



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// [www.real-times.com.cn](http://www.real-times.com.cn)

E-mail: [real-times@vip.163.com](mailto:real-times@vip.163.com)

## 动物胞浆活性蛋白提取试剂盒（不含去垢剂） (Animal Native Protein Extraction Kit, Detergent-free)

货号	名称	规格
RTD8106	动物胞浆活性蛋白提取试剂盒(不含去垢剂)	50 次

### ● 产品简介

蛋白提取过程中经常使用去垢剂裂解细胞，如 NP-40, Triton X-100, SDS 等。然而这些去垢剂会对提取的蛋白后续功能研究产生影响。如去垢剂会影响蛋白的荧光标记；高浓度的去垢剂会影响蛋白互作研究；阴离子去垢剂如 SDS 提取得到变性蛋白，不利于蛋白活性研究；含去垢剂的蛋白样品能与考马斯亮蓝 G-250 结合，影响 Blue Native 电泳的分离效果。

本试剂盒采用不含去垢剂的裂解缓冲液，在低渗透压条件下，使细胞充分膨胀，然后结合离心柱离心，有效破坏细胞膜，释放出细胞内蛋白，然后通过离心得到活性蛋白。另外，裂解缓冲液中也不含有还原剂如 DTT 和 BME 等，能有效保持蛋白的天然结构。

对于细胞样品，如果每个样品的数量为  $5 \times 10^6$  个细胞，本试剂盒可以抽提 50 个样品；对于组织样品，如果每个样品的重量不超过 30 毫克，本试剂盒可以抽提 50 个样品。

使用该产品提取的蛋白可以用于普通非变性电泳（Laemmli 系统）（货号：RTD6130, RTD6135）或 Blue Native 系统（货号：RTD6140）。

注：由于提取缓冲液的适用性，本试剂盒主要提取得到的是胞浆内的可溶性蛋白，对细胞膜蛋白，细胞器蛋白，细胞核蛋白提取效率不高，不建议使用。

### ● 产品组成

产品编号	名称	规格	贮存
RTD8106-01	裂解缓冲液	25 ml	4℃
CD-50	离心柱	50 个	RT
CDR-50	2 ml 连盖收集管	50 个	RT

### ● 贮存条件和运输：

按照标签温度贮存，有效期一年；常温运输。

### ● 用前必读：

1. 离心机请调整成 RCF/g 模式，按照离心力设置离心机（不要根据转速 rpm 模式设置），所有离心步骤都需要在 4℃ 低温离心机中进行。
2. 溶液混匀后放置于冰上。将离心柱套入 2 ml 连盖收集管中，盖好管盖，放置于冰上预冷。
3. 蛋白提取推荐添加蛋白酶抑制剂（自备，试剂盒不提供），根据蛋白酶抑制剂母液浓度提前添加在裂解缓冲液中（添加时按照 1:100 添加，即 1ml 裂解缓冲液 添加 10  $\mu$ l 抑制剂）。研究蛋白磷酸化，需要添加磷酸酶抑制剂（自备，试剂盒不提供）。

4. 蛋白定量推荐使用 BCA 方法，可以选择 BCA 蛋白浓度测定试剂盒（货号：RTP7102）。

## ● 使用方法：

### 一 培养细胞活性蛋白提取：

#### 1.1 即用型裂解缓冲液配制：

##### 2.1 即用型裂解缓冲液配制：

取适当体积的预冷裂解缓冲液，在使用前数分钟内加入 1/100 体积的蛋白酶抑制剂（100×），如果进行蛋白磷酸化研究，需要加入 1/100 体积的磷酸酶抑制剂（100×），随后立即放于冰上待用（30 分钟内使用）。

按照下表大体估算裂解缓冲液使用体积：

细胞类型	培养器皿	细胞数量	细胞沉淀体积(PCV)( $\mu$ l)	裂解缓冲液 ( $\mu$ l)
悬浮细胞		$2-5 \times 10^6$	20-50	200
		$5-10 \times 10^6$	>50	500
贴壁细胞	96 孔板	$\sim 1 \times 10^5$	调整细胞数目到 $2-5 \times 10^6$	200
	24 孔板	$\sim 5 \times 10^5$	调整细胞数目到 $2-5 \times 10^6$	200
	6 孔板	$\sim 2.5 \times 10^6$	$\sim 25$	200
	25cm <sup>2</sup> 培养瓶	$\sim 2 \times 10^6$	$\sim 20$	200
	75cm <sup>2</sup> 培养瓶	$\sim 8 \times 10^6$	$\sim 80$	500
	35 mm 培养皿	$\sim 2 \times 10^6$	$\sim 20$	200
	60 mm 培养皿	$\sim 5 \times 10^6$	$\sim 50$	500
	100 mm 培养皿	$\sim 1.5 \times 10^7$	调整细胞数目到 $2-5 \times 10^6$	200

注：（二百万， $2 \times 10^6$ ）HeLa 细胞，其细胞沉淀体积（PCM，Packed Cell Volume）大约为 20  $\mu$ l。

#### 1.2 准备细胞：

1.2.1 对于贴壁细胞：细胞用 PBS 漂洗一遍，弃 PBS；再加入适量 PBS，用细胞刮刀刮下细胞，或用 0.02% EDTA（0.5 mM）溶液处理细胞使细胞不再贴壁很紧，并用移液器吹打下细胞。400 g（ $\sim 2000$  rpm）4 $^{\circ}$ C 离心 5 min 收集细胞，尽最大努力吸尽上清，留下细胞沉淀备用。尽量避免用胰酶消化细胞，以免胰酶降解需抽提的目的蛋白。

1.2.2 对于悬浮细胞：400 g（ $\sim 2000$  rpm）4 $^{\circ}$ C 离心 5 min 收集细胞，用 PBS 洗一遍，离心收集细胞，尽最大努力吸尽上清，留下细胞沉淀备用。

#### 1.3 裂解细胞膜：

1.3.1 细胞沉淀中加入准备好的裂解缓冲液（含蛋白酶抑制剂），用移液器吹打重悬细胞沉淀，**涡旋剧烈震荡 30-60 秒，冰浴处理 10 分钟**，间歇 2-3 次混匀。

注：裂解缓冲液使用推荐经验值：起始细胞数低于  $5 \times 10^6$  加入 200  $\mu$ l 裂解缓冲液，起始细胞数高于  $5 \times 10^6$  加入 500  $\mu$ l。如果细胞数目低于  $1 \times 10^6$  或高于  $1 \times 10^7$ ，建议调整细胞数目在  $2-5 \times 10^6$  范围内。

1.3.2 将细胞悬液转移到离心柱中，盖上管盖，16,000 g (~13000 rpm) 4℃离心 1 分钟，离心后可见收集管底部有沉淀形成。

注：离心柱最大体积为 600 μl；**确保离心机转速可以在 1 分钟内提速到 16000 g。**

1.3.3 弃去离心柱，盖好 2 ml 收集管管盖，用 1ml 移液器轻柔吹打重悬收集管中的沉淀。

#### 1.4 去除细胞核和未破碎的细胞：

16000 g (~13000 rpm) 4℃离心 15 分钟。

#### 1.5 收集上清：

收集上清即为胞浆蛋白，其蛋白浓度约为 0.5-2 μg/μl，不同细胞略有不同。

**关键步骤：**吸取上清时不要触及沉淀，甚至可以丢弃部分上清不吸取，以免上清中污染其他蛋白。

## 二 组织活性蛋白提取：

#### 2.1 即用型裂解缓冲液配制：

取适当体积的预冷裂解缓冲液，在使用前数分钟内加入 1/100 体积的蛋白酶抑制剂 (100×)，如果进行蛋白磷酸化研究，需要加入 1/100 体积的磷酸酶抑制剂 (100×)，随后立即放于冰上待用 (30 分钟内使用)。

#### 2.2 准备组织：

手术切除组织块，迅速置于预冷的1×PBS 中，漂洗数次，滤纸吸干水分，将组织切成细小的组织块，称重组织。

#### 2.3 裂解组织细胞细胞膜：

2.3.1 将新鲜组织 (10-30 mg) 或冷冻组织 (20-30 mg) 置于离心管柱内。加入 200 μl 即用型裂解缓冲液，用塑料棒反复向下按压扭转研磨组织 1 分钟。

注：如果样品是肌肉组织或结缔组织较多的难研磨样品，建议研磨 2 分钟。

2.3.2 再加入 300 μl 即用型裂解缓冲液到离心管柱中，用移液器上下吹打混匀样品，**开盖冰上孵育 5 分钟。**

2.3.3 盖上 2 ml 收集管盖子，4℃ 16,000 g (~13000 rpm)，离心 1 分钟。

注：离心柱最大体积为 600 μl；**确保离心机可以在 10 秒内达到 16000 g。**

2.3.4 弃去离心柱，盖好 2 ml 收集管管盖，用 1ml 移液器轻柔吹打重悬收集管中的沉淀。

#### 2.4 去除细胞核和未破碎的细胞：

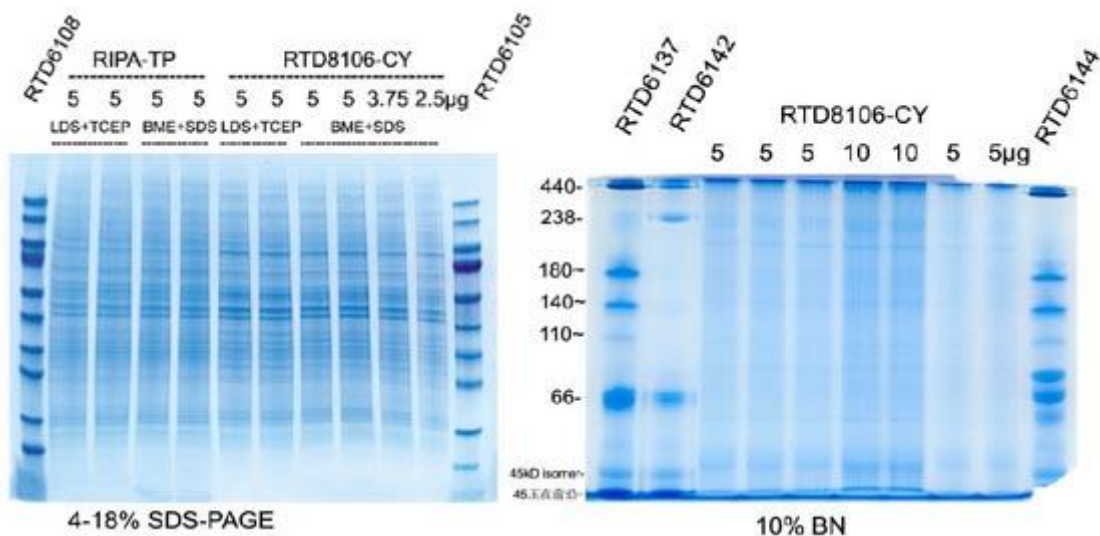
16000 g (~13000 rpm) 4℃离心 15 分钟。

#### 2.5 收集上清：

收集上清即为胞浆蛋白，其蛋白浓度约为 0.5-2 μg/μl，不同组织略有不同。

**关键步骤：**吸取上清时不要触及沉淀，甚至可以丢弃部分上清不吸取，以免上清中污染其他蛋白。

## 三 实验示例：



- 1 提取：5×10<sup>6</sup> K562 细胞，400g 3min 收集，PBS 漂洗一次；加 500μl 即用型提取缓冲液（含蛋白酶抑制剂），震荡 60 秒，冰浴 10min；16000g 1min 过离心柱；重悬沉淀；4 度 16000g 15 min，取上清即为胞浆活性蛋白。
- 2 BCA 测定蛋白浓度，蛋白得率 2×10<sup>8</sup> 细胞提取蛋白量约 1.5 mg。
- 3 BN 电泳（右图）：RTD6140 配制 10% BN 胶。  
使用 4×BN 蛋白上样缓冲液（货号：PL114）调整上样浓度为 0.5μg/μl。  
1×蓝色阴极电泳缓冲液 200V 50min，更换为 1×无色阴极缓冲液，电泳时间共 93min，FastBlue 蛋白染色液染色。
- 4 变性电泳（左图）：RealPAGE 4-18%预制胶，用 RIPA 提取总蛋白（RIPA-TP）做对照样品，使用含 BME 上样缓冲液调整上样浓度为 0.5μg/μl，200V 60min，FastBlue 蛋白染色液染色。