**RIPA 裂解液(强)**

**产品编号：**RC21237

**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：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  **编号****名称** | **RC21237** | **Storage** |
| 试剂（A）：Enhanced RIPA Lysis Buffer | 100ml | 4℃ |
| 试剂（B）：PMSF(100mM) | 1.5ml | -20℃ |
| 使用说明书 | 1份 |

**操作步奏**(仅供参考)：

配置含有PMSF的Enhanced RIPA Lysis Buffer：取Enhanced RIPA Lysis Buffer置于室温平衡，加入PMSF，使其终浓度为1mM.临用前配置，不可长期保存。

## (一)贴壁培养细胞

1、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。

2、6 孔板每孔加入150～250μl Lysis Buffer。用手指轻弹细胞，使其松散。移液器移液器轻轻吹打，使裂解液和细胞充分接触。置于冰上或 4℃裂解，通常裂解液作用于细胞1～3s内，细胞就会被裂解。通常 6 孔板每孔细胞加入 150μl 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 200～250μl。

3、10000～12000g，4℃离心 5～10min(如无低温离心机，室温离心亦可)，取上清。

4、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、低速离心悬浮细胞，弃上清，用PBS、NS或无血清培养液清洗1次，离心留取沉淀。

2、下同贴壁细胞2-4。

## 组织样本

1、组织剪碎，越小越好

2、放置液氮或超低温冰箱中冷冻 30min，用液氮研磨，尽量控制在 1～2min 之内，以减少蛋白的降解。每20mg 组织加入150～250μl Lysis Buffer。冰上或4℃ 裂解 15～30min。

3、亦可按照每20mg 组织加入150～250μl 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 2～5min 之内，以减少蛋白的降解。

4、下同贴壁细胞3-4。

# **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 Leagene 特殊成分，在低温情况下有可能出现浑浊现象，可 37℃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。4度保存即可，长期不用，亦可-20℃保存。

6、PMSF溶液，可置4℃保存1～2周，-20℃可保存一年以上，室温放置2天即可能失效。

7、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。

8、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。4℃运输，-20℃保存（PMSF溶液）