



NP-40 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。NP-40 裂解液 (NP-40 Lysis Buffer) 是采用一种温和的裂解方法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, 并含有多种蛋白酶抑制剂成分, 可有效抑制蛋白的降解, 并维持原有的蛋白间相互作用。

NP-40 Lysis Buffer 主要由 Tris-HCl、NaCl、NP-40 等组成并含多种蛋白酶抑制剂; 用 NP-40 Lysis Buffer 得到的蛋白, 由于含有较高浓度的去垢剂, 不能用 Bradford 法测定蛋白浓度。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	R21234	Storage
NP-40 Lysis Buffer	100ml	-20℃
PMSF(100mM)	1.5ml	-20℃
说明书	一份	

操作步骤(仅供参考):

(一)贴壁培养细胞

- 1、取 NP-40 Lysis Buffer 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 150~250 μ l 含有 PMSF 的裂解液的比例, 加入 NP-



40 Lysis Buffer, 移液器轻轻吹打使裂解液和细胞充分接触, 置于冰上或 4℃裂解 15~30min, 通常裂解液作用于细胞 1~3s 内, 细胞就会被裂解。

4、10000~12000g, 4℃离心 5~10min(如无低温离心机, 室温下离心亦可), 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 Lysis Buffer 置于室温溶解混匀, 加入 PMSF, 使 PMSF 终浓度为 1mM, 低速离心悬浮细胞, 弃上清, 收集沉淀。

2、用手指轻弹细胞, 使其松散, 按照 6 孔板每孔细胞加入 150~200μl 含有 PMSF 的裂解液的比例, 加入 NP-40 Lysis Buffer, 通常 6 孔板每孔细胞加入 150μl 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 200~250μl, 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。

3、10000~12000g, 4℃离心 5~10min(如无低温离心机, 室温下离心亦可), 取上清。

4、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 Lysis Buffer 置于室温溶解混匀, 加入 PMSF, 使 PMSF 终浓度为 1mM, 把组织剪切成细小的碎片, 越小越好。

2、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。

3、按照每 20mg 组织加入 150~250μl 裂解液的比例加入含有 PMSF 的裂解液, 冰上或 4℃裂解 30~60min。

4、步骤 3、4 亦可以采用如下过程: 按照每 20mg 组织加入 150~250μl 裂解液的比例, 加入含有 PMSF 的 NP-40 Lysis Buffer, 用玻璃匀浆器或组织研磨器匀浆, 直至充分裂解, 该过程尽量控制在 1~2min 之内, 以减少蛋白的降解。

5、10000~12000g, 4℃离心 5~15min(如无低温离心机, 室温下离心亦可)



可), 取上清。

6、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、在贴壁培养细胞的操作步骤中, 去除贴壁细胞的培养液后, 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、在培养细胞的裂解中, 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 NP-40 Lysis Buffer 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°C 进行。

7、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期: 12 个月有效。