

RIPA Lysis Buffer (Medium)

RIPA 裂解液 (中)

产品简介:

RIPA 裂解液是一种经典的细胞组织快速裂解液,对动物细胞膜、胞浆、胞核成分均有较强的裂解作用,裂解得到的蛋白样品可以用于常规的 Western、IP 等。RIPA 的本意是 Radio Immunoprecipitation Assay。RIPA 裂解液的配方有很多种,根据其裂解液的强度大致可以分为强、中、弱三类。

RIPA 裂解液(中)的主要成分为 50mM Tris-HCl (pH7.4), 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS 以及 Sodium Orthovanadate, Sodium Fluoride, EDTA 等。本产品需要和常规的蛋白酶抑制剂一起使用,以达到更好的提取效果;本产品含有磷酸酶抑制剂,可用于提取磷酸化蛋白。

用 RIPA 裂解液(中)裂解得到的蛋白样品,可以用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。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。

使用说明:

1、使裂解液充分融解,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,根据具体实验需求可选择加入蛋白酶抑制剂。

2、根据样品的类型进行如下操作:

对于贴壁细胞: 去除培养液,用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍(若血清中的蛋白没有干扰,可不洗)。按照 6 孔板每孔加入 150-250ul 裂解液的比例加入裂解液。用移液器吹打数下,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。

对于悬浮细胞: 离心收集细胞,去除培养基,用手指把细胞用力弹散,按照 6 孔板每孔细胞加入 150-250ul 裂解液的比例加入裂解液。再用手轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后应无明显的细胞沉淀。如果细胞量较多,必需分装成 50-100 万细胞/管后再裂解。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。

对于组织样品: 把组织剪切成细小的碎片。按照每 20mg 组织加入 150-250ul 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。)使用玻璃匀浆器匀浆,直至充分裂解。

3、样品充分裂解后,4℃ 10000-14000g 离心 3-5 分钟,取上清,即可进行后续的 PAGE、Western blot、免疫沉淀和免疫共沉淀等操作。

裂解液用量说明:通常 6 孔板每孔细胞加 150ul 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 或 250ul。

注意:RIPA 裂解液(中)的裂解产物中经常会出现透明胶状物,其主要成分为基因组 DNA,当检测的目标蛋白不与基因组 DNA 紧密结合,可以直接离心裂解产物,取上清液用于后续实验;如果目的蛋白与基因组 DNA 结合非常紧密,可通过超声处理打碎打散透明胶状物,随后离心取上清液用于后续实验。

注意事项:

- 1、为取得最佳的使用效果,尽量避免过多的反复冻融。可以适当分装后使用。
- 2、需自备 PMSF。
- 3、裂解样品的所有步骤都需在冰上或 4℃ 进行。
- 4、可能需要通过一些预实验来摸索最佳的适合您实验条件的裂解液。
- 5、为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

保存条件:

-20℃ 保存,一年有效。加入蛋白酶抑制剂后建议适量分装-20℃ 冻存,避免反复冻融。