

RIPA Lysis Buffer(Strong)

货号: RM02998

规格: 100 mL

◆ 产品简介

RIPA(Radio-Immunoprecipitation Assay) Lysis Buffer (Strong)是广泛用于报告基因检测、蛋白质激酶实验、免疫测定和蛋白质纯化的裂解液和洗涤缓冲液。 RIPA Lysis Buffer (Strong) 的主要成分为 50 mM Tris(pH 7.4)、150 mM NaCl、1%Triton X-100、1%sodium deoxycholate、0.1%SDS 和一般的蛋白酶和磷酸酶抑制剂(如 sodium orthovanadate,sodium fluoride 和 EDTA), 可有效抑制蛋白质的降解。

该产品适用于细菌、真菌、动物和植物的细胞或组织样品, 使用该产品得到的蛋白样品可用于常规的蛋白质印迹(Western blotting,WB)、免疫沉淀(Immunoprecipitation,IP)、免疫共沉淀(Co-immunoprecipitation,Co-IP) 和酶联免疫吸附测定法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay,ELISA)等实验。

◆ 产品组成

产品货号	名称	规格	保存
RM02998	RIPA Lysis Buffer(Strong)	100 mL	-20°C

◆ 保存条件

避免反复冻融, 适当分装后-20°C条件下储存, 稳定 12 个月以上。

◆ 操作流程

1.裂解细胞样品

(1)溶解 RIPA Lysis Buffer(Strong), 混匀。取适量的裂解液, 根据实验要求加入适量的蛋白酶磷酸酶抑制剂等混合物, 置于冰上备用。

(a) 贴壁细胞:

除去培养液, 用预冷的 PBS、生理盐水或无血清培养液洗 2 遍(洗去血清中的 IgG 有助于 IP 和 Co-IP 实验的顺利进行, 但对于 WB 实验并非必要, 如果血清中的蛋白质对后续实验没有干扰, 可以不洗)。按照 6 孔板每孔加入 150-250 μ L 裂解液的比例加入预冷的裂解液。用枪吹打数下, 使裂解液和细胞充分接触。冰上放置 5-10 min, 期间剧烈震荡 3-4 次, 每次 30 秒, 以充分裂解。一般裂解液接触动物细胞 1-2s 后细胞就会被裂解, 植物细胞宜在冰上裂解

2-10min。

(b) 悬浮细胞：

离心收集细胞，弃上清，用预冷的 PBS、生理盐水或无血清培养液洗 2 遍(洗去血清中的 IgG 有助于 IP 和 Co-IP 实验的顺利进行，但对于 WB 实验并非必要，如果血清中的蛋白质对后续实验没有干扰，可以不洗)。按照 6 孔板每孔加入 150-250 μ L 裂解液的比例加入预冷的裂解液。轻轻弹击管底使细胞充分裂解。充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。若细胞数量较多，需分装成 50-500 万细胞/管，之后再进行裂解。冰上放置 5-10min，期间剧烈震荡 3-4 次，每次 30s，以充分裂解。

注意：一般每 50-500 万细胞可用 1mL 的 RIPA 裂解液裂解。细胞数量较高时，可加大裂解液用量。

(c) 细菌或酵母：

以 1mL 菌液或酵母为例，离心去上清，轻轻涡旋或弹击管底使细菌或酵母尽量分散。加入 100-200 μ L 裂解液，轻轻混匀，冰上裂解 2-10 min。分别使用溶菌酶和破壁酶消化细菌和酵母，再使用本裂解液进行裂解，可获得更好的裂解效果。

(2)充分裂解后，14,000 g 低温离心 5min，取上清，即可进行后续的 WB、IP 和 PAGE 等操作。也可用液氮速冻后于 -80. C 长期保存。

2.裂解组织样品

(1)溶解 RIPA Lysis Buffer(Strong)，混匀。取适量的裂解液，根据实验要求加入适量的蛋白酶磷酸酶抑制剂等混合物，置于冰上备用。

(2)将组织置于小皿中，冰上操作，剪切成细小的碎片。

(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)用玻璃匀浆器匀浆或超声破碎细胞，直至充分裂解。匀浆或超声破碎细胞后应镜检，细胞破碎率不小于 90%，同时组织已经完全裂解，没有明显的小组织块。也可以把组织样品冷冻后进行液氮研磨，研磨充分后加入裂解液进行裂解。

(5)将匀浆物转移到离心管，冰上放置 5-10min，期间剧烈震荡 3-4 次，每次 30s，以充分裂解。

(6)充分裂解后，14,000 g 低温离心 5min，取上清，即可进行后续的 WB、IP 和 PAGE 等操作。

◆ 注意事项

(1) 裂解样品的所有步骤都需要在冰上或 4°C 条件下进行。

(2) 为取得最佳的使用效果，尽量避免反复冻融，建议适当分装后使用。

- (3) 本产品虽含有一般的蛋白酶和磷酸酶抑制剂，如为达到更好的抑制效果，需客户自备或可购买本公司的蛋白酶和磷酸酶抑制剂 Cocktail（货号分别为 RM02916 和 RM02997）。
- (4) 裂解液中 SDS 4℃保存易沉淀析出，使用前应该 37℃ 水浴重新溶解完全后恢复到室温使用。
- (5) RIPA 裂解缓冲液含有离子去污剂，如果待测定的激酶易变性，可能不适用。
- (6) 在制备用于磷酸酶测定的裂解物时，不要添加磷酸酶抑制剂。
- (7) 由于本产品中含有较高浓度的去垢剂，后续蛋白浓度测定不宜用 Bradford 法，推荐选用 BCA 法测定浓度。
- (8) RIPA 裂解液的裂解产物中经常会出现一小团透明胶状物，属于正常现象。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 3 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。
- (9) 每 20mg 冻存的小鼠肝脏组织用 200μL 本裂解液裂解后获得的上清，其蛋白浓度约为 15-25mg/mL，不同状态的不同组织有所不同。
- (10) 如果组织样品非常小，可以适当剪切后直接加入裂解液裂解，通过强烈涡旋使样品裂解充分。之后同样离心取上清，用于后续实验。