



## RIPA 裂解液 (强)

### RIPA Lysis Buffer (Strong)

#### 包装清单

Cat No.	组分	包装规格-100mL
MCK-0014	RIPA 裂解液 (强)	100 mL
	说明书	1 份

#### 产品简介

默科的 RIPA 裂解液 (Radio Immunoprecipitation Assay Lysis Buffer) 是一种传统的细胞、组织快速裂解液, 根据其裂解强度大致可以分为强、中、弱三类。RIPA 裂解液适用于 Western Blot (WB)、免疫沉淀 (IP) 及免疫共沉淀 (Co-IP) 等实验, 例如大部分抗原表位的检测、胞浆磷酸化蛋白和细胞核转录因子检测等。

RIPA 裂解液(强)的主要成分为 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 以及 sodium morthovanadate, EDTA 等。RIPA 裂解液 (强) 不含全面的蛋白酶或磷酸酶抑制剂。为有效的防止蛋白降解, 建议添加全面的蛋白酶和磷酸酶抑制剂。

#### 保存条件

-20℃ 保存, 有效期一年。

#### 注意事项

1. 本品不含蛋白酶抑制剂 Cocktail, 需用户自备。
2. 裂解样品的所有步骤都需要在冰上或 4° C 条件下进行。
3. 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。
4. 裂解液中 SDS 4° C 保存易沉淀析出, 使用前应该 37° C 水浴重新溶解完全后恢复到室温使用。
5. RIPA 裂解缓冲液含有离子去污剂, 如果待测定的激酶易变性, 可能不适用。
6. 在制备用于磷酸酶测定的裂解物时, 不要添加磷酸酶抑制剂。
7. 由于本品含有较高浓度的去垢剂, 后续蛋白浓度测定不宜用 Bradford 法, 推荐选用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒。
8. RIPA 裂解液的裂解产物中经常会出现一小团透明胶状物, 属于正常现象。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散打散该透明胶状物, 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。
9. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
10. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明

##### 1. 裂解细胞样品

(1) 取适当量的裂解液, 如有需要, 在使用前数分钟内加入 Protease Inhibitor Cocktail, Phosphatase Inhibitor Cocktails 或 Deacetylase Inhibitor Cocktail, 具体操作可参考相关产品说明书。准备好置于冰上备用。

##### (2) 贴壁细胞:

① 去除培养液, 用预冷的 PBS、生理盐水或无血清培养液洗 2 遍 (洗去血清中 IgG 干扰对 IP 和 Co-IP 实验是有益的, 但对 WB 可能并非必要)。

② 按照 6 孔板每孔加入 150-250μL 裂解液的比例加入预冷的裂解液。用枪吹打数下, 使裂解液和细胞充分接触。

③ 冰上放置 5-10 分钟, 期间剧烈震荡 3-4 次, 每次 30 秒, 以充分裂解。

##### 悬浮细胞:

① 离心收集细胞, 弃上清, 用预冷的 PBS、生理盐水或无血清培养液洗 2 遍 (洗去血清中 IgG 干扰对 IP 和 Co-IP 实验是有益的, 但对 WB 可能并非必要)。

② 按照 6 孔板每孔加入 150-250μL 裂解液的比例加入预冷的裂解液, 再用手指轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。如果细胞量较多, 必须分装成  $0.5-5 \times 10^6$  cells/管, 然后再裂解。

③ 冰上放置 5-10 分钟, 期间剧烈震荡 3-4 次, 每次 30 秒, 以充分裂解。

**注:** 一般每  $0.5-5 \times 10^6$  细胞用 1 mL 的 RIPA 裂解液裂解。细胞数量较高时, 可加大裂解液用量。

④ 充分裂解后, 14,000 g 低温离心 5 分钟, 取上清, 即可进行后续的 WB、IP 等操作。也可用液氮速冻后放 -80° C 长期保存。



## 2.裂解组织样品

(1) 取适当量的裂解液，如有需要，在使用前数分钟内加入 Protease Inhibitor Cocktail, Phosphatase Inhibitor Cocktails 或 Deacetylase Inhibitor Cocktail，具体操作可参考相关产品说明书。准备好置于冰上备用。

(2) 将组织置于小皿中，冰上操作，剪切成细小的碎片。

(3) 按照每 20 mg 组织加入 150-250 $\mu$ L 裂解液的比例加入预冷的裂解液。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。

(5) 将匀浆物转移到离心管，冰上放置 5-10 分钟，期间剧烈震荡 3-4 次，每次 30 秒，以充分裂解。充分裂解后，14,000 g 低温离心 5 分钟，取上清，即可进行后续的 PAGE、WB 和免疫沉淀等操作。

**注：**每 20 mg 冻存的小鼠肝脏组织用 200  $\mu$  L 本裂解液裂解后获得的上清，其蛋白浓度约为 15-25 mg/mL，不同状态的不同组织有所不同。