

Western 及 IP 细胞裂解液

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, 并含有多种蛋白酶抑制剂成分, 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。该试剂仅用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。

组成:

名称 \ 编号	R21233 [®]	R21233	Storage
Western 及 IP 细胞裂解液	100ml	500ml	-20℃
PMSF(100mM)	1.5ml	7.5ml	-20℃
说明书	一份		

操作步骤(仅供参考):

(一)贴壁培养细胞

- 1、取 Western 及 IP 细胞裂解液置于室温溶解混匀, 加入 PMSF, 使 PMSF 终浓度为 1mM。
- 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 含有 PMSF 的裂解液的比例，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 $^{\circ}$ C 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 细胞裂解液置于室温溶解混匀，加入 PMSF，使 PMSF 终浓度为 1mM。

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 含有 PMSF 的裂解液的比例，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，再用手指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 $^{\circ}$ C 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，加入 PMSF，使 PMSF 终浓度为 1mM。

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 $^{\circ}$ C 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 裂解液的比例加入含有 PMSF 的 Western 及 IP 细胞裂解液，用玻璃匀浆器或组织



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

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，加入含有 PMSF 的裂解液。

7、10000~12000g，4 $^{\circ}$ C 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，缺点是不如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 $^{\circ}$ C 进行。

有效期： 12 个月有效。