



RIPA（免疫沉淀用）试剂盒+0.1M PMSF

Catalog WB0021

Tel: 010-82908854

Quantity 25ml+0.5ml

Free: 400-0620-621

Web: www.tdybio.com

For research use only.

产品简介：RIPA（免疫沉淀）蛋白抽提试剂盒应用于哺乳动物细胞及组织样品蛋白的提取。所提取的总蛋白，可进行 IP、Co-IP、SDS-PAGE、Western Blot、蛋白纯化等，可用 BCA 法进行蛋白定量。

产品组分及规格：	RIPA（免疫沉淀）	25ml	
	0.1M PMSF	0.5ml	
储存条件：	RIPA	2-8℃	稳定保存一年
	0.1M PMSF	-20℃	稳定保存一年

操作方法：

一、贴壁细胞蛋白提取

1. 使用前请将 RIPA 预冷，并放置在冰上；
2. 小心倾去贴壁细胞的培养液，轻缓的加入预冷 PBS 漂洗细胞 3 次；
3. 在进行蛋白抽提前将 PMSF 加入 RIPA 中，终浓度为 1mM（取 0.1M PMSF 1ul 加入到 99ul 蛋白抽提试剂中）；
4. 根据细胞生长的密度及细胞计数结果加入适量的已经加有蛋白酶抑制剂的 RIPA，（在冰上用枪头吹打贴壁细胞，将裂解下来细胞的混合液转移至 EP 管中或者用胰酶消化细胞，转移至 EP 管中 1,500×rpm，离心 3min，弃去 PBS，重复用 PBS 洗细胞 3 次，最后一遍弃去 PBS 后加入抽提试剂），冰上孵育 20 分钟，让细胞充分裂解（试剂使用量请参考附表 1）；
5. 4 度，12,000rpm 离心 20min；
6. 转移上清液至新管中，用于进一步分析。

二、悬浮细胞蛋白提取

1. 使用前请将 RIPA 预冷，并放置在冰上；
2. 将悬浮细胞进行计数并用 1,500×rpm，离心 3min，弃去上清；用预冷 PBS 重新漩起细胞移至 EP 管中，1,500×rpm，离心 3min，弃去 PBS，重复用 PBS 洗细胞 3 次，最后一遍弃去 PBS 待用；
3. 在进行蛋白抽提前将 PMSF 加入 RIPA 中，终浓度为 1mM（取 0.1M PMSF 1ul 加入到 99ul 蛋白抽提试剂中）；
4. 根据细胞计数结果加入适量已经加有蛋白酶抑制剂的 RIPA，吹打均匀，冰上孵育 20 分钟，让细胞充分裂解（试剂使用量请参考附表 2）；



5. 4 度，12,000rpm 离心 20min;
6. 转移上清至新管中，进行下一步分析。

三、组织样品蛋白提取

- 1、使用前请将 RIPA 预冷，并放置在冰上；
- 2、在进行蛋白抽提前将 PMSF 加入 RIPA 中，终浓度为 1mM（取 0.1M PMSF 1u1 加入到 99u1 蛋白抽提试剂中）；
- 3、称量组织样品的重量，按照组织重量：蛋白抽提试剂体积=1：10（1g 组织 10ml 蛋白抽提试剂）的比例加入 RIPA 并匀浆处理。操作细节：先在冰块上用眼科剪把组织块剪碎，加入蛋白抽提试剂后移至玻璃匀浆器在冰水混合物中进行充分匀浆，以肉眼所见无明显组织块为标准。或者采用组织匀浆器在冰水混合物中进行匀浆，以 15000rpm 匀浆 10s，间歇 10s，匀浆 3 次；
- 4、冰上孵育 20 分钟（冰上放置时间应根据组织类型不同进行调整）；
- 5、12000rpm 离心 20min；
- 6、收集上清，分装保存，进行下一步的纯化或下游分析。

产品应用：本产品适用于新鲜、冻存的哺乳动物细胞及组织样品总蛋白的提取。

注意事项：

1. 本产品适用于提取培养的哺乳动物细胞及组织样品总蛋白；
2. 在整个蛋白抽提过程中需要记录在抽提试剂中加入 PMSF 的时间，30min PMSF 会完全降解。30min 之内如果蛋白抽提没有完成需要在抽提试剂中重新加入新的 PMSF；
3. 每次新溶解的抽提试剂进行蛋白抽提前需要加入 PMSF；
4. 为防止蛋白降解，所有的操作尽量在冰上进行。注意蛋白酶抑制剂的合理使用；
5. 使用本产品提取后蛋白，可采用 BCA 法进行蛋白定量；
6. 为了获得实验最佳效果，请根据实验调整最佳使用量。因细胞计数误差、细胞大小不同、细胞种类不同，建议第一次提取蛋白时采用 RIPA 最少用量进行蛋白抽提。



表 1. 贴壁细胞 RIPA 使用量推荐表（细胞长至 90%）

细胞培养板类型或培养面积	RIPA 使用量
100 mm*	500-1,000 μ l
60 mm	250-500 μ l
6 孔培养板	100-200 μ l /孔
24 孔培养板	50-100 μ l /孔
96 孔培养板	20-50 μ l/孔

附表 2

表 2. 悬浮细胞 RIPA 使用量推荐表

细胞计数结果	RIPA 使用量
1×10^7	500-1,000 μ l