



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// [www.real-tims.com.cn](http://www.real-tims.com.cn)

E-mail: [real-times@vip.163.com](mailto:real-times@vip.163.com)

## Western 及 IP 细胞裂解液（无抑制剂）

### ● 产品包装:

产品编号	产品名称	产品包装	说明书
WL0120F	Western 及 IP 细胞裂解液（无抑制剂）	100 ml	1 份

### ● 产品简介:

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。本细胞裂解液裂解能力比较温和, 可以用于 PAGE, Western, 免疫沉淀(immunol precipitation, IP)和免疫共沉淀(Co-IP)。裂解液的主要成分为 20 mM Tris (pH7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 等, 裂解后能维持原有的蛋白间相互作用。由于含有较高浓度的 Triton X-100 等干扰物质, 不能用传统 Bradford 法测定由本裂解液裂解得到样品的蛋白浓度, 可以使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号: RTP7102) 或 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (去垢剂兼容型) (货号: RTP7104) 测定蛋白浓度。使用本裂解液时, 用户可以根据具体用途自行添加特定抑制剂或者不添加抑制剂。

### ● 保存条件:

-20℃ 保存, 一年有效。

### ● 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 或其他蛋白酶抑制剂; 如进行蛋白磷酸化研究, 还需要自备磷酸酶抑制剂。
3. 裂解样品的所有步骤都需在冰上或 4℃ 进行。

### ● 使用说明:

#### 1. 准备裂解液:

溶解裂解液, 混匀; 取适当量的裂解液, 在使用前数分钟内加入 1/100 体积的 100 mM PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1 mM。如进行蛋白磷酸化研究, 需要加入磷酸酶抑制剂。

#### 2. 细胞蛋白提取:

**2.1 贴壁细胞:** 去除培养液, 加入适量 1×PBS, 轻柔漂洗一遍, 不要扰动贴壁细胞。按照 6 孔板每孔加入 100-200 μl 裂解液的比例加入裂解液, 移液器吹打数下, 使裂解液和细胞充分接触, 冰上裂解细胞 5 分钟, 用细胞刮刀刮下细胞收集于 1.5 ml 离心管中, 冰上继续裂解 15 分钟, 间歇混匀。

培养板规格/培养皿表面积	细胞量	裂解液推荐使用量
100 mm 培养皿	$1.5 \times 10^7$	0.5-1 ml
60 mm 培养皿	$5 \times 10^6$	0.25-0.5 ml
35 mm 培养皿	$2 \times 10^6$	0.2-0.4 ml
6 孔板	$2.5 \times 10^6$	100-200 μl
24 孔板	$5 \times 10^5$	100-150 μl

96孔板	$1 \times 10^5$	50-100 $\mu$ l
------	-----------------	----------------

**2.2 悬浮细胞:** 450 g 4°C 离心5 min收集细胞; 用适量1×PBS重悬细胞, 450 g 4°C 离心5 min收集细胞; 重复漂洗细胞一次; 按照细胞沉淀体积 (PCV) 20  $\mu$ l加入200  $\mu$ l 裂解液, 混匀细胞沉淀, 冰浴处理15分钟, 间歇混匀。

注:  $2 \times 10^6$  Jurkat细胞, 其细胞沉淀体积 (PCV, Packed Cell Volume) 大约为20  $\mu$ l。

**2.3 裂解细胞:**

用玻璃匀浆器匀浆, 直至充分裂解或通过强烈涡旋震荡使样品裂解充分。冰浴处理15分钟。

注: 裂解混合物不建议使用超声波破碎仪处理, 因为超声波处理比较剧烈, 容易破坏蛋白的相互作用导致蛋白变性。

**2.4 离心收集上清:**

充分裂解后, 4°C 16000 g离心10分钟, 取上清, 即可进行后续的PAGE、Western和免疫沉淀等操作。

**3. 组织样品蛋白提取:**

3.1 手术切除的组织块迅速置于预冷的生理盐水中, 漂洗数次, 洗净组织血迹, 用滤纸吸干组织表面液体, 将组织切成细小的碎片。

3.2 按照每20 mg组织加入200  $\mu$ l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。)

3.3 用玻璃匀浆器冰浴匀浆5-10次, 收集匀浆后的裂解混合物。裂解物冰浴处理15分钟。

注: 裂解混合物不建议使用超声波破碎仪处理, 因为超声波处理比较剧烈, 容易破坏蛋白的相互作用导致蛋白变性。

3.4 充分裂解后, 4°C 16000 g离心10分钟, 取上清, 即可进行后续的PAGE、Western和免疫沉淀等操作。