



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-tims.com.cn

E-mail: real-times@vip.163.com

柱式动物胞浆蛋白提取试剂盒 (细胞样品可溶性蛋白非变性提取,不含去垢剂)

(Column Animal Cells Native Protein Extraction Kit, Detergent-free)

货号	名称	规格
RTD8106	柱式动物胞浆蛋白提取试剂盒(细胞样品可溶性蛋白非变性提取,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 5×10^6 个细胞,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	非变性裂解缓冲液	25 ml	4°C
CD-50	离心柱套装 (包含离心柱和 2ml 连盖收集管)	50 个	RT

● 贮存、效期及运输:

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°C 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 μ 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：

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×）（自备，试剂盒不提供），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×）（自备，试剂盒不提供），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)(μl)	裂解缓冲液 (μl)
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	$\sim 2.5 \times 10^6$	~ 25	200
	25cm ² 培养瓶	$\sim 2 \times 10^6$	~ 20	200
	75cm ² 培养瓶	$\sim 8 \times 10^6$	~ 80	500
	35 mm 培养皿	$\sim 2 \times 10^6$	~ 20	200
	60 mm 培养皿	$\sim 5 \times 10^6$	~ 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， 2×10^6 ）HeLa 细胞，其细胞沉淀体积（PCV，Packed Cell Volume）大约为 20 μl 。

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（ ~ 2000 rpm）4°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（ ~ 2000 rpm）4°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 5×10^6 加入 200 μl 裂解缓冲液，起始细胞数在 $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 之间加入 500 μl 。如果细胞数目低于 1×10^6 或高于 1×10^7 ，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°C 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 μ l；**确保离心机转速可以在 1 分钟内升速到 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：

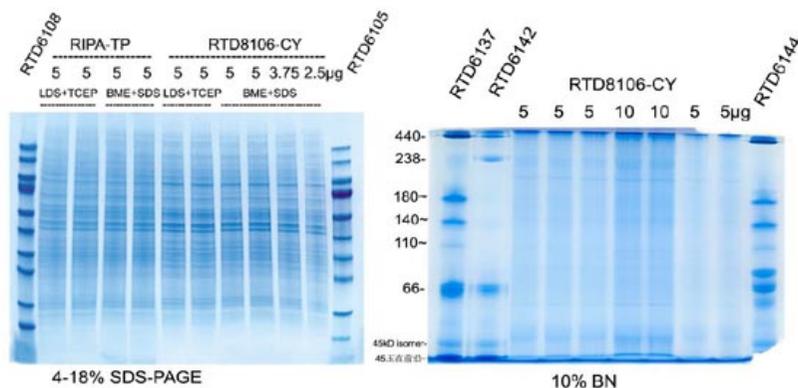
将悬浮溶液 16000 g (\sim 13000 rpm) 4 $^{\circ}$ C 离心 15 分钟。

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 μ g/ μ l，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 实验示例：



5 \times 10⁶ K562 细胞，400g 3min 收集，PBS 漂洗一次；加 500 μ l 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。BCA 测定蛋白浓度，蛋白得率 2 \times 10⁸ 细胞提取蛋白量约 1.5 mg。BN 电泳（右图）：RTD6140 配制 10% BN 胶。使用 4 \times BN 蛋白上样缓冲液（货号：PL114）调整上样浓度为 0.5 μ g/ μ l。1 \times 蓝色阴极电泳缓冲液 200V 50min，更换为 1 \times 无色阴极缓冲液，电泳时间共 93min，FastBlue 蛋白染色液染色。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 0.5 μ g/ μ l，200V 60min，FastBlue 蛋白染色液染色。