

NCM RIPA Buffer RIPA 裂解液

货号: Cat.No: WB3100 Size: 100 ml

产品介绍

RIPA 即 Radio Immunoprecipitation Assay, 是一种传统的细胞组织快速裂解液。新赛美生物的 RIPA 裂解液裂解所得的蛋白样品可以用于常规的 Western 等实验。主要成分是: 50mM Tris(pH 7.6), 150mM NaCl, 1% TritonX-100, 0.5% sodiumdeoxycholate, 0.1% SDS 等多种裂解剂和抑制剂, 能有效地抑制蛋白降解。

操作步骤

1. 取适当量的 NCM RIPA Buffer 裂解液, 在使用前数分钟内加入 PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1mM。

注意: NCM RIPA Buffer 不含蛋白酶等抑制剂, 根据需要在 使用前添加蛋白酶, 磷酸酶等抑制剂。

2. 样品前处理

(a) 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 150-250ul 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。通常裂解液接触细胞 1-2 秒后, 细胞就会被裂解, 然后转移至离心管中。

(b) 对于悬浮细胞: 离心收集细胞, 用手指把细胞用力弹散。按照 6 孔板每孔细胞加入 150-250ul 裂解液的比例加入裂解液。再用手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, 必需分装成 50-100 万细胞/管, 然后再裂解。

(c) 对于组织样品: 把组织剪切成细小的碎片, 按照每 20mg 组织加入 150-250ul 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), 用玻璃匀浆器匀浆, 直至充分裂解。

3. 上述样品转移至冰上, 裂解 30 分钟, 中间 15 分钟后补加一次终浓度 1mM PMSF。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 和免疫沉淀等操作。

保存条件

4°C 保存, 室温运输, 一年有效

注意事项

1. RIPA 裂解液的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。如果检测一些常见的转录因子, 例如 NFκB、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。

2. 为获得最佳的实验效果, 可适当分装使用, 以尽量避免反复冻融。

3. PMSF 应现用现加, 需自备 PMSF, 或者可以添加新赛美生物公司蛋白酶抑制剂混合物 (P001)。

4. 裂解蛋白的所有步骤都需在冰上或 4°C 进行。

5. 蛋白酶抑制剂均有较高的毒性, 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。一旦直接接触, 请立即用流水冲洗, 再向医疗保健结构咨询。