

RIPA法提取蛋白

1.配置

1.1 100-150 μL /6孔板加入裂解液

1.2 总蛋白：PMSF：RIPA（1：100）；磷酸化蛋白：PMSF：磷酸酶抑制剂：RIPA（1：1：100）



2.裂解

2.1 细胞：PBS清洗（弃培养基，用4 $^{\circ}\text{C}$ PBS轻柔冲洗2次，吸净残留PBS） \rightarrow 裂解（加入裂解液，裂解30~40 min，冰箱）

2.2 组织：称重（20~40 mg，每管2粒4 mm钢珠） \rightarrow 研磨（1（mg）：10（ μL ）比例加入裂解液，60 HZ，60 s，三次） \rightarrow 裂解（30~40 min，冰箱）



3.取上清

3.1 12000 g，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min，

3.2 转移上清至新EP管，混匀取5 μL 测浓度



4.变性

4.1 加入常温或预热过的5 \times SDS蛋白上样缓冲液，摇匀，裂解

4.2 混匀后收入EP管内，95 $^{\circ}\text{C}$ ，10 min使蛋白变性

常见问题解析

1. 蛋白降解（Western条带模糊/消失）怎么办？

①蛋白酶抑制剂失效：PMSF未现配现用或浓度不足。使用新鲜添加的蛋白酶抑制剂（如PMSF+EDTA或cocktail）。②操作温度过高：裂解或离心未在冰上进行。全程冰上操作，裂解后立即离心并分装保存于-80℃。③样本处理延迟：细胞/组织离体后未及时裂解。组织样本取材后迅速液氮速冻，避免室温放置。

2. 蛋白浓度过低怎么办？

①裂解不彻底：RIPA强度不足或裂解时间过短。难溶蛋白改用强效RIPA（含1% SDS）或延长裂解时间（冰上1 h）。②裂解液过量：体积与样本量不匹配（如细胞数太少）。调整裂解液比例（细胞：100 μL/10⁶；组织：1:10 w/v）。③离心不充分：蛋白未完全释放到上清中。提高离心速度至14000 rpm，延长至20 min。

3. 样品粘稠（DNA污染）的表现及可能解决方法。

①可能出现提取液粘稠难吸取，电泳条带拖尾。②DNase I处理：在裂解液中加入1-2 μg/mL DNase I+5 mM MgCl₂，冰上孵育10 min。③超声破碎：冰上超声（3-5秒脉冲，间隔10 s，重复3次）。

4. Western Blot背景高怎么办？

①SDS残留：强效RIPA中SDS未洗净，导致非特异结合。换用无SDS的温和RIPA（仅含NP-40/Triton X-100）。②离心不彻底：裂解液中含细胞碎片或杂质。离心后取上清时避免吸到底部沉淀。

5. 蛋白聚集（电泳条带异常）表现及可能解决方法。

①可能出现条带堆积在凝胶顶部或出现不规则条带。②添加还原剂：裂解时加入5% β-巯基乙醇或100 mM DTT。③煮沸变性：95℃加热5 min（仅适用于WB，IP实验禁用）。