature.
- * 2 It is recommended to incubate at 56°C for 30 min in 5 mM EDTA, 0.5% SDS and 50 μ g/ml Proteinase K before phenol extraction to inactivate the enzyme completely. Incubation at 75°C for 10 min prior to phenol extraction is more effective.

References :

- 1) Morton, R K. *Biochem J.* (1957) **65**: 674-682.
- 2) Chappellet-Tordo D, Fosset M, Iwatsubo M, Gache C, and Lazdunski M. *Biochemistry.* (1974) **13**: 1788-1795.
- 3) Besman M, and Coleman J E. *J Biol Chem.* (1985) **260**: 11190-11193.

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 6973 or from our website at www.takara-bio.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 (Calf intestine)

Code No. 2250A 容量： 1,000 U
濃度： 30 U/ μ l

添付試薬：
10 × Alkaline Phosphatase Buffer 1 ml

●製品説明

本酵素は分子量約 50,000 のサブユニット 2 つからなる、Zn²⁺ を含む糖タンパク質である。大腸菌由来の酵素同様、ほとんどのリン酸モノエステルを分解するが、リン酸ジエステルおよびリン酸トリエステルは分解しない。

●形状

10 mM Tris-HCl, pH8.0
1 mM MgCl₂
50 mM KCl
0.1 mM ZnCl₂
50% Glycerol

●保存 - 20°C

●起源

Yeast carrying the plasmid which encodes the gene of calf intestine alkaline phosphatase.

●活性の定義

p-nitrophenyl phosphate を基質として、37°C、pH 9.8 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 diethanolamine, pH9.8
0.5 mM MgCl₂
15 mM *p*-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のドキュメントセンターからダウンロードできます。

●使用上の注意

本酵素の最適 pH は高基質濃度では pH10 付近にあるが、低基質濃度では pH8 付近まで低下し、比活性も低下する。Tris 等アルコール化合物の添加、及び Mg²⁺ の添加により活性化される。本酵素は保存条件では安定であるが、キレート剤存在下 65°C、30 分間の熱処理で 99% 以上の活性が不可逆的に失活する。ただし使用条件によってはこれでも不十分な場合もあるので、より完全な失活のためにはフェノール処理することが望ましい。

●用途

DNA の 5' 末端の脱リン酸処理

●添付試薬組成

10 × Alkaline Phosphatase Buffer (保存 - 20°C)
500 mM Tris-HCl, pH9.0
10 mM MgCl₂

このバッファ系は、Alkaline Phosphatase (Calf intestine) 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

エッペンドルフチューブ内で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
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (30 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°C で 30 分間または 50°C で 30 分間インキュベートする。
または 37°C で 15 分間インキュベートした後、50°C で 15 分間インキュベートする。*1
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)。*2
クロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1) で抽出する (1 回)。
← 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

* 1 : 一本鎖や 5' 突出末端の核酸は、37°C でも十分に脱リン酸化されるが、平滑末端や 3' 突出末端の場合は、高い温度で処理するのがよい。

* 2 : 失活をより完全にするため、フェノール処理の前に、5 mM EDTA、0.5% SDS、50 μ g/ml Proteinase K 存在下で 56°C、30 分間インキュベートすると効果的である。フェノール処理の前に 75°C、10 分間インキュベートしておくことさらに効果的である。

●参考文献

- 1) Morton, R K. *Biochem J.* (1957) **65**: 674-682.
- 2) Chappellet-Tordo D, Fosset M, Iwatsubo M, Gache C, and Lazdunski M. *Biochemistry.* (1974) **13**: 1788-1795.
- 3) Besman M, and Coleman J E. *J Biol Chem.* (1985) **260**: 11190-11193.

●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。