

RIPA Lysis Buffer (Medium) RIPA 裂解液 (中)

产品信息

产品名称	产品编号	规格
RIPA Lysis Buffer (Medium) RIPA 裂解液 (中)	20115ES60	100 mL

产品描述

RIPA 裂解液(RIPA Lysis Buffer), 其本意是 Radio Immunoprecipitation Assay, 是一种传统的细胞组织快速裂解液, 对动物细胞胞膜、胞浆、胞核成分均有裂解作用。根据其裂解液的强度不同, 大致可以分为强、中、弱三类。

本品属于裂解强度居中的 RIPA 裂解液, 含有 sodium orthovanadate, sodium fluoride, EDTA, leupeptin 等多种抑制剂, 可以有效抑制蛋白降解。裂解得到的蛋白样品可用于常规的 Western、IP 等实验。

运输与保存方法

冰袋 (wet ice) 运输。-20°C 保存, 一年有效。尽量避免反复冻融, 建议分装后使用。

注意事项

- 1) 需自备 PMSF。
- 2) 裂解样品的所有步骤都需在冰上或 4°C 进行。
- 3) 用 RIPA 裂解液裂解得到的蛋白样品, 可以用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定其蛋白浓度 (YEASEN CAT NO.20201ES76)。
由于含有较高浓度的去垢剂, 不能用 Bradford 法测定由本裂解液裂解得到样品的蛋白浓度。
- 4) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

一、细胞样品

1. 融解 RIPA 裂解液, 混匀。取适当量的裂解液, 在使用前数分钟内加入 PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1mM。
2. 贴壁细胞: 去除培养液, 用 PBS、生理盐水或无血清培养液清洗细胞一遍(如果血清中的蛋白没有干扰, 可以不洗)。按照 6 孔板每孔加入 150-250 μ L 裂解液的比例加入裂解液。用枪吹打数下, 使裂解液和细胞充分接触。通常裂解液接触细胞 1-2 秒后, 细胞就会被裂解。
悬浮细胞: 离心收集细胞, 用手指把细胞用力弹散。按照 6 孔板每孔细胞加入 150-250 μ L 裂解液的比例加入裂解液。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。如果细胞量较多, 必需分装成 5×10^5 - 1×10^6 个细胞/管, 然后再裂解。
3. 充分裂解后, 10000-14000 g 离心 3-5 min, 取上清, 即可进行后续的 PAGE、Western 和免疫沉淀等操作。
裂解液用量说明: 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 μ L 或 250 μ L。

二、组织样品:

1. 把组织剪切成细小的碎片。
2. 融解 RIPA 裂解液, 混匀。取适当量的裂解液, 在使用前数分钟内加入 PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1 mM。
3. 按照每 20 mg 组织加入 150-250 μ L 裂解液的比例加入裂解液。(如果裂解不充分可以适当添加更多的裂解液, 如果需要高浓度的蛋白样品, 可以适当减少裂解液的用量。)
4. 用玻璃匀浆器匀浆, 直至充分裂解。

5. 充分裂解后, 10000-14000 g 离心 3-5 min, 取上清, 即可进行后续的 PAGE、Western 和免疫沉淀等操作。
6. 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。直接裂解的优点是比较方便, 不必使用匀浆器, 缺点是不如使用匀浆器那样裂解得充分。

【注】 RIPA 裂解液的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-kappaB、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。