

生物样本制备超声破碎机

产品使用说明书

针对产品型号: #YQ00001

艾比玛特医药科技（上海）有限公司

公司官网: <http://www.ab-mart.com.cn/>

专线: 4006-123-828

公司地址: 上海市徐汇区桂平路 333 号聚科生物园区 1 号楼 1-3 层

产品描述

产品为一款专门为生物样本提取而改进的超声波破碎机，主要适用于各种动物细胞和组织、昆虫细胞核组织以及植物细胞和组织等生物学样本的核酸和蛋白质的提取。经过本超声处理，可有效的提高核酸和蛋白的提取效率。

产品储存

常温运输和保存，使用完毕后及时倒掉冰水和关闭电源。

注意事项

- 1、请注意本体的控制面板会受到有机溶液，强酸，强碱所侵蚀。请勿将机器或电源线浸入水或其他液体中。非专业人员，请勿拆卸机器。
- 2、使用前，要确保地线可靠连接，以防漏电。如机器、电源线或插头有明显可见损坏迹象，请停止使用。机器待机时或雷暴天气时，请从插座上取下电源插头。
- 3、超声破碎机槽内无液体时，禁止启动超声波，可能会损坏机器。
- 4、超声破碎机槽内盛有液体时请勿移动设备，以防止液体溢出。禁止用水冲洗整机，以防触电。如果机器掉入水中，请立即拔出电源插头，从水中拿出机器，不要再使用此机器，防止漏电。
- 6、超声破碎机建议使用水溶性清洗剂。
- 7、请不要在下列恶劣环境下使用：
 - 1) 温度变化很激烈的地方；
 - 2) 湿度过高而且会产生露水的地方；
 - 3) 振动或冲击很强烈的地方；
 - 4) 有腐蚀性气体或粉尘存在的地方；
 - 5) 有水、油、化学药品飞溅的地方；
 - 6) 充满易爆炸及明燃烧气体的地方；其它请遵循国家和地方的有关电气法规。

操作步骤

1、加入冰水

超声破碎机槽加入清水和适量的碎冰，使超声破碎机槽处于冰水混合物状态，确保实验过程中的低温环境，液面高度建议为内槽高度 1/2-2/3 位置。

2、检测机器

插上电源，检查显示是否正常，确认机器已经通电；电源指示灯亮，显示“300”

3、将待超声样本置于 EP 管内，并插在水浴漂上面（随机有赠送 2 个），将漂置于冰水混合溶液中，确保样本部分全部在液面以下。

4、设置时间

根据样本类型设置时间，细胞样本设置为：60s-90s；组织样本设置为：120s-240s；

触摸“时间”键设置时间。

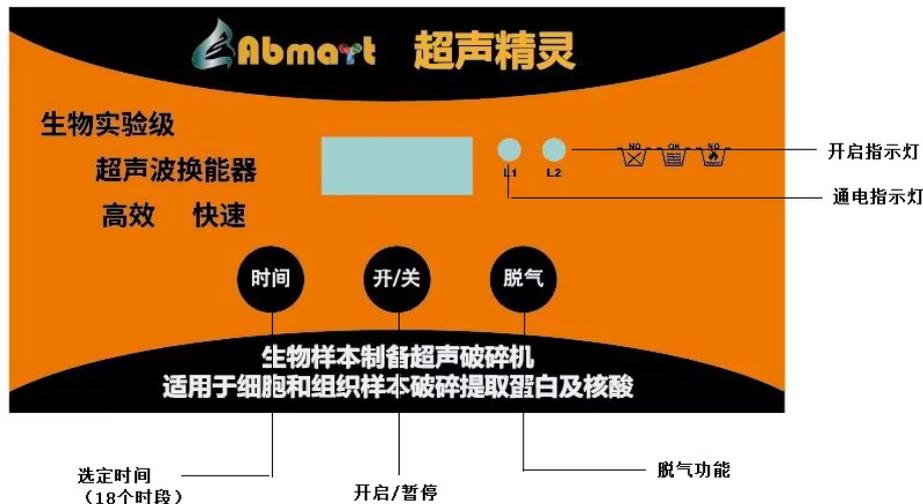
5、开启/暂停

按键“开/关”键后，超声破碎机开始工作。然后按“脱气”键，超声破碎机会自动开启关停模式，即超声 9 秒，停止 6 秒。

设置时间到后，超声破碎机会自动停止工作。

6、超声结束后，可以观察超声效果。如果超声之后，裂解液仍然比较浑浊或者粘稠，可适当延长长时间。

每次操作后请及时拔掉电源，倒掉液体并将机器擦拭干净，若需要长时间存放的一定要保证机器没有任何液体在机器里面。



产品保修：自购买日1年内为保修期，保修期内实行免费退换货。

常见故障检查排除方法

问题	可能原因	处理措施
1 超声机不工作	A、电源没有接通	A、检查并插好电源
	B、保险管烧坏	B、确认电源电压适宜，更换同规格保险管
	C、高频线缆连接不良或断路	C、连接好高频线缆或者更换线缆
	D、换能器线路故障	D、排查线路
	E、线路板烧坏	E、查明是哪个元器件烧坏，更换器件
	F、其它原因	F、联系厂家
2 超声效果不良	A、超声时间是否合适	A、建议延长超声时间
	B、样本量过大	B、分批次超声
	C、其它原因	C、联系厂家
3 漏电	A、设备底线未接好	A、检测设备内部地线和电源线地线是够接好
	B、设备内部火线或零件脱落	B、检测机器内部火线或零线是否脱落
4 其它	可以与我司联系 http://www.ab-mart.com.cn/	

其他：

1. 仪器使用参见网站产品网页视频，
网址：<http://www.ab-mart.com.cn/page.aspx?node=%2066%20&id=%20236971>
2. 后续实验方法和详细步骤，可关注公众号“Abmart 国货之光”，其中有“技术手册”板块可以下载各种实验技术方法。

附录：蛋白质印迹（Western blot） 实验方案和常见问题解决之道

蛋白质印迹（Western blot）实验方案溶液和试剂

裂解缓冲液

这些缓冲液可在 4 °C 下保存数周，或者以分装形式在 -20 °C 下保存长达 1 年。

Nonidet-P40 (NP40) 缓冲液

150 mM NaCl

1.0% NP40（可用 0.1% Triton X-100 替代）

50 mM Tris-HCl pH 8.0

蛋白酶抑制剂（一定要添加，推荐 cocktail 形式的，货号 A10004）

RIPA 缓冲液（放射免疫沉淀试验缓冲液）

150 mM NaCl

1.0% NP-40 或 0.1% Triton X-100

0.5% 脱氧胆酸钠

0.1% SDS（十二烷基硫酸钠）

50 mM Tris-HCl pH 8.0

蛋白酶抑制剂（一定要添加，推荐 cocktail 形式的，货号 A10004）

Tris-HCl 缓冲液

20 mM Tris-HCl pH 7.5

蛋白酶抑制剂（一定要添加，推荐 cocktail 形式的，货号 A10004）

电泳、转膜、封闭缓冲液

Laemmli 2×缓冲液/上样缓冲液

4% SDS

10% 2-巯基乙醇

20% 甘油

0.004% 溴酚蓝

0.125 M Tris-HCl

测定 pH 并调节至 pH 6.8。

电泳缓冲液（Tris-甘氨酸/SDS）

25 mM Tris 碱

190 mM 甘氨酸

0.1% SDS

测定 pH，pH 应为约 8.3。必要时进行调节。

转膜缓冲液（湿转）

25 mM Tris 碱

190 mM 甘氨酸

20% 甲醇

测定 pH, pH 应为约 8.3。必要时进行调节。

对于大于 80 kDa 的蛋白质，推荐加入最终浓度为 0.1% 的 SDS。

转膜缓冲液（半干转）

48 mM Tris

39 mM 甘氨酸

20% 甲醇

0.04% SDS

封闭缓冲液

5% 奶粉（推荐使用，也可以用 BSA 牛血清白蛋白）

加入 TBST 缓冲液中。混匀并过滤。过滤失败可能导致出现“斑点”，其中微小的黑色颗粒会在显色过程中污染印迹。

实验步骤

样品裂解

1. 制备细胞培养物裂解物

- 1) 将细胞培养皿置于冰上，用冰冷的 PBS 洗涤细胞。
- 2) 吸出 PBS，然后加入冰冷的裂解缓冲液（每 10^7 细胞/100 mm 培养皿/150 cm² 培养瓶加入 1 ml；每 5×10^6 细胞/60 mm 培养皿/75 cm² 培养瓶加入 0.5 ml）。
- 3) 用预冷的塑料细胞刮棒刮下贴壁细胞，然后轻轻地将细胞悬浮液转移至预冷的微量离心管中。
- 4) 在 4 °C 下持续搅拌 30 分钟。随后进行超声处理，如果使用该产品或者同类的水浴超声仪，根据细胞量的多少，设置时间为：60s-90s；【如果使用探头超声仪，设置功率 40W 或者总功率的 40%，打 3 秒停 3 秒，根据裂解液多少，细胞超声 5-10 次】，超声后溶液会变得澄清以及不再粘稠，然后离心取上清测浓度，最后加 Loading 煮样，注意跨膜蛋白不建议煮样，直接加 Loading 上样即可；**注意全程冰浴。**
- 5) 如果没有超声仪，请用带注射器的针头(20G-18G-16G)冰上反复抽吸，直到裂解液澄清；

2. 制备组织裂解物

- 1) 用干净的工具切取目标组织，此操作最好在冰上进行，并且应尽快完成，以防止样品被蛋白酶降解。
- 6) 将组织置于圆底微量离心管或 Eppendorf 管中，并浸入液氮中进行“速冻”。将样品保存在 -80 °C 下以备后续使用，或放置在冰上直接进行匀浆。对于约 5 mg 的组织，向离心管中快速加入约 300 μ L 裂解缓冲液，然后用电动匀浆器进行匀浆，用另外 300 μ L 裂解缓冲液冲洗刀片两次，然后在 4 °C 下持续搅拌（例如，在回旋振荡器上）1-2 小时。随后进行超声处理，如果使用该产品或者同类的水浴超声仪，根据组织量的多

少, 设置时间为: 120s-240s; 【如果使用探头超声仪, 设置功率 40W 或者总功率的 40%, 打 3 秒停 3 秒, 根据裂解液多少, 细胞超声 15-20 次】, 超声后溶液会变得澄清以及不再粘稠, 然后离心取上清测浓度, 最后加 Loading 煮样, 注意跨膜蛋白不建议煮样, 直接加 Loading 上样即可; **注意全程冰浴。**

注意: 分装细胞/组织裂解物 (50 - 100 μ L), -80 保存, 避免反复冻融循环。

注意: 如果目标蛋白为核蛋白或者膜蛋白, 建议使用膜蛋白或者核蛋白富集提取的方法进行蛋白提取。(膜蛋白提取试剂盒, 货号 A10008; 核蛋白提取试剂盒货号 A10009)

上样和电泳

1. 将等量的蛋白质和分子量标准上样到 SDS-PAGE 凝胶孔中。来源于细胞裂解物或组织匀浆的总蛋白的上样量为 20 - 30 μ g, 纯化蛋白的上样量为 10 - 100 ng。

2. 在 100 V 下电泳 1 至 2 小时。

需要根据蛋白大小、仪器等条件对时间和电压进行一些优化。

建议设置内参对照: 需要更具蛋白类型, 使用全蛋白内参、核蛋白内参、膜蛋白内参以及各个亚细胞器的内参。

选择可参见 <https://mp.weixin.qq.com/s/5dpukCHuCZ8aWVOEGTPQw>

将蛋白质从凝胶转移到膜上

膜可以是硝酸纤维素或 PVDF, 两者各具优点。用甲醇“活化”PVDF 1 分钟, 并在制备堆叠体之前用转膜缓冲液冲洗 PVDF。(可能需要对时间和电压进行一些优化。)

建议封闭步骤之前用丽春红染色法检查转膜。(1X 丽春红快染液, 货号 A10010)

抗体染色

1. 用 5% 封闭溶液在室温下封闭膜 1 小时, 或在 4 $^{\circ}$ C 下封闭过夜。

2. 用适当稀释度的一抗在 5% 封闭溶液中 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育膜, 或在室温下孵育 2 小时。

3. 用 TBST 洗涤膜 3 次, 每次 5 分钟。

4. 用推荐稀释度的标记二抗在含 5% 封闭缓冲液的 TBST 中室温孵育膜 1 小时。

5. 用 TBST 洗涤膜 3 次, 每次 5 分钟, 然后用 TBS 冲洗。

6. 移除多余的试剂, 利用暗室显影技术采集化学发光图像, 或利用常规图像扫描法采集比色检测图像。

注意: 如果第一次显色未出条带, 或者条带比较弱。可以先保存图片, 然后用清水漂洗膜数分钟, 重新使用超敏型的加发光液进行曝光。(超敏 ECL 化学发光试剂盒, 货号 A10017)

常见问题:**1. 目的蛋白信号弱**

一般如果有目的蛋白条带，但是目的蛋白信号弱，一般最主要的原因是目的蛋白含量少。建议增加蛋白上样量。如果没有进行过超声处理，建议提取蛋白超声处理。

如果背景不脏以及没有其他杂带，可以适当延长曝光时间。或者选择使用超敏型的加发光液进行曝光。（超敏 ECL 化学发光试剂盒，货号 A10017，<http://www.ab-mart.com.cn/page.aspx?node=%2066%20&id=%2017783>）



可能的其他原因，显色剂失效。

注意 1：跨膜蛋白最好不要煮样，容易导致蛋白沉淀。

注意 2：如果目标蛋白为核蛋白或者膜蛋白，建议使用膜蛋白或者核蛋白富集提取的方法进行蛋白提取。（膜蛋白提取试剂盒，货号 A10008，<http://www.ab-mart.com.cn/page.aspx?node=%2066%20&id=%2017733>；核蛋白提取试剂盒货号 A10009，<http://www.ab-mart.com.cn/page.aspx?node=%2066%20&id=%2017732>）

2. 背景脏

如果目的蛋白条带清晰，但是背景比较黑。建议更换封闭液和一抗稀释液。一般建议使用 5% 的脱脂奶进行封闭和一抗稀释。这种条件下，WB 背景会比较干净。如果目的蛋白条带比较弱且背景黑，建议按照 1 增加蛋白上样量，同时更换封闭液和一抗稀释液。

注：脱脂奶作为一抗稀释液，建议添加防腐剂（推荐货号 A10300，<http://www.ab-mart.com.cn/page.aspx?node=%2066%20&id=%2054955>）

即使没有使用防腐剂，牛奶变质的情况下，短时间内抗体一般也可以继续使用。

如果没有脱脂奶，可以尝试使用封闭液稀释一抗。

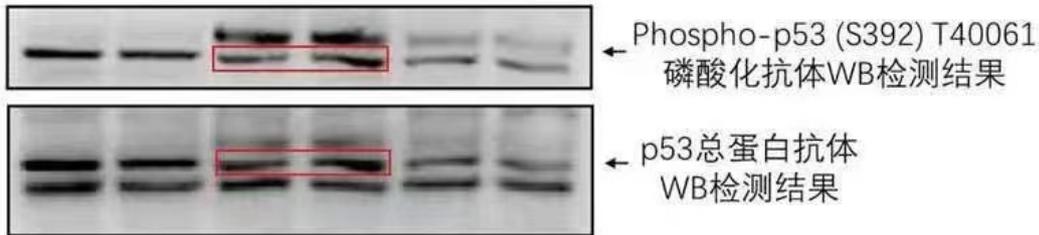
3. 有杂带

情况 1：目的蛋白条带比较强，但是有其他杂带。此种情况是由于一抗过量了，建议加倍稀释一抗。或者在稀释抗体的稀释液中添加 0.5% 的 SDS，可以去除一定的杂带情况。

情况 2：目的条带比较弱，同时还有杂带。建议同 2 的处理方式，增加蛋白上样量，同时更换封闭液和一抗稀释液。

情况 3：杂带位置在目的蛋白上面一点点，注意这个不是杂带，这个是目的蛋白被磷酸化修饰的带，一般当磷酸化强度比较强的时候，总蛋白的抗体是可以识别出来磷酸化的条带的，这是正常现象，不影响结果，计算的时候将两条带同时计算。如果非要去掉上面的磷酸化修饰带，可以尝试将抗体加倍稀释。

先用p-p53磷酸化抗体做WB检测（上图），
然后使用一抗二抗去除液洗膜，再重新孵育p53总蛋白的抗体进行WB检测（下图）。



说明：红框里面的带型是一模一样的，说明磷酸化抗体检测到的红框带就是磷酸化带（可能是单磷酸化修饰）下面的带是总蛋白（非修饰）的带，上面的带可能是多磷酸化修饰（也含有S392的磷酸化），或者同时还有其他修饰，导致蛋白分子量进一步上移。

4. WB 实验白板

可能原因 1：二抗使用错误，请注意一抗的来源；

可能原因 2：转膜效率低，特别是针对大分子量的蛋白（>100kd 以上的蛋白）。请参考这篇文章的大分子量蛋白的转膜方法进行优化。

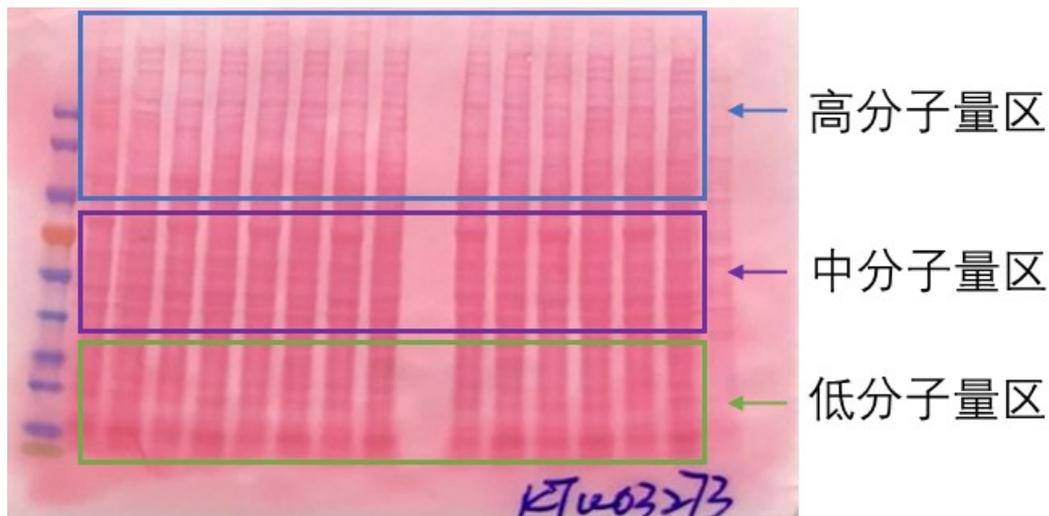
<https://mp.weixin.qq.com/s/rqRi3p3cztrzeSDyYOMOQA>

可能原因 3：蛋白分子量太小，一般分子量<15kd 的蛋白，需要使用 0.22 的 PVDF 膜，如果使用 0.44 的 PVDF 膜则容易转出去。

可能原因 4：如果条带是那种反白的，即背景黑，条带白，那么很可能是过曝了。一般重组蛋白检测，或者过表达检测容易出现。以及显色液反复给几张膜使用，可能后面的膜就会出现反白现象，建议重新加新的显色液。

可能原因 5：如果是裁膜的话，由于裁膜比较窄，或者蛋白有糖基化、泛素化、sumo 化等修饰导致分子量变大，而没在裁膜区间。（蛋白是否有这些修饰，建议在 uniprot 网站查询蛋白 PTM，<https://www.uniprot.org/>）。特别是一些 CD 类分子或者其他膜蛋白，往往有比较强的糖基化修饰。如果蛋白有上述这些修饰，建议全膜孵育，以确认目的条带位置。

可能原因 6：膜没有转好，marker 由于每一个分子量里面的蛋白量非常高，并不能完全体现正张膜的转膜质量，建议转膜完之后用“丽春红染色 QC 转膜质量”。观察是不是每个分子量区间都有比较清晰的蛋白条带，如果出现白色的空斑，说明有气泡。或者条带模糊或者很弱，说明转膜效率不好。



5. 蛋白分子量不对

可能原因 1: 蛋白有糖基化、泛素化、sumo 化等修饰导致分子量变大, 而没在裁膜区间。(蛋白是否有这些修饰, 建议在 uniprot 网站查询 PTM, <https://www.uniprot.org/>)。特别是一些 CD 类分子或者其他膜蛋白, 往往有比较强的糖基化修饰。

可能原因 2: 蛋白有不同的 isoforms, 即不同的转录本。(蛋白是否有不同的 isoforms, 建议在 uniprot 网站查询 <https://www.uniprot.org/>)。不同的 isoforms 分子量和表达组织是有差别的, 属于蛋白特性, 是正常情况。

可能原因 2: 蛋白存在剪切形式, 即翻译后的蛋白剪切, 会导致蛋白分子量变小。(蛋白是否有剪切, 建议在 uniprot 网站查询蛋白的 PTM, <https://www.uniprot.org/>)。

6. 条带拖尾、条带呈哑铃状等

最可能的原因是电泳过快, 建议减低电压跑, 以及需要控制电泳温度, 最好冰浴或者 4 度电泳。

如果提取蛋白没有进行超声处理, WB 条带也很可能会出现拖带现象, 这是由于核酸污染导致的。

7. 某个条带变形

原因: SDS-PAGE 胶中存在气泡或者某不溶性颗粒

解决办法: 配胶过程中要小心, 使用无杂质的液体。

经验: 很多实验室中使用的不是最新的设备, 比如配胶用的海绵垫, 如果用了很多年之后, 会从下面往上面漏小气泡, 当气泡足够小并且胶快凝固的时候, 走到中间的小气泡就停留在胶内, 并会影响到后面的跑胶。另外配胶用的水, SDS, Tris 缓冲液要注意不要有杂质。

建议使用预制胶进行电泳。(Absmart-Gel 变性蛋白预制胶, 货号 A10021)