

RIPA Lysis Buffer

RIPA裂解液（中）

产品介绍

多种成分均可以从细胞中提取出总蛋白，如Triton、SDS、NP-40等。RIPA裂解液(中)（RIPA Lysis Buffer）是采用一种温和的裂解方法获得总蛋白的裂解液，其裂解强度大于NP-40裂解液、RIPA裂解液(弱)。所获得的蛋白质可用于Western Blot，免疫沉淀(Immunol Precipitation,IP)等。

Medium RIPA Lysis Buffer主要由Tris-base、NaCl、NP-40、sodium deoxycholate等组成，可以有效抑制蛋白的降解，并维持原有的蛋白间相互作用。

保存条件

-20℃

使用方法

（一）贴壁培养细胞

- 1、取Medium RIPA Lysis Buffer置于室温溶解混匀，加入PMSF，使PMSF终浓度为1mM，或根据实验需要加入适当的蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物。
- 2、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。
- 3、按照6孔板每孔加入200~250 μ l Medium RIPA Lysis Buffer。移液器轻轻吹打，使裂解和细胞充分接触。置于冰上或4℃裂解15~30min，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200 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250~300 μ l。一般细胞密度过大，RIPA Lysis Buffer裂解细胞溶液易呈胶状，需要适当增加裂解液或者延长裂解时间，超声破碎处理有利于细胞充分裂解完全。加入RIPA后，充分裂解的细胞，没有细胞沉淀，很粘稠。如果像浑浊的水一样粘性很小则可能是裂解液得量加太多导致的；相反，如果RIPA裂解液后出现胶状物体，离心不能沉淀则可能是蛋白太多，RIPA裂解液加入的量太少导致的。
- 4、10000~12000g，4℃离心5~10min（如无低温离心机，室温下离心亦可），取上清。
- 5、后续的SDS-PAGE、Western Blot、免疫沉淀和免疫共沉淀等操作。

（二）悬浮培养细胞

- 1、取Medium RIPA Lysis Buffer置室温溶解混匀后，加入PMSF，使PMSF终浓度为1mM，或根据实验需要加入适当的蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物。
- 2、低速离心悬浮细胞，弃上清，收集沉淀。
- 3、用手指轻弹细胞，使其松散。按照6孔板每孔细胞加入200~250 μ l含有PMSF的裂解液的比例，加入Medium RIPA Lysis Buffer。通常6孔板每孔细胞加入200 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250~300 μ l，再用手指轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。一般细胞密度过大，RIPA Lysis Buffer裂解细胞溶液易呈胶状，需要适当增加裂解液或者延长裂解时间，超声破碎处理有利于细胞充分裂解完全。加入RIPA后，充分裂解的细胞，没有细胞沉淀，很粘稠。如果像浑浊的水一样粘性很小则可能是裂解液得量加太多导致的；相反，如果RIPA裂解液后出现胶状物体，离心不能沉淀则可能是蛋白太多，RIPA裂解液加入的量太少导致的。
- 4、10000~12000g，4℃离心5~10min（如无低温离心机，室温下离心亦可），取上清。
- 5、进行后续的SDS-PAGE、Western Blot、免疫沉淀和免疫共沉淀等操作。

（三）组织样本

- 1、取Medium RIPA Lysis Buffer置于室温溶解混匀，加入PMSF，使PMSF终浓度为1mM，或根据实验需要加入适当的蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物。
- 2、把组织剪切成细小的碎片，越小越好。
- 3、取在液氮或超低温冰箱中冷冻30min以上的组织，迅速用液氮研磨，研磨过程尽量控制在1~2min之内，

以减少蛋白的降解。

- 4、按照每20mg组织加入150~250 μ l裂解液的比例，加入含有PMSF的裂解液。冰上或4℃裂解15~30min。
- 5、步骤3、4亦可以采用如下过程：按照每20mg组织加入150~250 μ l裂解液的比例，加入含有PMSF的Medium RIPA Lysis Buffer。用玻璃匀浆器或组织研磨器匀浆，直至充分裂解，过程尽量控制在1~2min之内，以减少蛋白的降解。
- 6、10000~12000g，4℃离心5~10min（如无低温离心机，室温下离心亦可），取上清。
- 7、进行后续的SDS-PAGE、Western Blot、免疫沉淀和免疫共沉淀等操作。

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，可以适当剪切片直接加入裂解液裂解，通过强烈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那样裂解得比较充分。
- 5、溶解RIPA Lysis Buffer时，应尽量缩短溶解时间，避免裂解液中的有效成分失效。
- 6、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。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。
- 7、细胞裂解的操作步骤，应置于冰上或4℃进行。
- 8、为了您的安全和健康，请穿好实验服并佩戴一次性手套和口罩操作。
- 9、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。