

Blue/Clear 非变性凝胶电泳试剂盒

产品规格

产品编号	产品名称	包装规格
MA0469	Blue/Clear 非变性凝胶电泳试剂盒（3-12%预制胶）	10T/盒
MA0470	Blue/Clear 非变性凝胶电泳试剂盒（4-16%预制胶）	10T/盒

产品内容

产品组成	MA0469	MA0470	保存温度
3-12% Native BN/CN 预制胶（12 孔）	10 piece	—	2-8℃
4-16% Native BN/CN 预制胶（12 孔）	—	10 piece	2-8℃
10×BN/CN PAGE 电泳缓冲液粉末	500 mL	500 mL	RT
4×BN/CN PAGE 蛋白上样缓冲液	1 mL	1 mL	-20℃
0.4% G-250 染料（电泳用）	100 mL	100 mL	2-8℃
5% G-250 染料（上样用）	1 mL	1 mL	2-8℃
说明书	1 份	1 份	—

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 10 kDa-10M kDa 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。

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, No 1, 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）

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 蛋白上样缓冲液	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 500 mL 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	15 mL
0.4% G-250 染料（电泳用）	0.75 mL
超纯水	定容至 150 mL



（五）电泳过程

1. CN PAGE 电泳：

CN PAGE 电泳内外槽均使用 1×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
120 V	8-15 mA	3-10 mA	50 min +

2. BN PAGE 电泳：

BN-PAGE 电泳外槽使用 1×BN/CN PAGE 电泳缓冲液，内槽开始电泳时使用的是 1×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×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。

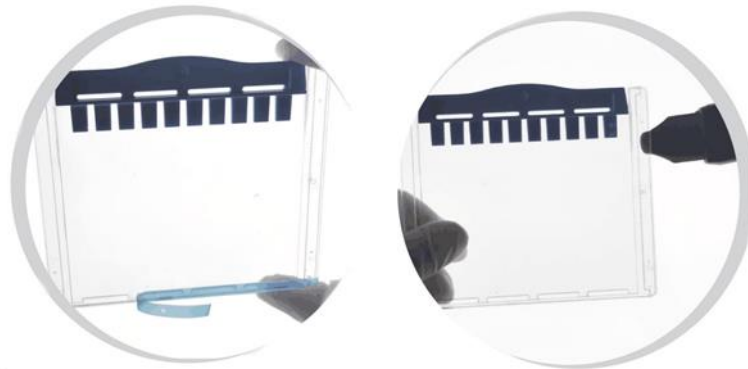
整个过程请按照以下条件冰浴电泳。

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
120 V	10-20 mA	20-50 min	1×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
120 V	3-5 mA	45 min +	1×BN/CN 电泳缓冲液

（六）染色

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 Meilunbio 超快速凝胶蛋白染色液（美仑货号：MA0399），染色液必须覆盖过凝胶表面 3 mm 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 2 h，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 30-50 min 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。

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。

注意事项

1. 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 4 mA）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 300 V，使得电流不要低于 4 mA。
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。

