

产品说明

无机焦磷酸酶（酿酒酵母，*Saccharomyces cerevisiae*）催化无机焦磷酸盐水解生成正磷酸盐： $P_2O_7^{4-} + H_2O \rightarrow 2HPO_4^{2-}$ 。焦磷酸水解酶在核酸扩增实验中，其可解除生成的无机焦磷酸盐对反应体系的抑制，提高 RNA 和 DNA 的合成产量。

本公司酵母无机焦磷酸酶是重组表达，并经多步纯化制备的重组蛋白。

活性定义

1 活性单位指在 20°C 下，1×无机焦磷酸酶反应缓冲体系下，1 min 催化无机焦磷酸盐生成 1μmol 磷酸盐所需的酶量。

活性测定条件

1× Buffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM MgCl₂ and 2 mM PPi,

浓度: 0.2U/μl

保存条件: -20°C 可保存 2 年，避免反复冻融

特点与适用范围

- 提高体外转录反应中 RNA 产量
- 增强 DNA 复制能力

产品包装规格及组成

Component	AE0905A	AE0905B
酵母无机焦磷酸酶	10U	100U
10×Yeast PPase Buffer	0.3ml	1.5ml

质量控制

经过严格的质控检测，确保该产品具有最高的活性和纯度。

酶贮存缓冲液

20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% Glycerol, pH 8.0 @ 25°C

注意事项

- 该酶在多种反应 Buffer 中均具有活性，通常该酶在 RPA 扩增、RNA 体外转录等实验中，可直接加入酶即可。
- 该酶的用量在不同的实验中需要优化，通常在 0.05~1U/ml 浓度调整。
- 该酶的最佳反应温度为 25°C，其在 16~37°C 均有活性，65°C 10min 可使该酶失活，因此不适合于 Bst DNA 聚合酶催化的 LAMP 扩增。

使用实例 1：水解无机焦磷酸

1) 按下表配制反应体系

反应组分	体积或浓度
10×Buffer	10ul
焦磷酸钠	2mM
酵母无机焦磷酸酶(0.2U/μl)	2-5ul
H ₂ O	Xul
总体积	100ul

- 2) 25°C × 10min 反应，
- 3) 20μl 0.1mM 柠檬酸终止反应，
- 4) 按实验目的进行后续操作。

使用实例 2：增加体外转录 RNA 合成量

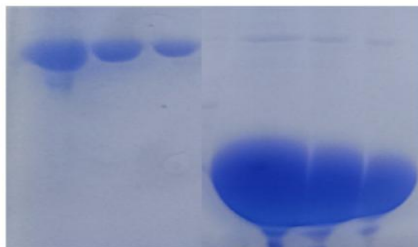
1) 按如下表格配制体外 RNA 转录反应液

反应组分	ul
10× Buffer	5
NTP (10mM ATP,GTP,TTP,CTP)	5
模板 DNA	1μg
RNase Inhibitor (40U/μl)	1
T7 RNA polymerase (50U/μl)	1
酵母无机焦磷酸酶(0.2U/μl)	1.0-2.0
DEPC-treated H ₂ O	Variable
总体积	50

2) 按设定条件进行体外转录，结束后琼脂糖胶电泳检测 RNA 转录产物

警告：本产品仅限科研实验使用，临床应用安全性和有效性未鉴定，不可用于医疗临床诊断。

一、表达纯化

AE0905 无机焦磷酸酶（酵母）			
批号	D20210803	纯化图片	
表达质粒	YF261	AE0905 无机焦磷酸酶（酵母）（YF261） 1mL TED 200mL 菌液 BL21StarDE3C2 D20210803 I- I+ 浊 清 流 5mM 合  洗脱合并10.5mL，上样均为5ul， 洗脱液浓度约为1.5mg/mL， 因此蛋白产量在153.75mg/L菌液。	
表达菌株	BL21 Star DE3 C2		
培养基	LB		
抗生素	K+		
菌液量	200mL		
OD600 起止	0.75/1.4		
诱导剂种类	IPTG		
诱导剂终浓度	0.5mM		
诱导条件	16°C×22h		
TED 树脂体积	1ml	第一次离子交换纯化	
Buffer A-C 咪唑浓度	0， 5， 50mM	树脂类型体积	
PMSF 终浓度	1mM	蛋白上样量/mg	
β-ME 终浓度	5mM	缓冲液组成	
热失活宿主蛋白	/	洗脱液 NaCl/mM	
裂解液/ml	25	洗脱体积	
洗涤液/ml	树脂体积的	第二次离子交换纯化	
0/5mM 咪唑	100/10 倍	树脂类型体积	
洗脱液/ml	10.5	蛋白上样量/mg	
蛋白表达量 mg/L	150	缓冲液组成	
蛋白可溶性	90%	洗脱液 NaCl/mM	
洗脱液浓度 mg/ml	1	洗脱体积	
纯化产量 mg	20.5	A280 6.419 酶 BSA 无机焦磷酸酶（酵母） （YF261） 浓度 1 0.5 0.25 7（1.5mL） ug/ul 上样量 4ul 4ul 2ul 1ul 	
蛋白纯度	80%		
浓缩液浓度 mg/ml	7		
浓缩液 A280	6.419		
浓缩液 Branford A595	/		
浓缩液体积/ml	1.5		
商品酶浓度 mg/ml	/		
商品酶 A280	/		
浓缩液活性单位 U/ul	10.65		
自产酶比活性 U/mg	1.522*10 ³		
商品酶比活性 U/mg	/		
蛋白热稳定性	°C半衰期 min		
问题：			

二、活性测定

1、三倍梯度稀释测活

(1) 测活条件如下：

1×反应 buffer: 20mM Tris-HCl, pH 7.5, 2mM MgCl₂, 2mM PPi

反应底物: 2mM PPi

反应体积: 150ul

反应温度: 20°C

反应时间: 10min

活性单位定义: 1 活性单位指在 20°C下, 1×无机焦磷酸酶反应缓冲体系下, 每分钟催化无机焦磷酸盐生成 1μmol 磷酸盐所需的酶量。

(2) 测活方案

反应组分	母液/ul (150ul×13)
10× Buffer	15×13
50mM Ppi	6×13
H ₂ O	124ul×13
无机焦磷酸酶 (酵母)	5ul
总体积 (ul)	150ul×13
1、自产酶稀释 10、100、1000、10000 倍 (即 0.7、0.07、0.007、0.0007ug/ul) ; 2、分 145ul 母液到 10 个 200ul Ep 管中, 包括 0.7、0.07、0.007、0.0007ug/ul 各 3 个和阴性对照 BSA; 3、取 5ul 稀释后的酶到各对应管中, 同时取 5ul BSA 加入 BSA 阴性对照管; 4、20°C×10min, 加 30ul 0.1mM 柠檬酸终止反应, 取 120ul 反应液, 加入 1ml AAM, 测 OD ₄₂₀ ; 5、阴性对照, BSA 反应液校零; 6、初步确定合适的测活浓度范围, 再分别取 2.5、5、10、15ul 的 0.0007ug/ul 酶液重复实验, 最后以 10ul 的 0.0007ug/ul 酶液(原液稀释了 10000 倍)做 6 组实验。产物浓度与吸收值的标准曲线为: $y = 5.7853x - 0.0465$ (吸收值>0.04 条件下, 公式准确) 7、结论: 自产无机焦磷酸酶原液活性单位浓度为 10.65 U/ul (7 mg/ml), 包装浓度 0.2 U/ul, 比活性: 1.522×10^3 U/mg	

(3) 测活结果

	AE0905
酶量/ug	0.007
OD420	0.132
	0.094
	0.108
	0.11
	0.12
	0.098

6 次和	0.662
平均值	0.110333

	平均值	产物 浓度	180ul 对 应的 umole 数	每分钟 生成 umole 数	比活性 U/ug	比活性 U/mg	包装质 量浓度 mg/ml	包装活 性浓度 U/ul	原液到包 装浓度稀 释倍数	原液质 量浓度 mg/ml	原液活性 单位浓度 U/ul
AE0905	0.1103	0.5918	0.1065	0.01065	1.522	1522	0.1314	0.2	53.263	7	10.65

自产酶原液稀释 10000 倍，

自产无机焦磷酸酶原液活性单位浓度为：10.65 U/ul（7mg/ml），比活性为：1.522×10³ U/mg

（4）再次三倍稀释测活（选做）

若上述步骤（1）-（3）标定的自产酶活性单位不准确，将步骤（3）标定的自产酶活性单位调整成 2.0、1.5、1.0、0.75、0.5U，加上 BSA 阴性对照，重新进行 5 个活性单位的反应测定。