



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-times.com.cn

E-mail: real-times@vip.163.com

RIPA 裂解液(中)

Ver.760856-1.0

货号	产品名称	规格
RL1030	RIPA 裂解液(中)	100 ml

● 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 (immunoprecipitation) 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 (high-strength)、中 (moderate-strength)、弱 (low-strength) 三类。RIPA裂解液(中) (moderate-strength RIPA lysis buffer) 的主要成分为Tris (pH 7.4), NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS等。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。

● 贮存、效期及运输:

-20℃保存; 一年有效; 湿冰运输。

● 注意事项:

1. 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。需自备蛋白酶抑制剂如PMSF或磷酸酶抑制剂。裂解样品的所有步骤都需在冰上或4℃进行。
2. 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。在不检测与基因组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-kappaB、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。

● 使用说明:

1. 准备RIPA裂解液:

溶解RIPA裂解液, 混匀; 取适当量的裂解液, 在使用前数分钟内加入1/100体积的100 mM PMSF, 使PMSF的最终浓度为1 mM。如做磷酸化蛋白实验, 还需要添加磷酸酶抑制剂。

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6孔板每孔加入100-200 μl裂解液的比例加入裂解液, 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。

培养板规格/培养皿表面积	细胞量	RIPA推荐使用量
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 μ l
24孔板	5×10^5	100-150 μ l
96孔板	1×10^5	50-100 μ l

2.2 悬浮细胞：450 g 4℃ 离心5 min收集细胞；用适量1×PBS重悬细胞，450 g 4℃ 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 μ l加入200 μ l 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 μ l。

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，建议条件为20%功率，超3 s停5 s，时间5 min）；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；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：

4℃ 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。

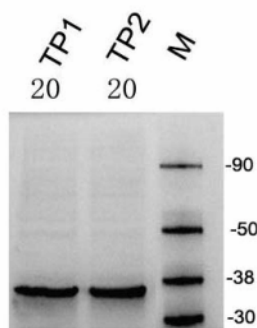
3.2 按照每20 mg组织加入200 μ l裂解液的比例加入裂解液。（如果裂解不充分可以适当添加更多的裂解液，如果需要高浓度的蛋白样品，可以适当减少裂解液的用量）。

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，建议条件为20%功率，超3 s停5 s，时间5 min）；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 4℃ 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：



Jurkat RIPA总蛋白提取，GAPDH检测

总蛋白提取：4×10⁶ Jurkat细胞，450 g 离心收集，去上清，PBS漂洗两次，沉淀中加入200 μl RIPA（中）（加2 μl 100 mM PMSF），冰上裂解15分钟，超声处理，继续冰浴15分钟，4℃ 16000 g 10 分钟，上清即为总蛋白（TP）；

电泳：RTD6132-15% 200 V 33-12 mA 55 min；

转膜：0.22 μm NC膜，1×RealBlot快速转膜液，湿转，稳流400 mA，转膜时间35 min；

封闭：无蛋白快速封闭液（PF1070），RT 20 min；

一抗孵育：GAPDH 兔多抗，一抗稀释液（WP1080）稀释1：2000；

二抗孵育：羊抗兔IgG-HRP（HGR1020），二抗稀释液（WS1056）稀释1：5000；

检测：RealECL发光液（EC2520）检测