



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// [www.real-tims.com.cn](http://www.real-tims.com.cn)

E-mail: [real-times@vip.163.com](mailto:real-times@vip.163.com)

## Blue/Clear 非变性凝胶电泳试剂盒（手灌胶） Blue/Clear Native PAGE Electrophoresis Kit

Ver.731270

货号	名称	包装
RTD6140	Blue/Clear 非变性凝胶电泳试剂盒(手灌胶)	10 次

### ● 货品内容：

组份	货号	名称	规格	保存
1	RTD6140-01	2×BN/CN 凝胶缓冲液	40 ml	4℃
2	AC2914-30ml	40% PAA (29:1)	30 ml	4℃
2	BC500P	10×BN/CN PAGE 电泳缓冲液(干粉)	500 ml	RT
3	PL114-01	4×BN/CN-PAGE 蛋白上样缓冲液	1 ml	-20℃
4	BC270	2% G-250 染料（电泳用）	20 ml	4℃
5	BC260-01	5% G-250 染料（上样用）	1 ml	4℃
6	SR0510	浓缩胶红色添加染料(200×)	0.5 ml	RT
7	AP020P	APS（干粉）	0.5 g	RT(配制后-20℃贮存)
8	TA0761	TEMED	0.5 ml	4℃ 避光
9		说明书	一份	

### ● 产品简介：

Blue/Clear Native PAGE（BN/CN-PAGE）是一种从生物样品（质膜，胞浆等）中分离分子量 10 kD-10 M kD 范围的蛋白质复合物的电泳技术。其原理是用温和去污剂(如 DDM, digitonin)将蛋白复合体从细胞膜中以近似天然的状态分离出来，Blue Native PAGE（BN-PAGE）是用考马斯亮蓝 G-250 代替 SDS 与蛋白结合而使其带负电荷，根据蛋白分子量不同在 PAGE 胶中得到分离；Clear Native PAGE（CN-PAGE）是电泳缓冲液中不加入任何染料，电泳中始终保持蛋白的天然电荷和活性状态，然而，其蛋白的分辨率要低于 Blue Native PAGE。另外，BN-PAGE 由于考马斯亮蓝 G-250 存在，使蛋白都覆盖上负电荷，可以分离碱性蛋白（ $pI > 7$ ）和酸性蛋白（ $pI < 7$ ）；而 CN-PAGE 只适合于酸性蛋白（ $pI < 7$ ）的分离。

本产品包括 BN/CN-PAGE 制胶的所有成分，方便使用。可以用于分离分子量在 10 kD-500 kD 的蛋白复合体，样品可以来自于胞浆、细胞总裂解液、细胞膜、线粒体膜和叶绿体膜等。电泳后可直接用于考染、银染、Western 杂交、SDS-PAGE 电泳、蛋白纯化、蛋白活性检测等分析实验，也可直接用于电洗脱制备蛋白。

试剂盒配套有红色浓缩胶添加染料,凝固后的浓缩胶为红色,有利于在蓝色电泳缓冲液中观察加样孔,方便上样。本试剂盒大约可以配制 8-25 块常规大小 (8×10 cm) PAGE 凝胶,具体数量根据凝胶浓度和厚度决定,1 mm 厚度 8%凝胶可以配制至少 10 块胶。

● **运输和贮存:**

本产品常温运输;组份按照标签温度贮存;有效期一年。

● **使用说明:**

一. **样品制备:**

该试剂盒不含样品制备的相关试剂,根据样品种类,具体选择不同提取方法。植物类囊体 BN 样品制备可以选择植物类囊体膜提取试剂盒(货号:RTU5002);动物总蛋白 BN 样品制备可以选择动物活性蛋白提取试剂盒(不含去垢剂)(货号:RTD8106);动物膜蛋白 BN 样品制备可以选择动物膜蛋白提取试剂盒(细胞)(货号:RTD8111)和动物膜蛋白提取试剂盒(组织)(货号:RTD8112);动物线粒体 BN 样品制备可以选择动物细胞线粒体提取试剂盒(货号:RTD8115)和动物组织线粒体提取试剂盒(货号:RTD8117)。

二. **制胶:**

2.1 **分离胶制备:**

2.1.1 不同浓度的分离胶的最佳分离范围:

分离胶浓度	最佳分离范围
6%	80-500 kD
8%	50-350 kD
10%	20-150 kD
12%	15-100 kD
15%	10-80 kD

2.1.2 根据表一,将不同体积的成分在小烧杯中混合,轻轻搅拌使其混匀,避免产生气泡

2.1.3 在凝胶模具中灌入适量分离胶溶液(对于 mini-gel,凝胶液加至约距前玻璃板顶端 1.5 cm 或距梳齿约 0.5 cm 即可),然后在分离胶溶液上轻轻覆盖一层 1-3 cm 的水层,使凝胶表面保持平整。

2.1.4 静置 15-30 分钟,待分离胶和水层之间出现一个清晰的界面后,说明凝胶已聚合。

注:凝胶的聚合时间与环境温度有关。夏天温度较高时,聚合较快;冬天气温低时,聚合时间会延长。

可以根据环境温度的不同调节 APS 的加入量。

表一 **Blue/Clear Native PAGE 分离胶配方表(以一块 1.0 mm 厚度 mini 胶为例)**

组份	分离胶总体积 5 ml				
	6%	8%	10%	12%	15%
	组份加入体积 (ml)				
灭菌水	1.7	1.45	1.2	0.95	0.57
2×BN/CN 凝胶缓冲液	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
40% PAA (29:1)	0.75	1	1.25	1.5	1.875
10% APS	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005

## 2.2 浓缩胶制备:

2.2.1 去除覆盖在分离胶上的水层。

2.2.2 按照表二将不同成分在一个小烧杯中混合, 轻轻搅拌使其混匀, 避免产生气泡。

2.2.3 将浓缩胶溶液加至分离胶的上面, 直至凝胶溶液到达前玻璃板的顶端。

2.2.4 将梳子插入凝胶内, 避免产生气泡。

2.2.5 静置 30-60 分钟, 等待浓缩胶聚合。

注: 凝胶的聚合时间与环境温度有关。夏天温度较高时, 聚合较快; 冬天气温低时, 聚合时间会延长。可以根据环境温度的不同调节 APS 的加入量。

表二 **Blue/Clear Native PAGE 浓缩胶 (4%) 配方表** (以一块 1.0mm 厚度 mini 胶为例)

组份	各组份的取样量 (总体积 2 ml)
H <sub>2</sub> O	0.8 ml
2×BN/CN 凝胶缓冲液	1 ml
40% PAA (29:1)	0.2 ml
浓缩胶红色添加染料(200×)	10 μl
10% APS	20 μl
TEMED	2 μl

## 三. 电泳:

### 3.1 准备电泳缓冲液:

将 10×BN/CN PAGE 电泳缓冲液 (干粉) 溶于 500 ml 灭菌水中, 彻底溶解, 不要调节 pH。用前稀释 10 倍即配成 1×BN/CN PAGE 电泳缓冲液。

#### 3.1.1 CN-PAGE 电泳:

阳极缓冲液(外槽)和阴极缓冲液(内槽)均直接使用 1×BN/CN PAGE 电泳缓冲液进行电泳。

#### 3.1.2 BN-PAGE 电泳:

阳极缓冲液(外槽)使用 1×BN/CN PAGE 电泳缓冲液, 阴极缓冲液(内槽)按照下表配制:

	1×蓝色阴极缓冲液
	150 ml
10×BN/CN PAGE 电泳缓冲液	15 ml
2% G-250 染料 (电泳用)	1.5 ml
超纯水	定容至 150 ml

### 3.2 准备样品:

#### 3.2.1 CN-PAGE 电泳:

总体积	10 μl
蛋白样品	x μl
4×BN/CN-PAGE 蛋白上样缓冲液	2.5 μl
超纯水	补至 10 μl

### 3.2.2 BN-PAGE 电泳:

#### 3.2.2.1 植物类囊体膜蛋白电泳:

总体积	10 $\mu$ l
	含去垢剂样品*
植物类囊体膜蛋白样品 (2%DDM 增溶)	x $\mu$ l
4 $\times$ BN/CN-PAGE 蛋白上样缓冲液	2.5 $\mu$ l
5% G-250 染料 (蛋白上样)	1 $\mu$ l
超纯水	补至 10 $\mu$ l
	不要加热

\*植物类囊体膜蛋白电泳中, 含去垢剂样品中染料加入按照以下原则:

植物类囊体样品中 G250 终浓度为去垢剂终浓度的 1/4。例如样品中 DDM (n-Dodecyl  $\beta$ -D-maltoside,  $\beta$ -DM, n-十二烷基- $\beta$ -D-麦芽糖苷) 终浓度为 2%, 则需要 G-250 终浓度为 0.5%。10  $\mu$ l 蛋白样品中需要加 5% G-250 染料 1  $\mu$ l。

#### 3.2.2.2 动物线粒体 BN 样品电泳:

总体积	10 $\mu$ l
	含去垢剂样品*
动物线粒体 BN 样品 (1%DDM 增溶)	x $\mu$ l
4 $\times$ BN/CN-PAGE 蛋白上样缓冲液	2.5 $\mu$ l
5% G-250 染料 (蛋白上样)	0.25 $\mu$ l
超纯水	补至 10 $\mu$ l
	不要加热

\*动物线粒体 BN 样品电泳中, 含去垢剂样品中染料加入按照以下原则:

动物线粒体 BN 样品中 G250 终浓度为去垢剂终浓度的 1/8。例如样品中 DDM 终浓度为 1%, 则需要 G-250 终浓度为 0.125%。10  $\mu$ l 蛋白样品中需要加 5% G-250 染料 0.25  $\mu$ l。

#### 3.2.2.3 不含去垢剂样品:

总体积	10 $\mu$ l
不含去垢剂样品	x $\mu$ l
4 $\times$ BN/CN-PAGE 蛋白上样缓冲液	2.5 $\mu$ l
5% G-250 染料 (蛋白上样)	- #
超纯水	补至 10 $\mu$ l
	不要加热

# 不含去垢剂样品可以不必添加 5%G-250 染料。

### 3.3 电泳过程:

#### 3.3.1 CN-PAGE 电泳:

电泳内外槽均使用 1 $\times$ BN/CN PAGE 电泳缓冲液。在电泳槽的内槽内加入 1 $\times$ BN/CN PAGE 电泳缓冲液(让电泳缓冲液漫过加样孔), 轻轻拨出预制胶梳子, 用 1ml 吸头冲洗加样孔 3 次, 随后在电泳槽外槽加入适量的 1 $\times$ BN/CN PAGE 电泳缓冲液。

CN-PAGE 电泳			
恒电压	起始电流	结束电流	电泳时间
120V	10-15mA/板胶	4-10mA/板胶	50+min
注：冰浴电泳			

### 3.3.2 BN-PAGE 电泳：

BN-PAGE 电泳外槽使用 1×BN/CN 电泳缓冲液；内槽开始电泳使用的是 1×蓝色阴极缓冲液，冰浴电泳，等待电泳指示前沿到达距离凝胶顶部 2/3 处时，将电泳缓冲液更换为 1×BN/CN 电泳缓冲液，继续后续电泳，因为过多染料会影响蛋白在凝胶中的迁移以及蛋白后续的转膜实验。

#### BN-PAGE 电泳条件（一板胶）

恒电压	起始电流	电泳时间	缓冲液	
120 V	8-15 mA	35-45 min	1×蓝色阴极缓冲液	冰浴电泳



指示前沿至凝胶顶部三分之二处，更换内槽缓冲液为无色 1×BN/CN 电泳缓冲液

恒电压	继续电泳时间	结束电流	缓冲液	
120 V	45 min +	3-5 mA	1×BN/CN 电泳缓冲液	冰浴电泳

注：在 Blue Native PAGE 凝胶电泳期间，电流下降至低于 1 mA 很常见。有些电泳电源如伯乐电源有负载检查功能，电流过低（低于 4mA）会认为没有负载，报错 E1 错误代码，终止电泳。解决方法是更换电泳电源，如使用国产电源；另外可以调高电压高于 300 V，使得电流不要低于 4mA。

## 四. 转膜：

BN-PAGE 转膜必须用 PVDF 膜，不能用 NC 膜，因为 NC 膜与 G-250 结合非常紧密。

转膜缓冲液可以使用 10×BN 转膜缓冲液（货号：BC600P）。转膜后 PVDF 膜上的蓝色可以用无水甲醇漂洗 2-3 分钟去除干净后进行后续的 WB 操作。

## 五. 染色：

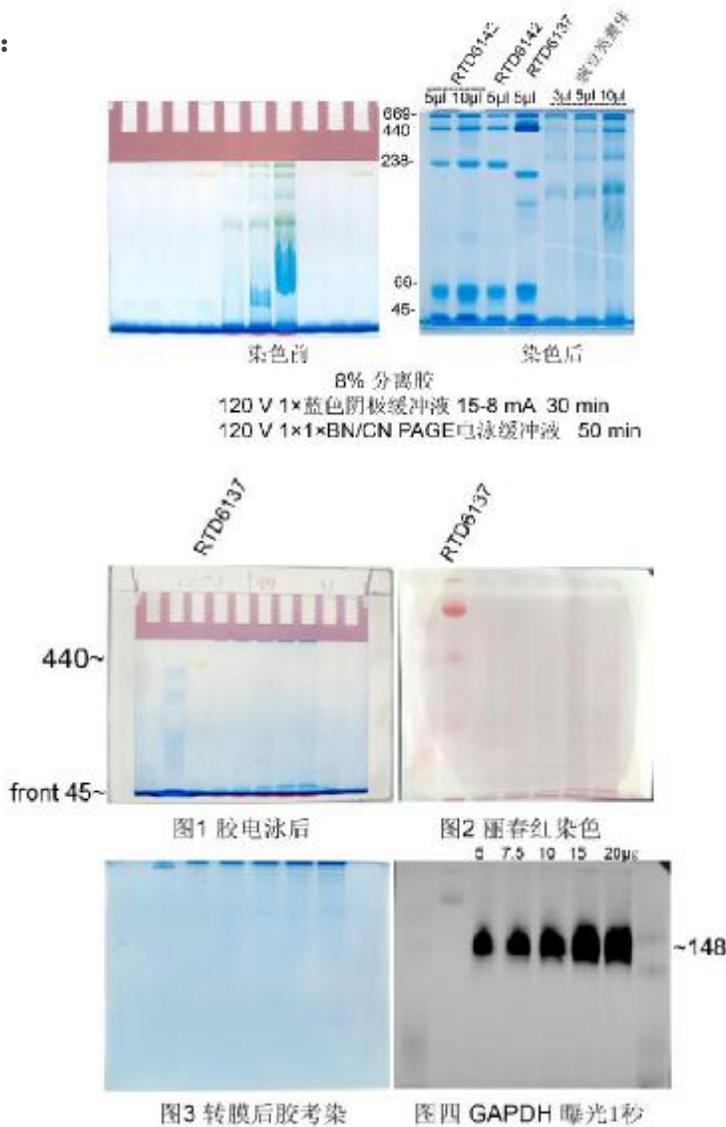
5.1 将电泳后的 PAGE 胶取下放入塑料容器中，加入适量 FastBlue 蛋白染色液（以刚刚覆盖过胶面为适），高于 1 μg 含量的蛋白条带 1-2 分钟即可见。

5.2 摇床常温摇动 10-15 分钟至条带清晰可见。

5.3 加入适量蒸馏水脱色，期间更换 1-2 次蒸馏水，摇床常温摇动 10-15 分钟至背景干净。

5.4 观察保存结果。

## 六. 实验示例:



### RTD6140 Blue/Clear 非变性凝胶电泳试剂盒（手灌胶） WB 检测

样品处理: K562 悬浮细胞提取胞浆活性蛋白 (货号: RTD6106 动物活性蛋白提取试剂盒 (不含去垢剂))

4×BN/CN-PAGE 蛋白上样缓冲液 (货号: PL114) 调整蛋白浓度为 1μg/μl 上样液, 梯度上样 5-20μg

电泳: 8% BN 手灌胶, 稳压 200V 1×蓝色阴极缓冲液至指示前沿距离胶上沿 2/3 处, 更换为无色 1×BN/CN PAGE 电泳缓冲液, 电泳时间共 83 分钟

转膜: 0.45 μm PVDF 膜, 10×BN 转膜缓冲液 (货号: BC600P) 稀释为 1×BN 转膜缓冲液加 20% 甲醇, 恒流 200mA 2 小时, 未冰浴。

转膜效果检测: 膜用丽春红染色液染色 (货号: RTD6301) 有可见条带, 胶用 FastBlue 蛋白

染色液染色（货号：RTD6202）几乎无条带，证明转膜成功。膜用无水甲醇清洗 5 分钟去除膜上蓝色残余。

封闭：Western 快速封闭液（货号：WR5020） RT 封闭 10 分钟；

一抗：兔单抗 GAPDH 1:10000 RT 60min；二抗：羊抗兔 IgG-HRP 1:5000 RT 60min，

ECL 检测：RealECL 发光液（货号：EC2520），曝光 1 秒。