



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-times.com.cn

E-mail: real-times@vip.163.com

RIPA 裂解液(强)

● 产品包装:

产品编号	产品名称	产品包装	说明书
RL1020	RIPA 裂解液(强)	100 ml	1 份

● 产品简介:

RIPA裂解液(RIPA Lysis Buffer)是一种传统的细胞组织快速裂解液。RIPA裂解液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(强)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, 以及sodium orthovanadate, sodium fluoride, EDTA, EGTA等多种抑制剂。可以有效抑制蛋白降解。由于含有较高浓度的Triton X-100等干扰物质,不能用传统Bradford法测定由本裂解液裂解得到样品的蛋白浓度,可以使用BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号: RTP7102)或Bradford蛋白浓度测定试剂盒(去垢剂兼容型)(货号: RTP7104)测定蛋白浓度。

● 保存条件:

-20℃保存,一年有效。

● 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。需自备PMSF。裂解样品的所有步骤都需在冰上或4℃进行。
2. 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。在不检测与基因组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。

● 使用说明:

1. 准备RIPA裂解液:

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1/100体积的100 mM PMSF,使PMSF的最终浓度为1 mM。

2. 细胞蛋白提取:

2.1 贴壁细胞: 去除培养液,加入适量1×PBS,轻柔漂洗一遍,不要扰动贴壁细胞。按照6孔板每孔加入100-200 μl裂解液的比例加入裂解液,移液器吹打数下,使裂解液和细胞充分接触,冰上裂解细胞5分钟,用细胞刮刀刮下细胞收集于1.5 ml离心管中,冰上继续裂解15分钟,间歇混匀。

培养板规格/培养皿表面积	细胞量	RIPA推荐使用量
100 mm培养皿	1.5×10^7	0.5-1 ml
60 mm培养皿	5×10^6	0.25-0.5 ml
35 mm培养皿	2×10^6	0.2-0.4 ml
6孔板	2.5×10^6	100-200 μ l
24孔板	5×10^5	100-150 μ l
96孔板	1×10^5	50-100 μ l

2.2 悬浮细胞: 450 g 4℃ 离心5 min收集细胞; 用适量 $1 \times$ PBS重悬细胞, 450 g 4℃ 离心5 min收集细胞; 重复漂洗细胞一次; 按照细胞沉淀体积 (PCM) 20 μ l加入200 μ l RIPA的比例加入RIPA, 混匀细胞沉淀, 冰浴处理15分钟, 间歇混匀。

注: 2×10^6 Jurkat细胞, 其细胞沉淀体积 (PCM, Packed Cell Volume) 大约为20 μ l。

2.3 裂解细胞:

裂解混合物超声波处理 (超声条件根据仪器调整, 建议条件为); 如没有超声破碎仪, 可以使用注射器用27G针头处理裂解物10-15次 (货号: PE2719, 蛋白提取针头套装), 以彻底裂解细胞。冰浴处理15分钟。

注: 裂解中细胞会释放出变性的核酸, 呈团状粘稠透明样, 如不进行超声或针头裂解处理, 会导致裂解物非常粘稠, 大大降低蛋白提取的得率和纯度。

2.4 离心收集上清:

充分裂解后, 4℃ 16000 g离心10分钟, 取上清, 即可进行后续的PAGE、Western和免疫沉淀等操作。

3. 组织样品蛋白提取:

3.1 手术切除的组织块迅速置于预冷的生理盐水中, 漂洗数次, 洗净组织血迹, 用滤纸吸干组织表面液体, 将组织切成细小的碎片。

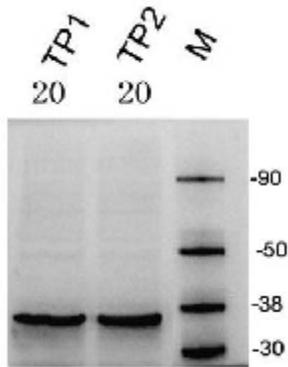
3.2 按照每20 mg组织加入200 μ l裂解液的比例加入裂解液。(如果裂解不充分可以适当添加更多的裂解液, 如果需要高浓度的蛋白样品, 可以适当减少裂解液的用量。)

3.3 用玻璃匀浆器冰浴匀浆5-10次, 收集匀浆后的裂解混合物, 超声波处理 (超声条件根据仪器调整, 建议条件为); 如没有超声破碎仪, 可以使用注射器用27G针头处理裂解物10-15次 (货号: PE2719, 蛋白提取针头套装), 以彻底裂解细胞。裂解物冰浴处理15分钟。

注: 裂解中细胞会释放出变性的核酸, 呈团状粘稠透明样, 如不进行超声或针头裂解处理, 会导致裂解物非常粘稠, 大大降低蛋白提取的得率和纯度。

3.4 充分裂解后, 4℃ 16000 g离心10分钟, 取上清, 即可进行后续的PAGE、Western和免疫沉淀等操作。

3. 实验示例:



Jurkat RIPA总蛋白提取，GAPDH检测

总蛋白提取： 4×10^6 Jurkat细胞，450 g 离心收集，去上清，PBS漂洗两次，沉淀中加入200 μ l RIPA（加2 μ l 100 mM PMSF），冰上裂解15分钟，超声处理，冰浴裂解15分钟，4 $^{\circ}$ C 16000 g 10 分钟，上清即为总蛋白（TP）。

电泳：RTD6132-15%3.3C 200 V 33-12 mA 55 min

转膜：NC膜，1 \times RealBlot快速转膜液湿转，稳流400 mA，电压变化64-57 V，转膜时间35 min

封闭：无蛋白快速封闭液，RT 20 min

一抗孵育：GAPDH 羊抗兔多抗，一抗稀释液稀释1: 2000

二抗孵育：羊抗兔IgG-HRP，二抗稀释液稀释1: 5000

检测：ECL发光检测