

## RIPA 裂解液(弱)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：

多种成分均可从细胞中提取总蛋白，如 Triton、SDS、NP-40 等。RIPA 裂解液(弱) (Weak RIPA Lysis Buffer)是采用一种温和的裂解方法获得总蛋白的裂解液。所获得的蛋白质可用

于 PAGE 电泳、Western、免疫沉淀(Immunol Precipitation, IP)和免疫共沉淀(co-IP)等。 Weak 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(弱)	100ml	-20℃	1 份	1 年
Weak RIPA Lysis Buffer	100ml	-20℃	1 份	1 年
PMSF(100mM)	1.5ml	-20℃	1 份	1 年

### 操作步骤(仅供参考)：

#### (一)贴壁培养细胞

- 1、取 Weak RIPA Lysis Buffer 置于室温溶解混匀，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 Weak 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，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 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。
- 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、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 Weak RIPA Lysis Buffer 置室温溶解混匀后，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 Weak 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 Weak RIPA Lysis Buffer 置于室温溶解混匀后, 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 Weak 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、Weak 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℃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℃进行。