



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-times.com.cn

E-mail: real-times@163.com

Blue/Clear 非变性凝胶电泳试剂盒（货号：RTD6136）

Blue/Clear Native PAGE Electrophoresis Kit

Ver.700763

● 货品内容：

组份	货号	名称	规格	保存
1	RTD6135-0312	3-12% RealPAGE Native BN/CN 预制胶(12 孔)	10 板	4℃
2	BC500P	10×BN/CN PAGE 电泳缓冲液（干粉）	500 ml	RT
3	PL114	4×BN/CN-PAGE 蛋白上样缓冲液	1 ml	-20℃
4	BC250	0.4% G-250 染料（电泳用）	100 ml	4℃
5	BC260	5% G-250 染料（上样用）	1 ml	4℃
6		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（ $pI > 7$ ）；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 的蛋白复合体，样品可以来于胞浆、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。

● 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：

1. 样品制备：

该试剂盒不含样品制备的相关试剂，样品具体制备方法参考 Blue Native PAGE. Wittig I, Braun H, Schagger H. *Nature Protocols*. Vol 1, No 1, 418, 2006.

2. 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：试剂盒配套预制胶兼容伯乐 Mini III 或 Mini-PROTEAN Tetra Cell，天能 VE-180，六一 24K 系列电泳槽。不兼容 Thermol，六一其他系列，君意东方，百晶等电泳槽。

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 灭菌水中，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:

阳极缓冲液和阴极缓冲液均直接使用 1×BN/CN PAGE 电泳缓冲液进行电泳。

2.2.2 BN-PAGE 电泳:

阳极缓冲液使用 1×BN/CN PAGE 电泳缓冲液，阴极缓冲液按照下表配制:

	1×蓝色阴极缓冲液
	150 ml
10×BN/CN PAGE 电泳缓冲液	15 ml
0.4% G-250 染料（电泳用）	0.75 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 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
	不要加热

2.3.2 BN-PAGE 电泳:

注：以下以植物类囊体膜蛋白电泳为例。

总体积	10 μl	10 μl
	含去垢剂样品*	不含去垢剂样品
植物类囊体膜蛋白样品（DM 复溶）	x μl	x μl
4×BN/CN-PAGE 蛋白上样缓冲液	2.5 μl	2.5 μl
5% G-250 染料（蛋白上样）	0.25-1 μl	0.1 μl（终浓度 0.05%）
超纯水	补至 10 μl	补至 10 μl
	不要加热	不要加热

* 含去垢剂样品中染料加入按照以下原则:

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 1%，则需要 G-250 终浓度为 0.25%。10 μl 蛋白样品中需要加 5% G-250 染料 0.5 μl。

2.4 电泳过程:

2.4.1 CN-PAGE 电泳:

电泳内外槽均使用 1×BN/CN PAGE 电泳缓冲液。在电泳槽的内槽内加入 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 3 次，随后在电泳槽外槽加入适量的 1×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			

2.4.2 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凝胶 1/3 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）

恒电流	起始电压	电泳时间	缓冲液	
10 mA	80-110 V	20-25 min	1×蓝色阴极缓冲液	冰浴电泳



指示前沿至凝胶三分之一处，更换内槽缓冲液为 1×BN/CN 电泳缓冲液

恒电流	继续电泳时间	结束电压	电泳总时间	缓冲液	
10 mA	60-70 min	不要超过 500 V	1.5- 2 h	1×BN/CN 电泳缓冲液	冰浴电泳

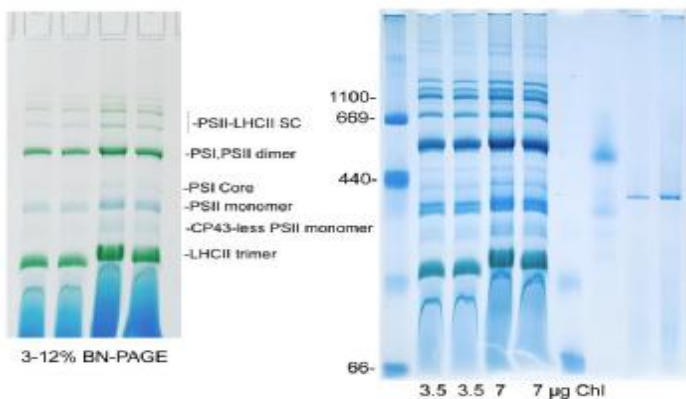
3. 转膜：

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。转膜缓冲液使用 1×BN/CN PAGE 电泳缓冲液即可。

4. 染色：

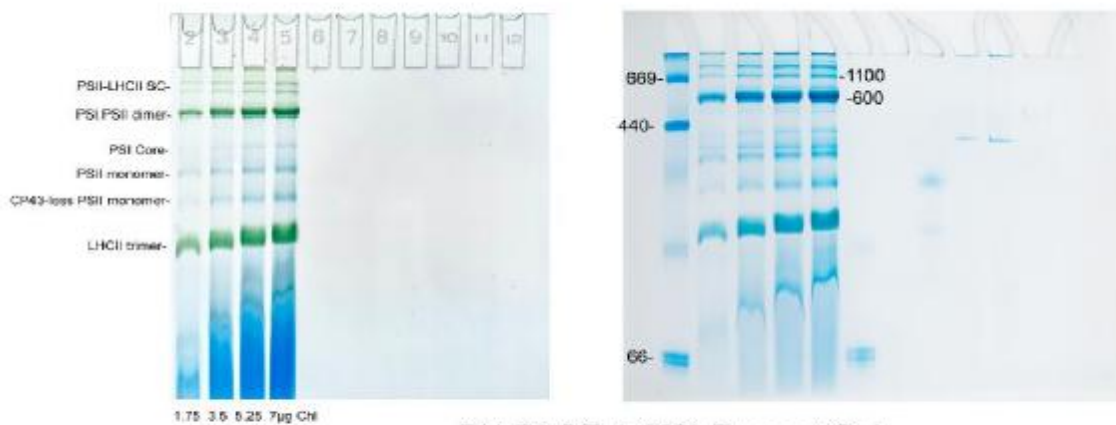
- 4.1 将电泳后的 PAGE 胶取下放入塑料容器中，加入适量 FastBlue 蛋白染色液或常规考马斯亮蓝染色液（以刚刚覆盖过胶面为适），条带 1-2 分钟即可见。
- 4.2 摇床常温摇动 10-15 分钟至条带清晰可见。
- 4.3 加入适量蒸馏水脱色，期间更换 1-2 次蒸馏水，摇床常温摇动 10-15 分钟至背景干净。
- 4.4 观察保存结果。

5. 实验示例:



BN-PAGE 3-12% Precast Gel

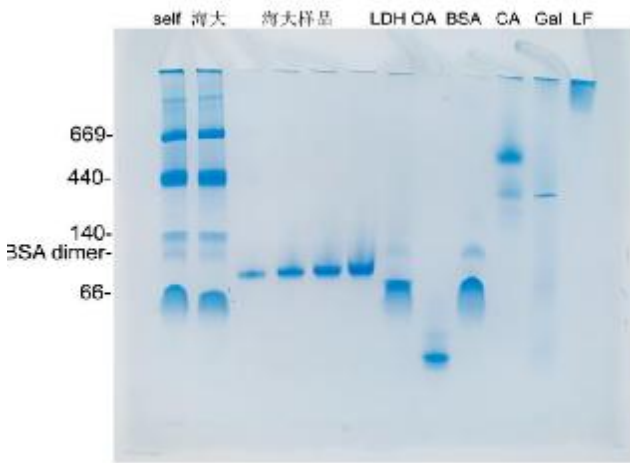
恒流 10mA 1.5 h 1×BN/CN 电泳缓冲液 冰浴电泳



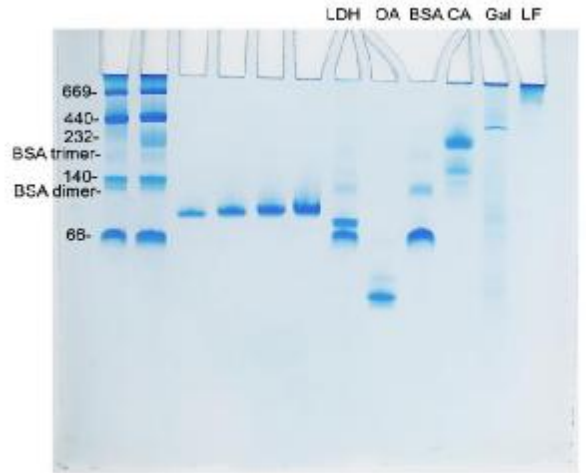
BN-PAGE 4-16% Precast Gel

恒流10mA 2h 1×BN/CN电泳缓冲液 冰浴电泳

RTD6112



3-12% CN-PAGE 76 2020-7-21
120V 14-5mA 60min



4-16% CN-PAGE
120V 14-6 mA 45 min