

用VIBRA-CELL超声波细胞破碎仪-破坏和溶解细胞

细胞的破坏是蛋白质组学领域以及细胞内产物的分离和制备中的重要方法。分离亚细胞级分和浓缩蛋白质可以更有效地鉴定和研究目的蛋白质。从研究到生产，生物技术的许多领域，特别是重组技术，都需要使用超声波来破坏细胞。细胞破坏的重点是从细胞内获得所需的产物，必须破坏细胞壁才能进入细胞内。

所有细胞都有质膜，是一种蛋白质-脂质双层，形成将细胞内容物与细胞外环境分隔开的屏障。构成质膜的脂质是两亲性的，具有自发缔合形成闭合双分子片的亲水和疏水部分。膜蛋白包埋在脂质双层中，由跨疏水核心的一个或多个域固定在适当位置。另外，外周蛋白通过与完整的膜蛋白或极性脂头基团的相互作用而结合双层的内表面或外表面。脂质和蛋白质含量的性质随细胞类型而变化。

在动物细胞中，质膜是将细胞内容物与环境分开的唯一屏障，但在植物中，质膜也被刚性细胞壁包围。植物细胞壁由多层纤维素组成。这些类型的细胞外屏障赋予细胞形状和刚性。植物细胞壁特别坚硬，很难机械或化学破坏。动物细胞中缺乏细胞外壁，使其相对易于裂解。

柔软，新鲜的植物组织通常可以通过在裂解缓冲液中进行超声处理来破坏。其他植物组织（例如松针）需要干燥，没有液氮。一些坚硬的木质植物材料需要先在液氮中冷冻和研磨，然后再进行超声波处理。植物细胞悬浮培养物和愈伤组织可通过在裂解缓冲液中超声处理30秒至2分钟来裂解。植物和植物组织的多样性使得不可能对所有样品都给出单一建议。但是，应该意识到，大多数植物组织通常都含有多糖和多酚，它们可以与RNA共沉淀并抑制下游分析。在进行实际的RNA分离之前，用聚乙烯吡咯烷酮（PVP）处理植物组织裂解液会从裂解液中沉淀出此类有问题的成分。

单细胞生物（微生物）由围绕原生质膜和细胞质的半渗透性，坚硬，刚性的外细胞壁组成。细胞质由核酸，蛋白质，碳水化合物，脂质，酶，无机离子，维生素，色素，包涵体和约80%的水组成。为了从细胞内部分离和提取任何这些物质，有必要破坏细胞壁和原生质膜。在某些情况下，细胞可能会在没有帮助的情况下排泄所需的物质，但是在大多数情况下，必须裂解细胞才能释放这些细胞内物质。打破细胞膜并释放内含物提出了重大挑战。该过程必须快速而彻底，以最大程度地提高蛋白质产量。由于施加的能量必须足够大，足以破坏细胞膜或壁，同时又要足够柔和，以免对物理或化学造成损害，因此，具有可变强度功能的Sonic Vibra-Cell非常适合此应用。

微生物对超声分解的敏感性差异很大。例如，最容易崩解的是棒状形式（杆菌），而球形生物（球菌）则更具抵抗力。结核病微生物所属的分枝杆菌属特别难以破坏。

与动物细胞相比，酵母，革兰氏阳性细菌以及在较小程度上革兰氏阴性细菌的细胞壁要硬得多，并且需要相对较高的功率才能破坏细胞。

细菌极为多样。因此，很难对所有细菌提出一个建议。超声波处理将裂解包括分枝杆菌在内的大多数革兰氏阳性和阴性细菌。通常，将玻璃珠和裂解液添加到细菌细胞沉淀中，并将样品超声处理几分钟。仅通过在裂解液中进行超声处理就可以裂解某些革兰氏阴性细菌。细菌细胞壁可用溶菌酶消化，形成原生质球。与革兰氏阴性菌相比，革兰氏阳性菌通常需要更严格的消化作用（增加孵育时间，提高孵育温度等）。然后用超声在GITC裂解缓冲液中轻松裂解原生质球。

革兰氏阴性菌通常需要10至15分钟的处理时间，而葡萄球菌则需要20至30分钟的处理时间。

使用Vibra-Cell时，应使用的强度级别取决于应用程序。例如，高强度可能被推荐用于细胞分裂，但是当细胞内组分的释放可能令人反感时，例如当细胞分裂时，绝对不应使用。细胞器隔离。

控制探头尖端的振幅的能力是进行过程优化的前提。而且由于每种应用都需要自己的一组处理参数，由于体积和成分的变化，最佳振幅只能凭经验确定。处理新样品时，建议先将幅度设置为50%（带微尖的幅度为30%），然后根据需要增加或减小。

在超声破碎之前，可以用各种试剂处理细胞以帮助破坏过程。可以通过将细胞悬浮在低渗缓冲液中来促进溶解，这会使它们通过物理剪切而更容易肿胀和破裂。溶菌酶可用于消化酵母和细菌细胞壁的多糖成分。或者，可以通过用玻璃珠处理坚韧的细胞来促进细胞壁的破碎，从而加快加工速度。这种处理通常用于酵母细胞。样品的粘度通常在裂解期间由于核酸材料的释放而增加。可以将DNase加入样品中（25-50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ ），以减少此问题。超声处理的材料不需要核酸酶处理，因为超声处理会剪切染色体。因为每当细胞被操纵时，蛋白水解都会成为一个问题。建议在裂解样品中加入蛋白酶抑制剂。

注意:

所有活生物体均含有蛋白水解酶（蛋白酶和肽酶）。多种细胞功能（例如细胞修复或细胞外物质的消化）都需要蛋白酶。在整个细胞中，蛋白酶活性受到间隔区或抑制剂的严格调控，以防止对细胞蛋白质的破坏。细胞裂解干扰了这种调节，样品的蛋白水解降解成为一个问题。因此，经常需要向细胞裂解缓冲液中添加蛋白酶抑制剂。蛋白酶抑制剂是通过与蛋白酶可逆或不可逆结合而起作用的生物或化学化合物。基于涉及肽键裂解的官能团，蛋白酶通常属于四个进化上不同的酶家族之一。因此，通常需要几种不同类型的抑制剂来保护蛋白质在提取和纯化过程中不被蛋白水解。

细胞破坏是RNA分离的第一步，也是影响分离RNA产量和质量的最关键步骤之一。通常，细胞破坏需要快速而彻底。缓慢的破坏，例如将细胞或组织置于异硫氰酸胍（GITC）裂解液中，而没有任何额外的物理剪切，可能会由于内部释放的内源性RNase而导致RNA降解，但仍然不能被蛋白质变性剂GITC吸收。当处理内源性RNase高的组织（如脾脏和胰腺）时，这尤其令人担忧。不完全破坏也可能导致产量降低，因为样品中的某些RNA仍被捕获在完整细胞中，因此无法用于后续纯化。对于大多数样品，彻底破坏可以通过在破坏之后仔细检查裂解液来监测。除破坏含有坚硬，非细胞成分的物质（例如结缔组织或骨骼）外，不应有可见的颗粒。

当使用Vibra-Cell处理困难的细胞时，用酶“弱化”细胞壁进行预处理是有益的。酵母经常使用的酶促方法包括溶菌酶，糖醛酸苷酶，糖苷酶，葡糖醛酸酶，裂解酶，酶解酶和溶葡萄球菌素消化。溶菌酶，酶解酶和溶葡萄球菌素消化是细菌和酵母经常使用的酶解方法，用于溶解被超声波难以剪切的外壳，胶囊，衣壳或其他结构。酶处理后通常在GITC裂解缓冲液中进行超声处理。胶原蛋白酶可以与胶原蛋白，溶葡萄球菌素和葡萄球菌一起使用，以及胰蛋白酶透明质酸酶与肝脏和肾脏一起使用。

酵母极难破坏。在装有样品，胍基裂解缓冲液和小玻璃珠（0.5 – 1毫米）的试管中处理酵母声波。强烈建议进行上述酶预处理。

要破坏丝状真菌，请将菌丝体垫刮入冷研钵中，加入液氮，用杵研磨成细粉，然后在裂解缓冲液中超声处理，使其完全溶解。由于真菌也可能富含多糖，因此用聚乙烯吡咯烷酮（PVP）进行预处理可能是有益的。

在土壤和沉积物中发现细胞的破坏是通过以下步骤完成的：1) 在RNA分离步骤之前，从材料中分离细菌细胞。这是通过在机械搅拌器中将湿土壤均质化，然后以低速沉淀细菌细胞来实现的。从这一点出发，可以如上所述对细菌进行裂解，或者2) 直接从土壤或沉积物中分离RNA。例如，将土壤添加到硅藻土和裂解缓冲液中，然后进行超声处理。然后将样品离心以除去固体碎片。

培养的细胞相对容易被Vibra-Cell破坏。通过离心收集悬浮液中生长的细胞，漂洗以除去培养基，然后通过GITC裂解缓冲液中超声处理来裂解。在洗涤和裂解细胞的同时将烧瓶或平板放在冰上，将进一步保护RNA免受破坏过程中释放的内源性Rnases的侵害。

洗涤剂细胞裂解有时会与超声处理结合使用以促进破坏。洗涤剂通过溶解蛋白质并破坏脂质：脂质，蛋白质：蛋白质和蛋白质：脂质相互作用来破坏细胞周围的脂质屏障。洗涤剂（如脂质）会自缔合并与疏水表面结合。它们由极性亲水性头基和非极性疏水性尾基组成，并且根据头部基团的性质分类为离子性（阳离子或阴离子），非离子性或两性离子。它们的行为取决于头组和尾部的属性。

注意:

使用清洁剂时，请勿使用配备了带有可更换尖端的探头的Vibra-Cell。请改用坚固的探头。

不幸的是，没有标准的方案可用于选择用于膜裂解的去污剂，理想的去污剂将取决于预期的应用。通常，非离子型和两性离子型去污剂比离子型去污剂温和且变性小，当对于酶测定或免疫测定至关重要时是维持蛋白质功能和/或保留天然蛋白质：蛋白质相互作用时，可用于溶解膜蛋白。两性离子洗涤剂和非离子洗涤剂通常用于这些目的。相反，离子型去污剂是强的增溶剂，并且倾向于使蛋白质变性，从而破坏蛋白质的活性和功能。有一些仅能轻度变性的常用离子型去污剂，包括胆酸钠和脱氧胆酸钠。

用于细胞裂解的去污剂的选择还取决于样品类型。由于不存在细胞壁，因此动物细胞，细菌和酵母菌均具有不同的最佳裂解要求。由于动物组织的致密和复杂性质，它们需要洗涤剂和超声处理。除了选择去污剂外，优化细胞裂解的其他重要考虑因素还包括缓冲液，pH，盐浓度和温度。应考虑所选洗涤剂与下游应用的相容性。例如，如果必须除去用于裂解的去污剂，则应选择可透析的去污剂。

如果不能使用酶或去污剂进行预处理，则应考虑冷冻/解冻方法。冷冻/解冻方法通常用于裂解细菌和哺乳动物细胞。该技术包括在干冰和异丙醇浴中将细胞悬浮液冷冻10分钟，然后在即将进行超声处理之前将其在室温下解冻。冷冻/融化循环应重复三遍，然后再进行超声波处理。这种裂解方法会使细胞膨胀，并最终在冰冻过程中形成冰晶，然后破裂，然后在融化过程中收缩。已显示该预处理可有效释放位于细菌细胞质中的重组蛋白，并建议在裂解哺乳动物细胞时使用。但是，当使用胍水解酶时，不建议使用这种裂解方法，因为已经注意到纯化的胍水解酶在冷冻时会遭受结构破坏。

大多数动物组织可以新鲜处理（未冷冻）。但是，重要的是要保持它们凉爽，并在解剖后迅速（30分钟内）对其进行处理。当破坏新鲜组织时，需要在添加GITC裂解液时立即剪切细胞。这可以通过将溶解溶液分配到试管中，添加组织并立即进行超声处理来完成。切勿将样品直接溶解在裂解溶液中。硬组织应首先在搅拌机或机械均质机中进行处理。

收集后已冷冻的动物组织应通过用研钵和研杵在液氮中研磨来破坏。在此过程中，重要的是设备和组织必须保持低温。研磨后，纸巾应干燥且呈粉状。研磨后应在GITC裂解缓冲液中进行超声处理。以这种方式处理冷冻的组织既麻烦又费时，但是有效。

用Vibra-Cell处理样品通常会导致样品温度升高，尤其是小体积时。由于高温会抑制气穴现象，因此样品温度应保持尽可能低的温度-最好刚好高于其冰点。这可以通过在保持样品容器浸入冰浴中的同时打开和关闭超声波脉冲来实现。在处理样品时，偶尔触摸容器以确保样品相对凉爽。

增加静水压力（通常为15-60 psi）和粘度会增强细胞破裂。对于微生物，添加0.5至1mm大小的玻璃珠可促进细胞分裂。加工孢子和酵母时，珠子几乎是先决条件。一个好的比率是一体积的小珠与两体积的液体。

玻璃珠可从以下渠道获得：

中国 浙江省 宁波市 高新区杨木碶690号

手机: 135-8653-9683(微信同号)

电话: 0574-8908-5812

传真: 0574-8908-5815

Q Q: 411027524

Email: wd@lawsonsmart.com

当用超声波处理样品时，请始终将探头浸入样品表面以下足够深的位置，以防止气雾或起泡，起泡可大大减少空化现象。在没有泡沫的情况下以较低的功率设置进行处理比在使用泡沫的情况下以较高的功率设置进行处理要有效得多。降低功率，增加处理时间并降低样品的温度通常可以防止气溶胶和泡沫。请勿使用任何消泡剂或表面活性剂。

在空化过程中，会形成自由基，如果自由基堆积，则自由基会与蛋白质，多糖或核酸发生反应，从而极大地影响样品的生物完整性。尽管在较短的加工时间内通常不认为它们的形成有问题；对于更长的时间，添加自由基清除剂，例如二氧化碳，N₂O，半胱氨酸，还原型谷胱甘肽，二硫苏糖醇或其他SH化合物可能是有益的。用氦气或氮气的保护性气氛使样品饱和，或在样品中滴入一小块干冰，也会抑制自由基的形成。尽管确实需要气体才能有效破坏细胞，但气相不必是氧气或空气，因为除二氧化碳以外的任何气体也能正常工作。

超声破碎后，可以将细胞碎片以15,000 rpm离心10分钟。

由于最大的能量集中在探针下方，因此必须将样品保持在尽可能靠近尖端的位置，因为自由移动的细胞在探针下方反复循环，所以液体易于处理。但是，固体材料有被超声波排斥的趋势，应在足够大以容纳探针的容器中进行处理，但又要足够小以限制样品移动。对于小样品，建议使用锥形试管。尽管塑料管效果很好，但是玻璃和不锈钢管通常比塑料管更好。

确保探头未触及容器底部。让探针接触容器会降低功率输出，并使微小的灰色玻璃颗粒迁移到样品中。尽管这些玻璃颗粒不会对样品的化学成分产生不利影响，但它们在离心作用下会形成薄的灰色层。如果探针必须与固体样品接触，请使用标准的直径为20mm（3/4”）的不锈钢离心管切成70mm（3”）的长度。不要使用玻璃管。除液体外，禁止接触尖端，因为与硬表面接触时所产生的应力会导致尖端破裂。尽管较大的探针如果与玻璃容器接触也不会破裂，但可能会导致容器破裂。

在使用Vibra-Cell之前，将吸头置于100%乙醇中，并为电源供电几秒钟，以除去所有残留物质。如果仍然担心以前使用的污染物，请用消毒剂（例如20%Virkon溶液）清洁探头，并用蒸馏水冲洗。探头可高压灭菌。

为防止由于粘着而导致试管中的样品流失，请按以下步骤对试管进行硅化：彻底清洗并干燥试管，涂上硅胶，然后风干。

高粘度和浓度是有问题的。最大限制为2,000 cps和15%重量百分比。超声波处理通过样品传播声波。如果样品太稠密以至于它不容易倾倒或流通，它将吸收声波，并且对于超声波处理来说太厚了。

使用Cup Horn可以完全隔离地处理病原性，放射性和生物危害性材料，而无需探头侵入。由于塑料管易于吸收振动，因此在使用杯形喇叭进行工作时，最好将样品容纳在不锈钢管或玻璃管中。为了加快处理速度，请在样品中加入玻璃珠。如果需要，还可以将碎冰添加到杯形喇叭内部的水中，以优化冷却效果。在Cup Horn中处理样品的时间通常比直接探头侵入的时间长4倍。

可以采用各种方法来测量超声破坏的效率。通常，使用显微镜计数细胞是令人满意的方法。但是，为了获得更高的准确性，应该使用蛋白质测定法。考虑到破裂后释放的蛋白质量，该程序被公认为是测量细胞破裂的好方法。然后测试破裂的细胞，并对照该数字检查破损百分比。

蛋白质检测有几种类型。最常见的是Folin反应（Lowry分析）方法，因为它相对简单并且提供了一致的结果。该比色法对测定溶液中蛋白质的敏感度约为8 µg / mL。

由于碱性溶液中的铜离子与蛋白质发生反应，并且经过处理的蛋白质中的芳香族氨基酸使Folin试剂中的磷钼酸-磷钨酸还原，因此该测定在蛋白质存在的情况下变为蓝色。

使用以下公式并将结果乘以100，可以计算出蛋白质的分数释放Rp：

$$Rp = \frac{Cf - Cb}{Ct - Cb}$$

Cf = Free protein Ct = total protein

Cb = Background protein

考虑到破坏之前蛋白质的背景水平，这给出了实际破坏百分比。