RIPA 组织细胞高效裂解液

一、产品包装

-20℃避光储存至少 12 个月，使用前充分溶解混匀。

产品编号	产品名称	产品规格
YWB001	RIPA 组织细胞高效裂解液	100mL
	PMSF (100mM)	1mL

二、产品简介

RIPA 组织细胞高高效裂解液是广泛用于报告基因检测、蛋白质激酶实验、免疫测定和蛋白质纯化的裂解液和洗涤缓冲液，其主要成分为 50mM Tris（pH7.4）、150mM NaCl、1% Triton X-100、1% sodium deoxycholate、0.1% SDS 和一般的蛋白酶和磷酸酶抑制剂（如 sodium orthovanadate， sodium fluoride 和 EDTA），可有效抑制蛋白质的降解。

该产品适用于细菌、真菌、动物和植物的细胞或组织样品，使用该产品得到的蛋白样品可用于常规的蛋白质印迹(Western blotting，WB)、免疫沉淀(Immunoprecipitation，IP)、免疫共沉淀(Coimmunoprecipitation， Co-IP)和酶联免疫吸附测定法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay，ELISA)等实验。

三、操作步骤

1、 融解RIPA组织细胞高效裂解液和PMSF，混匀。按照1mL裂解液加入10μL PMSF的比例，使PMSF的使用浓度为1mM（PMSF要现用限加）。可根据实验需要加入适当的上述蛋白酶磷酸酶抑制剂Cocktails。

2、 蛋白提取：

A． 贴壁细胞：弃培养液，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150-250μL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(一般情况下裂解液接触动物细胞1-2s后，细胞就会被裂解)。植物细胞宜在冰上裂解2-10 min。

B． 悬浮细胞：离心收集细胞，轻轻涡旋或者弹击管底使细胞尽量分散。按照6孔板每孔细胞加入150-250μL裂解液的比例加入裂解液。轻弹管底以便充分裂解细胞。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。大团的细胞较难裂解充分，而少量的细胞由于裂解液易和细胞充分接触，相对比较容易裂解充分。

C． 细菌或酵母：取1mL菌液或酵母液，离心去上清(或可使用PBS洗涤一次，充分去除液体)，轻轻涡旋或者弹击管底把细菌或酵母尽量分散。加入100-200μL裂解液，轻轻涡旋或弹击管底以混匀，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)。

D． 组织样品：把组织剪切成细小的碎片，照20mg加入150-250μL裂解液的比例加入裂解液（如果裂解不充分可适当增加裂解液的使用量；如需获得高浓度的蛋白样品，可适当减少裂解液的使用量），用玻璃匀浆器进行匀浆，直至充分裂解。

3、 充分裂解后，10000-14000g 离心 3-5min，取上清，进行后续蛋白质浓度测定、SDS-PAGE、WesternBlotting 以及免疫沉淀等操作。

四、注意事项

1、本裂解液也可以裂解细胞核，释放出核蛋白的同时，也会释放出基因组 DNA，造成细胞裂解液粘稠，此时可直接入蛋白上样缓冲液煮沸离心后直接进行上样电泳；若测定蛋白质浓度，可加入少量 SDS（1%），煮沸后离心测定浓度。

2、本裂解液提取的蛋白含有去污剂，所以不适合使用 BradFord 法进行蛋白浓度测定，而需要使用 BCA 法或者 Lowry 法进行蛋白浓度测定。

3、RIPA 裂解液的裂解产物中经常会出现一小团透明胶状物，该透明胶状物为含有基因组 DNA 等的复合物，是正常现象。如需要检测与基因组 DNA 紧密结合的蛋白质，可以通过超声波进行处理打碎粘稠物，离心取上清后用于后续实验。如果检测一些常见的转录因子，如 NF-kappaB、p53 等时，通常不必进行超声处理，即可检测到这些转录因子

4、裂解液用量说明：通常 6 孔板每孔细胞或者 1 mL 的菌液或酵母液中的细菌和酵母量加入 150μL 裂解液已足够，若细胞密度非常高可以适当加大裂解液的用量到 200μL 或 250μL。每 100 万动物细胞用 100μL 本产品裂解后获得的上清，其蛋白浓度约为 2-4 mg/mL，不同细胞有所不同。

5、每 20mg 冻存的小鼠肝脏组织用 200μL 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，通过强烈涡旋使样品裂解充分。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，不必使用匀浆器或研磨设备，缺点是不如匀浆或研磨那样裂解比较充分。

7、为取得最佳的使用效果，建议适当分装后使用尽量避免反复冻融。

8、裂解样品的所有步骤都需在冰上或 4℃ 进行。