



## RIPA Lysis Buffer

Nr kat.	j.m.
E0295-01	50 ml
E0295-02	200 ml

**Przechowywanie:** 4°C.

**Zawartość:** 25mM Tris-HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 1% detergent, 1% deoksycholan sodowy, 0,1% SDS.

### Ważne informacje dotyczące produktu:

RIPA Lysis Buffer nie zawiera inhibitorów proteaz i fosfataz (ang. protease inhibitor cocktails). Jeśli ich użycie jest konieczne, dodać tabletkę z inhibitorami bezpośrednio przed użyciem buforu.

RIPA Buffer jest buforem denaturującym przez dodatek SDS i deoksycholanu sodowego, niektóre kinazy i inne enzymy mogą być wrażliwe na te składniki buforu. Łagodniejszymi buforami do ekstrakcji białek są Basic Cell Lysis (E0294), Mild Cell Lysis (E0292) i Mild Cell Lysis PLUS (E0293).

Bufor RIPA (ang. Radioimmunoprecipitation Assay) to roztwór stosowany do szybkiej i wydajnej całkowitej lizy oraz solubilizacji białka z hodowlanych komórek ssaczych, zarówno przylegających, jak i zawieszonych w pożywce oraz homogenatów tkanek zwierzęcych. Bufor RIPA w składzie zawiera detergenty umożliwiające skuteczną ekstrakcję zarówno białek cytoplazmatycznych, jak i jądrowych oraz błonowych.

### Protokół lizy adhezyjnych komórek ssaczych

- Ostrożnie zlać pożywkę z nad komórek przylegających do podłoża.
- Przeemyć komórki dwukrotnie schłodzonym buforem PBS.
- Dodać schłodzony RIPA Lysis Buffer do komórek (1mL buforu na  $5 \times 10^6$  komórek HeLa lub A431). Inkubować na lodzie przez 5 min, mieszając lekko naczyniem hodowlanym.
- Przenieść lizat do probówki i wirować 15 min z prędkością  $\sim 14,000 \times g$ .
- Przenieść supernatant do nowej probówki do dalszych analiz.

### Protokół lizy komórek ssaczych hodowanych w zawiesinie

- Osadzić komórki przez wirowanie 5 min z prędkością 2500 x g. Ostrożnie usunąć supernatant.
- Przeemyć komórki dwukrotnie schłodzonym buforem PBS. Osadzić komórki wirując przez 5 min z prędkością 2500 x g. Ostrożnie usunąć supernatant.
- Dodać schłodzony RIPA Lysis Buffer do komórek (1mL buforu na  $5 \times 10^6$  komórek) i rozpipetować.
- Delikatnie wytrząsać próbkę przez 15 min na lodzie.
- Wirować 15 min z prędkością  $\sim 14,000 \times g$ .
- Przenieść supernatant do nowej probówki do dalszych analiz.

### Protokół lizy tkanek zwierzęcych:

- Przeemyć świeżą tkankę schłodzonym buforem PBS kilka razy (co najmniej 2 razy). Rozdrobnić tkankę na mniejsze kawałki.
- Dodać schłodzony RIPA Lysis Buffer do tkanki (1mL buforu na 1 g tkanki).
- Homogenizować do uzyskania jednorodnej zawiesiny. Inkubować na lodzie przez 3 min.
- Wirować 15 min z prędkością  $\sim 10\,000 \times g$ .
- Przenieść supernatant do nowej probówki do dalszych analiz.

### Rozwiązywanie problemów

Problem	Możliwa przyczyna	Rozwiązanie
Niska wydajność izolacji białek	niektóre komórki są bardziej odporne na lizę	Sonikacja homogenatu komórkowego, dokładnie zawieszenie komórek w RIPA Lysis Buffer lub inkubacja z mieszaniem na lodzie przez dłużej niż 15 min.
niskie stężenie białek	zbyt dużo użytego RIPA Lysis Buffer	Użyj mniej buforu
proteoliza	brak inhibitorów proteaz	Dodanie inhibitorów proteaz do RIPA Lysis Buffer przed użyciem
defosforylacja białek	aktywność fosfataz	Dodanie inhibitora fosfataz do RIPA Lysis Buffer przed użyciem lub NP-40 Lysis Buffer PLUS (bufor niedenaturujący), który w składzie ma inhibitory fosfataz.

Produkt został opracowany, zaprojektowany i jest sprzedawany wyłącznie do celów badawczych i wyłącznie do użytku in vitro.