

脂筏提取缓冲液 FAQ

Q-1.如果单独使用B编中液，溶解效率是否高于RIPA编中液？

A-1.B编中液的溶解活性比RIPA（A编中液）高。本试剂盒的操作分为2个阶段，首先将RIPA不溶性组分回收并用B编中液将其溶解，并以浓缩和简单提取RIPA不溶性组分中含有的脂筏蛋白为目的而进行第2阶段的操作。但是，如果是直接用B缓冲液处理样本的时候，溶解率的确比RIPA高。

Q-2.使用ULTRARIPA Kit是否只可以提取脂筏蛋白？

A-2.多数研究认为，脂筏的细胞膜穴样内陷和神经突触中含有的组成蛋白不能用TritonX-100等温和的表面活性剂溶解，因此认为表面活性剂的不溶性组分（DRM）是生化脂质筏。本产品着眼于RIPA不溶性组分富含的脂筏蛋白，用B缓冲液进一步使其溶解，使得脂筏蛋白在非变性状态下溶解。因此，即使不是脂筏，只要是不溶于RIPA的样本，都可以使用本试剂盒进行检测（关于核蛋白的污染参见Q-3）。本试剂盒使用溶解能力较高的RIPA缓冲液作为A编中液，但是也可以用1%TritonX-100等的裂解缓冲液代替RIPA编中液。

Q-3.推荐使用均质或超声破碎设备，单独使用涡旋和移液是否不够充分？

A-3.本产品采用A缓冲液溶解后离心，并回收RIPA不溶性组分这样简单的步骤。因此，如果有细胞/组织的未破碎物或核残留的话，则可能污染RIPA不溶性组分。特别是RIPA编中液的核溶解效率较弱，如果不添加物理破碎，则核可能会大量残留在RIPA不溶性组分中。另一方面，由于B缓冲液的核溶解率较高，如果有核残留的话就会释放出DNA，使溶液变浑浊。在A编中液溶解时进行超声处理的话可以破坏核以及使基因组DNA片段化。核的污染可能会影响后续的应用，因此，我们强烈推荐均质或超声破碎设备。

Q-4.B缓冲液的成分是什么种类的表面活性剂。听说表面活性剂的种类会影响电泳，我想知道它的成分。

A-4.非常抱歉，B缓冲液的成分是非公开的。我们无法告诉您表面活性剂的种类。然而，我们可以确定B编中液不会影响电泳。

Q-5.几乎无法看见A不溶性组分。即使添加了B缓冲液也无法获取蛋白质量，怎么

办？

A-5.RIPA缓中液可以溶解90~95%包括膜蛋白在内的总蛋白（根据组织/细胞种的不同多少会有点差别）。因此，考虑蛋白质总量时，RIPA不溶性组分中含有的蛋白为样本总体的10%以下。肉眼无法看见RIPA不溶性组分时，需要增加细胞数/组织量。想要提高B缓中液溶解组分蛋白浓度时，减少添加至RIPA不溶性组分的B缓中液量就可以得到改善。我们建议您设置如下的阳性对照。

探讨样本量的阳性对照实验

需要准备的试剂：2%SDS编中液（50mM Tris-HCl（pH 8.0），150mM NaCl，2%SDS）

步骤：回收RIPA不溶性组分后，添加2%SDS编中液，通过进行蛋白质定量检测，可以预估RIPA不溶性组分中含有的蛋白质总量。

Q-6.在A缓中液溶解组分中可以观察到脂筏标记物，有什么改善的方法吗？

A-6.我们无法保证在其他方法中作为脂筏标记物被检测出的蛋白能否在A缓中液不溶性组分中获得。特别是根据脂筏标记物的不同，细胞种类/组织，有无外部信号也会有变动。我们会根据以下案例提供相关的改善方法，请酌情参考。

例1：不溶于1%TritonX-100，但用RIPA编中液可以检测出可溶性组分。

改善方法：可能是由于RIPA缓中液（1%NP-40，0.1%SDS，0.5%sodium deoxycholate）的提取效率比19%Triton X-100强，所以能将其溶解。这时候，可以通过用1%Triton X-100编中液代替A缓中液来浓缩以及溶解目的蛋白。

例2：离心条件不足时，虽然不溶解，但是不沉淀。

改善方法：虽然我们推荐的离心条件为10,000×g，但是根据目的蛋白的不同，离心10,000×g可能不足。

这时，也有把离心条件调整为20,000×g之后得到改善的案例。因此，我们建议您探讨一下离心条件。

Q-7.用B编中液洗脱的蛋白可以用于质谱分析吗？

A-7.B缓中液溶解的蛋白经过SDS-PAGE分离后，可以通过一般的蛋白质组学分析的顺序（切割凝胶，在凝胶中进行胰蛋白酶消化，提取肽以及脱盐操作）进行分析。

Q-8: 用B缓冲液提取后，我想用适合试验的缓冲液来置换它。可以通过透析去除B缓冲液中的表面活性剂吗？

A-8: B缓冲液含有的表面活性剂可以通过透析去除。请使用孔径为5kDa的透析膜。但是，也有根据蛋白质的不同，在去除表面活性剂时也可能聚集或变性，需要添加别的表面活性剂到透析缓冲液中。建议进行预实验。