



## RIPA 裂解液(中)

### 产品简介:

多种成分均可以从细胞中提取总蛋白, 如 Triton、SDS、NP-40 等。RIPA 裂解液(中)(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(弱)。所获得的蛋白质可用于 Western, 免疫沉淀(Immunol Precipitation, IP)等。

Medium 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:

名称	SS0886	保存条件
Medium RIPA Lysis Buffer	100ml	-20℃
PMSF(100mM)	1.5ml	-20℃
说明书	1 份	

### 操作步骤(仅供参考):

#### (一)贴壁培养细胞

- 1、取 Medium RIPA Lysis Buffer 置室温溶解混匀, 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  $\mu$ l 含有 PMSF 的裂解液的比例, 加入 Medium 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 100  $\mu$ l 裂解液已经足够, 如果细胞密度很高可以适当加大裂解液的用量到 200~250  $\mu$ 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 Medium RIPA Lysis Buffer 置室温溶解混匀, 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  $\mu$ 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 150  $\mu$ 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  $\mu$ l。再用手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 Medium RIPA Lysis Buffer 置室温溶解混匀, 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。
- 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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，该过程尽量控制在 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 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、溶解 NOVON RIPA Lysis Buffer 时，应尽量缩短溶解时间，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。如果检测一些常见的转录因子，例如 NF- $\kappa$ 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。

**有效期：** 12 个月有效。