

Nuclear Extract Kit

(D4 版本)

货号: 40010&40410

Active Motif 中国

地址: 上海市静安区万渡航路 889 号

电话: (86)-21-20926090

邮箱: techchina@activemotif.com

版权所有 2014 Active Motif. Inc

版本说明

版本编号	日期	版本说明
D4	2018 年 12 月	详细说明关于测量细胞提取物的蛋白质浓度的建议

本手册中的信息如有更改，恕不另行通知，也不构成 Active Motif, Inc. 的承诺。本手册按“原样”提供，无任何明示或暗示的担保。本手册中的信息可随时更改或更新。

未经 Active Motif, Inc. 事先书面同意，不得复制、转让、再复制、披露或复制本文件的全部或部分内容。本文件为专有信息，受美国版权法和国际条约的保护。

本文件的制造商为 Active Motif, Inc.

© 2014 Active Motif, Inc., 地址: 1914 Palomar Oaks Way, Suite 150; Carlsbad, CA 92008。版权所有。

此处引用的所有商标、商号、服务标志或徽标均属于其各自的公司。

仅供科研实验使用，不可用于医学诊断。

目录

版本说明.....	2
简介.....	1
试剂特点与优势.....	2
Nuclear Extract Kit.....	2
试剂组分.....	4
额外所需耗材.....	4
可选附加耗材.....	4
实验方法—缓冲液的准备和实验建议.....	5
实验方案 I: 贴壁细胞和悬浮细胞.....	6
A. 提取细胞中核提取物的准备工作.....	6
B. 全细胞提取物的制备.....	8
实验方案 II: 新鲜或冷冻组织.....	10
A. 组织的细胞核提取物制备.....	10
B. 组织全细胞提取物的提取.....	12
附录.....	13

简介

Nuclear Extract Kit 用于提取细胞核，胞质或全细胞的蛋白提取物。该试剂盒方法可简单，快速且高效的提取未变性的活性蛋白。采用这种高盐方法提取的蛋白可应用于 EMSA，DNA 印记，WB，或进一步的纯化蛋白用于下游的酶活实验或蛋白结合实验。同时，Nuclear Extract Kit 也是 TransAM™ (Active Motif) 分析推荐使用的样本制备试剂盒，可进一步检测转录因子的活性。

每个试剂盒提供了从 8.8×10^6 个细胞中提取 100 次（货号 40010）或 400 次（货号 40410）的试剂量，这相当于 HeLa 细胞在 100 mm 的组织培养皿中的生长量。

Nuclear Extract Kit 可从细胞，新鲜或冻存组织中提取细胞核，胞质或全细胞的蛋白提取物，适用于多种细胞和组织类型。

为了制备核提取物，首先将细胞收集在预冷的 PBS 中，在磷酸酶抑制剂的作用下，限制蛋白质的进一步修饰（表达、蛋白分解、去磷酸化等）。然后，将细胞重新悬浮在低渗缓冲液中，使细胞膜膨胀并变得脆弱。加入去垢剂使细胞质蛋白渗入上清液，收集上清的细胞质部分后，裂解沉淀中的细胞核，在有蛋白酶抑制剂的情况下，将核蛋白溶于无去垢剂的裂解缓冲液中。

为了制备全细胞的提取物，将细胞收集在 PBS/磷酸酶抑制剂溶液中，并在裂解缓冲液中裂解。通过离心法将溶解的蛋白质从细胞碎片中分离出来。

从新鲜或冷冻的组织中制备提取物，样品需被切成小块，用 Dounce 均质器打碎，形成单细胞浆。然后用裂解缓冲液裂解细胞，用离心机将溶解的蛋白质从细胞碎片中分离出来。

然后用 Active Motif 的 ProStatin™ 蛋白质定量试剂盒（货号：15001）或 Bradford-based 的检测方法测量细胞提取物的蛋白质浓度。我们不推荐使用 BCA 测定法，因为所需的适当稀释会产生稀少的提取物，蛋白质浓度将不在产生的标准曲线范围内。

为了方便您的使用，Active Motif 提供了 100 多种来自各种细胞和组织的核、全细胞和细胞质提取物，详情请见 <https://www.activemotif.com.cn/catalog/751/cell-acid-tissue-extracts>

试剂特点与优势

此 Nuclear Extract Kit 仅供科研实验使用，不可用于医学诊断。

实验时长： 2 小时

预估产量： 细胞质提取物：从 8.8×10^6 cells 中提取 $\sim 0.5 - 1$ mg，浓度为 2 mg/ml
细胞核提取物：从 8.8×10^6 cells 中提取 $\sim 0.15 - 0.25$ mg，浓度为 $\sim 3 - 5$ mg/ml
全细胞提取物：从 8.8×10^6 cells 中提取 $\sim 1.2 - 2.4$ mg，浓度为 4-8 mg/ml
(注：样本来源于 HeLa 细胞生长至融合状态)

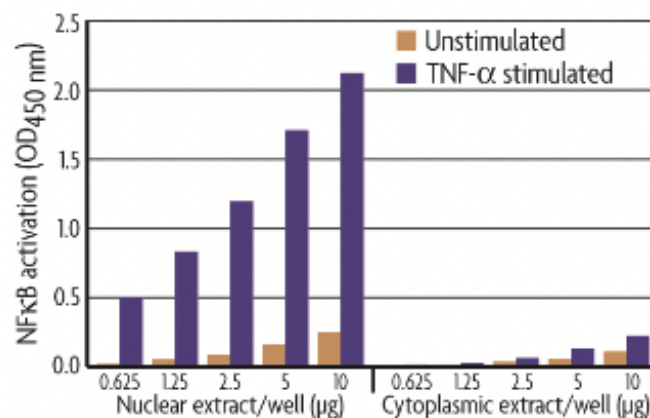
实验兼容性：TransAM™，EMSA，DNA footprinting，Western blotting，细胞核蛋白纯化，蛋白相关实验。

活性转录因子提取：NF κ B，AP-1，CREB，p53，HIF-1，STAT，Sp1，NFAT，MyoD，NF-YA，C/EBP 和 PPAR γ 。

成功提取的细胞系有：HeLa, WI-38, COS-7, PC-12, Jurkat 和 RINm5F 等细胞系。可以用新鲜或冷冻的细胞和组织样本进行提取

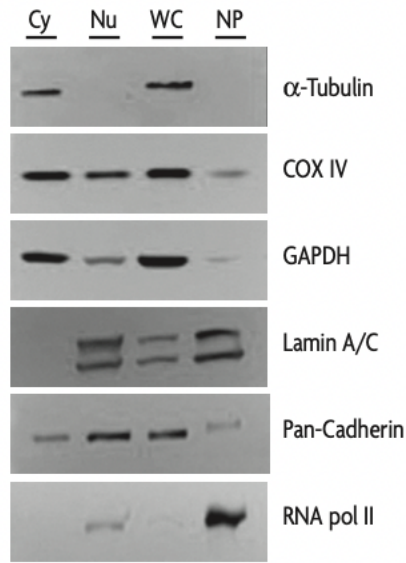
时序性研究：针对时序性研究的样本，有不同的时间点处理，我们建议样本同一时间裂解和处理细胞，以保持样品间在提取过程中的一致性。

Nuclear Extract Kit



图一：特异性提取核和细胞质提取物

TransAM® NF κ B p50 Kit(货号：41096 和 41596)检测 NF κ B 的活性，利用 Nuclear Extract Kit 提取细胞核蛋白。



图二：细胞不同部分提取结果中特定蛋白质的 Western blots

Active Motif 的 Nuclear Extract Kit 被用来提取 HeLa 细胞的核、细胞质和全细胞提取物，以分析细胞分离提取的效率。20 μ g 的细胞质 (Cy)、核 (Nu) 和全细胞 (WC) 提取物，以及从核提取中收集的核颗粒 (NP)，在 4-20% 的 SDS-PAGE 凝胶上电泳检测，并使用 1 : 1000 稀释的各种特定蛋白的一级抗体进行 Western Blots 分析。一级抗体：Active Motif alpha Tubulin mAb (货号：39528)，COX IV mAb，GAPDH mAb，Active Motif Lamin A/C mAb (货号：39288)，Pan- Cadherin mAb，Active Motif RNA pol II mAb (货号：39097)。请注意，RNA pol II 主要存在于核团中，因为它与核骨架和染色质有关。在核沉淀中加入洗涤剂，有时可以帮助溶解核骨架或染色质结合的蛋白质，如 RNA pol II。

试剂组分

试剂组分可在第一次使用前一直放于-20℃保存，当开始使用后，请按下表个组分储藏温度进行分开储藏。

组分名称	规格	储藏及效期
	100 rxns/400 rxns	
Lysis Buffer AM1	10 ml / 50 ml	4℃ / 6 个月
1 M Dithiothreitol (DTT)	100 µl / 500 µl	-20℃ / 一年
Protease Inhibitor Cocktail	100 µl / 500 µl	-20℃ / 一年
10 × PBS	100 ml / 4 × 100 ml	4℃ / 6 个月
Phosphatase Inhibitors	50 ml / 4 × 50 ml	4℃ / 6 个月
10 × Hypotonic Buffer	50 ml / 4 × 50 ml	4℃ / 6 个月
Detergent	3 ml / 4 × 3 ml	4℃ / 一年

额外所需耗材

5 和 10 ml 移液器

移液器

细胞刮刀

15 ml 锥形管

EP 管

离心机（有适合 15 ml 锥形管的适配器）和 4℃ 预冷的微离心机

水平混合器

蒸馏水

可选附加耗材

Dounce 均质器（2 ml）,配备较松的间隙为 0.12 mm 的 A 型研磨杵，用于促使样品的匀浆化，间隙为 0.06 mm 较紧的 B 型研磨杵用于最终的均质化。

注：粘附和悬浮细胞的制备需要 B 型杵，而新鲜和冷冻组织的制备则需要 A 型和 B 型的杵。

（建议的 Dounce 均质器：Active Motif, Catalog Nos.40401 和 40415）

实验方法—缓冲液的准备和实验建议

Nuclear Extract Kit 所需试剂

PBS/Phosphate Inhibitors 的配制

PBS/Phosphatase Inhibitors 溶液应该呈现出透明的亮黄色。在储藏期间可能会出现沉淀，并在外观上变得浑浊。当出现上述情况时，可 50°C 水浴 10 min，在使用前使其完全重悬。请参考合适的实验方法（从细胞或组织中提取核、细胞质或全细胞提取物），以确定提取时需要的 PBS/Phosphate Inhibitors 溶液的量。例如，从 100 mm 培养皿培养的细胞中提取核提取物，需要按如下步骤准备 8 ml PBS/Phosphatase 溶液：取 0.8 ml 10 × PBS 溶于 6.8 ml 去蒸馏水中，加入 0.4 ml Phosphatase Inhibitors。由于 Phosphatase Inhibitors 稀释过后会在 24 小时内失去活性，所以配制好的溶液需在这个范围内尽快使用。如果不在同一天使用，任何剩余的溶液应被丢弃。

1 × Hypotonic Buffer 的配制

需要注意的是，Hypotonic Buffer 中已经含有 Phosphatase inhibitors。请参考合适的实验方法（从细胞或组织中提取核、细胞质或全细胞提取物），以确定提取时需要的 1 × Hypotonic Buffer。例如，从 100 mm 培养皿培养的细胞中提取核提取物，按如下步骤准备 500 μl 1 × Hypotonic Buffer：取 50 μl 10 × Hypotonic Buffer 与 450 μl 蒸馏水混合。使用后剩余的 1 × Hypotonic buffer 可在 4°C 下储存 1 周。

10 mM DTT 的配制

Nuclear Extract Kit 中提供 1 M DTT。为了制备 Complete Lysis Buffer，需要将 1 M DTT 稀释配制成为 10 mM DTT。然而，1 M DTT 需要用于从组织中进行核和细胞质的提取（见第 10 页的实验方案 II：新鲜或冷冻组织）。要制作 10 mM DTT，将提供的 1 M DTT 在蒸馏水中进行 1 : 100 的稀释。例如，取 1 μl 的 1 M DTT 与 99 μl 蒸馏水混合。DTT 易氧化且稳定性较差，所以 10 mM DTT 必须现配现用。避免反复冻融。

Complete Lysis Buffer 的配制

需要注意的是，Complete Lysis Buffer 中已经含有 Phosphatase inhibitors。由于 Phosphatase Inhibitors 的存在使 Lysis Buffer AM1 呈现黄色。参考适当的实验方法（从细胞或组织中提取细胞核、细胞质或全细胞提取物），以确定提取时需要的 Complete Lysis Buffer。例如，从 100 mm 培养皿培养的细胞中提取核提取物，按如下步骤准备 50 μl Complete Lysis Buffer：取 5 μl 10 mM DTT 与 44.5 μl Lysis Buffer AM1 混合，然后加入 0.5 μl Protase Inhibitor Cocktail。因为一些 Protase inhibitors 在稀释后会迅速失去其活性。所以，立即使用 Complete Lysis Buffer 进行细胞裂解。如果不在同一天使用，任何剩余的溶液应被丢弃。

实验方案 I：贴壁细胞和悬浮细胞

A. 提取细胞中核提取物的准备工作

以下实验方法依据样本量 8.8×10^6 cells 设计，参照 HeLa 细胞在 100 mm 培养皿中生长至融合状态。每个样本代表一次反应。提前按照第 5 页的建议配制 PBS/Phosphatase Inhibitors, Hypotonic Buffer 和 Complete Lysis Buffer。如果使用不同尺寸的培养皿，请根据缓冲液制备表调整体积。在开始实验前将缓冲液和任何需要的试管尽量放在冰上。

从细胞中提取核提取物的缓冲液配制表

缓冲液名称	组成成分	60 mm 平板	100 mm 平板	150 mm 平板
		或 3.2×10^6 个 细胞	或 8.8×10^6 个 细胞	或 2×10^7 个 细胞
PBS/Phosphatase Inhibitors	10 × PBS	0.4 ml	0.8 ml	1.6 ml
	Distilled water	3.4 ml	6.8 ml	13.6 ml
	Phosphatase Inhibitors	0.2 ml	0.4 ml	0.8 ml
	总体积	4.0 ml	8.0 ml	16.0 ml
1 × Hypotonic Buffer	10 × Hypotonic Buffer	25.0 μl	50.0 μl	100.0 μl
	Distill water	225.0 μl	450.0 μl	0.9 ml
	总体积	250.0 μl	500.0 μl	1.0 ml
Complete Lysis Buffer	10 mM DTT	2.5 μl	5.0 μl	10.0 μl
	Lysis Buffer AM1	22.25 μl	44.5 μl	89.0 μl
	Protease Inhibitor Cocktail	0.25 μl	0.5 μl	1.0 μl
	总体积	25.0 μl	50.0 μl	100.0 μl
Detergent (可选) *	总体积	1.25 μl	2.5 μl	5 μl

* 在核聚集物中加入 Detergent 可能有助于蛋白质的溶解，特别是那些与膜或染色质紧密联系的蛋白质。

Step 1: 细胞收集

1. 移除平板中的培养基，使用 5 ml 预冷的 PBS/Phosphatase Inhibitors 清洗一次。移除液体加入 3 ml 预冷的 PBS/Phosphatase Inhibitors。若是使用的悬浮细胞，请将细胞沉淀，用 3 ml PBS/Phosphatase Inhibitors 清洗，然后直接进入 Step 3。
2. 用细胞刮刀轻轻刮取粘附的细胞，将细胞从培养皿中移出，或者通过离心法将悬浮细胞沉降。将细胞转移到预先冷却的 15 ml 锥形管中。

注：使用胰酶消化得到的细胞可能被激活了一些信号通路。

3. 4℃ 离心机中以 200 × g 离心力离心 5 min。
4. 去除上清，将细胞沉淀放置于冰上。

Step 2: 细胞质部分的收集

注：确保通过使用相差显微镜比较细胞裂解前后（Step 1 和 Step 2）的外观来验证细胞裂解效率和细胞核的释放。完整的细胞应该表现为一个深色的中央细胞核，周围有一圈密度较低的细胞质。

1. 于 500 μl 1 × Hypotonic Buffer 中轻柔的重悬细胞细胞，使用移液器缓慢吹打。转移均匀重悬后的细胞至预冷的离心管中。在冰上孵化 15 分钟，让细胞膨胀。
2. 加入 25 μl Detergent（对于组织，每 100 μl Hypotonic Buffer 中加入 5 μl Detergent），最高档涡旋震荡 10 s。
3. 在显微镜下检测细胞是否被有效裂解，细胞核是否释放。若细胞未能有效裂解，可使用预冷的 Dounce 均质器，使用 B 型杵进行研磨（详细参考附录中 Section A 部分的故障排除指南）。
4. 14,000 × g 离心力 4 °C 离心 30 s。
5. 转移上清（染色质部分）至预冷的离心管中。可将这部分上清-80°C 储藏直至使用。沉淀即为细胞核部分。

可选：保存的上清（细胞质部分）可以利用 western blot 检测分离效果和制备效率。

Step 3: 细胞核部分的收集

1. 利用 50 μl Complete Lysis Buffer 重悬细胞核沉淀，用移液器轻柔的上下吹打。

可选：加入 2.5 μl Detergent 有利于细胞核膜蛋白的溶解。一个非常粘稠的聚团可能无法完全重新悬浮。另外，也可以使用 Dounce 均质器（参考附录的 Section A 节中的故障排除指南了解更多信息）。在最高档位下涡旋震荡 10 s。

2. 将样本置于 150 rpm 的水平水平混合器上，冰上孵育 30 min。
3. 在最高档位下涡旋震荡 30 s。14,000 × g 下 4°C 离心 10 min。转移上清（细胞核部分）至新的预冷的离心管中。

可选：保留上清液的一部分（细胞核部分），以便通过 Western blot 检测分离效果和分离效率。

4. 等分样本并-80°C 保存。避免反复融冻。

注：某些洗涤剂或 PMSF 的存在可能会干扰 Bradford 检测，因此对你的样品进行 1:50 或 1:250 的稀释。用平板分光光度计在 595 纳米处读取吸光度（参考附录中 Section A 节中的稀释系列示例）。作为替代方案，可以尝试使用 Active Motif 的 ProStain™ Protein Quantification Kit（货号：15001），它具有更高的灵敏度和对许多污染剂的抵抗力。

B. 全细胞提取物的制备

以下实验方法依据样本量 8.8×10^6 cells 设计，参照 HeLa 细胞在 100 mm 培养皿中生长至融合状态。每个样本代表一次反应。提前按照第 5 页的建议配制 PBS/Phosphatase Inhibitors, Hypotonic Buffer 和 Complete Lysis Buffer。如果使用不同尺寸的培养皿，请根据缓冲液制备表调整体积。在开始实验前将缓冲液和任何需要的试管尽量放在冰上。

提取全细胞提取物的缓冲液配制表

缓冲液名称	组成成分	60 mm 平板	100 mm 平板	150 mm 平板
		或 3.2×10^6 个细胞	或 8.8×10^6 个细胞	或 2×10^7 个细胞
PBS/Phosphatase Inhibitors	10 × PBS	0.4 ml	0.8 ml	1.6 ml
	Distilled water	3.4 ml	6.8 ml	13.6 ml
	Phosphatase Inhibitors	0.2 ml	0.4 ml	0.8 ml
	总体积	4.0 ml	8.0 ml	16.0 ml
Complete Lysis Buffer	10 mM DTT	10.0 μl	30.0 μl	90.0 μl
	Lysis Buffer AM1	89.0 μl	267.0 μl	801.0 μl
	Protease Inhibitor Cocktail	1.0 μl	3.0 μl	9.0 μl
	总体积	100.0 μl	300.0 μl	900.0 μl

Step 1: 细胞收集

1. 移除平板中的培养基，使用 5 ml 预冷的 PBS/Phosphatase Inhibitors 清洗一次。移除液体加入 3 ml 预冷的 PBS/Phosphatase Inhibitors。若是使用的悬浮细胞，请将细胞沉淀，用 3 ml PBS/Phosphatase Inhibitors 清洗，然后直接进入 Step 3。
2. 细胞刮刀轻轻刮取粘附的细胞，将细胞从培养皿中移出，或者通过离心法将悬浮细胞沉降。将细胞转移到预先冷却的 15 ml 锥形管中。
3. 4°C 离心机中以 $200 \times g$ 离心力离心 5 min。
4. 去除上清，将细胞沉淀放置于冰上。

Step 2: 细胞裂解

1. 利用 300 μl Complete Lysis Buffer 重悬细胞沉淀，用移液器上下轻柔的吹打。
2. 将样本置于 150 rpm 的水平混合器上，冰上孵育 10 - 30 min。在显微镜下检查少量样本，以验证细胞是否被有效裂解，从而确定孵化时间。如果在这一步骤中细胞没有被充分裂解，则使用预冷的 Dounce 均质器和 B 型研磨杵来裂解细胞（参考附录 Section A 节中的故障排除指南，以获得进一步信息）。

注：在细胞未充分裂解前，请勿进行离心。

3. 在最高档位下涡旋震荡 30 s。14,000 × g 下 4℃ 离心 20 min。转移上清（全细胞提取物）至新的预冷的离心管中。
4. 等分样本并 -80℃ 保存。避免反复融冻。

可选：保留上清液的一部分，以便通过 Western blot 检测分离效果和分离效率。

注：某些洗涤剂或 PMSF 的存在可能会干扰 Bradford 检测，因此对你的样品进行 1:50 或 1:250 的稀释。用平板分光光度计在 595 纳米处读取吸光度（参考附录中 Section A 节中的稀释系列示例）。作为替代方案，可以尝试使用 Active Motif 的 ProStain™ Protein Quantification Kit（货号：15001），它具有更高的灵敏度和对许多污染剂的抵抗力。

实验方案 II：新鲜或冷冻组织

A. 组织的细胞核提取物制备

Step 1: 组织的均质化

我们建议只使用新鲜的组织样本。如果你有冷冻组织，我们建议您使用全细胞提取步骤（详见第 12 页）。然而，用冻存组织提取细胞核内提取物可能质量高，但产量会很低。所有步骤都在冰上或在 4°C 下用预冷的缓冲液和设备进行。一般来说，可以估计每毫克组织中有 2×10^5 个细胞。然而，我们强烈建议您在进行实验之前，对你的特定组织样品进行准确的细胞数量定量。

注：对于 Complete Lysis Buffer，要将 1M DTT 母液按 1:100 稀释成 10mM DTT。

从组织中提取核提取物的缓冲液配制表

缓冲液名称	组成成分	1 g	100 mg	50 mg
1 × Hypotonic Buffer (针对组织均质化)	10 × Hypotonic Buffer	400 µl	40 µl	20 µl
	Protease Inhibitor Cocktail	40 µl	4 µl	2 µl
	Phosphatase Inhibitors	400 µl	40 µl	20 µl
	Distilled water	3.2 ml	315 µl	158 µl
	1 M DTT	4 µl	0.4 µl	0.2 µl
	Detergent	4 µl	0.4 µl	0.2 µl
	总体积	4.0 ml	400 µl	200 µl
1 × Hypotonic Buffer (针对细胞质部分的分离)	10 × Hypotonic Buffer	50.0 µl	5.0 µl	2.5 µl
	Distill water	450.0 µl	45.0 µl	22.5 ml
	总体积	500.0 µl	50.0 µl	25.0 µl
Complete Lysis Buffer	10 mM DTT	5 µl	0.5 µl	0.25 µl
	Lysis Buffer AM1	44.5 µl	4.45 µl	2.22 µl
	Protease Inhibitor Cocktail	0.5 µl	0.05 µl	0.025 µl
	总体积	50.0 µl	5.0 µl	2.5 µl
Detergent (可选) *	总体积	2.5 µl	0.5 -1 µl	0.5 -1 µl

* 在核聚集物中加入 Detergent 可能有助于蛋白质的溶解，特别是那些与膜或染色质紧密联系的蛋白质。

注：试剂的使用量可能需要针对每个组织进行优化。

1. 在制备过程中迅速高效的^{操作能够很好的保护组织质量。}
2. 对于 1 g 组织样本，为了获得单细胞匀浆，需对组织块进行如下处理：
*新鲜组织：*用干净的刀片或手术刀将组织切成 1-3 mm³ 的小块。在冷的陶瓷研钵中进行这一步骤，以保持组织的低温（研钵可通过将其底部浸入液氮中来保持低温）。在预先冷却的干净 Dounce 均质器中收集小块，用 A 型杵进行匀浆化。
*冻存组织：*用浸泡在液氮中的研钵和研杵压碎所需数量的冷冻组织。可以将一些液氮与冷冻组织一起放在研钵中。研杵可以用液氮冷却。
3. 本示例实验步骤使用 1g 冷冻组织，请根据上表中的组织量调整体积。在冰上，每克组织加入 3ml 冰冷的预冷的 1× Hypotonic Buffer（含有磷酸酶和蛋白酶抑制剂，并辅以 DTT 和洗涤剂），使用 Dounce 均质器和 A 型杵进行约 20 下研磨以破坏组织。在显微镜下检查以确保细胞被解离，继续均质化处理直到得到单细胞悬液。
4. 冰上孵育 15 min。
5. 850 × g 离心力下 4℃ 离心 10 min。转移上清至新的预冷离心管中。
可选：保留上清液的一部分上清，以便通过 Western blot 检测分离效果和分离效率。
6. 到了这一步，组织已被均质化为单细胞浆。但大多数细胞还没有被裂解，需进一步对细胞裂解，后续需继续进行实验方案 I：贴壁细胞和悬浮细胞中细胞核提取物制备方案中的 Step 2 的第 1 步基于 100 mm 的组织培养板（8.8 × 10⁶）的操作步骤。

B. 组织全细胞提取物的提取

从组织中提取核提取物的缓冲液配制表

缓冲液名称	组成成分	1 g	100 mg	50 mg
Complete Lysis Buffer	10 mM DTT	4 μ l	0.4 μ l	0.2 μ l
	Lysis Buffer	3.6 ml	356 μ l	178 μ l
	Protease Inhibitor Cocktail	40 μ l	4 μ l	2 μ l
	Phosphatase Inhibitors	400 μ l	40 μ l	20 μ l
	总体积	4.0 ml	400 μ l	200 μ l

注：试剂的使用量可能需要针对每个组织进行优化。

1. 对于 1 g 的组织样本，使用干净的刀片将组织切成 1 – 3 mm³ 的小块，并收集在预冷的 15 ml 锥形管内。
2. 在冰上，用 Dounce 均质器将每克组织在 3 ml 预冷的 Complete Lysis Buffer 中均质化组织。在所有过程中保持温度在 4°C。均质化后在冰上孵育 30 min。

注：冻结的组织可以切得很薄，并在此缓冲液中解冻。当使用机械匀浆器时，以慢速开始匀浆，直到组织被打成小块，然后将速度提高到最大，持续 45-60 s。避免产生多余的热量或泡沫。

3. 转移至预冷的离心管中，以 10,000 × g 离心力下 4°C 离心 10 min。
4. 将上清液转移到新的预冷管中并再次离心。将上清液汇集到同一管中。上清液包含全细胞裂解液。有时需要更长时间的离心以获得澄清的裂解液。
5. 等分样本并 -80°C 保存。避免反复融冻。

注：某些洗涤剂或 PMSF 的存在可能会干扰 Bradford 检测，因此对你的样品进行 1:50 或 1:250 的稀释。用平板分光光度计在 595 纳米处读取吸光度（参考附录中 Section A 节中的稀释系列示例）。作为替代方案，可以尝试使用 Active Motif 的 ProStain™ Protein Quantification Kit（货号：15001），它具有更高的灵敏度和对许多污染剂的抵抗力。

附录

Section A. Bradford 蛋白质定量的稀释示例

以下是准备进行 Bradford 试验的稀释阵列的示例

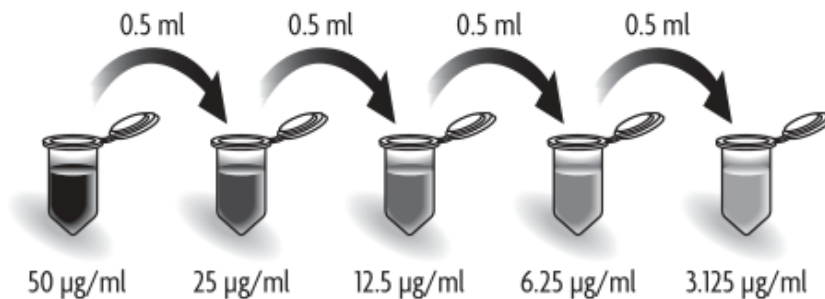
1. 利用 Bradford 检测蛋白浓度，首先要准备 BSA（下面的例子使用 5 mg/ml 的 BSA 作为母液）。
注：在测定蛋白质浓度之前，需要对 Complete lysis buffer 中的 DTT 和 protease inhibitors 进行稀释。在进行适当的蛋白梯度稀释之前，将 DTT 和 protease inhibitors 加入裂解缓冲液是很重要的。
2. 稀释 Complete Lysis Buffer 为蛋白浓度分析做准备。建议稀释度为 1:50 或 1:250。确定要进行分析的空白和标准孔的数量，并制备足够稀释的 1:50 或 1:250 Lysis buffer 缓冲液，以进行所有稀释。用蒸馏水稀释。按照 Bradford 分析说明计算每个孔所需的体积。

示例： Lysis Buffer 1 : 50 stock = 30 μ l Complete Lysis Buffer + 1470 μ l H₂O

Lysis Buffer 1 : 250 stock = 6 μ l Complete Lysis Buffer + 1494 μ l H₂O

3. 取 10 μ l 5 mg/ml 的 BSA 溶解于 990 μ l Complete Lysis Buffer 中，配制成 50 μ g/ml 的 BSA 溶液。下一步，分装四管 0.5 ml 的 Complete Lysis Buffer。使用 50 μ g/ml 的 BSA 溶液制备如下的稀释系列。下面的例子标准使用了以下浓度：50、25、12.5、6.25、3.125 μ g/ml。

注意：前面的范围是作为指导，可以使用更广泛的数值。具体数值设置请依据您的 Bradford 实验说明。每次转移前，请充分混合试管。准备好空白和样品。50 μ g/ml 的标准品为高标准品，空白品（仅完整裂解缓冲液）为 0.0 μ g/ml。



示例： 10 μ l BSA (5 mg/ml) + 0.99 ml Complete Lysis Buffer (1 : 50 或 1 : 250 稀释比) = 50 μ g/ml

取上一步 0.5 ml 与 0.5 ml Complete Lysis Buffer (1 : 50 或 1 : 250 稀释比) = 25 μ g/ml

取上一步 0.5 ml 与 0.5 ml Complete Lysis Buffer (1 : 50 或 1 : 250 稀释比) = 12.5 μ g/ml

取上一步 0.5 ml 与 0.5 ml Complete Lysis Buffer (1 : 50 或 1 : 250 稀释比) = 6.25 μ g/ml

取上一步 0.5 ml 与 0.5 ml Complete Lysis Buffer (1 : 50 或 1 : 250 稀释比) = 3.125 μ g/ml

空白样 = Complete Lysis Buffer (1 : 50 或 1 : 250 稀释比)

标准样 = 含梯度稀释 BSA 的 Complete Lysis Buffer (1 : 50 或 1 : 250 稀释比)

实验样本 = 1 μ l 样本加入 49 μ l 或 249 μ l 蒸馏水

4. 根据 Bradford 实验说明，用分光光度计在 595 nm 处测量吸光度，分析空白，标准品和样品。

附录

Section B. 故障排除指南

故障/问题	可能原因	建议
细胞质中蛋白提取浓度低	提取试剂的体积不适合给定的细胞数量	调整 "准备缓冲液快速图表" 中指示的试剂体积。
	实验方案 I 制备细胞核提取物的 step 2 的第 1 步中, 细胞颗粒中细胞质膜未被完全破碎	使用移液器轻柔的上下吹打破坏细胞颗粒。在显微镜下监测裂解情况。使用具有小间隙的 B 型杵进行 Dounce 均质化。
细胞核提取物浓度低	裂解缓冲液的体积或起始细胞数不准确	减少 Lysis buffer 的用量, 或增加细胞的使用量
	提取试剂的体积不适合给定的细胞数量	调整 "准备缓冲液快速图表" 中指示的试剂体积。
	细胞核破裂后核蛋白溶解在细胞质中	在显微镜下观察。减少涡旋、离心力和在实验方案 I (第 7 页) 的细胞核提取物制备部分 Step 2 中第 2 和 3 步的时间, 当细胞核被释放时停止孵育。
	实验方案 I 中制备细胞核提取物的 Step 3 中第 1 步中未充分分散核沉淀物 (第 7 页)	彻底涡旋以确保核裂解。如果颗粒溶解有困难, 则使用 Dounce 均质器。
无论是细胞核还是细胞质的蛋白产量都很低	细胞类型不适合	肿胀和裂解条件以及试剂需要针对这种细胞类型进行优化。
	过裂解	细胞质部分存在核蛋白。减少在低渗缓冲液中的孵化时间。对于冷冻样品, 细胞质部分会因冷冻/解冻过程中的核裂解而出现蛋白。
	不完全裂解	在加入洗涤剂后, 在显微镜下检查细胞是否存在游离的细胞核, 以表明有效的裂解。另外, 用带有小间隙(B)杵的冷冻 Dounce 匀浆器进行 10 次搅拌, 以完全裂解细胞。
蛋白质核质间分离性差	细胞质部分的去除不完全	确保在加入裂解缓冲液之前, 从核颗粒中去除所有的细胞质部分。
提取的蛋白无活性或活性低	回收的蛋白已经降解	在实验过程中保持低温要求。将实验时间限制在最短, 并立即速冻等分。加入更多或不同的蛋白酶抑制剂。
核团是粘性的, 无法重新悬浮	核的聚团不均匀分散	彻底涡旋以确保核裂解。如果核难以溶解, 则使用 Dounce 均质器。某些细胞类型会产生粘稠的核团, 但仍能从核提取中产生有效的产量。