

## EasyLys-I 昆虫活性蛋白提取试剂使用说明书

### 【包装规格】

产品编号	产品名称	包装
ES-6225	EasyLys-I Insect Cell Protein Extraction Reagent	100ml/500ml
	使用说明书	1 份

### 【保存条件】

4℃ 保存，一年有效。室温保存，至少 2 周内有效。-20℃ 可以保存更长时间。

### 【概述】

本产品能够快速、温和、有效地抽提昆虫细胞或组织的总蛋白，抽提的蛋白能较好地保持其原有的空间结构和生物学活性，可用于多种生物化学和细胞生物学用途。例如，带有 His、GST、HA、Flag、Myc、V5 等标签蛋白的分离纯化，免疫印迹(Western blot)、免疫沉淀(Immunoprecipitation)、免疫共沉淀(Co-immunoprecipitation)和 ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)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 (tyrosine kinase)等蛋白激酶活力的检测等方面的用途。

### 【操作方法】

#### 1. 溶液的准备

取适量的昆虫活性蛋白抽提试剂，根据具体实验目的加入适量的蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂，也可以根据实验目的选不含磷酸酶抑制剂的蛋白酶抑制剂混合物。放置于冰浴备用。

#### 2. 悬浮培养昆虫细胞的蛋白抽提

- a. **收集细胞**：对细胞进行计数，并确定总的细胞数。800g 室温离心 5min，弃上清。
- b. **洗涤细胞(可选做)**：用 PBS 洗涤细胞，800g 室温离心 5min，弃上清。如有必要，可以重复洗涤一次。
- c. **裂解细胞**：弹击离心管底，使细胞沉淀适当分散开。每  $0.5-2 \times 10^7$  个细胞加入冰浴预冷的 1ml 昆虫活性蛋白抽提试剂，用移液器吹打混匀，再以中速涡悬震荡约 5 秒后置于冰上孵育 10min。如果希望获得更多的蛋白，或者对于一些较难裂解提取的蛋白，则需要额外的孵育时间以提高得率。额外的孵育时间，可能会增加蛋白得率。
- d. 12,000-16,000g (16,000g 更佳) 4℃ 离心 15min。

e. 将含有可溶性蛋白的上清转移到新的离心管中，立即用于后续分析检测，或者-20℃或-80℃保存备用。如有必要，可以考虑保留沉淀物用于后续分析。

### 3. 贴壁培养昆虫细胞的蛋白抽提

a. **洗涤细胞(可选做)**: 吸除培养液，加入适量 PBS，轻轻摇动，吸除 PBS 重复洗涤一次。如有必要，可以再重复洗涤一次。洗涤过程中应尽量避免贴壁细胞的脱落，如果发生细胞脱落，可以收集相应的培养液或 PBS 溶液，800g 离心 5min，以沉淀并收集脱落的细胞。

b. **裂解细胞**: 吸净细胞培养液或洗涤液，参考下表，加入适量的昆虫活性蛋白抽提试剂，冰上孵育 10min。冰上孵育期间，可以将培养器皿放置在水平或侧摆摇床上剧烈摇动、敲击细胞培养瓶细胞培养侧的外壁或用细胞刮刮下贴壁细胞。通常直接孵育 5-6min 后，昆虫细胞会逐渐出现从培养器皿表面脱落的现象。

培养板/皿	表面积 (cm <sup>2</sup> )	裂解液用量(μl)
10-cm dish	55	500-1000
6-cm dish	21	200-400
6 孔板	9.5	100-200
12 孔板	3.8	50-100
24 孔板	1.9	25-50
48 孔板	0.95	12.5-25
96 孔板	0.32	5-10

c. 用移液器将细胞抽提产物吹打悬起并转移到离心管中，12,000-16,000g (16,000g 更佳) 4℃ 离心 15min。

d. 将含有可溶性蛋白的上清转移到新的离心管中，立即用于后续分析检测，或者-20℃或-80℃保存备用。如有必要，可以考虑保留沉淀物用于后续分析。吸取上清时触及沉淀会导致抽提产物中含有更多的杂蛋白等

#### 【注意事项】

1. 该产品仅实验室使用，不适合农业/家庭/临床用途使用。
2. 为了您的安全与健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。