



RIPA 裂解液(弱)

简介:

多种成分均可从细胞中提取总蛋白, 如 Triton、SDS、NP-40 等, RIPA 裂解液(弱) (Weak RIPA Lysis Buffer)是采用一种较温和的获得总蛋白的裂解方法, 所获得的蛋白质可用于 PAGE 电泳、Western、免疫沉淀 (Immunol Precipitation, IP)和免疫共沉淀(co-IP)等。

Weak RIPA Lysis Buffer 主要由 Tris、NP-40、sodium deoxycholate 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, 并维持原有的蛋白间相互作用。该试剂仅用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。

组成:

名称 \ 编号	R21235	Storage
试剂(A): Weak RIPA Lysis Buffer	100ml	4℃
试剂(B): PMSF 溶液(100mM)	1.5ml	-20℃
说明书	一份	

操作步骤(仅供参考):

配制含有 PMSF 的 Weak RIPA Lysis Buffer: 取 Weak RIPA Lysis Buffer 置于室温平衡, 加入 PMSF, 使其终浓度为 1mM, 临用前配制, 不可长期保存。

(一)贴壁细胞

1、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。

2、6 孔板每孔加入 150~250 μ l 含有 PMSF 的 Weak RIPA Lysis Buffer, 用手指轻弹细胞, 使其松散, 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, 通常裂解液作用于细胞 1~3s 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。

3、10000~12000g 4 $^{\circ}$ C 离心 5~10min(如无低温离心机, 室温离心亦可), 取上清。

4、后续的 SDS-PAGE、Western、免疫沉淀和免疫共沉淀等操作。

(二)悬浮细胞

1、低速离心悬浮细胞, 弃上清, 用 PBS、NS 或无血清培养液清洗 1 次, 离心留取沉淀。

2、下同贴壁细胞 2~4 操作步骤。

(三)组织样本

1、组织剪碎, 越小越好。

2、放置液氮或超低温冰箱中冷冻 30min, 用液氮研磨, 尽量控制在 1~2min 之内以减少蛋白的降解, 每 20mg 组织加入 150~250 μ l 含有 PMSF 的 Weak RIPA Lysis Buffer, 冰上或 4 $^{\circ}$ C 裂解 15~30min。

3、亦可按照每 20mg 组织加入 150~250 μ l 含有 PMSF 的 Weak RIPA Lysis Buffer, 用玻璃匀浆器或组织研磨器匀浆, 直至充分裂解, 该过程控制在 2~5min 以减少蛋白的降解。

4、下同贴壁细胞 2~4 操作步骤。

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



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

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裂解的充分。

5、Weak RIPA Lysis Buffer 含有特殊成分, 在低温情况下有可能出现浑浊现象, 可 37°C 水浴促其溶解, 不会影响使用效果; 溶解时间不易过长, 避免成分失效, 4°C 保存即可, 长期不用亦可 -20°C 保存。

6、PMSF 溶液可置 4°C 保存 1~2 周, -20°C 可保存 1 年以上, 室温放置 2 天即可能失效。

7、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。

8、细胞裂解的操作步骤, 应置于冰上或 4°C 进行。

有效期: 12 个月有效; 4°C 运输, -20°C 保存(PMSF 溶液)。

