

蛋白裂解及上样缓冲液 (1X, 还原性)

ProtLytic Protein Lysis and Sample Loading

货号: Cat.No: WB2010 Size: 10ml; Cat.No:WB2040 Size :4X 10ml -20 °C 保存, 冰袋运输, 至少 1 年有效

产品介绍

新赛美生物生产的蛋白裂解及上样缓冲液(ProtLytic Protein Lysis and Sample Loading, 1X), 是一种经过改良的以溴酚蓝为染料的可直接裂解蛋白且直接上样的缓冲液。可以直接用于细胞或组织样品的裂解, 并用于后续常规的 SDS-PAGE 蛋白样品的上样。直接裂解蛋白样品的优点是比较便捷; 缺点是裂解好的蛋白样品不能用常规的 Bradford 法或 BCA 法测定蛋白浓度。这样蛋白上样量的均一性就较难控制, 需要借助考马斯亮蓝等的染色结果或 Western 的检测结果, 来调整上样量。该产品是还原性的, 加入了 TCEP 的还原剂, 替代了传统的 DTT 或 2-ME, 还原剂 TCEP 无难闻气味, 稳定性更高, 还原效果更佳。

操作步骤

1. 取适当量的蛋白裂解及上样缓冲液, 在使用前数分钟内加入 PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1mM。

注意: 该产品不含蛋白酶等抑制剂, 根据需要在添加蛋白酶, 磷酸酶等抑制剂 (蛋白酶抑制剂混合液, 货号: P001)。

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 微升比例加入裂解液。用枪吹打数下, 使裂解液和细胞充分接触。

3. 对于悬浮细胞: 离心收集细胞, 将细胞用力弹散。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。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:

(a). 把组织剪切成细小的碎片。

(b) 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)

(c) 用玻璃匀浆器匀浆, 直至充分裂解。充分裂解后, 将样品收集到一洁净离心管中。

4. 100°C 或沸水浴加热 5-10 分钟, 以充分变性蛋白。

注意: 煮沸前通常会发现蛋白样品内有粘稠的半透明状物体, 通常在本上样缓冲液内沸水浴煮沸 8-10 分钟后可以确保该粘稠的半透明状物体消失, 以便于后续的上样操作。

5. 冷却到室温后, 室温稍离心一下以沉淀可能出现的杂质等, 上清即可直接上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内即可。通常电泳至蓝色染料到达胶的底端处附近即可停止电泳。

注意事项:

1. 裂解液的裂解产物中经常会出现一小团胶状物, 属正常现象。
2. 为获得最佳的实验效果, 可适当分装使用, 以尽量避免反复冻融。
3. PMSF 应现用现加, 需自备 PMSF。
4. 裂解蛋白的所有步骤都需在冰上或 4°C 进行。
5. 蛋白酶抑制剂均有较高的毒性, 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。一旦直接接触, 请立即用流水冲洗, 再向医疗保健结构咨询。