

Western 及 IP 细胞裂解液

产品详情

目录号	WD100020
保存方法	-20℃ 一年
产品规格	100ml

产品简介

Western 及 IP 细胞裂解液(Cell lysis buffer for Western and IP), 是一种在非变性条件下裂解细胞或组织样品从而制备蛋白样品的裂解液。本裂解液裂解的细胞或组织样品, 可以用于 PAGE, Western, 免疫沉淀(immunol precipitation, IP)、免疫共沉淀(co-IP)和 ELISA 等

Western 及 IP 细胞裂解液 的主要成分为 20mM Tris (pH7.5), 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 以及 sodium pyrophosphate, β -glycerophosphate, EDTA, Na₃VO₄, leupeptin 等多种 抑制剂。可以有效抑制蛋白的降解, 并维持原有的蛋白间相互作用。

用 Western 及 IP 细胞裂解液 裂解得到的蛋白样品, 可以用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。由于含有较高浓度的 Triton X-100 等干扰物质, 不能用 Bradford 法测定由本裂解液裂解得到样品的蛋白浓度。

使用说明:

对于培养细胞样品:

1. 融解 Western 及 IP 细胞裂解液, 混匀。取适当量的裂解液, 在使用前数分钟内加入 PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1mM, 或者根据实验需要加入适当的上述蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物。
2. **对于贴壁细胞:** 去除培养液, 用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍(如果血清中的蛋白没有干扰, 可以不洗)。按照 6 孔板每孔加入 100-200 微升裂解液的比例加入裂解液。用枪吹打数下, 使裂解液和细胞充分接触。通常裂解液接触动物细胞 1-2 秒后, 细胞就会被裂解。植物细胞宜在冰上裂解 2-10min。
3. **对于悬浮细胞:** 离心收集细胞, 轻轻 vortex 或者弹击管底以把细胞尽量分散开。按照 6 孔板每孔细胞加入 100-200 微升裂解液的比例加入裂解液。轻弹管底以充分裂解细胞。充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。如果细胞量较多, 必需分装成 50-100 万细胞/管, 然后再裂解。大团的细胞较难裂解充分, 而少量的细胞由于裂解液容易和细胞充分接触, 相对比较容易裂解充分。
4. **对于细菌或酵母:** 对于 1ml 菌液或酵母液, 离心去上清, 如果有必要可以使用 PBS 洗涤一次, 充分去除液体后, 轻轻 vortex 或者弹击管底以把细菌或酵母尽量弹散。加入 100-200 微升裂解液, 轻轻 vortex 或者弹击管底以混匀, 冰上裂解 2- 10min。如果希望获得更好的裂解效果, 细菌和酵母可以分别使用溶菌酶和破壁酶(Lyticase)消化, 然后再使用本裂解液进行裂解。
5. **裂解液用量说明:** 通常 6 孔板每孔细胞或者 1ml 的菌液或酵母液中的细菌和酵母量加入 100 微升裂解液已经足够, 但如果细胞密度非常高可以适当加大裂解液的用量到 150 微升

或 200 微升。每 100 万动物细胞用 100 微升本产品裂解后获得的上清，其蛋白浓度约为 2-4mg/ml，不同细胞有所不同。

6. 充分裂解后，10000-14000g 离心 3-5 分钟，取上清，即可进行后续的 PAGE、Western、免疫沉淀和免疫共沉淀等操作。

对于组织样品：

1. 把组织剪切成细小的碎片。
2. 融解 Western 及 IP 细胞裂解液，混匀。取适当量的裂解液，在使用前数分钟内加入 PMSF，使 PMSF 的最终浓度为 1mM。
3. 按照每 20 毫克组织加入 100-200ul 裂解液的比例加入裂解液。(如果裂解不充分可以添加更多的裂解液，如果需要高浓度的蛋白样品，可以适当减少裂解液的用量。)
4. 用玻璃匀浆器匀浆，直至充分裂解。
5. 充分裂解后，10000-14000g 离心 3-5 分钟，取上清，即可进行后续的 PAGE、Western、免疫沉淀和免疫共沉淀等操作。
6. 如果组织样品本身非常细小，可以适当剪切后直接加入裂解液裂解，通过强烈 vortex 使样品裂解充分。然后同样离心取上清，用于后续实验。直接裂解的优点是比较方便，不必使用匀浆器，缺点是不如使用匀浆器那样裂解得比较充分。

注意事项：

1. 为取得最佳的使用效果，尽量避免过多的反复冻融。可以适当分装后使用。
 2. 需自备 PMSF。
 3. 裂解样品的所有步骤都需在冰上或 4℃进行。
 4. 可能需要通过一些预实验来摸索最佳的适合您实验条件的裂解液。
 5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
-