

PL-25

RIPA-Puffer

Komponenten	PL-25 mg/L
Tris	6057,00
NP 40	10000,00
Natriumdeoxycholat	2500,00
NaCl	8766,00
NaF	41,99
Na ₃ VO ₄	183,90
EGTA	380,35
Aprotinin	1,00
Leupeptin	1,00
Pepstatin	1,00
PMSF	34,84



Ein gebrauchsfertiger Puffer zur Lyse von eukariontischen Zellen für die Proteinanalyse. Der Puffer wird gebrauchsfertig geliefert; PMSF wird, aus Stabilitätsgründen, separat 200 mM in Isopropanol mitgeliefert.

1. Waschen Sie adhärente Zellen zweimal in der Schale oder Flasche mit eisgekühltem PBS und dekantieren Sie den PBS. Nichtadhärente Zellen werden mit PBS gewaschen und mit 800 - 1000 U/min in der Tischzentrifuge 5 min zentrifugiert um die Zellen zu pelletieren.
2. Geben Sie eisgekühlten RIPA-Puffer zu den Zellen (1 ml für 10⁷ Zellen/100 mm Schale/150 cm² Flasche; 0,5 ml für 5 x 10⁶ Zellen/60 mm Schale/75cm² Flasche).
3. Schaben Sie die adhärennten Zellen mit einem eisgekühlten Schaber . Geben Sie die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen. Schütteln Sie die Suspension im Kühlraum für 15 min.
4. Zentrifugieren Sie das Lysat mit 14 000 x g in einer vorgekühlten Zentrifuge für 15 min. Unmittelbar danach trennen Sie den Überstand vom Pellet und werfen das Pellet.
5. Zur Proteinbestimmung verdünnen Sie das Lysat mindestens 1:10 weil ansonsten die Detergentien des Lysispuffers mit den Coomassie-Reagenzien interferieren.

Ab diesem Schritt kann die Probe aliquotiert und bei -20°C bis zu einem Monat aufbewahrt werden.