



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

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

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

低渗裂解缓冲液

Ver.760758-1.0

货号	产品名称	规格
RL1100	低渗裂解缓冲液	100 ml

● 产品简介：

低渗裂解缓冲液（Hypotonic Lysis Buffer）是一种不含任何去垢剂的温和细胞裂解缓冲体系，主要由缓冲体系、低离子强度盐体系、镁离子稳定体系及蛋白保护成分组成，不含 EDTA，pH ~7.4。该缓冲液通过低渗作用使细胞吸水膨胀，降低细胞膜稳定性，再配合机械匀浆等机械方式，可促进细胞膜破裂并释放胞浆蛋白。

本产品适用于悬浮细胞和贴壁细胞的温和破膜、胞浆蛋白提取、细胞核去除、胞浆/粗膜组分分离，由于不含任何去垢剂，可温和破膜并最大程度保留天然蛋白复合物状态，特别适合作为 BN-PAGE/CN-PAGE 样品制备的前处理缓冲液。

本产品不建议用于高纯度线粒体提取、完整细胞器活性实验或需要严格保持细胞器完整性的实验。

使用本产品获得的蛋白样品可用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号: RTP7102)或 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒（货号: RTP7101）进行定量分析。

由于组织的特殊性，本产品不建议用于组织样品的裂解。

● 保存、运输及效期：

2-8℃ 保存；常温运输；有效期一年。

● 实验前准备：

使用前请将低渗裂解缓冲液预冷至 4℃；根据实验目的加入相应抑制剂：普通蛋白检测：加入 1× 蛋白酶抑制剂(PC2930)；磷酸化蛋白检测：加入 1× 蛋白酶抑制剂和 1× 磷酸酶抑制剂(PC1830)；对氧化敏感蛋白：可加入 0.5-1 mM DTT。所有操作建议在冰上或 4℃ 条件下进行。

● 使用说明：

1. 准备即用型低渗裂解缓冲液：

向预冷的裂解缓冲液中加入蛋白酶抑制剂（自备，货号：PC2930）；如果进行磷酸化研究，还需要加入磷酸酶抑制剂（自备，货号：PC1830），混匀，冰上预冷待用。

2. 细胞收集

收集细胞，4℃，500 g 离心 5 min，弃上清；加入适量预冷 PBS 重悬细胞，4℃，500 g 离心 5 min；弃上清，并尽量吸尽残留 PBS。注意：PBS 残留过多会降低低渗裂解效果。

3. 低渗处理：

3.1 按照细胞数量加入预冷低渗裂解缓冲液。

推荐用量：

细胞量	裂解液推荐使用量
$\sim 1 \times 10^6$	50-100 μl
$\sim 5 \times 10^6$	200-300 μl
$\sim 1 \times 10^7$	300-500 μl

3.2 轻轻吹打混匀，使细胞充分重悬；冰上孵育10 min，使细胞充分膨胀。

4. 机械破膜：

将细胞悬浮液转移到合适体积的玻璃匀浆器（自备）中，上下匀浆20-50次。

注：此匀浆步骤为关键环节，玻璃匀浆器须配套选用间隙严密的研杵，其特征是将研杵插入匀浆器套管后，可提起研杵而套管不会脱落。正确的匀浆不是旋转研杵，而是上下缓慢推拉研杵一次为一次完整的匀浆过程。匀浆次数原则是宁少勿多，建议初始匀浆次数~10次，台盼蓝染色后显微镜观察匀浆程度后再确定是否继续增加匀浆次数，过度匀浆会导致细胞核破裂释放核酸，导致样品粘稠。破碎效果与细胞类型有关，不同的样品所需匀浆次数不同。鉴定方法：取10 μl 匀浆后的样品，加入等体积的台盼蓝溶液（自备），混匀，在显微镜下观察台盼蓝溶液染色阳性（蓝色表明细胞膜破裂，但细胞核仍保持相对完整）细胞数目的比例，当阳性（蓝色）细胞破碎达到80%即可停止匀浆，请勿过度匀浆。若阳性（蓝色）细胞比例未达到80%，适当增加5-10次匀浆，随后按照同样的方法使用台盼蓝溶液进行鉴定。

5. 去除细胞核和未破碎细胞：

5.1 将细胞破碎液转移至预冷离心管中，4℃ 700 g 10 min；离心后小心收集上清，即去核后上清（PNS, post-nuclear supernatant）。沉淀主要包括细胞核、未破碎细胞和大块细胞碎片。

5.2 如上清中仍有较多完整细胞或明显碎片，可再次4℃ 700 g 5 min离心，保留PNS上清。

6. 胞浆组分和粗膜组分分离：

6.1 将 PNS上清转移至新的预冷离心管中，4℃ 16,000 g 15 min，上清为胞浆组分（CY），沉淀为粗膜组分（M），小心转移胞浆上清，避免扰动沉淀。

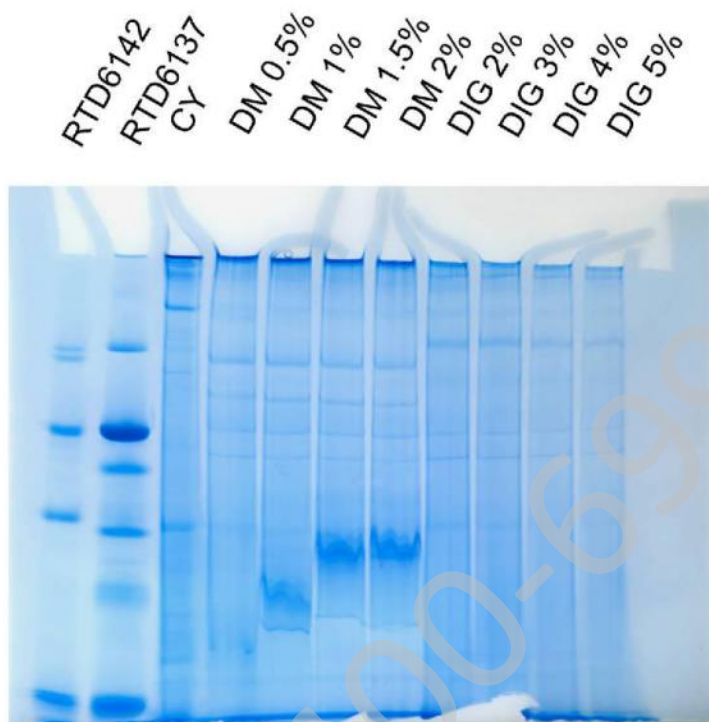
6.2 胞浆组分处理：胞浆上清可直接用于 BCA 定量，后续用于SDS-PAGE电泳或BN-PAGE电泳。

6.3 粗膜组分处理：本产品不含去垢剂，因此低渗裂解后获得的粗膜沉淀不会被直接溶解。若需检测膜蛋白或膜蛋白复合物，可根据后续实验选择不同处理方式。

6.3.1 SDS-PAGE变性检测：向粗膜沉淀中加入适量RIPA强（RL1020）或者Western及IP细胞裂解液（WL1020），冰上裂解30 min，期间轻轻吹打或震荡混匀数次，4℃ 16,000 g 15 min，收集上清，上清中加入变性还原上样缓冲液（PL080），37℃ 30 min或者50℃ 15 min（不要95度处理，容易导致膜蛋白聚集），SDS-PAGE检测。

6.3.2 BN-PAGE检测：建议使用温和去垢剂（如Digitonin, DDM等）溶解粗膜组份或使用膜蛋白增溶液A（DM1080）进行样品处理。

● 实验示例：



K562细胞使用低渗裂解缓冲液（RL1100）提取膜蛋白BN电泳

- 1 膜蛋白提取：K562悬浮细胞 1.7×10^6 ，400 g 3 min，1×PBS漂洗一次，沉淀中加入300 μ l低渗裂解缓冲液（RL1100），涡旋30秒，冰浴10 min，细胞悬液过离心柱（CD-50），16000 g 1 min，2 ml离心管中的滤出液重悬，700 g 10 min，取上清（PNS），不要触及沉淀，PNS上清16000g 4度离心15 min，上清为CY，沉淀即为膜蛋白（M）。
 - 2 膜蛋白溶解：膜蛋白中加入膜蛋白悬浮液（PN1020）悬浮沉淀，BCA定量后调整蛋白浓度为1 μ g/ μ l。取50 μ l重悬液 4度16000g 5min，去上清，沉淀中加入50 μ l膜蛋白增溶液A（DM1080），冰浴10 min，16000g 15min，取上清即为增溶后的膜蛋白（1 μ g/ μ l）
 - 3.膜蛋白上样液配制：取40 μ l 1 μ g/ μ l的膜蛋白样品（DM终浓度1%），加入4 μ l 10×膜蛋白上样缓冲液（PL130）混匀后上样，建议每个泳道上样10-20 μ l（10-20 μ g）。
- 注：其余去垢剂浓度为相同蛋白含量加不同去垢剂增溶。
- 4.BN电泳：3-12%BN梯度胶（RTD6138-0312），内槽缓冲液 1×蓝色电泳缓冲液（0.002% G-250）恒压200 V 电流变化 15-2.5 mA 55 min，更换为无色缓冲液，电流变化2.7-2.1 mA，约30 min，合计电泳时间85 min。
 5. 染色：FastBlue蛋白染色液染色30 min