

仅限科研

版本号: 202301

RIPA Lysis Buffer(Strong)

产品内容

名称	货号	规格	保存
RIPA Lysis Buffer(Strong)	SDP0001	100mL	-20℃

产品描述

RIPA 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 50mMTris(pH7.4)、150mMNaCl、1% TritonX-100、1% sodiumdeoxycholate、0.1% SDS 和一般的蛋白酶和磷酸酶抑制剂(如 sodiumorthovanadate, sodiumfluoride 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(Westernblotting, WB)、免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)、免疫共沉淀(Coimmunoprecipitation, Co-IP)和酶联免疫吸附测定法(Enzyme-LinkedImmunoSorbentAssay, ELISA)等实验。

操作流程

1.裂解细胞样本

(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 150-250uL 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 5-10min, 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 150-250uL 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 100-200pL



裂解液, 轻轻混匀, 冰上裂解 2-10min。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, 14,000g 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℃长期保存。

2. 裂解组织样品

(1)溶解 RIPALysisBuffer(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 20mg 组织加入 150-250pL 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, 14,000g 低温离心 5min, 取上清, 即可进行后续的 WB、IP 和 PAGE 等操作。

3. 注意事项

(1)裂解样品的所有步骤都需要在冰上或 4℃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, 需客户单独购买蛋白酶抑制剂 Cocktai (货号: SDP0003)、磷酸酶抑制剂 Cocktail(货号: SDP0004)。

(4)裂解液中 SDS4° C 保存易沉淀析出, 使用前应该 37° C 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 200uL 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。

