



Polar BAP

Thermosensitive bakterielle alkalische Phosphatase

Polare bakterielle
alkalische Phosphatase

Artikel Nr.	Größe
E1027-01	1.000 Einheiten
E1027-02	5.000 Einheiten

Definition der Einheit:

Eine Einheit wird als die Menge des Enzyms definiert, die erforderlich ist, um 1 µg linearisierten pUC19-Vektor DNA innerhalb von 30 min bei 37°C vollständig zu dephosphorylieren.

Lagerbedingungen:

Lagerung bei -20°

Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf Endonuklease-, sowie auf unspezifische RNase und auf einzel- wie doppelsträngige DNase- Aktivitäten geprüft.

Unspezifische Deoxyribonuclease, Endonuklease, erzeugt 5'-phosphorylierte Di-, Tri- und Oligonukleotide aus einzel- und doppelsträngiger DNA.

Anwendungsgebiete:

- Entfernt 5'-Phosphate von DNA, RNA, rNTPs und dNTPs.
- Hitzeinaktivierung für 5 Minuten bei 70°C.
- Aktiv in einer weiten Bandbreite chemischer Bedingungen. Stabile Aktivität in verschiedenartigen Pufferformulierungen.
- Geeignet zum Abbau von dNTPs vor Sequenzierung von PCR-Produkten.
- Entfernt 5'-Phosphate von linearisierten Vektormolekülen, um einer Selbstligierung des Vektors während Klonierungsarbeiten entgegenzuwirken (1).
- Ermöglicht Dephosphorylierung von Proteinen.
- Für Verwendung in diagnostischen Immunoassays und für die Immunodetektion von Proteinen und Nucleinsäuren im Anschluss an Tüpfelnachweis- ("Blotting")-Experimente.

PCR-Aufreinigungsprotokoll (Exonuklease I - Aufreinigung von PCR-Produkten vor Sequenzierung):

Die folgenden Reaktionskomponenten werden gemischt:

25-50 µl PCR-Produkt (direkt nach PCR-Amplifikation)
0.5 µl (10 U) Exonuklease I (Best.Nr. E1150)
1 µl 5 U Polar BAP

Inkubation für 15 min bei 37°C

Hitzeinaktivierung für 15 min bei 80°C

Bis zu 5 µl des Oligonukleotid-befreiten PCR-Produktes kann direkt, ohne weitere Aufreinigung, zur Sequenzierung eingesetzt werden. Die Benutzung von PCR-Produkten ohne jegliche unspezifischen Nebenprodukte wird dringend empfohlen. Für die Durchführung dieses Protokolls sind keine speziellen Puffer erforderlich.

Standard-Protokoll zur Dephosphorylierung von Vektor-DNA.

Die folgenden Reaktionskomponenten werden gemischt:

1-5 µg von Restriktionsenzym-geschnittener DNA
5 µl 10 x Polar-BAP Reaktionspuffer
1 µl 5 U Polar-BAP
@ 50 µl H₂O, nukleasefrei (Best. Nr.)

Inkubation für 30 min bei 37°C

Hitzeinaktivierung für 5 min bei 70°C

1 x Polar-BAP Reaktionspuffer:

50 mM Bis-Tris-Propan-HCl pH 6 @ 25°C, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂.

Lagerungspuffer:

10 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 22°C), 1 mM MgCl₂, 0.01 mM ZnCl₂, 1 mM DTT, 50% Glycerin.

Literatur:

1. Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. Seite 72.
2. Werle et al. (1994) *Nuc. Acids Research* 22(20): 4354-4355