

Western 及 IP 细胞裂解液(无抑制剂)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

产品简介：

多种成分均可以从细胞中提取总蛋白，如 Triton、SDS、NP-40 等，Western 及 IP 细胞裂解液是采用一种非变性裂解方法来裂解细胞，并获得总蛋白的裂解液。所获得的蛋白质可以用于 PAGE 电泳，Western，免疫沉淀(Immunol Precipitation,IP)和免疫共沉淀(co-IP)等，主要由 Tris-HCl、NaCl、低浓度 Triton X-100，低浓度 sodium pyrophosphate 等组成，不含蛋白酶、磷酸酶抑制剂，并维持原有的蛋白间相互作用。

用 Western 及 IP 细胞裂解液(无抑制剂)(Cell lysis buffer for Western and IP without inhibitors)得到的蛋白，可以用 BCA 蛋白定量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，不宜用 Bradford 法测定由 Western 及 IP 细胞裂解液获得样本的蛋白浓度。

产品组成：

产品名称	规格	保存条件	说明书	有效期
Western 及 IP 细胞裂解液(无抑制剂)	100ml	-20℃	1 份	1 年

操作步骤(仅供参考)：

(一)贴壁培养细胞

- 1、取 Western 及 IP 细胞裂解液室温溶解混匀，根据需要选择添加或不添加蛋白酶抑制剂。
- 2、去除贴壁细胞的培养液，用 PBS、NS 或无血清培养液清洗 1 次，低速离心，弃上清，留取沉淀。
- 3、按照 6 孔板每孔加入 100~200 μ l 裂解液的比例，加入 Western 及 IP 细胞裂解液。移液器轻轻吹打，使裂解液和细胞充分接触。通常裂解液作用于细胞 1~5s 内，细胞就会被裂解。
- 4、10000~12000g，离心 3~5min(如果用冷冻离心机 4℃离心效果更佳)，取上清。
- 5、进行后续的 SDS-PAGE、Western、免疫沉淀和免疫共沉淀等操作。

(二)悬浮培养细胞

- 1、取 Western 及 IP 细胞裂解液室温溶解混匀，根据需要选择添加或不添加蛋白酶抑制剂。
- 2、低速离心悬浮细胞，弃上清，收集沉淀。
- 3、用手指轻弹细胞，使其松散。按照 6 孔板每孔细胞加入 100~200 μ l 裂解液的比例，加入 Western 及 IP 细胞裂解液。通常 6 孔板每孔细胞加入 100 μ l 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 150~200 μ l，再用手轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。

- 4、10000~12000g, 4℃离心 3~5min(如无低温离心机, 室温下离心亦可), 取上清。
- 5、进行后续的 PAGE、Western、免疫沉淀等操作。

(三)组织样本

- 1、取 Western 及 IP 细胞裂解液置于室温溶解混匀, 根据实验需要选择添加或不添加蛋白酶抑制剂。
- 2、把组织剪切成细小的碎片, 越小越好。
- 3、取在液氮或超低温冰箱中冷冻 30min 以上的组织, 迅速用液氮研磨, 研磨过程尽量控制在 1~2min 之内, 以减少蛋白的降解。
- 4、按照每 20mg 组织加入 100~200 μ l 裂解液的比例, 加入含有 PMSF 的裂解液。冰上或 4℃裂解 30~60min。
- 5、步骤 3、4 亦可以采用如下过程: 按照每 20mg 组织加入 100~200 μ l 裂解液的比例加入 Western 及 IP 细胞裂解液。用玻璃匀浆器或组织研磨器匀浆, 直至充分裂解, 过程尽量控制在 1~2min 之内, 以减少蛋白的降解。
- 6、按照每 20mg 组织加入 100~200 μ l 裂解液的比例, 加入 Western 及 IP 细胞裂解液。
- 7、10000~12000g, 4℃离心 10~15min(如无低温离心机, 室温下离心亦可), 取上清。
- 8、进行后续的 PAGE、Western、免疫沉淀和免疫共沉淀等操作。

注意事项:

- 1、去除贴壁细胞的培养液时, 如果血清中的蛋白没有干扰, 可以不用清洗。
- 2、如果裂解不充分可以适当增加裂解液的用量, 如果需要高浓度的蛋白样品, 可以适当减少裂解液的用量。
- 3、如果细胞量较多, 必需分装成 50~100 万细胞/离心管, 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、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, 缺点是如果使用匀浆器那样裂解得比较充分。
- 5、溶解 Cell lysis buffer for Western and IP 时, 应尽量缩短溶解时间, 避免裂解液中的有效成分失效。
- 6、细胞裂解的操作步骤, 应置于冰上或 4℃进行。