



RIPA Lysis Buffer (Strong)

使用说明书
Instruction Manual

产品描述

TargetMol RIPA 裂解液 (Radio Immunoprecipitation Assay Lysis Buffer) 是一种细胞组织快速裂解液。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 裂解液裂解得到的蛋白样品可以用于常规的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE)、Western Blot (WB)、免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP)、免疫共沉淀 (Co-IP) 和酶联免疫吸附试验 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 等。本产品可以用于动物、植物的细胞或组织样品, 也可以用于真菌或细菌样品。

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, leupeptin 等多种抑制剂, 但并不包含蛋白酶磷酸酶抑制剂 Cocktail 的全部成分。为有效的防止蛋白降解, 建议添加 PMSF 或者蛋白酶磷酸酶抑制剂 Cocktail。

操作说明

一、裂解细胞或细菌酵母样品

融解 RIPA 裂解液, 混匀。据实验需求, 取适量的裂解液, 在使用前数分钟内加入 PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1 mM, 或者根据实验需要加入适当的蛋白酶、磷酸酶抑制剂 Cocktail。置于冰上操作。

1. 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 2 遍（如果血清中的蛋白不会干扰实验，可跳过此步骤）。以 6 孔板为例，在每个孔中加入 150-250 μL 裂解液。用枪轻轻吹打数下，使裂解液和细胞充分接触。冰上放置 5-10 分钟，期间可震荡 3-4 次，每次 30 秒，以充分裂解。
2. 对于悬浮细胞：离心收集细胞，轻轻涡旋或者弹击管底以把细胞尽量分散开。以 6 孔板为例，每孔细胞加入 150-250 μL 的裂解液，轻弹管底以充分裂解细胞。充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。如果细胞量较多，需要分装成 $0.5-5 \times 10^6$ cells / 管，然后再裂解。冰上放置 5-10 分钟，期间可震荡 3-4 次，每次 30 秒，以充分裂解。
3. 对于细菌或酵母：对于 1 mL 菌液或酵母液，离心去上清，如果有必要可以使用 PBS 洗涤一次，充分去除液体后，轻轻涡旋或者弹击管底以把细菌或酵母尽量弹散。加入 100-200 μL 裂解液，轻轻涡旋或者弹击管底以混匀，冰上裂解 2-10 分钟。如果希望获得更好的裂解效果，细菌和酵母可以分别使用溶菌酶和破壁酶消化，然后再使用本裂解液进行裂解。
4. 充分裂解后，10000-14000 g 离心 3-5 分钟，取上清，即可进行后续的 PAGE、Western 和 IP 操作，也可用液氮速冻后放 -80°C 长期保存。

二、裂解组织样品

1. 把组织剪切成细小的碎片。
2. 融解 RIPA 裂解液，混匀。根据实验需求，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，或者根据实验需要加入蛋白酶、磷酸酶抑制剂 Cocktail。

3. 按照每 20 mg 组织加入 150-250 μL 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. 用玻璃匀浆器冰上均质 30-50 次，或超声破碎细胞，每次 30 秒，3-4 次，每次间隔 1 分钟，置于冰上冷却。均质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。将匀浆物转移到离心管，冰上放置 5-10 分钟，期间震荡 3-4 次，每次 30 秒，以充分裂解。
5. 充分裂解后，10000-14000 g 离心 3-5 分钟，取上清，即可进行后续的 PAGE、Western 和免疫沉淀等操作。每 20 mg 冻存的小鼠肝脏组织用 200 μL 本裂解液裂解后获得的上清，其蛋白浓度约为 15-25 mg/ mL，不同状态的不同组织有所不同。

备注：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- κB 、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。

保存条件


-20 $^{\circ}\text{C}$ 1 □

I 注意事项

1. 为获得最佳效果，尽量避免反复冻融，建议适当分装后使用。
2. 本品含有部分抑制剂可在一定程度上抑制蛋白降解，但不含 PMSF 以及蛋白酶、磷酸酶抑制剂 Cocktail 的全部成分，如有需求请自备。
3. 如果裂解组织样本，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，通过强烈涡旋使样品裂解充分。然后离心取上清，用于后续实验。直接裂解的优点是比较方便，不必使用匀浆器或研磨设备，缺点是不如匀浆或研磨那样裂解比较充分。
4. 裂解样品的所有步骤都需要在冰上操作。
5. 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。
6. 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。
7. 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。
8. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。



 www.targetmol.cn

 400 - 820 - 0310

 support@targetmol.com