



Ver. 750172-1.0



RTD6140

Blue/Clear 非变性凝胶电泳试剂盒 (手灌胶)

产品货号及规格:

货号	规格
RTD6140	10次

产品组成:

组份货号	组份名称	规格	贮存
RTD6140-01	2×BN/CN凝胶缓冲液	40 ml	4°C
AC2914-30ml	40%PAA(29:1)	30 ml	4°C
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°C
BC270	2% G-250染料 (电泳用)	20 ml	RT
BC260-01	5% G-250染料 (上样用)	1 ml	4°C
SR0510	浓缩胶红色添加染料(200×)	0.5 ml	RT
AP020P	APS(干粉)	0.5 g	RT(配制后-20°C)
TA0761-01	TEMED	0.5 ml	4°C避光

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蛋白质复合物, 后来被用于线粒体膜、类囊体膜、质膜等膜蛋白复合体的研究。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。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, 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; 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, 可以用于分离分子量在 10-500 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。

试剂盒配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。

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); 动物胞浆蛋白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); 动物细胞总蛋白(不含膜蛋白)BN样品制备可以选择非变性裂解液(哺乳动物细胞)(货号:RL1080); 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. 制胶:

2.1 分离胶制备:

2.1.1 根据目的蛋白的分子量大小选择合适的凝胶浓度:

表一 不同浓度分离胶的推荐分离范围

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

2.1.2 10% APS配制-5 ml: 将0.5 g APS干粉溶于5 ml 灭菌水中, 彻底溶解后分装, 1 ml/支, -20°C 备存, 每次取一管使用。10% APS应尽量减少常温存放时间, 以防失效。10% APS在4°C有效期为一周, -20°C有效期6个月。若发现凝胶聚合时间延长, 应考虑更换使用-20度保存的10% APS。

2.1.3 按照表二将不同体积的成分在小烧杯中混匀; 随后加入10% APS和TEMED, 轻轻搅拌使其混匀, 避免产生气泡。

表二 Blue/Clear Native PAGE分离胶配方表 (以一块1.0 mm厚度mini胶为例)

	浓缩胶		分离胶			
	4%	6%	8%	10%	12%	15%
超纯水	0.8 ml	1.7 ml	1.45 ml	1.2 ml	0.95 ml	0.57 ml
40% PAA(29:1)	0.2 ml	0.75 ml	1 ml	1.25 ml	1.5 ml	1.875 ml
2×BN/CN凝胶缓冲液	1 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
浓缩胶红色添加染料	10 μl	-	-	-	-	-
10% APS	20 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
TEMED	2 μl	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl
总体积	2 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml

2.1.4 在玻璃板中灌入适量分离胶溶液, 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。
2.1.5 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。

2.2 浓缩胶制备:

2.2.1 去除覆盖在分离胶上的水层;按照表二将不同成分混合, 将溶液加至分离胶的上面, 插入梳子;
2.2.2 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。

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超纯水中,彻底溶解,不要调节pH。用前稀释10倍即配成1×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×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×电泳缓冲液,阴极缓冲液(内槽)要使用1×蓝色阴极缓冲液,如150 ml 1×BN/CN PAGE电泳缓冲液加入1.5 ml 2% G-250染料(货号:BC270)。

3.2准备样品:

3.2.1 CN-PAGE电泳:

	总体积 10μl
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 BN-PAGE电泳:

3.2.1 植物类囊体膜蛋白电泳:

	总体积 10μl
	含去垢剂样品
植物类囊体膜蛋白样品(2%DDM增溶)	x μl
4×BN/CN-PAGE蛋白上样缓冲液	2.5 μl
5% G-250染料(蛋白上样)	1 μl
超纯水	补至10 μl

植物类囊体膜蛋白电泳中,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 μl蛋白样品中需要加5% G-250染料(货号:BC260) 1 μl。

3.2.2 动物线粒体BN样品电泳:

	总体积 10μl
	含去垢剂样品
动物线粒体BN样品(1%DDM增溶)	x μl
4×BN/CN-PAGE蛋白上样缓冲液	2.5 μl
5% G-250染料(蛋白上样)	0.25 μl
超纯水	补至10 μl

动物线粒体BN样品电泳中,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 μl蛋白样品中需要加5% G-250染料0.25 μl。

3.2.3 不含去垢剂样品:

不含去垢剂样品可以不必添加5%G-250染料。样品直接与4×BN/CN-PAGE蛋白上样缓冲液按照1:3比例混合后上样。

3.3电泳过程:

3.3.1 CN-PAGE电泳:

电泳内外槽均使用1×BN/CN PAGE电泳缓冲液。在电泳槽内槽内加入1×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×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

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位置时,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



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×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。

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,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×BN转膜缓冲液(货号:BC600P)。

五. 染色:

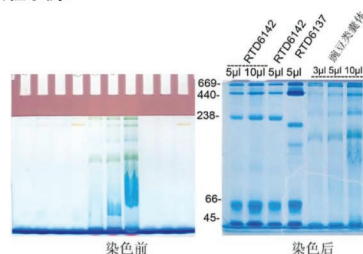
5.1 将电泳后的PAGE胶取下放入塑料容器中,加入适量FastBlue蛋白染色液(货号:RTD6202)或常规考马斯亮蓝染色液,以刚刚覆盖过胶面为适。

5.2 摇床常温摇动,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:



BN-PAGE 8% Gel

稳压120 V 15-8 mA 30min 1×蓝色阴极缓冲液
稳压120 V 50 min 1×BN/CN PAGE电泳缓冲液