

归  
去  
来  
系  
列

CAT#:120642-30  
常温运输, 4℃保存

**TIANDZ**

一站式 Blue Native PAGE 电泳套装

One-Stop Blue Native PAGE Pack

---

使用手册 V1.1

---

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

| <p><b>产品及特点</b></p> | <p>Blue Native PAGE (BN-PAGE) 是一种从生物样品 (质膜, 胞浆等) 中分离分子量在 10KD-10M 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 digitonin) 将蛋白复合体从细胞膜中以近似天然的状态分离出来, 再用考马斯亮蓝 G-250 代替 SDS 跟蛋白结合而使其带负电荷, 染料-蛋白复合体呈蓝色条带, 并因分子量不同而在 PAGE 胶分离。本产品是在传统 BN-PAGE 技术的基础进行而得, 它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 一站式, 即开即用, 用户不需单独准备各种成分, 十分方便安全, 将实验人员接触粉末状丙烯酰胺的可能降到最低。</li> <li>2. 可以用于分离分子量在 10-10M 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。</li> <li>3. 既可用于分析, 也可以用于一步式制备。本手册只描述了分析电泳过程。</li> <li>4. 电泳后可直接用于考染、银染、Western 杂交、SDS-GAPE 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。</li> </ol>  |                      |  |     |     |           |         |          |                      |    |         |       |       |        |        |           |        |     |                    |          |      |                    |          |      |                   |          |        |                |          |       |                 |          |       |                   |          |       |      |  |     |
|---------------------|---|----------------------|--|-----|-----|-----------|---------|----------|----------------------|----|---------|-------|-------|--------|--------|-----------|--------|-----|--------------------|----------|------|--------------------|----------|------|-------------------|----------|--------|----------------|----------|-------|-----------------|----------|-------|-------------------|----------|-------|------|--|-----|
| <p><b>规格及成分</b></p> | <table border="1"> <thead> <tr> <th>成 份</th> <th>编 号</th> <th>30 次大纸盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>AB 溶液干粉</td> <td>120642 a</td> <td>49.5 g (125mL 棕色玻璃瓶)</td> </tr> <tr> <td>甘油</td> <td>56-81-5</td> <td>50 mL</td> </tr> <tr> <td>TEMED</td> <td>100880</td> <td>1.5 mL</td> </tr> <tr> <td>过硫酸铵 (干粉)</td> <td>100879</td> <td>1 g</td> </tr> <tr> <td>BN-PAGE 正极电泳液 (干粉)</td> <td>120642 b</td> <td>10 L</td> </tr> <tr> <td>BN-PAGE 负极电泳液 (干粉)</td> <td>120642 c</td> <td>10 L</td> </tr> <tr> <td>BN-PAGE 配胶缓冲液, 3×</td> <td>120642 d</td> <td>100 mL</td> </tr> <tr> <td>BN-PAGE 膜蛋白溶解液</td> <td>120642 e</td> <td>30 mL</td> </tr> <tr> <td>BN-PAGE 染料 (5%)</td> <td>120642 f</td> <td>1.5mL</td> </tr> <tr> <td>BN-PAGE 去污剂 (20%)</td> <td>120642 g</td> <td>10 mL</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td></td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table> |                      |  | 成 份 | 编 号 | 30 次大纸盒包装 | AB 溶液干粉 | 120642 a | 49.5 g (125mL 棕色玻璃瓶) | 甘油 | 56-81-5 | 50 mL | TEMED | 100880 | 1.5 mL | 过硫酸铵 (干粉) | 100879 | 1 g | BN-PAGE 正极电泳液 (干粉) | 120642 b | 10 L | BN-PAGE 负极电泳液 (干粉) | 120642 c | 10 L | BN-PAGE 配胶缓冲液, 3× | 120642 d | 100 mL | BN-PAGE 膜蛋白溶解液 | 120642 e | 30 mL | BN-PAGE 染料 (5%) | 120642 f | 1.5mL | BN-PAGE 去污剂 (20%) | 120642 g | 10 mL | 使用手册 |  | 1 份 |
| 成 份                 | 编 号   | 30 次大纸盒包装            |  |     |     |           |         |          |                      |    |         |       |       |        |        |           |        |     |                    |          |      |                    |          |      |                   |          |        |                |          |       |                 |          |       |                   |          |       |      |  |     |
| AB 溶液干粉             | 120642 a  | 49.5 g (125mL 棕色玻璃瓶) |  |     |     |           |         |          |                      |    |         |       |       |        |        |           |        |     |                    |          |      |                    |          |      |                   |          |        |                |          |       |                 |          |       |                   |          |       |      |  |     |
| 甘油                  | 56-81-5   | 50 mL                |  |     |     |           |         |          |                      |    |         |       |       |        |        |           |        |     |                    |          |      |                    |          |      |                   |          |        |                |          |       |                 |          |       |                   |          |       |      |  |     |
| TEMED               | 100880  | 1.5 mL               |  |     |     |           |         |          |                      |    |         |       |       |        |        |           |        |     |                    |          |      |                    |          |      |                   |          |        |                |          |       |                 |          |       |                   |          |       |      |  |     |
| 过硫酸铵 (干粉)           | 100879  | 1 g                  |  |     |     |           |         |          |                      |    |         |       |       |        |        |           |        |     |                    |          |      |                    |          |      |                   |          |        |                |          |       |                 |          |       |                   |          |       |      |  |     |
| BN-PAGE 正极电泳液 (干粉)  | 120642 b  | 10 L                 |  |     |     |           |         |          |                      |    |         |       |       |        |        |           |        |     |                    |          |      |                    |          |      |                   |          |        |                |          |       |                 |          |       |                   |          |       |      |  |     |
| BN-PAGE 负极电泳液 (干粉)  | 120642 c  | 10 L                 |  |     |     |           |         |          |                      |    |         |       |       |        |        |           |        |     |                    |          |      |                    |          |      |                   |          |        |                |          |       |                 |          |       |                   |          |       |      |  |     |
| BN-PAGE 配胶缓冲液, 3×   | 120642 d  | 100 mL               |  |     |     |           |         |          |                      |    |         |       |       |        |        |           |        |     |                    |          |      |                    |          |      |                   |          |        |                |          |       |                 |          |       |                   |          |       |      |  |     |
| BN-PAGE 膜蛋白溶解液      | 120642 e  | 30 mL                |  |     |     |           |         |          |                      |    |         |       |       |        |        |           |        |     |                    |          |      |                    |          |      |                   |          |        |                |          |       |                 |          |       |                   |          |       |      |  |     |
| BN-PAGE 染料 (5%)     | 120642 f  | 1.5mL                |  |     |     |           |         |          |                      |    |         |       |       |        |        |           |        |     |                    |          |      |                    |          |      |                   |          |        |                |          |       |                 |          |       |                   |          |       |      |  |     |
| BN-PAGE 去污剂 (20%)   | 120642 g  | 10 mL                |  |     |     |           |         |          |                      |    |         |       |       |        |        |           |        |     |                    |          |      |                    |          |      |                   |          |        |                |          |       |                 |          |       |                   |          |       |      |  |     |
| 使用手册                |   | 1 份                  |  |     |     |           |         |          |                      |    |         |       |       |        |        |           |        |     |                    |          |      |                    |          |      |                   |          |        |                |          |       |                 |          |       |                   |          |       |      |  |     |
| <p><b>运输及保存</b></p> | <p>常温运输和保存 (TEMED、BN-PAGE 膜蛋白溶解液 4℃保存), 有效期一年</p>   |                      |  |     |     |           |         |          |                      |    |         |       |       |        |        |           |        |     |                    |          |      |                    |          |      |                   |          |        |                |          |       |                 |          |       |                   |          |       |      |  |     |
| <p><b>自备试剂</b></p>  | <p>去离子水, 梯度胶灌胶器</p>   |                      |  |     |     |           |         |          |                      |    |         |       |       |        |        |           |        |     |                    |          |      |                    |          |      |                   |          |        |                |          |       |                 |          |       |                   |          |       |      |  |     |

## 使用方法

### 一：配制梯度 PAGE 胶（此手册以分析电泳为例）

1. 根据靶蛋白的分子量范围选择 BN-PAGE 的浓缩胶和分离胶的浓度：

| 分子量范围 (kD) | 浓缩胶浓度 (%T) | 梯度胶浓度范围 (%T) |
|------------|------------|--------------|
| 10-500     | 4.0        | 6-18         |
| 10-1000    | 4.0        | 5-13         |
| 10-3000    | 3.5        | 4-13         |
| 0-10000    | 3.0        | 3-13         |

2. 配制丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺溶液 (48:1.5) (简称 AB 溶液, 下同): 在含有 AB 干粉的棕色玻璃瓶中加入 52.7 mL 自备的去离子水, 溶解, 标记为 AB 溶液 (49.5%T, 3%C)。该溶液可 4℃ 避光保存一个月。上述试剂有神经毒性, 要在通风橱中操作。
3. 配制 10% 的 APS (过硫酸铵): 0.1 克 APS 干粉溶于 1 mL 去离子水中即得。新配制的 10% APS 溶液只可在 4℃ 存放一周。
4. 配制正极电泳液: 将 BN-PAGE 正极电泳液干粉溶解在 600-800 mL 去离子水中, 用自备的浓盐酸调 pH 到 7.0 (25℃) 后定容到 1000 mL 即得 10× 正极电泳液, 灭菌后可以 4℃ 长期放置。电泳前用去离子水稀释 10 倍成 1× 正极电泳液再使用。
5. 配制负极电泳液: 将 BN-PAGE 负极电泳液干粉溶解在 600-800 mL 去离子水中, 用自备的浓盐酸调 pH 到 7.0 (25℃) 后定容到 1000 mL 即得 10× 负极电泳液, 灭菌后可以 4℃ 长期放置。电泳前用去离子水稀释 10 倍, 每 100 mL 中再加入 0.4 mL BN-PAGE 染料, 搅拌 3 小时, 得 1× 负极电泳液。注意: 必须搅拌和常温放置, 否则染料容易沉淀。
6. 配制 PAGE 胶: 此处以配制一块浓缩胶浓度为 3.5%, 分离胶浓度为 4-13%, 大小为 14×14×0.16cm 的 BN-PAGE 为例 (其他大小的胶请按比例调整各成分用量。如果条件允许, 建议一次制备数块胶)。先按下表配制 4% 低浓度液和 13% 高浓度液两种溶液。

| 成份             | 3.5% 浓缩胶 | 4% 低浓度液 | 13% 高浓度液  |
|----------------|----------|---------|-----------|
| AB 溶液 (49.5%T) | 0.44 mL  | 1.5 mL  | 3.9 mL    |
| 配胶缓冲液, 3×      | 2.0 mL   | 6.0 mL  | 5.0 mL    |
| 甘油             | 无        | 无       | 3 g (是重量) |
| 去离子水           | 3.4 mL   | 10.4 mL | 3 mL      |
| 总体积            | 6 mL     | 18 mL   | 15 mL     |
| 10% APS 溶液     | 50 uL    | 100 uL  | 75 uL     |
| TEMED 溶液       | 5 uL     | 10 uL   | 7.5 uL    |

7. 加入 APS 和 TEMED 后,用梯度胶灌胶器在 4-8℃条件下迅速灌胶(具体操作请参考灌胶器厂家提供的使用手册),预留 1/3 空间给浓缩胶,最后加 1cm 高的去离子水在最上层隔开空气(氧气会抑制聚合反应)。
8. 将胶板垂直放置在室温让 PAGE 胶聚合,一般需要 30 分钟。
9. 聚合后去掉水层,按上表准备 3.5%浓缩胶溶液并灌胶,然后插入梳子(如果是制备型电泳,则选择长孔梳),室温下放置直到凝胶聚合(约需要 15 分钟)。聚合后放 4℃待用,最长可保存 1 周(但需要湿润密封环境)。
10. 使用前把胶板装在电泳槽上,取掉梳子,加入 1×负极电泳液(上槽)和 1×正极电泳液(下槽)待用。用电泳洗加样孔去除残留的丙烯酰胺。

## 二: 细胞膜样品的制备 (本试剂盒不含相关试剂)

按常规方法制备细胞膜或细胞器样品,样品最好不含基因组 DNA 污染,否则 DNA 将会降低电泳分辨率。所得样品用 10%甘油(可用水稀释甘油而得)重悬以便维护蛋白复合体在冻融时的稳定,蛋白终浓度不低于 40ug/uL,分装后放液氮或-80℃保存数月待用。如果样品的蛋白浓度低于 40ug/uL,需离心浓缩(线粒体膜一般需要 10,000-20,000g 离心 10 分钟,细菌膜样品一般需要 100,000g 超速离心 30 分钟)后再用 10%甘油重悬。注意:制备膜样品时避免使用钾盐和二价盐,因它们能使考马斯染料和蛋白产生沉淀。

## 三: 膜蛋白复合体的溶解

1. 线粒体膜和细菌膜蛋白的溶解:
2. 线粒体膜和细菌膜蛋白的溶解: 在含 400ug 蛋白的膜样品中加入 40uL BN-PAGE 蛋白溶解液,轻柔混匀。按下表加入 BN-PAGE 去污剂(此表的用量仅供参考,此步暂不加染料),混匀后室温放置 10 分钟。如果靶蛋白分子量大于 5MDa,则 20,000g 离心 20 分钟收集上清。在上清中加入 5uL 50%甘油(可用水稀释甘油而得,下同)轻柔混匀,最后按下表加入 BN-PAGE 染料,混匀后上样,每个孔(厚宽=0.16×0.5cm)加 20uL 样品。

| 成分            | 细菌膜    | 酵母线粒体膜 | 哺乳动物线粒体膜 |
|---------------|--------|--------|----------|
| BN-PAGE 去污剂用量 | 4.0 uL | 4.8 uL | 6.0 uL   |
| BN-PAGE 染料用量  | 2.0 uL | 2.4 uL | 3.0 uL   |

3. 叶绿体膜蛋白的溶解: 在含 500ug 蛋白的叶绿体或叶绿体膜中加入 50uL BN-PAGE 蛋白溶解液,轻柔混匀。加入 2.5uL BN-PAGE 去污剂后室温放置 10 分钟。加入 5uL 50%甘油轻柔混匀,最后加入 1.25uL BN-PAGE 染料,混匀后上样,每个孔(厚宽=0.16×0.5cm)加 25uL。
4. 哺乳动物膜蛋白的溶解: 在从 5-20mg 培养细胞或实体组织(如肝脏、肌肉等)得到的匀浆沉淀中加入 35uL BN-PAGE 膜蛋白溶解液,轻柔混匀。加入 2.5uL BN-PAGE

去污剂后室温放置 10 分钟。100,000g 离心 15 分钟后采集上清，在上清中加入 5uL 50%甘油轻柔混匀，最后加入 1.25uL BN-PAGE 染料，混匀后上样，每个孔（厚宽 =0.16×0.5cm）加 20uL。

#### 四：电泳

11. 注意：整个电泳需要在 4-8℃进行以便蛋白复合体保持完整构型。上样后，以恒压 100V 电泳，待样品跑过浓缩胶后，电压改为 250V，之后可以慢慢增大，但最高不要超过 500V，电流不要超过 15 毫安（对 0.16×4cm 的胶）。如果后续实验是电转，则待样品跑过凝胶的 1/3 长度后关掉电源，吸出上槽的 1×负极电泳液，加入 1×低染料负极电泳液继续电泳（制备方法：将 10×负极电泳液用水稀释 10 倍，然后每 100mL 中再加入 40uL 的 BN-PAGE 染料），以便在电泳过程中能够观察条带的位置，防止其跑出凝胶之外，同时减少染料浓度也可以降低转膜时染料跟蛋白质竞争在 PVDF 膜上的结合位点。如果后续实验没有电转步骤而且知道电泳时间内蛋白不会跑出凝胶，则不需要中途换电泳液，电泳后直接脱色观察条带。
12. 终止电泳（一般需要 2-4 小时），取出凝胶进行后续实验处理（如二维电泳或进一步考染或银染检查，请按相关标准操作程序进行）。如果不需要其他处理，只需要切出所需条带，则必须立即进行，因为考马斯亮蓝染料是小分子，非常容易扩散，蛋白条带会快速变淡。

#### 关联产品

快速蛋白银染试剂（CAT#：100602）