



RIPA Lysis Buffer (middle)

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 (中) 的主要成分为 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% 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 或者蛋白酶抑制剂 Cocktail (Cat. No C0001) 及磷酸酶抑制剂 Cocktail (Cat. No C0002, C0003, C0004)。

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 $0.5\text{-}5 \times 10^6$ 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 μ L 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，10000-14000g 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 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 μ L 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- κ B、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 °C 1 年

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。
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 °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。
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. RIPA 裂解液提取得到的是全蛋白，包括核蛋白、浆蛋白、膜蛋白等。如果要提取特定的蛋白（如：核蛋白、膜蛋白）则可利用专门的蛋白提取试剂盒进行提取。
9. 如果发现 IP 的时候背景很高，即非特异的蛋白也被 IP 下来，则需要选用裂解强度较高的裂解液，如 RIPA 裂解液(强)。如果发现目的蛋白无法被 IP 下来，则说明裂解液的强度过强，可以使用较为温和的裂解液例如 RIPA 裂解液（弱）。
10. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，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。
11. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

产品名称	RIPA裂解液(强)	RIPA裂解液(中)	RIPA裂解液(弱)
产品编号	C0045	C0046	C0047
有效裂解成分	1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS	1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS	1% NP-40, 0.25% deoxycholate
裂解强度	强	中	温和
提取膜蛋白效果	很好	较好	一般
提取胞浆蛋白效果	很好	很好	很好
提取核蛋白效果	很好	较好	较好
提取胞浆磷酸化蛋白效果	很好	很好	很好
提取细胞核转录因子效果	很好	很好	很好
含蛋白酶抑制剂	是	是	是
含磷酸酶抑制剂	是	是	是
不同物种样品兼容性	高	高	高
主要用途	WB, IP	WB, IP	WB, IP, co-IP



 www.targetmol.cn

 400 - 820 - 0310

 support@targetmol.com