

Western 及 IP 裂解液

ProtLytic Protein Lysis and Sample Loading

货号: Cat.No: P70100 Size: 10m

产品介绍

新赛美生物生产的 Western 及 IP 细胞裂解液 (Cell Lysis Buffer for Western and IP without Inhibitors), 是一种在非变性条件下裂解细胞的裂解液。本细胞裂解液可以有效地裂解细胞蛋白, 同时不会释放出基因组 DNA 等物质, 亦不会破坏蛋白的结构, 处理好的样品可以用于 PAGE, Western, 免疫沉淀(Immunol precipitation, IP), 免疫共沉淀(Co-IP), 以及许多兼容 1%NP-40 的酶活性或者生物小分子的检测。本细胞裂解液的主要成分为 25mM Tris-HCl(pH7.4), 150mM NaCl, 1% NP-40 和 5%的 glycerol 等, 可有效抑制蛋白的降解, 并维持原有的蛋白间相互作用。

操作步骤

对于培养细胞样品 (仅供参考)

1. 取适当量的 Western 及 IP 细胞裂解液, 在使用前数分钟内加入 PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1mM。

注意: Western 及 IP 细胞裂解液不含蛋白酶等抑制剂, 根据需要在购买前添加蛋白酶, 磷酸酶等抑制剂。

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 150-250 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。通常裂解液接触细胞 1-2 秒后, 细胞就会被裂解。

对于悬浮细胞: 离心收集细胞, 用手指把细胞用力弹散。按照 6 孔板每孔细胞加入 150-250 微升裂解液的比例加入裂解液。再用手轻轻弹以充分裂解细胞。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。

对于组织样品:

1. 把组织剪切成细小的碎片。

2. 取适当量的 Western 及 IP 细胞裂解液, 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 150-250 微升裂解液的比例加入裂解液。(如果裂解不充分可以适当添加更多的裂解液, 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 和免疫沉淀等操作。

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, 通过强烈涡旋使样品裂解充分。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. 本裂解液不含有抑制剂, 根据实验的需要, 加入相应的蛋白酶或磷酸酶抑制剂。
3. 裂解样品的所有步骤都需在冰上或 4℃ 进行。
4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。