天净沙系列

CAT#:221123-6

低温运输，-20℃保存

天净沙

T 型 BN-PAGE 蛋白电泳上样液

T-type BN-PAGE Sample Loading Buffer

共享手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是 BN-PAGE 蛋白电泳试剂盒（CAT#:221123）的成份之一，故可以直接按照此试剂盒的使用手册使用本产品。

Blue Native PAGE（BN-PAGE）蓝色非变性 PAGE 是分离多亚基蛋白质复合物的一种特殊的非变性聚丙烯酰胺胶梯度电泳方法，其原理是使用温和的非离子型表面活性剂将蛋白质复合物与细胞膜分离，再用考马斯亮蓝 G-250 助溶并使蛋白质复合物带负电荷，在电泳时向阳极泳动，直到进入孔径直径跟自身直径相当的凝胶区域时停止。由于 20-30%的蛋白是以膜蛋白复合体的形式存在并参与细胞活动，而 BN-PAGE 跟其他分离多亚基蛋白质复合物的技术（如排阻层析和密度梯度电泳）相比具有更高的分辨率，因此该技术正得到日益广泛的应用。为满足市场需求，本公司开发了 BN-PAGE 试剂盒，它具有下列特点:

1. 一站式，用户用于不需要单独准备各种成分，不需要单独优化各种条件，即开即用，十分方便。
2. 本试剂盒只提供 T 型上样液，它可溶解膜系蛋白复合体，跟 BN-PAGE 常用的其他表面活性剂兼容。
3. 可以分离分子量在 10 kDa 到 10,000 kDa（10 MDa）之间的膜系蛋白复合体。不可用于非膜系蛋白复合体。
4. BN-PAGE 电泳后高丰度的蛋白复合体呈蓝色条带，可以直接肉眼观察。
5. 切下的蓝色条带可以用于蛋白回收，也可以再第二维 SDS- PAGE 电泳，分离蛋白复合体的组成亚基。
6. BN-PAGE 胶跟后续的考染、银染、Western 杂交或活性检测等操作兼容。
7. 本产品足够制备 30 块 0.16 cm×14 cm×14 cm 大小的 BN-PAGE 胶。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品第一部分，编号 221123pt1，大扁盒包装，常温运输，4℃保存。但 BN-PAGE 深蓝阴极电泳液必须放室温。

成份	编号	规格	包装
丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺	221123a	98+3 g	250 mL 棕塑瓶
TEMED	110-18-9	1 mL	1.5 mL 白盖管
过硫酸铵	100879	1 g	1.5 mL 绿盖管
20%去污剂溶液	221123b	1 mL	1.5 mL 黄盖管
5% CBB 溶液	221123c	1 mL	1.5 mL 棕色管
50%甘油溶液	221123d	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
3×BN-PAGE 配胶缓冲液	221123e	250 mL	250 mL 本色瓶
10×BN-PAGE	221123f1	250 mL	250 mL 棕色瓶

深蓝阴极电泳液			
10×BN-PAGE 浅蓝阴极电泳液	221123f2	250 mL	250 mL 棕色瓶
10×BN-PAGE 阳极电泳液	221123g	250 mL	250 mL 本色瓶
使用手册	221123sc	1 份	无

本产品第二部分 221123pt2，logo 热封袋包装，低温运输，-20℃保存。

成份	编号	规格	包装
T 型 BN-PAGE 上样液	221123h	1.5 mL	1.5 mL 本色管

运输及保存

大扁盒部分常温运输，4℃保存，但 BN-PAGE 深蓝阴极电泳液必须放室温，否则其含有的染料将会聚集，影响使用效果。logo 热封袋装的成分需要低温运输，-20℃保存。本试剂盒有效期一年。

自备试剂

梯度灌胶仪、速度 100,000×g 的台式离心机、去离子水

使用方法

一、样本制备

1. 本试剂盒不含样本制备相关试剂，但由于样本制备对 BN-PAGE 电泳非常重要，只有样品制备得到了完整的蛋白复合体，才有可能在 BN-PAGE 电泳胶上出现相应的条带。因此特别提醒用户在样本制备时需要使用跟 BN-PAGE 兼容的制备方法:

   第一、制备膜系所用盐离子最好是钠盐和锂盐，不能使用钾盐和二价金属盐，因为它们可能会使本试剂盒提供的 CCB 染料或蛋白-CCB 染料复合体沉淀。如果制备的样本已经含有高盐，必须先透析脱盐后才能用于本电泳试剂盒。

   第二、不能使用任何可能使蛋白复合体解离的蛋白变性剂（如尿素，SDS)、还原剂（如 DTT、β-巯基乙醇)、极端 pH 溶液。所用器皿也需要洗净这些残留的变性剂和还原剂。

   第三、所有操作必须在 4℃进行，避免加热和冻凝样本。

   第四、酵母和细菌的细胞膜样品可能需要用 DNase 去除基因组 DNA，否则粘稠的 DNA 会堵塞浓缩胶胶孔，使蛋白复合体根本进入不了凝胶。

二、膜系样本上样前处理

2. 用跟 BN-PAGE 兼容的方法制备膜系样本沉淀（包括细胞膜、线粒体膜、叶绿体膜等等)，沉淀前用自备 Lowry 法试剂盒测定膜蛋白浓度，然后按每管 400 μg 膜蛋白的量将样本分成很多小管，4℃离心沉淀（离心力和离心时间需要用户根据所研究的膜系选择，真核膜系和细菌膜系离心力可以差 5 倍)，弃上清后得膜系样本沉淀。
3. 在膜系样本沉淀中加入本试剂盒提供的 T 型 BN-PAGE 上样液 40 μL，用移液枪

头搅拌匀浆，然后加入适量 20% 去污剂溶液（动物线粒体膜加 6 μL，酵母线粒体膜加 4.8 μL，细菌细胞膜加 4 μL)。对于其他样本，加入 20%去污剂溶液的最适量可以参考下表:

样本类型	去污剂终浓度
人全细胞裂解物	0.1%
哺乳动物线粒体	1.0-2.4%
植物线粒体	0.5%
叶绿体	0.8 %
酵母过氧化物酶体	0.2-1.0%
酵母微粒体	0.2-1.0%

4. 4℃放置 60 分钟溶解样品，每 15 分钟用枪头搅拌 10 秒助溶。
5. 保温结束后 4℃离心 10 分钟收集上清。此步用以去除没有溶解的膜，离心力和离心时间需要用户根据所研究的膜系选择，真核膜系和细菌膜系离心力可以差 5 倍。
6. 在上清中加入 5 μL 50%甘油和适量的 5% CBB 溶液（动物线粒体膜加 3 μL，酵母线粒体膜加 2.4 μL，细菌细胞膜加 2 μL)，对其他样本，加入 CBB 溶液的原则是 0.5-1 g CBB 比 1 g 膜蛋白，最适量可能需自行摸索。
7. 电泳时每孔上样 10-20 μL。

三、制备 BN-PAGE 梯度胶

8. 首次使用本试剂盒时，需要按下述流程配制 10%的 APS（过硫酸铵）和丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺溶液。

   新鲜配制 10%APS：称量约 0.1 克过硫酸铵干粉到一个 1.5 mL 塑料离心管中，按每 0.1 克过硫酸铵干粉加 1 mL 自备去离子水的比例将水加到管中，颠倒摇晃到过硫酸铵粉末全部溶解。配制好的 10%的 APS 溶液可以在 4℃存放一周，超过一周则不能再用。

   新鲜配制丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺溶液（T=49.5%，C=3%)：在装有丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺的棕色塑料瓶中，加入 146 mL 自备的去离子水，充分摇晃直到溶解（约需 10-20 分钟)。此溶液简称为 AB 溶液，最好在一个月内用完，4℃保存。
9. 根据所要分离的蛋白复合体的分子量大小按下表选择所需 BN-PAGE 胶的浓度范围。

样本分子量范围	浓缩胶浓度	梯度分离胶浓度范围
10-500 kDa	4.0%	6%-18%
10-1000 kDa	4.0%	5%-13%

10-3000 kDa	3.5%	4%-13%
10-10000 kDa	3%	3%-13%

10. 下面以浓缩胶为 3.5%、分离胶浓度为 4%-13%的 BN-PAGE 为例说明制备两块 0.16 cm×14 cm×14 cm 梯度胶的配制方法。如配制其他浓度的胶，各成分用量需按比例调整。如果电泳的目的是制备，则胶的厚度最好是 0.3 cm。

11. 先根据下表制备三种制胶液：

成分	3.5%浓缩胶	4%母液	13%母液
3×BN-PAGE 配胶缓冲液	2 mL	6 mL	5 mL
AB 溶液	0.44 mL	1.5 mL	3.9 mL
自备去离子水	3.4 mL	10.4 mL	3.0 mL
灌胶前加 10%APS	50 μL	100 μL	75 μL
灌胶前加 TEMED	5 μL	10 μL	7.5 μL
总体积	6 mL	18 mL	15 mL

12. 根据梯度灌胶仪手册用 4%母液和 13%母液制备 4%-13%的梯度胶，混合灌胶前才能加 10%APS 和 TEMED。灌胶后胶上层需要盖上水以隔绝空气（氧气可以抑制聚合），水比胶轻，自然在上层。常温聚合 30 分钟。

13. 倒掉上层的水后再在已经凝固的梯度分离胶上灌入 3.5%的浓缩胶，灌胶前才能加 10%APS 和 TEMED，灌胶后立即插上样品梳。需要根据实验目的是分析还是制备选择相应类型的梳子。室温聚合 30 分钟。如果暂时不用，凝固的胶可在 4℃放置 1 周。

四、BN-PAGE 电泳（需要在 4℃进行）

14. 胶凝固后，将胶板固定到电泳架上，预冷 6 小时。低温容易使非共价聚合的蛋白复合体保持在聚合状态。

15. 往上槽和下槽中分别加入足够的预冷的 1×BN-PAGE 深蓝阴极电泳液（上槽）和 1×预冷的 BN-PAGE 阳极电泳液（下槽）。上述两种电泳液均可用去离子水稀释本试剂盒提供的 10×母液得到。

16. 小心拔出梳子后用槽中的深蓝阴级缓冲液吹加样孔。

17. 小心将溶解在 BN-PAGE 上样液中的样品上样。如果有自备的分子量标准，可以同时上样到最靠边的泳道。建议将一个等量的重复样品加热煮沸 10 分钟，离心后作为热解聚阴性对照上样。

18. 将电流设置在 10 mA，电压设置在 100V 并开始电泳。

19. 等蓝色样品进入凝胶后（约需要 10 分钟）再将电流调到 15 mA，电压调到 500V 继续电泳。

	20. 当蓝色条带的前沿移动到距离胶底部 1/3 位置的时候(约在调高电压后 30 分钟)，关掉电源，吸出上槽的 BN-PAGE 深蓝阴极电泳液（此溶液可以 4℃保存，再使用 2-3 次)，加入 1×BN-PAGE 浅蓝阴极电泳液。打开电源，继续电泳。 21. 如果后续还要进行蛋白纯化、Western 转膜、第二维电泳等需要蛋白移位的实验，则必须在所要蛋白复合体达到孔径直径跟自身直径相当的凝胶区域之前停止电泳，这样在后续处理时蛋白复合体才有移位的可能。具体电泳时间根据蛋白复合体分子量大小决定，可能需要 1-2 次预实验摸索。 22. 如果后续只是原位染色观察，则可以继续电泳，直到蛋白复合体移动到孔径直径跟自身直径相当的凝胶区域，不能再移动为止。一般需要 3-6 小时。由于在此凝胶区域的蛋白聚合体相当于被凝胶卡住，没法再移位，因此得到的 BN-PAGE 胶只能进行原位检测（如考染或银染)，不能进行需要移位的检测（如蛋白回收、Western 杂交等)。 23. 停止电泳，对 BN-PAGE 胶进行后续操作。本产品不含相关试剂。由于 CBB 染料会很快扩散，蛋白复合体条带也将很快变淡，因此需要快速进行需要颜色指导的操作（如切取 BN-PAGE 胶的条带等)。
关联试剂	BN-PAGE 蛋白电泳转膜液