

Invent® RIPA 裂解液

目录号:IN-WB001

描述:

RIPA(Radio-Immunoprecipitation Assay)裂解液用于从哺乳动物细胞和组织中提取蛋白质已经有数十年时间。裂解液中含有低浓度的离子型和非离子型表面活性剂，不会干扰抗原-抗体结合。操作方法相对简单，提取的蛋白质可用于 Western blotting, ELISA 和免疫沉淀等应用。虽然 RIPA 裂解液被广泛使用，但在使用过程中存在以下风险问题（详见第 3 页 RIPA 裂解液存在的潜在使用风险）：

- 1.使用 RIPA 裂解液提取的蛋白图谱并非完整。
- 2.不可溶组分中丢失的蛋白质是不成比例的，非选择性和不可预测的。
- 3.研究证实使用 RIPA 进行细胞凋亡研究时会产生许多偏差数据。
- 4.由于蛋白丢失，提取的蛋白质的数量和比例与细胞或组织中实际存在的蛋白质的数量和比例存在偏差，从而导致实验数据偏差，特别是涉及定量和半定量实验时。

鉴于上述问题，使用 RIPA 裂解液进行蛋白样品制备存在一定的风险。如果您决定在您的研究中使用 RIPA 裂解液，本款 RIPA 裂解液（Cat# IN-WB001）的表现与任何其他品牌一样好。如果您介意上述实验风险，我们强烈建议您使用基于离心管柱技术的新一代柱式法蛋白质提取工具（Cat#SD-001/SN-002），这种新技术可以快速提取蛋白质(最快 1 分钟)，且不会人为改变蛋白质图谱,可获取高质量高得率蛋白质。

更多信息请访问: https://www.inventchina.cn/pro_view.asp?id=85&class=1

配方:

10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS,
1mM EDTA (pH 8.0)

所需附加材料:

离心机，离心管，组织匀浆器，洗涤缓冲液如 PBS，蛋白酶和/或磷酸酶抑制剂。

运输和储存: 常温运输，4°C 储存。

操作方法：

RIPA 裂解液中不含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂。如需要请在 RIPA 裂解液中加入蛋白酶抑制剂，如研究涉及磷酸化蛋白，则需同时在裂解液中加入磷酸酶抑制剂。**(各类抑制剂的添加方法请按照抑制剂母液比例，例如母液是 100x，添加时按照 1：100 添加，即 1ml 裂解液中添加 10ul 抑制剂)**。

细胞样品：

1. 低速离心（500Xg，5min）收集培养的细胞。贴壁细胞可以通过细胞刮刮拭或胰蛋白酶消化后，低速离心收集细胞。用预冷的 PBS 清洗细胞沉淀两次，完全去除上清液。

注意：对于贴壁细胞，用 PBS 冲洗后，也可将 RIPA 裂解液直接加入培养容器中，使用细胞刮刀将裂解物收集到一侧并转移到离心管中。然后转至步骤 3 和步骤 4。

2. 在细胞沉淀中加入适量的预冷 RIPA 裂解液，用移液器上下吹打重悬细胞沉淀(通常 1ml RIPA 裂解液可用于 $1-5 \times 10^7$ 个细胞的裂解，裂解液加入量根据细胞量按比例适当调整)。
3. 裂解物在冰上孵育 5-30 分钟，孵育后涡旋震荡混匀样品，4°C，8,000Xg，离心 10 分钟。
4. 将上清（提取的蛋白溶液）转到一个新的管中，用于下游实验或储存于 -80°C 备用。

组织样品：

将一块新鲜或冷冻的动物组织放入离心管中，用预冷的 PBS 清洗两次，加入预冷的 RIPA 裂解液覆盖组织(1ml RIPA 裂解液可用于 20-100 mg 组织的裂解，裂解液加入量请根据组织样品量按比例适当调整)。按照前述方法使用前在 RIPA 裂解液中添加蛋白酶抑制剂/磷酸酶抑制剂。用合适的组织匀浆方法(如研磨仪或塑料杵)将组织匀浆 30 秒至 1 分钟。匀浆后按照上述步骤 3 和 4 进行操作。

注意：匀浆后如见黏液样聚集物，离心前用移液器将其取出。蛋白质浓度测定可使用 BCA 或 Lowry 分析法。对于免疫沉淀，我们建议将提取的蛋白用 IP 缓冲液 1:2 ~ 1:3 进行稀释后实验。

RIPA 裂解液存在的潜在使用风险

经典的 RIPA 裂解液由低浓度的十二烷基硫酸钠(SDS，一种变性表面活性剂)，和用于破坏蛋白质-蛋白质相互作用的脱氧胆酸钠等成分组成。虽然 RIPA 裂解液有很多不同的配方，但不论哪种 RIPA 裂解液提取蛋白质都会产生两种不同的组分：即 RIPA 可溶组分和 RIPA 不可溶组分。通常实验者只使用 RIPA 可溶组分进行下游实验，而 RIPA 不可溶组分被丢弃。近年来，研究发现 RIPA 不溶组分中仍含有蛋白质，越来越多的研究者对使用 RIPA 裂解液可能存在的问题密切关注。

○蛋白质图谱不完整

Li[1]比较了小鼠脾脏组织和肝脏组织使用 RIPA 裂解液提取后 RIPA 可溶组分和 RIPA 不可溶组分以及基于离心管柱技术的蛋白提取试剂盒 (Invent Cat#SD-001/SN-002)提取的蛋白质图谱 (图 1)，发现 RIPA 不可溶组分的蛋白质图谱与 RIPA 可溶组分相似，但不完全相同。不可溶组分的蛋白质覆盖了整个蛋白质图谱，且不同样品的 RIPA 不可溶组分发现的蛋白质种类也因样品而异。在不同的样本中，蛋白质的损失似乎是不可预测的。然而，柱式法蛋白提取试剂盒提取的蛋白具有更完整的蛋白质图谱，因为其不产生不可溶组分，且操作快速简单。

根据这些结果说明 RIPA 裂解液提取的蛋白质图谱是不完整的，蛋白丢失导致了蛋白比例的改变。使用 RIPA 裂解液提取的蛋白质用于定性和定量实验时可能会出现严重的数据偏差问题。

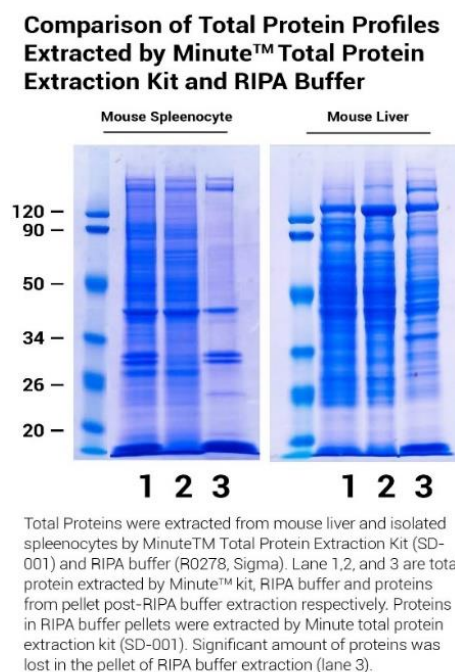


图 1.

○内参不齐

内参不齐是 WB 实验中常见的问题，出现的可能原因是在某些样品中管家基因的表达并不恒定，或者浓度检测不准确，但样品提取方法也会影响内参。

为了测试 RIPA 裂解条件对免疫印迹结果的影响，Kevin 等人[2]使用 RIPA 裂解液裂解 HT-29 人结肠腺癌细胞，在等体积的含二巯基苏糖醇的 Laemmli 样品缓冲液中煮沸 RIPA 不可溶组分，然后对 20 种不同的蛋白靶点进行免疫印迹。与预期的一样，RIPA 裂解液有效地溶解了许多细胞质蛋白：GAPDH, Hsp90 和 I κ B α ，各种激酶(图 2A 和 B)。RIPA 裂解液液提取出了细胞骨架蛋白和细胞骨架相关蛋白、肌动蛋白(actin)和黏附激酶(FAK)。然而，微管蛋白(tubulin)和中间丝蛋白(lamin A 和 KRT5)大量流失到 RIPA 不可溶组分中(图 2C)。值得注意的是，RIPA 不可溶组分不仅限于细胞骨架蛋白：转录因子 GATA2 和细胞粘附蛋白 β -catenin 也存在于不可溶组分中。相反，用 Laemmli 样品缓冲液裂解的不可溶组分，配合使用针筒剪切粘性基因组 DNA 溶解出了在可溶组分中不存在的与 DNA 紧密相关的蛋白质(如组蛋白)(图 2D)。尽管蛋白质在各种裂解液中的溶解度有所差异，但这些结果表明，在开始免疫印迹研究之前，最好先确定提取的方法是否适合于目的蛋白质提取。

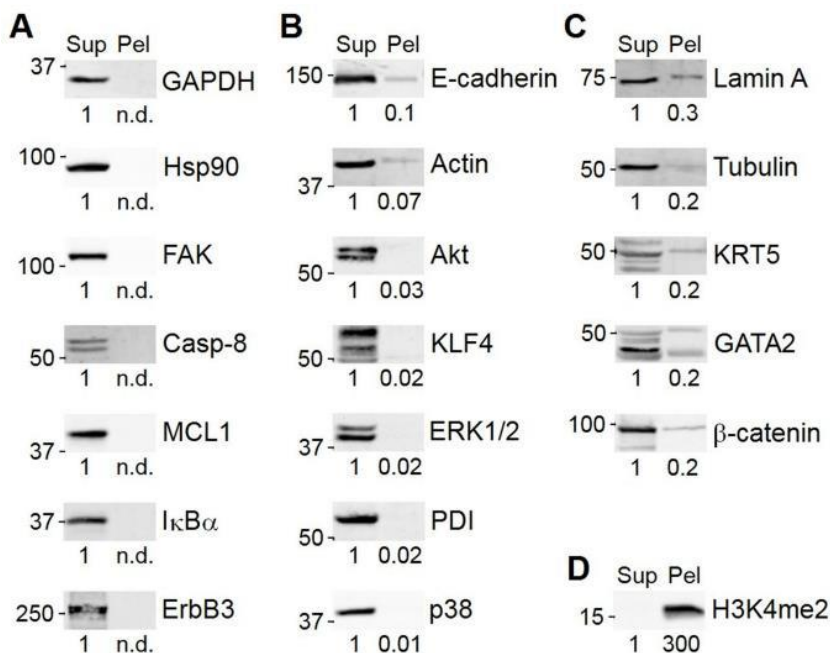


Fig. 1. Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer solubilizes many, but not all, cellular proteins. (A) Examples of proteins that are entirely solubilized (100% in the supernatant, Sup). (B) Examples of proteins that are mostly solubilized (>90% Sup). (C) Examples of proteins that are partially solubilized (\leq 90% Sup). (D) Dimethyl-lysine 4 histone H3 (H3K4me2) resides almost entirely in the RIPA-insoluble pellet (Pel). Band intensities were quantified from the 16-bit digital image by densitometry in ImageJ and are shown normalized to the Sup lane for each target. n.d., not detected. Data are representative of 2-4 experiments.

图 2.

○影响磷酸化蛋白检测

Ni Hui 等[3]研究了不同蛋白提取方法对 PI3K / Akt / mTOR 信号通路相关蛋白表达的影响。取空白组 3 只大鼠和模型组 3 只大鼠的双侧海马组织，分别采用 RIPA 裂解法和 Invent 柱式法蛋白提取试剂盒进行蛋白提取。WB 检测 PI3K / Akt / mTOR 信号通路相关蛋白的表达。

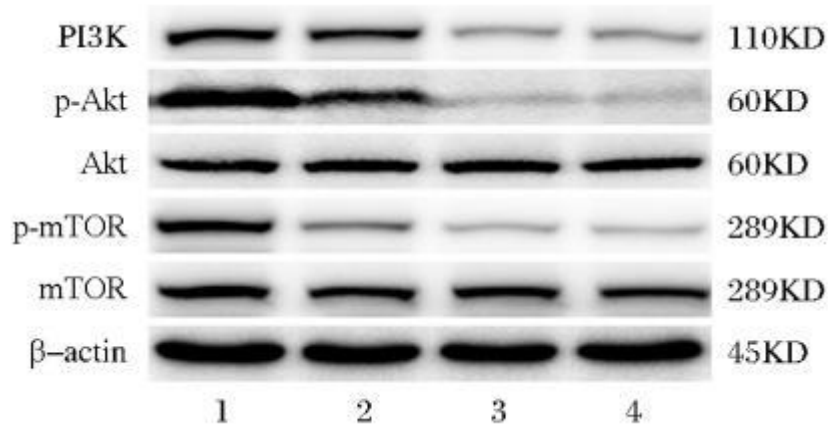


图 3.采用不同蛋白提取方法对两组大鼠进行 PI3K / Akt / mTOR 信号通路相关蛋白电泳

1:空白+Invent 组; 2:模型+Invent 组; 3:空白+RIPA 组; 4: 模型 + RIPA 组

结果显示 (图 3), RIPA 提取的样品 PI3K/β-actin、p-Akt/Akt 和 p-mTOR / mTOR 的表达水平显著低于 Invent 柱式法。Invent 柱式法提取的样品, 空白组 PI3K/β-actin、P -Akt/Akt、P -mTOR / mTOR 的表达量与模型组比较差异有统计学意义($P = 0.001$), 模型组 PI3K/β-actin、P -Akt/Akt、P -mTOR / mTOR 的表达量显著低于空白组; RIPA 提取的样品, PI3K/β-actin、P -Akt/Akt、P -mTOR / mTOR 表达水平在两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

磷酸化蛋白的表达量很低, 仅占总蛋白的一小部分。在蛋白提取过程中容易发生降解或处理不当导致快速去磷酸化, 从而使磷酸化蛋白在 Western Blot 检测中结果不理想。如果在提取蛋白质的过程中丢失了部分蛋白质, 磷酸化和非磷酸化蛋白质的比例就会发生改变, 从而导致数据偏差。

○导致高背景意外因素

许多因素都可能导致 WB 高背景，包括但不限于抗体稀释不当、封闭不足、封闭试剂的干扰、洗涤不足和转印膜质量差等因素。除上述因素外，WB 中影响背景的另一个因素是使用的蛋白质样品制备的方法和试剂。当 WB 出现高背景问题时，很少有研究人员意识到蛋白质提取的方法可以显著地影响背景。下面两张图平行比较了不同的蛋白质提取方法，即 RIPA 裂解液法和 Invent 柱式蛋白提取法提取的样品，对 WB 背景的影响（图 4）。

结论:蛋白的提取方法显著影响了 WB 的背景，Invent 柱式法蛋白提取法优于 RIPA 裂解液法。

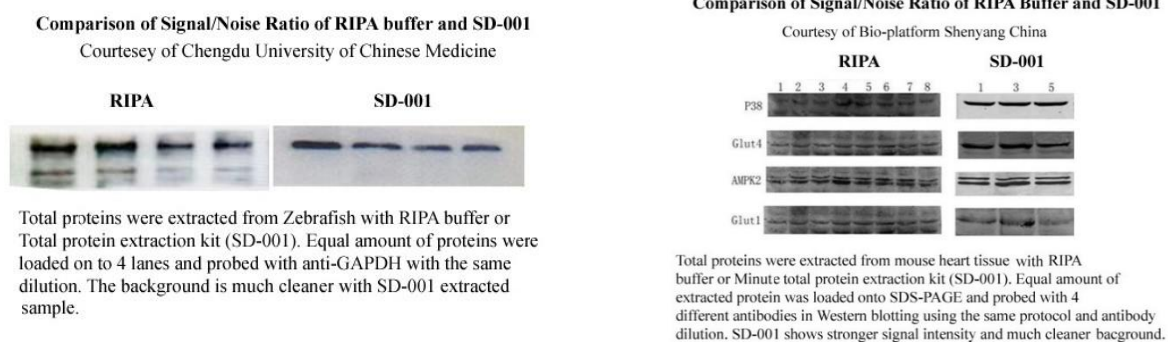


图 4.

如果您在使用 RIPA 裂解液时遇到上述类似问题，我们强烈推荐您使用柱式法蛋白质提取技术。更多信息请访问：https://www.inventchina.cn/pro_view.asp?id=85&class=1

参考文献：

1. Li, Q. (2016) Pitfalls of Protein Extraction by RIPA Buffer. BioTechniques. Biotechniques. 61:327
2. Kevin A. Janes, 2017, An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting. Sci Signal.; 8(371): rs2. doi:10.1126/scisignal.2005966.
3. Hui N I, Zhang M, Haiqing A O, et al. Effect of Different Protein Extraction Methods on Expressions of PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway-related Proteins[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2019.

本品仅供研究使用，不可用于临床诊断。

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

