

Blue/Clear非变性凝胶电泳试剂盒（4-16%预制胶）

产品货号：T15657

产品规格：10T

产品简介：

Blue/Clear Native PAGE（BN/CN-PAGE）的原理是：用温和去污剂（如DDM，digitonin）将分子量在10kDa-10MkDa范围的蛋白质复合物从生物样品（胞浆、细胞总裂解液、细胞膜、线粒体膜和叶绿体膜等）中以近似天然的状态分离出来，并通过电泳进行分析的技术。Blue Native PAGE（BN-PAGE）利用考马斯亮蓝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，可以分离碱性蛋白（ $pI > 7$ ）；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，只适合于酸性蛋白（ $pI < 7$ ）的分离。CN-PAGE的分辨率要低于BN-PAGE。

传统的Blue/Clear非变性凝胶电泳需要试剂及染料种类繁多、成分复杂，配制过程冗杂，且经常会出现条带不美观、不理想的情况。Blue/Clear非变性凝胶电泳试剂盒提供了BN/CN-PAGE电泳过程的所有成分，使用方便。电泳后的样品可直接用于考染、银染、Western杂交、SDS-PAGE电泳、蛋白纯化和蛋白活性检测等分析实验，也可直接用于电洗脱制备蛋白。本试剂盒中预制胶的梳孔数为12孔，最大上样量为50 μ L。

产品内容：

产品组成	10T	保存温度
4-16% Native BN/CN预制胶（12孔）	10 piece	2-8 $^{\circ}$ C
10 $\times$ BN/CN PAGE电泳缓冲液粉末	1pack（500mL）	室温
4 $\times$ BN/CN PAGE蛋白上样缓冲液	1mL	-20 $^{\circ}$ C
0.4% G-250染料（电泳用）	100mL	2-8 $^{\circ}$ C
5% G-250染料（上样用）	1mL	2-8 $^{\circ}$ C

使用方法：

（一）样品制备

样品制备方法请参考Blue Native PAGE. Wittig I, Braun H, Schagger H. Nature Protocols. Vol 1, No1, 418, 2006（<https://www.nature.com/articles/nprot.2006.62>）。

（二）拆开并安装预制胶

将试剂盒中的蛋白预制胶从包装袋中取出，撕掉胶板底部的蓝色胶带，缓慢地拔出梳子，将预制胶固定在电泳槽中。（注：伯乐Mini III或Mini-PROTEAN Tetra Cell、天能VE-180、六一24K系列电泳槽使用时，需将框架内绿色硅胶密封条取出，然后将其平坦的一面朝外并重新装回凹槽中压紧。）

（三）准备样品

1. CN PAGE样品：

表 1. CN-PAGE上样蛋白配制表

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

【注1】配制好的上样蛋白不要加热。

2. BN PAGE样品：（以植物类囊体膜蛋白电泳为例）



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

表 2. BN-PAGE上样蛋白配制表

	含去垢剂样品*	不含去垢剂样品
总体积	10 μ L	10 μ L
植物类囊体膜蛋白样品（DDM复溶）	X μ L	X μ L
4 $\times$ BN/CN PAGE蛋白上样缓冲	2.5 μ L	2.5 μ L
5% G-250染料（蛋白上样）	0.25-1 μ L	0.1 μ L（终浓度0.05%）
超纯水	补至10 μ L	补至10 μ L

【注2】 *含去垢剂样品中染料加入按照以下原则：样品中G-250终浓度为去垢剂终浓度的1/4。例如样品中DDM终浓度为1%，则需要G-250终浓度为0.25%，即10 μ L蛋白样品中需要加0.5 μ L的5%G-250染料。

【注3】 配制好的上样蛋白不要加热。

（四）准备1 $\times$ BN/CN PAGE电泳缓冲液

将10 $\times$ BN/CN PAGE电泳缓冲液粉末全部溶解并定容于500mL超纯水中，测定pH应为7.0左右，不用调节pH。用前用超纯水稀释10倍即配成1 $\times$ BN/CN PAGE电泳缓冲液。

【注4】 配好的10 $\times$ BN/CN PAGE电泳缓冲液2-8 $^{\circ}$ C保存。

1. CN PAGE电泳液：

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

2. BN PAGE电泳液：

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

表 3. 1 $\times$ 蓝色阴极缓冲液（内槽）配制表

10 $\times$ BN/CN PAGE电泳缓冲液	15mL
0.4% G-250染料（电泳用）	0.75mL
超纯水	定容至150mL

（五）电泳过程

1. CN PAGE电泳：

CN PAGE电泳内外槽均使用1 $\times$ BN/CN PAGE电泳缓冲液，内槽加满，外槽加到1/3液面处即可，最高不可漫过胶板。按照以下条件冰浴电泳。

表 4. CN-PAGE电泳条件（1块胶）

恒电压	起始电流	结束电流	电泳时间
120V	8-15mA	3-10mA	50min+

2. BN PAGE电泳：

BN-PAGE电泳外槽使用1 $\times$ BN/CN PAGE电泳缓冲液，内槽开始电泳时使用的是1 $\times$ 蓝色阴极缓冲液，内槽加满，外槽加到1/3液面处即可，最高不可漫过胶板。待电泳指示前沿到达距凝胶底部1/3处时，将内槽电泳缓冲液更换为1 $\times$ BN/CN PAGE电泳缓冲液，继续后续电泳。该操作可以避免过多染料影响蛋白在凝胶中的迁移及转膜等后续实验。

整个过程请按照以下条件冰浴电泳。

表 5. BN-PAGE电泳条件（1块胶）

电泳开始时条件：			
恒电压	起始电流	电泳时间	内槽缓冲液
120V	10-20mA	20-50min	1 $\times$ 蓝色阴极缓冲液
待指示条带前沿到达距凝胶底部1/3处时，更换内槽电泳缓冲液后，电泳条件：			
恒电压	结束电流	继续电泳时间	内槽缓冲液
120V	3-5mA	45min+	1 $\times$ BN/CN电泳缓冲液

（六）染色



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

1. 电泳结束，取出凝胶。通过起胶器或其他合适的工具小心地插入到胶板两侧之间的空隙中，用起胶器慢慢地上下撬动胶板，重复上述操作，撬动上、中、下三个不同的位置，直至胶板两侧完全打开（见下图）。



2. 将电泳后的PAGE胶取下放入塑料容器中，加入适量超快速凝胶蛋白染色液，染色液必须覆盖过凝胶表面3mm以上，摇床常温摇动，条带20-30分钟即可见。继续染色可增加颜色深度，但不会增加灵敏度。染色2h，即可达到最大染色深度。（也可使用常规考马斯亮蓝染色液按照常规染色步骤进行。）
3. 条带显示后倒掉染色液，用适量体积超纯水漂洗一下。
4. 加入适量超纯水脱色，期间更换1-2次蒸馏水，摇床常温摇动30-50min至背景干净。
【注5】具体染色和脱色时间也与染色液配方和蛋白样品浓度相关，应根据实际情况调整。
5. 观察并保存结果。

（七）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膜上若有残留的蓝色染料可以用甲醇漂洗去除。

注意事项

1. 在Blue Native PAGE凝胶电泳期间，电流下降至低于1mA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。可以调高电压高于300V，使得电流不要低于4mA。
2. 预制胶不能置于0℃以下冷冻，置于4℃冰箱时也不要紧靠箱胆或门胆，否则凝胶会冻裂或产生气泡。
3. 请确保使用兼容的电泳槽，内外槽之间液体的泄露会导致蛋白迁移率低。
4. 1×BN/CN电泳缓冲液可以回收，回收后可作为外槽的电泳液重复使用1-2次。但为了取得最佳的电泳效果，应使用新鲜配制的电泳液。
5. 4×BN/CN-PAGE蛋白上样缓冲液必须完全融化混匀后再使用。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服和佩戴一次性手套。

保存条件：

各组分按照标签温度保存，自生产之日起12个月有效。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com