

RIPA 裂解液（弱）

产品详情

目录号	WD100016
保存方法	-20℃ 一年
产品规格	100ml

产品简介

该 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（弱）裂解得到的蛋白样品可以用于常规的 Western、免疫沉淀(immunol precipitation, IP)、免疫共沉淀(co-IP)和 ELISA 等。

RIPA 的本意是 Radio Immunoprecipitation Assay。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(弱)的主要成分为 50mM Tris (pH7.4), 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 以及 sodium orthovanadate, sodium fluoride, EDTA, leupeptin 等多种抑制剂。可以有效抑制蛋白降解。

用 RIPA 裂解液裂解得到的蛋白样品，可以用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。由于含有较高浓度的去垢剂，不能用 Bradford 法测定由本裂解液裂解得到样品的蛋白浓度。

使用说明：

对于培养细胞样品：

1. 融解 RIPA 裂解液，混匀。取适当量的裂解液，在使用前数分钟内加入 PMSF，使 PMSF 的最终浓度为 1mM，或者根据实验需要加入适当的上述蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物。
2. **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一遍(如果血清中的蛋白没有干扰，可以不洗)。按照 6 孔板每孔加入 150-250 微升裂解液的比例加入裂解液。用枪吹打数下，使裂解液和细胞充分接触。通常裂解液接触动物细胞 1-2 秒后，细胞就会被裂解。植物细胞宜在冰上裂解 2-10min。
3. **对于悬浮细胞：**离心收集细胞，轻轻 vortex 或者弹击管底以把细胞尽量分散开。按照 6 孔板每孔细胞加入 150-250 微升裂解液的比例加入裂解液。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，必需分装成 50-100 万细胞/管，然后再裂解。
4. **对于细菌或酵母：**对于 1ml 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 vortex 或者弹击管底以把细菌或酵母尽量弹散。加入 100-200 微升裂解液，轻轻 vortex 或者弹击管底以混匀，冰上裂解 2- 10min。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(Lyticase)消化，然后再使用本裂解液进行裂解。
5. **裂解液用量说明：**通常 6 孔板每孔细胞或者 1ml 的菌液或酵母液中的细菌和酵母量加入 150 微升裂解液已经足够，但如果细胞密度非常高可以适当加大裂解液的用量到 200 微升或 250 微升。每 100 万动物细胞用 100 微升本产品裂解后获得的上清，其蛋白浓度约为 2-4mg/ml，不同细胞有所不同。

6. 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、免疫沉淀和免疫共沉淀等操作。

对于组织样品:

1. 把组织剪切成细小的碎片。
2. 融解 RIPA 裂解液, 混匀。取适当量的裂解液, 在使用前数分钟内加入 PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1mM, 或者根据实验需要加入适当的上述蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物。
3. 按照每 20 毫克组织加入 150-250ul 裂解液的比例加入裂解液。(如果裂解不充分可以添加更多的裂解液, 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, 直至充分裂解。可以把组织样品冷冻后液氮研磨, 研磨充分后加入裂解液进行裂解。
5. 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 和免疫沉淀等操作。每 20mg 冻存的小鼠肝脏组织用 200 微升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。
6. 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。

注意事项:

1. RIPA 裂解液的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。
 2. 需自备 PMSF。
 3. 裂解样品的所有步骤都需在冰上或 4℃进行。
 4. 可能需要通过一些预实验来摸索最佳的适合您实验条件的裂解液。
 5. 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。
 6. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
-