



RIPA 裂解液(强)

产品简介:

多种成分均可以从细胞中提取总蛋白, 例如 Triton、SDS、NP-40 等。RIPA 裂解液(强)(Enhanced RIPA Lysis Buffer), 是采用一种经典的细胞组织快速裂解, 并获得总蛋白的裂解液, 其裂解强度大于 NP-40 裂解液、RIPA 裂解液(中)。所获得的蛋白质可以用于 Western, 免疫沉淀(Immunol Precipitation, IP)等。

Enhanced RIPA Lysis Buffer 主要由 Tris、NP-40、sodium deoxycholate 等组成, 并含有多种蛋白酶抑制剂成分, 可以有效抑制蛋白的降解, 并维持原有的蛋白间相互作用。

产品组成:

名称 \ 货号	SS0887	Storage
Enhanced RIPA Lysis Buffer	100ml	-20℃
PMSF(100mM)	1.5ml	-20℃
使用说明书	1 份	

操作步骤 (仅供参考):

(一)贴壁培养细胞

- 1、取 Enhanced RIPA Lysis Buffer 室温溶解混匀, 加入 PMSF, 使 PMSF 终浓度为 1mM。
- 2、去除贴壁细胞的培养液, 用 PBS、NS 或无血清培养液清洗 1 次, 低速离心, 弃上清, 留取沉淀。
- 3、按照 6 孔板每孔加入 150~250 μ l 含有 PMSF 的裂解液的比例, 加入 RIPA Lysis Buffer。移液器轻轻吹打, 使裂解液和细胞充分接触。置于冰上或 4℃裂解 15~30min, 通常裂解液作用于细胞 1~3 秒内, 细胞就会被裂解。通常 6 孔板每孔细胞加入 150 μ l 裂解液已经足够, 但如果细胞密度非常高可以适当加大裂解液的用量到 200~250 μ l。
- 4、10000~12000g, 4℃离心 5~10min(如无低温离心机, 室温下离心亦可), 取上清。
- 5、进行后续的 SDS-PAGE、Western、免疫沉淀和免疫共沉淀等操作。

(二)悬浮培养细胞

- 1、取 Enhanced RIPA Lysis Buffer 室温溶解混匀, 加入 PMSF, 使 PMSF 终浓度为 1mM。
- 2、低速离心悬浮细胞, 弃上清, 收集沉淀。
- 3、用手指轻弹细胞, 使其松散。按照 6 孔板每孔细胞加入 150~250 μ l 含有 PMSF 的裂解液的比例, 加入 Enhanced RIPA Lysis Buffer。通常 6 孔板每孔细胞加入 150 μ l 裂解液已经足够, 但如果细胞密度非常高可以适当加大裂解液的用量到 200~250 μ l。再用手轻弹以充分裂解细胞, 充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。



4、 10000~12000g, 4℃离心 5~10min(如无低温离心机, 室温下离心亦可), 取上清。

5、 进行后续的 SDS-PAGE、Western、免疫沉淀和免疫共沉淀等操作。

(三)组织样本

1、 取 Enhanced Lysis Buffer 置于室温溶解混匀, 加入 PMSF, 使 PMSF 终浓度为 1mM。

2、 把组织剪切成细小的碎片, 越小越好。取在液氮或超低温冰箱中冷冻 30min 以上的组织, 迅速用液氮研磨, 研磨过程尽量控制在 1~2min 之内, 以减少蛋白的降解。

3、 按照每 20mg 组织加入 150~250 μ l 裂解液的比例加入含有 PMSF 的裂解液。冰上或 4℃裂解 15-30min。

4、 步骤 3、4 亦可以采用如下过程: 按照每 20mg 组织加入 150~250 μ l 裂解液的比例加入含有 PMSF 的 Enhanced RIPA Lysis Buffer。用玻璃匀浆器或组织研磨器匀浆, 直至充分裂解, 该过程尽量控制在 1~2min 之内, 以减少蛋白的降解。

5、 10000~12000g, 4℃离心 5~10min(如无低温离心机, 室温下离心亦可), 取上清。

6、 进行后续的 PAGE、Western、免疫沉淀和免疫共沉淀等操作。

注意事项:

1、 去除贴壁细胞的培养液后, 如果血清中的蛋白没有干扰, 可以不用清洗。

2、 如果裂解不充分可以适当增加裂解液的用量, 如果需要高浓度的蛋白样品, 可以适当减少裂解液的用量。

3、 如果细胞量较多, 必需分装成 50~100 万细胞/离心管, 然后再裂解。大团的细胞较难裂解充分, 而少量的细胞由于裂解液容易和细胞充分接触, 相对比较容易裂解充分。

4、 如果组织样品本身非常细小, 可以适当剪切后直接加入裂解液裂解, 通过强烈 Vortex 使样品裂解充分。然后同样离心取上清, 用于后续实验。

5、 溶解 NOVON RIPA Lysis Buffer 时, 应尽量缩短溶解时间, 避免有效成分失效。

6、 裂解产物中经常会出现一小团透明胶状物, 属正常现象。该透明胶状物为含有基因组 DNA 等的复合物。在不检测和基因组 DNA 结合特别紧密的蛋白的情况下, 可以直接离心取上清用于后续实验; 如果需要检测和基因组结合特别紧密的蛋白, 则可以通过超声处理打碎打散该透明胶状物, 随后离心取上清用于后续实验。如果检测一些常见的转录因子, 例如 NF- κ B、p53 等时, 通常不必进行超声处理, 就可以检测到这些转录因子。

7、 细胞裂解的操作步骤, 应置于冰上或 4℃进行。

有效期: 12 个月有效。