



RTD6139

Ver. 740356

Blue/Clear非变性凝胶电泳试剂盒

Blue/Clear Native PAGE Electrophoresis Kit

产品编号及规格:

货号	说明	规格
RTD6139-0312 (含3-12%预制胶, 通用型)		10次
RTD6139-0416 (含4-16%预制胶, 通用型)		10次

贮存和运输:

按照标签温度贮存; 试剂盒常温运输; 有效期一年。

产品组成:

名称	规格	贮存
RTD6138-0312 3-12% RealPAGE Native 或 BN/CN 预制胶(U型板, 通用型)	10板	4℃
RTD6138-0416 4-16% RealPAGE Native 或 BN/CN 预制胶(U型板, 通用型)	10板	4℃
BC500P 10×BN/CN PAGE电泳缓冲液(干粉)	500 ml	RT
PL114-01 4×BN/CN-PAGE蛋白上样缓冲液	1 ml	-20℃
BC270 2% G-250染料(电泳用)	20 ml	4℃
BC260-01 5% G-250染料(上样用)	1 ml	4℃

产品简介:

Blue/Clear Native PAGE (BN/CN-PAGE) 由Schägger等建立的一种电泳系统, 最初被用来分离牛心脏组织中线粒体上的蛋白质复合物。由于在研究蛋白复合物上的优势, BN/CN-PAGE被用于线粒体膜、类囊体膜、质膜等膜蛋白复合物的研究。

在做植物类囊体膜的BN-PAGE电泳时, 结合叶绿素的蛋白质复合物呈绿色, 而不含叶绿素的呈蓝色, 因此又称之为蓝绿温和胶电泳。BN/CN-PAGE通常可以分离分子量10 kD-10 M kD范围的蛋白质复合物。其原理是用温和去污剂(如 DDM, digitonin)将蛋白复合物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($pI > 7$); 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-10M kD的蛋白复合物, 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。

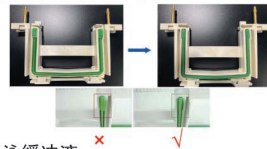
使用说明:

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胞浆活性蛋白提取试剂盒(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(货号:RTD8111, RTD8112); 动物线粒体BN样品制备可以选择动物线粒体提取试剂盒(货号:RTD8115和RTD8116)。

二. 电泳:

2.1 拆开预制胶包装, 将预制胶安装在合适的电泳槽中。注: 伯乐Mini III或Mini-PROTEAN Tetra Cell, 天能VE-180, 六一-24K系列电泳槽请确保密封条的安装方向(下图)。六一其他系列, 君意东方JY-SCZ2/4, 百晶BG-verMINI等电泳槽可以直接使用预制胶。不兼容Thermo系列电泳槽。



2.2 准备电泳缓冲液:

将10×BN/CN PAGE电泳缓冲液(干粉)溶于500 ml水中, 彻底溶解, 测定pH应为7.0左右, 不要调节pH。用前稀释10倍即配成1×BN/CN PAGE电泳缓冲液。

2.2.1 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。

2.2.2 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 配制量 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

2.3 准备样品:

2.3.1 CN-PAGE电泳:

	总体积 10 μ l
蛋白样品	x μ l
4 \times BN/CN-PAGE蛋白上样缓冲液	2.5 μ l
超纯水	补至10 μ l

2.3.2 BN-PAGE电泳:

2.3.2.1 植物类囊体膜蛋白电泳:

	总体积 10 μ l
	含去垢剂样品
植物类囊体膜蛋白样品(2%DDM增溶)	x μ l
4 \times BN/CN-PAGE蛋白上样缓冲液	2.5 μ l
5% G-250染料 (蛋白上样)	1 μ l
超纯水	补至10 μ 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终浓度为2%, 则需要G-250终浓度为0.5%。10 μ l蛋白样品中需要加5% G-250染料1 μ l。

2.3.2.2 动物线粒体BN样品电泳:

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

2.4 电泳过程:

2.4.1 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, 随后在电泳槽外槽加入适量的1 \times BN/CN PAGE电泳缓冲液, 冰浴电泳。

CN-PAGE电泳 (一板胶)

恒电压	起始电流	结束电流	时间
120 V	10-15 mA	4-10 mA	50+ min

2.4.2 BN-PAGE电泳:

BN-PAGE电泳外槽使用1 \times BN/CN电泳缓冲液; 内槽开始电泳使用的是1 \times 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位置时, 将电泳缓冲液更换为1 \times 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
150 V	8-15 mA	45 min+	1 \times 蓝色阴极缓冲液



指示前沿至距离凝胶顶部三分之二处, 更换内槽缓冲液为1 \times BN/CN 电泳缓冲液

恒电压	继续电泳时间	结束电流	缓冲液
150 V	45 min+	2-5 mA	1 \times BN/CN缓冲液

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。

三. 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, 不易去除。转膜后PVDF膜上的蓝色染料可以用无水甲醇漂洗去除。转膜缓冲液推荐使用10 \times BN转膜缓冲液(货号: BC600P)。

四. 染色:

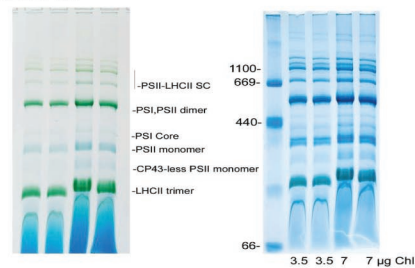
4.1 将电泳后的PAGE胶取下放入塑料容器中, 加入适量FastBlue蛋白染色液(货号: RTD6202)或常规考马斯亮蓝染色液, 以刚刚覆盖过胶面为适。

4.2 摇床常温摇动, 至条带清晰可见。

4.3 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。

4.4 观察保存结果。

五. 实验示例:



BN-PAGE 3-12% Precast Gel
稳压120V 1.5 h 1 \times BN/CN电泳缓冲液 冰浴电泳

六. 发表文章:

1. [2021 IF=10.15] SIRIP1b is a global organellar RNA editing factor, required for normal fruit development in tomato plants
Author: Jinyan Li, Keru Wang, Yunbo Luo, Hongliang Zhu
植物材料: 西红柿线粒体蛋白
Journal: *New Phytologist* (2023) 237: 1188–1203