



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

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

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

## 非变性裂解液（细胞样品）

货号	产品名称	规格
RL1080	非变性裂解液（细胞样品）	100 ml

### ● 产品简介：

非变性裂解液（细胞样品）（**Native Lysis Buffer for Cells**）是一种用于活性提取哺乳动物细胞的胞浆蛋白、胞核蛋白的提取试剂。本产品与 Thermo 的 M-PER<sup>®</sup> Mammalian Protein Extraction Reagent（Thermo 货号：78501, 78503, 78505）以及 Sigma 的 CelLytic M mammalian cell lysis/extraction reagent（Sigma 货号：C2978）为同类产品，可以考虑平替。

本产品含有一种比较温和的非变性去垢剂，缓冲系统 pH7.6，能够确保蛋白高效抽提的同时还可以保留蛋白样品中蛋白或酶的活性，便于进行后续的蛋白活性分析检测。

对于使用本产品提取的蛋白溶液，如果希望去除其中的去垢剂，可以通过离心式去垢剂去除柱（货号：DD0550）快速去除。

本产品提取的蛋白样品，能较好地保持其原有的空间结构和生物学活性，可用于蛋白的非变性电泳和多种生物化学和细胞生物学用途。例如，Tris-甘氨酸非变性电泳（货号：RTD6135, RTD6130）、Blue Native 电泳（货号：RTD6139, RTD6140）、免疫沉淀(IP)、免疫共沉淀(Co-IP)，ELISA 等常规生化分析，luciferase、 $\beta$ -gal、alkaline phosphatase、chloramphenicol acetyltransferase (CAT)等报告基因(Report gene)酶活性检测，PKA、PKC 和酪氨酸激酶等蛋白激酶活力的检测，以及带有 HA、Flag、Myc、V5、His 和 GST 等标签蛋白的分离纯化等方面的用途。

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（去垢剂兼容型）（货号：RTP7104）进行定量分析。由于含有较高浓度去垢剂，不建议使用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒（货号：RTP7101）测定蛋白含量。

本产品裂解液比较温和，对于膜蛋白提取效果不好，不建议用于膜蛋白提取；由于组织的特殊性，本产品不建议用于组织蛋白的非变性提取。

按照每次裂解  $5 \times 10^6$  细胞，每次使用 0.5 ml 裂解液，该产品可以提取 200 个样品。

### ● 产品特点：

1. 高效：提取效率比冻融、超声等方法效率高。
2. 非变性：最大限度保持蛋白活性，不会干扰下游应用。
3. 方便：贴壁细胞可以直接在器皿上裂解，不用刮下细胞。
4. 快速：可在常温下快速裂解细胞。

### ● 保存、运输及效期：

4度保存，常温运输，有效期两年。

● **用前必读：**

1. 裂解样品的所有步骤都需在冰上或 4℃ 进行。
2. 需自备蛋白酶抑制剂或者购买蛋白酶抑制剂 **Cocktail** (不含 EDTA, 片剂, 通用型) (货号: PC2930) 和/或磷酸酶抑制剂。

● **使用说明：**

**1. 准备即用型裂解缓冲液：**

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），混匀，冰上预冷待用。

**2. 贴壁细胞蛋白提取：**

- 2.1 去除培养液，加入适量1×PBS，轻柔漂洗一遍，不要扰动贴壁细胞。按照下表直接在培养器皿中加入裂解液，移液器吹打数下，使裂解液和细胞充分接触，冰上裂解细胞5分钟，间歇混匀。

培养板规格/培养皿表面积	细胞量	裂解液推荐用量
100 mm培养皿*	~1.5×10 <sup>7</sup>	0.5-1 ml
60 mm培养皿	~5×10 <sup>6</sup>	0.25-0.5 ml
35 mm培养皿	~2×10 <sup>6</sup>	0.2-0.4 ml
6孔板	~2.5×10 <sup>6</sup>	200-400 μl
24孔板	~5×10 <sup>5</sup>	100-150 μl
96孔板	~1×10 <sup>5</sup>	50-100 μl

注：100 mm培养皿收集的细胞量~1.5×10<sup>7</sup>（50 mg），可以提取~3 mg总蛋白。

- 2.2 细胞收集于1.5 ml离心管中，冰上继续裂解15分钟，间歇混匀。

- 2.3 4℃ 16000 g离心10分钟，取上清。

**3. 悬浮细胞蛋白提取：**

- 3.1 450 g 4℃ 离心5 min收集细胞；用适量1×PBS重悬细胞，450 g 4℃ 离心5 min收集细胞；重复漂洗细胞一次；

- 3.2 按照细胞沉淀体积（PCM）20 μl（~20 mg）加入200 μl 裂解缓冲液的比例加入裂解液，混匀细胞沉淀，冰浴处理15分钟，间歇混匀。

注：2×10<sup>6</sup> Jurkat细胞，其细胞沉淀体积（PCM, Packed Cell Volume）大约为20 μl（~20 mg），可以提取~1.5 mg总蛋白。

- 3.3 4℃ 16000 g离心10分钟，取上清。

**4. 可选步骤：蛋白样品去除去垢剂：**

如果实验中遇到以下情况，建议进行步骤4。非变性电泳，发现样品中的去垢剂导致泳道拖尾；样品中的去垢剂影响后续实验，如ELISA或酶活性测定；样品中的去垢剂对质谱实验有影响。

**4.1 去垢剂去除柱（自备，货号：DD0550）预处理：**

- 4.1.1 取出柱子，放入套管中。

4.1.2 旋开管盖，不要拧掉柱子底部堵头，加入 0.4 ml 1×PBS，盖紧管盖，常温静置 2 min，活化填料。

4.1.3 拧掉柱子底部堵头，将柱子放入套管中，1000 g 离心 1 min，弃流穿液。

注：离心力不要高于 1000 g，过高的离心力会损伤填料，降低去垢剂去除效率。

4.1.4 在柱子管盖上标记填料在柱子内的倾斜方向，随后离心步骤均按同一倾斜方向在离心机内放置柱子。

4.1.5 柱子中加入 0.4 ml 1×PBS，1000 g 离心 1min，弃流穿液。至此，柱子活化结束，备用。

#### 4.2 样品去垢剂去除：

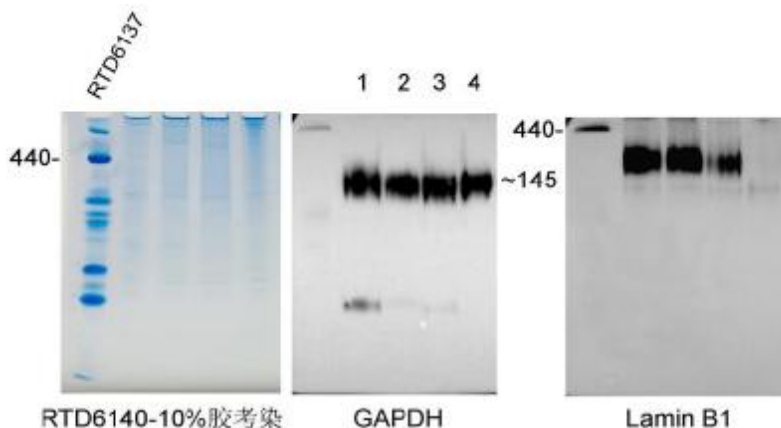
4.2.1 将柱子转移到 2 ml 尖底离心管中，加入 25-100  $\mu$ l 待处理样品（样品浓度高于 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l），常温静置 2 min。

4.2.2 1000g 离心 2 min，收集离心管内样品。

#### 5. 常见问题：

常见问题	可能原因	解决方法
蛋白提取得率低	RL1080 未能有效裂解细胞膜	步骤 2.2 和 3.2 修改为 4 度条件下摇床持续混匀 30min。
	RL1080 使用量不够	加入更多的裂解液
	蛋白表达量低	优化转染程序
不能提取膜蛋白	RL1080 非变性裂解液仅能提取胞浆蛋白和胞核蛋白	使用膜蛋白提取专用裂解缓冲液

#### ● 实验示例：



样品提取：K562细胞 1×10<sup>7</sup>细胞，400 g 离心3 min收集，1×PBS清洗2次，细胞沉淀中加入0.6 ml 非变性裂解液(货号:RL1080)，轻柔悬浮细胞，4度冰浴15min，间歇混匀，4度 16000 g 15 min，收集上清。

电泳上样样品制备：BCA蛋白浓度测定试剂盒测定浓度（货号：RTP7102），样品加入4×BN/CN-PAGE蛋白上样缓冲液（货号：PL114），调配为0.3  $\mu$ g/ $\mu$ l上样液，上样40  $\mu$ l（12  $\mu$ g）。

样品1：RL1080提取样品，加终浓度0.125% G-250（5% G-250染料，货号：BC260）；

样品2：RL1080提取样品，不加G-250；

样品3: RL1080提取样品使用离心式去垢剂去除柱(货号: DD0550) 去除去垢剂,

样品4: 柱式动物胞浆蛋白提取试剂盒(细胞样品,非变性提取,不含去垢剂)(货号:RTD8106) 提取样品;

凝胶制备: Blue/Clear 非变性凝胶电泳试剂盒(手灌胶)(货号: RTD6140) 制备10% 厚度1.5 mm凝胶;

电泳: 使用10×BN电泳缓冲液(货号: BC500P)。开始电泳用1×蓝色BN电泳缓冲液(0.02%G250), 恒压200 V 51min后, 换无色1×BN 电泳缓冲液,电泳时间共104 min

凝胶预处理: 凝胶浸泡于1×BN转膜缓冲液+0.1%SDS中 摇床慢摇10 min。

湿转法转膜: 用10×BN转膜缓冲液(货号: BC600P) 配制1×BN转膜缓冲液+20%甲醇, 用0.45 μm PVDF, 恒流200 mA(电压变化114-83 V) 2小时, 未冰浴(缓冲液水温36度)。

膜用无水甲醇去除蓝色。

封闭: Western快速封闭液(货号: WR5020) 快速封闭 10 min。

GAPDH检测: GAPDH 兔单抗(货号: RGA1150) 1:10000 过夜孵育; 羊抗兔IgG-HRP 1:5000(货号: HGR1020) RT 1h, ECL 1秒。

抗体清除: PVDF膜用Western一抗二抗去除液(弱碱,温和型)(货号: WS1200) 清除30min, 快速封闭 10min。

Lamin B1检测: Anti-Lamin B1抗体(兔单抗)(货号: RGL1150) 1: 3000 RT 1h, 羊抗兔IgG-HRP 1:5000(货号: HGR1020) RT 1h, ECL 8秒。

羊抗兔IgG-HRP 1:5000(货号: HGR1020) RT 1h, ECL 8秒