

WB 或 IP 样品制备的技术指导 (物理或机械的方式破碎样品)

在 WB 和 IP 实验中，破碎细胞或组织与选择和配制裂解液一样重要。比起一些更软的组织（如脑组织），在准备 WB 或 IP 的样品时，紧密的纤维组织（如肌肉组织）需要更剧烈的方法；对于培养的原代细胞或细胞系，在准备 WB 和 IP 的样品时需要一定的机械搅拌去提取蛋白。机械破碎样品常规的方法和设备如下：

组织高速匀浆仪

通常破碎体积大的植物或者动物组织需要用可旋转、带有刀片的匀浆仪或者搅拌器。这些仪器通常通过一个电动的马达带动不锈钢可旋转切割刀片，可以从顶部或者底部启动，这个过程中产生很少热量，但是样品需要置于冰上。匀浆仪的转速和刀片的尺寸，需要根据样品的体积和组织大小来确定。大部分匀浆仪产生的颗粒较大，然而，一些带特殊旋转刀片的匀浆仪可以切割产生小到 4 微米且一致的颗粒，这种破碎对于一些小的单细胞样本（如细菌、酵母）效果不明显，但是对于大块的、骨质的、纤维较多的样本特别适用。

研钵和研磨匀浆器

研磨匀浆器特别适合软组织和细胞悬液，它是由一个不锈钢或玻璃的活塞样槌头和一个玻璃槌管组成，匀浆器槌头表面和槌管壁是磨砂面的，以提高研磨的效果。槌头在管底部的缝隙通常是几百微米，小的组织（通常被切割成 1mm 的小段）放在槌管底部，同时加有预冷的少量裂解液，槌头在匀浆槌管中旋转可以使小的组织碎片粉碎。某些组织研磨相关仪器也会加入玻璃粉，氧化铝珠或细沙去增强样品的粉碎。

值得注意的是，在加入裂解液之前，一般陶瓷或者石制的研磨钵和冷冻过的研磨棒可以用来磨碎部分已经用液氮动过的固体组织。其他更进一步的组织粉碎的方法可以与冷冻研磨一起合用。

超声破碎

超声破碎一般是用超声波的能量（大于 20kHz）去破坏蛋白复合物、细胞器和细胞膜。超声波的能量会产生很多微气泡，这些气泡可以内爆并产生冲击波，也称作气穴作用。气穴作用产生的机械压力可以破坏细胞膜结构和蛋白复合物。超声破碎是有效的切割染色质方法，可以有效提升样品中蛋白质的可溶性，特别是完整的核蛋白和染色质相关蛋白的有效裂解都需要样品的超声处理。需要注意的是，尽管之前在样品制备的过程中可能用其他的方法匀浆处理过，CST 仍然推荐补加超声步骤处理所有样品。

超声的方法有两种：直接法和间接法。直接法是超声仪的探头直接插入样本中，而间接法是通过水浴这个介质将超声波能量的传递到样品管直至样品内部，这两种方法的优缺点如下：

1、直接（利用探头）超声

带有探头的超声仪非常广泛的用于小和中量样本制备中。这种超声仪的基本单元，通过电线与圆柱转换器的连接产生高压脉冲。转换器把电能转化成超声波振动，这种超声振动被放大，并通过实体的探头传递到液体裂解样品中。

有效超声所需振动能量的优化（放大倍数/超声强度）取决于样本的体积和超声探头的大小。如果裂解液体积太小，探头没有足够浸没在液体中，或者探头太大、超声仪设置的频率太高，样本可能会在超声过程中产生气泡，影响超声效果。

选择合适的探头也很重要，当液体的体积在 1-5ml 之间,很多超声厂商推荐使用直径为 3 mm 的探头。如果用很小的探头（小于 3mm），并把探头放于样品较深的位置，将导致超声破碎样本效果大打折扣。

长时间的超声过程产生的热量会导致样品变性或者降解。为了阻止样本过热，超声过程中需要将样品管放在冰浴中，每次超声处理一段时间后需要在冰上暂停一段时间，用来减少热量的产生，每次超声的时间也可以优化。更多高级的超声仪可以设置时间、强度、暂停时间、重复超声次数等参数并储存为程序，以实现自动超声。CST 只用带探头的超声仪去准备样品，当处理 1ml 的样品时，用 3mm 的探头。我们一般推荐使用 35%-40% 的最大功率进行 3 次超声脉冲，每次超声时间 10 秒,每次超声之间停顿 10 秒，不同的仪器可以调整最大功率水平在 200W 左右。

2、间接（水浴）超声

水浴超声的能量是通过水传递到样品的内部，可以同时做多个样品。因为不需要样本与探针的匹配，因此样本可以在无菌的条件下操作，避免探头造成污染，还可以避免样本在超声中过热。这个方法比较适合高通量的实验，或者小体积的样本，因为体积小使用直接超声会产生气泡。间接超声没有直接超声那么有效，可以多做几次间接超声来提高样品破碎的效果。当样本数量不多时，直接超声裂解还是很有效的。

3、用带针头的注射器进行破碎

如果没有探头超声仪，可以用细的注射器针头破碎样本，也可以破坏细胞膜并切割核染色质。针头抽吸样品产生的机械压力，可以破碎细胞膜、细胞器和核蛋白复合物。首先，将样本用裂解液重悬后，先用粗一些的针头（如 10ml 注射器针头）进行多次吹吸，再换成更小的的针头继续吹吸，直到样品粘稠度明显下降，整个过程需要在冰上操作。