



中科瑞泰

Ver. 731255

RIPA裂解液(强) RIPA Lysis Buffer(Harsh)

产品编号及规格:

RL1020 100 ml

贮存、效期及运输:

-20°C 贮存; 湿冰运输; 有效期一年。

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% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 以及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。

使用说明:

1. 准备RIPA裂解液:

溶解RIPA裂解液, 混匀; 取适量的裂解液, 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。按照表格推荐比例加入裂解液, 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。

2.2 悬浮细胞: 450 g 4°C 离心5 min收集细胞; 用适量1×PBS重悬细胞, 450 g 4°C 离心5 min收集细胞; 重复漂洗细胞一次; 按照细胞沉淀体积(PCV) 20 µl加入200 µl 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: 2×10⁶ Jurkat细胞, 其细胞沉淀体积(PCV, Packed Cell Volume)大约为20 µl。

培养板规格/培养皿表面积	细胞量	RIPA推荐量
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 µl
12孔板	1×10 ⁶	150-180 µl
24孔板	5×10 ⁵	100-150 µl
96孔板	1×10 ⁵	50-100 µl

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); 如没有超声破碎仪, 可以使用注射器27G针头处理裂解物10-15次, 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°C 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。

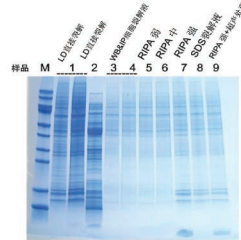
3.2 按照每20 mg组织加入200 µl裂解液的比例加入裂解液。如果裂解不充分可以适当添加更多的裂解液, 如果需要高浓度的蛋白样品, 可以适当减少裂解液的用量。

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); 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, 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°C 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。

4. 实验示例:



样品1制备: 2 ml K562细胞(6.5×10⁶/ml), 3000rpm 5min, 沉淀用PBS清洗2次, 离心后彻底去除PBS, 加入130 µl超纯水, 100 µl 5×loading buffer(变性, 还原), 95度10min, 上样5 µl和10 µl。
样品2制备: 2 ml 4K细菌细胞(O/N培养), 13000 rpm 5min, 离心后彻底去除残余液体, 加入130 µl超纯水, 100 µl 5×loading buffer, 95度10min, 上样7.5 µl。

样品3-9: 1 ml K562细胞(6.5×10⁶/ml), 3000 rpm 5min, 沉淀用PBS清洗2次, 离心后彻底去除PBS, 加入200 µl各种裂解缓冲液, 冰浴15 min, 间歇漩涡震荡40秒(样品9加超声处理2 min), 13000 rpm低温离心10 min, 取上清即为总蛋白。加入5×loading buffer(变性, 还原)调整样品浓度为0.2 µg/µl, 95度10min, 上样10 µl。