

RIPA 裂解液(强)

Enhanced RIPA Lysis buffer

货号: BN25011

规格: 100ml

储存条件: RIPA裂解液4 保存, PMSF -20℃避光保存, 有效期 12 个月。

简介:

RIPA 裂解液是一种传统的细胞组织快速裂解液, 裂解得到的蛋白样品可用于常规的 Western、IP 等实验。蛋白样品可用 BCA Protein Assay Kit (BN27109) 测定蛋白浓度。由于含有较高浓度的去污剂, 不能用 Bradford 法测定 RIPA 裂解后的蛋白浓度。RIPA 裂解液种类很多, 根据其裂解液的强度不同为强、中、弱三类。为保证实验结果请根据检测样本与检测目的的不同选择适当的裂解液。

RIPA 裂解液(强) (Enhanced RIPA Lysis buffer) 主要由 50mM Tris(pH 7.4), 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS 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, 维持原有的蛋白间相互作用。含有 PMSF(100mM, 100×)一支。

本产品仅用于科研领域, 不用于临床诊断。

使用方法:

(一) 贴壁培养细胞

1. 取 Enhanced RIPA Lysis Buffer 室温溶解混匀, 加入 PMSF 使终浓度为 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 RIPA Lysis Buffer 置室温溶解混匀，加入 PMSF 使终浓度为 1mM。
2. 把组织剪切成细小的碎片，越小越好。
3. 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。
4. 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 $^{\circ}$ C 裂解 15~30min。
5. 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。
6. 10000~12000g, 4 $^{\circ}$ C 离心 5~10min (如无低温离心机，室温下离心亦可)，取上清。
7. 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。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比较充分。
5. Medium RIPA Lysis Buffer 含有 Leagene 特殊成分，在低温情况下有可能出现浑浊现象，可 37 $^{\circ}$ C 水浴促其溶解，不会影响使用效果；溶解时间不易过长，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。
7. 细胞裂解的操作步骤，应置于冰上或 4 $^{\circ}$ C 进行。