

RIPA 裂解液(强)

目录号: ANT071

规格: 100ml

储存: -20°C 1 年

产品简介:

RIPA 裂解液(强)的主要成分为 50mM Tris(pH7.4), 150mM NaCl, 1% TritonX-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 以及 sodium orthovanadate, sodium fluoride, EDTA, leupeptin 等多种抑制剂, 但并不包含全面的蛋白酶磷酸酶抑制剂 Cocktail。为有效的防止蛋白降解, 建议添加 PMSF 或者蛋白酶磷酸酶抑制剂 Cocktail。

操作说明:

1 裂解细胞或细菌酵母样品

融解 RIPA 裂解液, 混匀。取适当量的裂解液, 在使用前数分钟内加入 PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1mM, 或者根据实验需要加入适当的蛋白酶磷酸酶抑制剂 Cocktail。置于冰上操作。

1) 对于贴壁细胞: 去除培养液, 用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗 2 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 150-250 μ L 裂解液的比例加入裂解液。用枪轻轻吹打数下, 使裂解液和细胞充分接触。冰上放置 5-10 分钟, 期间可震荡 3-4 次, 每次 30 秒, 以充分裂解。

2) 对于悬浮细胞: 离心收集细胞, 轻轻涡旋或者弹击管底以把细胞尽量分散开。按照 6 孔板每孔细胞加入 150-250 μ L 裂解液的比例加入裂解液, 轻弹管底以充分裂解细胞。充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。如果细胞量较多, 需要分装成 0.5-5 $\times 10^6$ cells/管, 然后再裂解。冰上放置 5-10 分钟, 期间可震荡 3-4 次, 每次 30 秒, 以充分裂解。

3) 对于细菌或酵母: 对于 1mL 菌液或酵母液, 离心去上清, 如果有必要可以使用 PBS 洗涤一次, 充分去除液体后, 轻轻涡旋或者弹击管底以把细菌或酵母尽量弹散。加入 100-200 μ L 裂解液, 轻轻涡旋或者弹击管底以混匀, 冰上裂解 2-10min。如果希望获得更好的裂解效果, 细菌和酵母可以分别使用溶菌酶和破壁酶消化, 然后再使用本裂解液进行裂解。

4) 充分裂解后, 10000-14000g 离心 3-5 分钟, 取上清, 即可进行后续的 PAGE、Western、IP 和 Co-IP 操作, 也可用液氮速冻后放 -80°C 长期保存。

2 裂解组织样品

1) 把组织剪切成细小的碎片。

2) 融解 RIPA 裂解液, 混匀。取适当量的裂解液, 在使用前数分钟内加入 PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1mM, 或者根据实验需要加入蛋白酶磷酸酶抑制剂 Cocktail。

3) 按照每 20mg 组织加入 150-250 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。

4) 用玻璃匀浆器冰上均质 30-50 次, 或超声破碎细胞, 每次 30 秒, 3-4 次, 每次间隔 1 分钟, 置于冰上冷却。均质或超声破碎细胞后应镜检, 细胞破碎率不小于 90%, 同时组织已经完全裂解, 没有明显的小组织块。将匀浆物转移到离心管, 冰上放置 5-10 分钟, 期间震荡 3-4 次, 每次 30 秒, 以充分裂解。

5) 充分裂解后, 10000-14000g 离心 3-5 分钟, 取上清, 即可进行后续的 PAGE、Western、IP 和 Co-IP 等操作。每 20mg 冻存的小鼠肝脏组织用 200 μ L 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。

产品名称	RIPA 裂解液(强)	RIPA 裂解液(中)	RIPA 裂解液(弱)
有效裂解成分	1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS	1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS	1% NP-40, 0.25% deoxycholate
裂解强度	强	中	温和
提取膜蛋白效果	很好	较好	一般
提取胞浆蛋白效果	很好	很好	很好
提取核蛋白效果	很好	较好	较好
提取胞浆磷酸化蛋白效果	很好	很好	很好
提取细胞核转录因子效果	很好	很好	很好
含蛋白酶抑制剂	是	是	是
含磷酸酶抑制剂	是	是	是
不同物种样品兼容性	高	高	高

相关产品:

ANT071 RIPA (强) 100ml

ANT081 RIPA (中) 100ml

ANT091 RIPA (弱) 100ml