

毕赤酵母 Breaking Buffer (50 mM 磷酸钠, pH 7.4) 说明书

● 产品规格和内容

包装名称	货号	包装含量	包装数量	保存条件	保存时间
毕赤酵母 Breaking Buffer (50 mM 磷酸钠, pH 7.4)	CAT# :	Breaking Buffer 250ml	1 瓶	4°C/干燥	24 个月
	PIP1002-250	100mM PMSF 1.25ml	2 支	-20°C	12 个月
毕赤酵母 Breaking Buffer (50 mM 磷酸钠, pH 7.4)	CAT# :	Breaking Buffer 500ml	1 瓶	4°C/干燥	24 个月
	PIP1002-500	100mM PMSF 1.25ml	4 支	-20°C	12 个月

● 产品组分

产品名称	产品组分	配方/L	除菌方式
毕赤酵母 Breaking Buffer (50 mM 磷酸钠, pH 7.4)	磷酸二氢钠	6g	0.22um 过滤
	EDTA	372 mg	
	甘油	50 mL	
	PMSF	1mM	

● 产品说明

Breaking Buffer 是毕赤酵母胞内蛋白提取专用裂解缓冲液，主要用于酸洗玻璃珠机械破碎毕赤酵母细胞方法，裂解细胞后释放胞内重组蛋白；缓冲体系为 pH 7.4 磷酸钠体系，EDTA 螯合金属离子抑制金属蛋白酶；甘油用于保护蛋白，减少蛋白变性失活。Breaking Buffer 不含去污剂，依靠机械破碎破除酵母细胞壁；蛋白酶抑制剂（PMSF 或其它蛋白酶抑制剂）必须临用前添加，不可预先添加（PMSF 在母液中-20 度可保存一年，在 pH 7.5 的水溶液中半衰期约 55 min）。细胞裂解后离心得到的上清样品可用于 SDS-PAGE、Western Blot、 β -半乳糖苷酶酶活测定、可溶性与不溶性蛋白分析；若用于金属螯合亲和层析（ProBond/ Ni-NTA），样品必须置换缓冲液，消除高浓度磷酸盐与 EDTA 干扰。适配范围：除毕赤酵母外，也可用于酿酒酵母、汉逊酵母、乳酸克鲁维酵母等多种酵母的玻璃珠破碎提取胞内蛋白。

● 材料准备

1. 冰预冷 Breaking Buffer 基础液（不含 PMSF），临用前加入 PMSF 至终浓度 1 mM，也可加入其他蛋白酶抑制剂。
2. 酸洗玻璃珠（唯地货号：CO5203），直径 0.5 mm（直径 0.5 mm 破碎效果最好）。
3. 毕赤酵母菌体沉淀（-80°C冻存菌体，菌体沉淀经-80°C冻存后更容易被裂解）。
4. 螺口离心管（防止涡旋开盖喷液）、涡旋振荡器、4°C冷冻离心机。

● 使用方法

1. 冰上快速融化的菌体沉淀；每 1 mL 菌体样品，加入 100 μ L 预冷 Breaking Buffer（已经添加 PMSF），充分重悬细胞。
2. 加入等体积酸洗玻璃珠（估算等体积，不要用称重量的方法）。
3. 最高转速（通常要求 3000rpm）涡旋振荡 30 s，立刻置于冰上冷却 30 s；循环 8 次。

⚠ 间歇冰浴至关重要：涡旋摩擦会大量产热，高温会让蛋白变性、蛋白酶降解目的蛋白。

4. 4°C, 12000-20000rpm 转速离心 10 min。

5. 小心吸取上层澄清裂解上清，转移至新预冷离心管（尽量不要吸到玻璃珠、细胞碎片沉淀）。

上清可用于 SDS- PAGE、Western blot、酶活测定；沉淀可再加尿素 / Triton X- 100 处理，检测不溶性包涵体蛋白。

● 注意事项

1. 不开封的毕赤酵母 Breaking Buffer (50 mM 磷酸钠, pH 7.4) 溶液可在 4°C 保存 1 年，若长期保存最好放 -20 度，开封后若发现染菌，停止使用。

2. 不适用：分泌表达的上清样品不需要 Breaking Buffer；上清直接取样处理即可。

3. 酵母相比大肠杆菌，体内蛋白酶种类多，活性高（三类蛋白酶：丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶），如果只做 SDS-PAGE、WB 试验，可以只加 PMSF；如果做蛋白纯化或酶活实验，裂解液中必须含有多种蛋白酶抑制剂（PMSF 只能抑制丝氨酸蛋白酶），推荐使用唯地生物开发的 EDTA-free 蛋白酶抑制剂 cocktail I（唯地货号：GR4211），可同时抑制三种蛋白酶。