

RIPA 裂解液(强)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

产品简介：

多种成分均可以从细胞中提取总蛋白，例如 Triton、SDS、NP-40 等。RIPA 裂解液（强）(Enhanced RIPA Lysis Buffer)，是采用一种经典的细胞组织快速裂解，并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(中)。所获得的蛋白质可以用于 Western，免疫沉淀(Immunol Precipitation, IP)等。

Enhanced RIPA Lysis Buffer 主要由 Tris、NP-40、sodium deoxycholate 等组成，并含有多种蛋白酶抑制剂成分，可以有效抑制蛋白的降解，并维持原有的蛋白间相互作用。

产品组成：

产品名称	规格	保存条件	说明书	有效期
RIPA 裂解液(强)	100ml	-20℃	1 份	1 年
Enhanced RIPA Lysis Buffer	100ml	4℃	1 份	1 年
PMSF(100mM)	1.5ml	4℃	1 份	1 年

操作步骤(仅供参考)：

(一)贴壁培养细胞

- 1、取 Enhanced RIPA Lysis Buffer 室温溶解混匀，加入 PMSF，使 PMSF 终浓度为 1mM。
- 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 150~250 μ l 含有 PMSF 的裂解液的比例，加入 RIPA Lysis Buffer。移液器轻轻吹打，使裂解液和细胞充分接触。置于冰上或 4℃裂解 15~30min，通常裂解液作用于细胞 1~3 秒内，细胞就会被裂解。通常 6 孔板每孔细胞加入 150 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 200~250 μ l。
- 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、免疫沉淀和免疫共沉淀等操作。

(二)悬浮培养细胞

- 1、取 Enhanced RIPA Lysis Buffer 室温溶解混匀，加入 PMSF，使 PMSF 终浓度为 1mM。
- 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 150~250 μ l 含有 PMSF 的裂解液的比例，加入 Enhanced RIPA Lysis Buffer。通常 6 孔板每孔细胞加入 150 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 200~250 μ l。再用手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。
- 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、免疫沉淀和免疫共沉淀等操作。

(三)组织样本

- 1、取 Enhanced Lysis Buffer 置于室温溶解混匀，加入 PMSF，使 PMSF 终浓度为 1mM。
- 2、把组织剪切成细小的碎片，越小越好。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。
- 3、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 $^{\circ}$ C 裂解 15-30min。
- 4、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 Enhanced RIPA Lysis Buffer。用玻璃匀浆器或组织研磨器匀浆，直至充分裂解，该过程尽量控制在 1~2min 之内，以减少蛋白的降解。
- 5、10000~12000g，4 $^{\circ}$ C 离心 5~10min(如无低温离心机，室温下离心亦可)，取上清。
- 6、进行后续的 PAGE、Western、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。
- 5、Enhanced RIPA Lysis Buffer 含有特殊成分，在低温情况下有可能出现浑浊现象，可 37 $^{\circ}$ C 水浴促其溶解，不会影响使用效果；溶解时间不易过长，避免有效成分失效。
- 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。
- 7、细胞裂解的操作步骤，应置于冰上或 4 $^{\circ}$ C 进行。