

PRODUKT INFORMATION

RIPA Buffer

Cat. no. 39244

Produktbeschreibung:

Allgemein	RIPA-Puffer ist einer der zuverlässigsten Puffer, der zur Lyse kultivierter Säugetierzellen aus adhärenter oder Suspensionskultur pelletierten Zellen verwendet wird. Dieser Puffer ermöglicht die Proteinextraktion aus Zytoplasma-, Membran- und Kernproteinen und ist mit vielen Anwendungen, z. B. Reporter-assays, Proteinassays, Immunoassays und Proteinreinigung kompatibel
Wichtig	Der Puffer enthält weder Protease- noch Phosphatase-Inhibitoren. Wir empfehlen: <ul style="list-style-type: none"> • Kat.-Nr. 39102 Protease Inhibitor Mix M (für Säugerzellen und -gewebe) • Kat.-Nr. 39050 Phosphatase Inhibitor Mix I, Pulver • Kat.-Nr. 39055 Phosphatase Inhibitor Mix II, Lösung

Anwendung: Falls notwendig, fügen Sie dem RIPA-Puffer unmittelbar vor der Verwendung Protease- und Phosphatase-Inhibitoren hinzu.

Verwenden Sie 1 ml kalten RIPA-Puffer pro 5×10^6 HeLa- oder A431-Zellen (~ 20 μ l gepackte Zellen, entspricht ~ 40 mg Zellen). Um konzentrierte Proteinextrakte zu erhalten, lysieren Sie die Zellen direkt auf der Kulturplatte unter Verwendung von weniger Puffer.

Lyse von adhärennten Säugerzellen (Monolayer-Kultur)

- Entfernen Sie vorsichtig das Kulturmedium von den anhaftenden Zellen.
- Waschen Sie die Zellen zweimal mit kaltem PBS.
- Fügen Sie kalten RIPA-Puffer hinzu.
Verwenden Sie 1 ml Puffer pro 75 cm²-Kulturgefäß mit 5×10^6 HeLa- oder A431-Zellen. Das Lysat 5 min auf Eis stellen und gelegentlich das Kulturgefäß drehen, um eine gleichmäßige Verteilung zu erreichen.
- Lösen Sie die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers und sammeln Sie das Lysat auf einer Seite und transferieren Sie es in ein Reaktionsgefäß.
- Zentrifugieren Sie die Proben 15 min bei ~ 14.000 x g, um die Zellreste zu pelletieren.
Hinweis: Zur Erhöhung der Proteinausbeute das Pellet 30 Sekunden mit 50 % Puls beschallen.
- Transferieren Sie den Überstand zur weiteren Analyse in ein neues Reaktionsgefäß.

Lyse von nicht-adhärennten Säugerzellen (Suspensionskultur)

- Pelletieren Sie die Zellen durch Zentrifugation 2500 x g, 5 min und werfen den Überstand.
- Zellen zweimal in kaltem PBS waschen
- Zentrifugation bei 2500 x g, 5 min
- Zugabe von RIPA-Puffer zum Zellpellet.
Verwenden Sie 1 ml RIPA-Puffer für 40 mg (~ 5×10^6 HeLa-Zellen) feuchtes Zellpellet. Pipettieren Sie die Mischung auf und ab, um das Pellet zu suspendieren.
Hinweis: Zur Erhöhung der Erträge das Pellet 30 Sekunden lang mit 50% Puls beschallen.
- Schütteln Sie die Mischung 15 min lang vorsichtig auf Eis.
- Zentrifugation ~ 14.000 x g, 15 min, um die Zellrümmer zu pelletieren.
- Transferieren Sie den Überstand zur weiteren Analyse in ein neues Reaktionsgefäß.

Troubleshooting

Problem	Mögliche Ursache	Abhilfe
Geringe Gesamtproteinausbeute	Einige Zellen sind resistenter gegen Lyse als andere	Das Zellpellet sollte gründlich in RIPA-Puffer suspendiert sein, und mit gelegentlichem Verwirbeln für längere Zeit inkubieren
Geringe Proteinkonzentration	Zuviel Lysepuffer verwendet	Weniger Puffer, z. B. 0,25 – 0,5 ml pro 75 cm ² -Kulturgefäß mit 5×10^6 Zellen – Verwenden Sie eine ausreichende Menge, um die gesamte Platte abzudecken
Proteolyse	Keine Protease-Inhibitoren zugesetzt	Vor Gebrauch Zugabe von Protease Inhibitor Mix M zum Puffer
Geringe Protein-Phosphorylierung	Phosphatase-Aktivität	Vor Gebrauch Zugabe von Phosphatase Inhibitor Mix I oder II zum Puffer
	Protein ist nicht oder nur gering phosphoryliert	-

Version 12/18