

Cell lysis buffer for IP (without inhibitors)

货号: RM00022

规格: 100 ml

◆ 产品描述

本产品为 NP-40 裂解液, NP-40 裂解液是一种比较温和的细胞组织裂解液。裂解得到的蛋白样品可以用于常规的 Western、IP 和 Co-IP 等。裂解液中不含蛋白酶抑制剂, 需根据要求选择添加蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂。当用于研究磷酸化作用使蛋白改良时, 应加入磷酸酶抑制剂。如果出现目标蛋白降解, 应加入蛋白酶抑制剂。用该裂解液裂解得到的样品, 可用 BCA 或 Bradford 法测定浓度。

◆ 产品成分

成分	浓度
氯化钠 (NaCl)	13.689mM
磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄)	2.558mM
磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	0.176mM
氯化钾 (KCl)	0.268 mM
SDS	0.0347 mM
NP-40	0.5% (V/V)

◆ 保存条件

-20℃ 保存, 12 个月。

◆ 操作说明 (仅供参考)

一、贴壁培养细胞

- 1、取 NP-40 裂解液室温溶解混匀, 根据需要进行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 或无血清培养基清洗 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 μl 裂解液的比例, 加入 NP-40 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, 细胞会被裂解。
- 4、1000~12000g, 离心 3~5min (如果用冷冻离心机 4℃ 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 NP-40 裂解液室温溶解混匀, 根据需要进行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 孔板每孔加入 100~200 μl 裂解液的比例, 加入 NP-40 裂解液。通常

6孔板每孔加入 100~200 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 150~200 μ l, 再用手指轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后应无明显沉淀。

4、1000~12000g, 离心 3~5min (如果用冷冻离心机 4 $^{\circ}$ C 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。

三、组织样本

1、取 NP-40 裂解液室温溶解混匀, 根据需要进行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。

(步骤 3、4 也可采用以下过程: 按照每 20mg 组织加入 100~200 μ l 裂解液的比例加入 NP-40 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。)

5、1000~12000g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10~15min (如无低温离心机, 室温下离心也可), 取上清。

6、进行后续的 SDS-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溶液与细胞充分接触, 相对比较容易裂解充分。

4、如果组织样品本身比较细小, 可以适当剪切后直接加入裂解液溶解, 再通过强烈 Vortex 使样品裂解充分。再离心取上清, 用于后续实验。

5、细胞裂解的操作步骤, 应置于冰上或 4 $^{\circ}$ C 进行。

6、本产品可作为免疫沉淀和免疫共沉淀的 Washing buffer 使用, 每 200ug 磁珠加入 1ml 本产品进行洗脱即可。