

非变性组织细胞裂解液(Nondenaturing Lysis Buffer) C1050

描述: 非变性细胞裂解液(Nondenaturing Lysis Buffer, C1050)内含非离子型去垢剂和盐,能裂解细胞并在非变性条件下释放胞浆蛋白和可溶性膜蛋白、核蛋白。非变性条件下的裂解蛋白产物最大限度地保留了蛋白的特性和功能,如抗原-抗体结合能力或酶学活性,因此适宜于进行免疫共沉淀。另外,有些抗体对非变性蛋白具有更高的结合能力或只能识别非变性蛋白的抗原位点,在这种情况下,应该使用非变性细胞裂解液制备总蛋白。

储存: 4℃保存 12个月有效

操作步骤:

制备细胞裂解产物:

1. 800g 4℃离心 5分钟收集培养细胞,而后用预冷的 PBS 洗涤细胞两次。估计细胞离心后的体积(PCV, 10^6 cells \approx 20 μ l, 10^7 cells \approx 100 μ l PCV);
2. 每 50~100 μ l PCV 加入 5 倍体积非变性组织细胞裂解液(250~500 μ l),涡旋震荡 10 秒,冰浴放置 20 分钟;
3. 12000g 4℃离心 15 分钟,将上清转移到新的离心管中,即得细胞总蛋白产物,

制备组织裂解产物:

1. 取 50-100 mg 组织在冰上剪成碎片,用预冷的 PBS 洗涤 2 次离心弃去 PBS;
2. 加入 0.5-1 ml 预冷的非变性组织细胞裂解液;
3. 4℃用玻璃匀浆器匀浆 20-40 次,直到 95%的细胞被破碎,涡旋震荡 10 秒,冰浴放置 20 分钟;
4. 12000g 4℃离心 15 分钟,将上清转移到新的离心管中,即得组织总蛋白产物,可用于后续的免疫沉淀或者 Western Blot 等实验。

注意:

1. 在转移上清液时不要吸入底部的沉淀物;
2. 在做免疫沉淀或免疫共沉淀时最好在实验前进行蛋白的提取,以避免某些不稳定蛋白的降解;
3. 在该裂解缓冲液中未加入蛋白酶抑制剂,用户可自行选择进行添加。