

WSE-7420

EzRIPA Lysis kit 사용 설명서

1. 사용 전 주의사항

본 제품을 안전하게 사용해 주시기 위해서, 우선 본 사용 설명서를 잘 읽어 주십시오. 본 사용 설명서의 내용이 충분히 이해될 때까지, 사용은 삼가 해 주십시오. 또한 본 사용 설명서에서 설명하는 사용법 외 설명서에 기재되지 않고 있는 목적·방법에서의 사용은 삼가 해 주십시오. 만일, 본 사용 설명서에 기재되지 않고 있는 목적, 방법으로 사용의 경우, 필요한 안전대책 및 불측의 사태는 모두 조작 하시는 분의 책임이 됩니다. 또한, 동시에 사용하는 장치의 사용 설명서도 숙지 해 주십시오.

2. 사용목적

본 제품은 동물배양 세포를 용해하고, 단백질을 추출하는 키트입니다. 첨부된 **【Protease Inhibitor】** (단백질분해 효소조해제) 과 **【Phosphatase Inhibitor】** (탈(脫)인(磷) 산화 효소 조해제)을 사용하는 것에 의해, 단백질의 분해나 탈(脫)인산화를 막으면서 단백질을 추출해 냅니다. 이렇게 분리된 단백질은 전기영동이나 면역침강, ELISA등의 생화학적·면역학적 실험에 사용할 수 있습니다. 또 HEPES에 기초한 완충 액이므로, 아미노기나 인산기를 포함하지 않아 단백질의 표식실험 등에도 그대로 사용할 수 있습니다.

3. 제품의 구성

명칭	용량	갯수	보관
RIPA Lysis buffer	100 mL	1 개	4℃
Protease Inhibitor	1 mL	1 개	-20℃
Phosphatase Inhibitor	1 mL	1 개	-20℃

4. 조성

명칭	주성분
RIPA Lysis buffer	20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL® CA-630, 0.1% SDS, 0.5% Sodium deoxycholate/ pH7.5
Protease Inhibitor	100×농도, Aprotinin, PepstatinA, Leupeptin, DMSO
Phosphatase Inhibitor	100×농도, Sodium fluoride, Sodium orthovanadate(V), beta Sodium glycerophosphate

본 제품은 독극물 단속법의 독물 또는 극물, 노동 안전위생법의 제외 규정량을 넘는 통지 대상물은 포함되고 있지 않습니다. PRTR법 지정 화학물질의 제외 규정량을 넘는 통지 대상물이 일부 포함되어 있습니다. 자세한 내용은 본 제품의 MSDS를 요청 바랍니다.

5. 보존방법

- **RIPA Lysis buffer** (Radio-Immuno-precipitation assay Lysis buffer : 냉장(2~8도)보존으로 미개봉의 상태라면 사용 기한 내는 안정합니다.)
- **Protease Inhibitor** (단백질분해 효소 조해제) 와 **Phosphatase Inhibitor** (탈(脫)인(磷) 산화 효소 조해제)은 냉동(-20도)보존으로 미개봉의 상태라면 사용 기한 내는 안정합니다.

6. 폐기방법

- 각 시약의 폐기는, 소속 기관의 폐기 방법에 준거하고, 실시해 주십시오.

7. 본 제품 이외에 필요 물품

- Cooled PBS buffer
- Microcentrifuge tube
- vortexer
- 냉장 원심분리기

8. 사용상의 주의사항

- 본 제품은 냉장 수송으로 전해 드립니다. 받으신 후, 즉시 개봉하고, 각각의 시약에 적합한 온도로 보존해 주십시오.
- 실험 시작 전에 모든 시약을 녹여 주십시오. 또한 실험 조 작은 ice 혹은 저온상태로 진행 해 주십시오.
- **Protease Inhibitor**는 DMSO를 함유하고 있기 때문에, 저온아래에서 동결할 경우가 있습니다. 실온에서 완전히 녹인 후 사용해 주십시오.
- **Protease Inhibitor**는 필요에 따라, 첨가량의 증감, 혹은 AEBSF나 Bestatin등의 inhibitor를 추가해 주십시오.

9. 사용방법

I. RIPA Lysis buffer의 준비

아래표를 따르고, 필요에 따라 **Protease Inhibitor** 및 **Phosphatase Inhibitor**를 혼합합니다. 혼합 후의 **RIPA Lysis buffer**은 사용 시까지 ice에 둡니다.

※세포에 대한 **RIPA Lysis buffer** 적용량은 $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 세포에 대해 약 1 mL입니다.

	적용량	Protease Inhibitor (파란뚜껑)	Phosphatase Inhibitor (차광상태)
RIPA Lysis buffer	1 mL	(10μL)	(10μL)

II. 배양세포의 가용화

① 부착성 세포의 경우

1. 세포를 배양하고 있는 culture dish에, 적절한 양의 차가운 PBS를 첨가해서 세포를 2회 이상 세정합니다.
2. PBS에 세정된 culture dish에 **I. RIPA Lysis buffer의 준비**에서 준비한 RIPA Lysis buffer를 첨가합니다.
※세포에 대한 RIPA Lysis buffer 적용량은 $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 세포에 대해 약 1 mL입니다.
3. Ice에서 15분간 incubation 합니다.
4. Culture dish로 부터 세포를 scrap 하여 microcentrifuge tube로 회수합니다.
5. $14,000 \times g$ 에 5~15분간 원심 분리합니다.
6. 원심 분리하여 나온 supernatant를 새로운 microcentrifuge tube로 옮깁니다. 회수한 단백질 용액은 사용시까지 ice에 두거나 또는 -80°C 로 보존해 주십시오.

② 비부착성 세포 또는 Trypsin 처리로 회수한 세포의 경우

1. Trypsin 등으로 처리하여 떼어낸 세포현탁액 준비합니다.
2. 세포 현탁액을 $200 \times g$ 에 3~5분간 원심 분리합니다.
3. 원심 분리하여 나온 supernatant를 조심스레 버리고, 남은 pellet에 적당량의 차가운 PBS를 첨가해 재 현탁시킵니다.
4. 세포 현탁액을 $200 \times g$ 에 3~5분간 원심 분리합니다.
5. 원심 분리하여 나온 supernatant를 조심스레 버리고, 남은 pellet에 적당량의 차가운 PBS를 첨가해 재 현탁시킵니다.
6. 세포 현탁액을 $200 \times g$ 에 3~5분간 원심 분리합니다.
7. 원심 분리하여 나온 supernatant를 버리고 pellet에 **I. RIPA Lysis buffer의 준비**에서 준비하여 둔 RIPA Lysis buffer를 첨가하여 pipettig을 통해 현탁합니다.
※세포에 대한 RIPA Lysis buffer 적용량은 $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 세포에 대해 약 1 mL입니다.
8. Ice에서 15분간 incubation 합니다.
※ Incubation 하는 사이, 1~2분 마다 2, 3회 정도 inverting 해 줍니다.
9. 시료를 $14,000 \times g$ 에 5~15분간 원심 분리합니다.
10. 원심 분리하여 나온 supernatant를 새로운 microcentrifuge tube로 옮깁니다. 회수한 단백질 용액은 사용시까지 ice에 두거나 또는 -80°C 로 보존해 주십시오.

시오.

※ 핵단백질 추출 시, SDS를 최종 농도 0.5% 되도록 첨가해 주면 추출 효율이 좋아집니다. DNA 용출로 인해 시료에 점성이 있다면, 초음파 파쇄 또는 DNase I ($100 \sim 500 \text{U/mL}$)로 처리해 주십시오.

10. 참고

SDS-PAGE 용 Sample 준비

1. 단백질 용액과 동량의 EzApply (AE-1430) 또는 2×SDS sample buffer를 첨가해 혼합합니다.
2. 단백질 혼합액을 100°C 에서 10분간 가열 처리 합니다.
3. $14,000 \times g$ 에 10분간 (4°C) 원심 분리합니다.
4. 원심 분리 후 나온 supernatant를 SDS-PAGE 용 sample로써 사용 가능합니다.

11. ATTO 관련 제품

SDS-PAGE용 Sample buffer

AE-1430 EzApply

2D 전기영동 용 Sample Kit

AE-1435 EzApply 2D kit

세포 소 기관 추출 Kit

WSE-7421 EzSubcell Extract

세포 소 기관 Fraction Kit

WSE-7422 EzSubcell Fraction

SDS 제거 시약

AE-1390 SDS-eliminant

전원 일체형 전기영동 장치

WSE-1020 compact PAGE • Twin R
WSE-1100 PAGE -R

※ 실험은 같은 Protocol 상에서도 대수롭지 않은 작은 요령의 차이로 결과가 달라질 수 있습니다. 최적의 결과를 얻기 위해서는 어느 정도 숙련된 노하우가 필요합니다.

아토 홈페이지를 통해 다양한 실험 요령이 게재된 자료를 다룬 받을 수 있으므로 참고바랍니다.



アト一株式会社

生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器
開発/生産/販売/サービス

主要製品

- ペリスタポンプ
- クロマトグラフ

- DNA分析装置
- 画像分析システム
- 発光分析装置
- バイオ研究機器

■本 社 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2
◆技術サービス
■技術開発 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6
センター (東京都許可 医療機器製造業)

TEL (03) 5827-4861 (代表) Fax (03) 5827-6647
TEL (03) 5827-4873 (代表) Fax (03) 5827-4874
TEL (03) 5818-7560 (代表) Fax (03) 5818-7563