کیت استخراج پروتئین تام توسط RIPA

RIPA-total protein extraction kit

(Cat-No: SK1151-50 □, SK1151-100 □)

الف) مقدمه

بافر لیز RIPA (**R**adio**i**mmunoprecip**i**tation **a**ssay buffer) یک محلول کامل شامل دترجنت های یونی و غیر یونی است که قادر به لیز و محلول‌سازی طیف وسیعی از پروتئین‌ها از انواع سلولهای چسبنده، سوسپانسیون و انواع بافت‌های نرم جانوری می‌باشد. از آنجایی که اکثر پروتئین ها و آنتی بادی ها تحت تاثیر اجزای تشکیل دهنده این بافر قرار نمی گیرند، لذا به طور گسترده به عنوان بافر لیز و بافر شستشو درسنجش‌های تمایلی pull down از جمله رسوبدهی ایمنی مورد استفاده قرار گرفته است. علاوه بر این، بافر لیز RIPA میانکنش های غیر اختصاصی بین پروتئین ها را به حداقل رسانده و با حفظ میانکنش‌های اختصاصی، امکان مطالعه میانکنشهای پروتئین- پروتئین را فراهم می آورد. پروتئین های استخراج شده با بافر RIPA برای انواع روش‌های الایزا، PAGE، SDS-PAGE، وسترن بلات، رسوبدهی ایمنی و سنجش آنزیمی سازگار است.

این بافر حاوی انواع مهارکننده‌های پروتئازی و فسفاتازی می باشد. بافر RIPA حاضر بصورت 1X و آماده مصرف می باشد. اما برخی از مهار کننده های آن بصورت کوکتل 100X در کیت گنجانده شده است که قبل از مصرف ۱۰ میکرولیتر از آن به یک میلی لیتر بافر افزوده شود.

کاربردهای کیت: این بافر استخراج مناسب برای تهیه نمونه جهت وسترن بلات WB، ELISA، SDS-PAGE، IP،Co-IP، تخلیص پروتئین و سنجش های آنزیمی می‌باشد.

ب) محتویات کیت

	نام ماده	مقدار
۱	بافر RIPA	۱۰ ml
۲	کوکتل مهار کننده پروتئیناز ۱ و ۲	۱ ml

نگهداری کیت

بافر استخراج پروتئین و کوکتل های مهار کننده بایستی در کمتر یا مساوی ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. این بافر به مدت ۲-۳ هفته در ۴°C و به مدت شش ماه در ۲۰°C- پایدار است. بهتر است بافر و کوکتل ها الیکوت شده و از فریز و دفریز بافر به صورت مکرر خودداری گردد. در صورت نگهداری بافر در شرایط مناسب، بافر تا یک سال پایدار می‌باشد.

ج) روش کار

بر اساس منبعی که قرار است پروتئین از آن جداسازی شود روش استخراج متفاوت خواهد بود:

۱- نمونه سلولی

این پروتکل را می‌توان برای انواع رده‌های سلولی چسبنده و سوسپانس به کار برد. ممکن است بهینه‌سازی شرایط برای هر نمونه‌ای لازم باشد که بایستی قبل از استخراج در نظر گرفته شود.

۱- سلولهای سوسپانسیون را درون اپندورف جمع آوری کرده و به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm /۶۰۰g سانتریفیوژ کنید.

۲- محلول رویی را دور ریخته و با PBS سرد رسوب را حل کرده و مجدداً در ۱۰۰۰rpm سانتریفیوژ کنید محلول رویی را دور بیندازید. این مرحله بهتر است دو بار تکرار گردد.

نکته: در مورد سلول های چسبنده، بایستی پس از حذف محیط رویی و افزودن مقداری PBS سرد، با اسکراپر سلولها را از سطح پتری دیش یا فلاسک جدا و درون یک اپندروف جمع آوری نمود. سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm /۶۰۰g سانتریفیوژ کرد. محلول رویی را دور ریخته و مجددا با PBS سرد رسوب را حل کرده و مجدداً در ۱۰۰۰rpm سانتریفیوژ کنید محلول رویی را دور بیندازید.

۳- به رسوب سلولی مقدار مناسب بافر لیز RIPA حاوی مهار کننده را اضافه کرده و پس از سوسپانسیون کردن رسوب به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس نمایید و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ در ۴°C انکوبه نمایید. هر ۱۰ دقیقه یکبار به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس کنید.

نکته: حجم بافر استخراج به تعداد سلولی و میزان بیان پروتئین هدف و میزان فسفریلاسیون پروتئین مورد نظر دارد. حجم اولیه مناسب برای تعداد 10^{7}-10^{8}سلول حدود ۱ml بافر لیز RIPA می باشد.

۴- نمونه‌ها را در ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴°C سانتریفیوژ کنید.

۵- محلول رویی را برداشته پس از الیکوت کردن تا زمان استفاده برای آنالیزهای بعدی از جمله سنجش غلظت پروتئین، WBدر ۸۰°C- به مدت یک ماه نگهداری گردد. از فریز/دفریز مکرر نمونه‌ها جداً باید خودداری گردد.

۲- نمونه بافت

۱-نمونه بافتی نظیر بافت کبدی را پس از خارج کردن جهت حذف کامل سلول های خونی با PBS سرد شستشو دهید.

۲- مقدار مناسب بافر لیز حاوی مهارکننده پروتئازی را به بافت اضافه کنید. نمونه ها روی یخ هموژنه کنید. پیشنهاد می شود که نسبت مقدار بافت به بافر RIPA حدود ۳:۱۰ باشد بطوریکه برای ۳۰ میلی گرم بافت بایستی ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز به کار برد.

۳- پس از هموژناسیون، نمونه ها را به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ در ۴°C انکوبه نمایید و هر ۱۰ دقیقه یکبار به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس کنید.

نکته: برای کاهش ویسکوزیتی لیزات بافتی و حصول اطمینان از لیز کامل بافت می توان نمونه را به مدت یک دقیقه با تناوب ۵ ثانیه ای روی آب یخ سونیکه کرد.

۴- در پایان، نمونه‌ها را در ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴°C سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را پس از الیکوت کردن تا زمان استفاده در ۸۰- نگهداری نمایید.

نکته: برای اطمینان از استخراج پروتئین، پس از تعیین غلظت پروتئین کل به روش برادفورد (SK1144) یا لوری (SK1145)، الگوی آن را بر روی ژل SDS-APGE ۱۲٪ مشاهده کنید.