



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

Blue Native PAGE凝胶配制试剂盒

产品编号	产品名称	包装
P0543S	Blue Native PAGE凝胶配制试剂盒	30-50gels

产品简介:

- 碧云天生产的Blue Native PAGE凝胶配制试剂盒(Blue Native PAGE Gel Preparation Kit), 提供了配制Blue Native PAGE凝胶所需的各种试剂, 用户只需自备制胶器具和蒸馏水, 即可配制不同浓度的Blue Native PAGE凝胶(即聚丙烯酰胺凝胶)。Blue Native PAGE凝胶主要用于分离细胞膜、细胞浆等生物样品中10kDa-10,000kDa的生物膜蛋白及蛋白质复合物。Blue Native PAGE凝胶是以考马斯亮蓝G-250代替SDS使蛋白质复合物带上负电荷, 并根据各个不同复合物的分子量差异从而在凝胶中得到分离, 同时这些复合物在胶中以蓝色条带形式呈现。另外, 在样品制备过程中使用一些温和的非离子型去垢剂进行溶解, 从而使复合物以近似天然的状态分离。
- 聚丙烯酰胺凝胶电泳(Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)技术广泛用于蛋白质、核酸及蛋白质-核酸复合物的分离纯化、检测、鉴定、分子量分析等实验, 是生命科学研究中最基本的实验技术之一。常见的Western印迹(Western blot)检测就是基于PAGE的。
- Blue Native PAGE (简称BN-PAGE)是Hermann Schägger等人于1991年建立的蛋白电泳技术, 该电泳技术的用途包括从生物膜、细胞以及组织匀浆中分离微克量的膜蛋白复合物, 线粒体疾病的临床诊断, 确定蛋白质分子量和低聚物状态, 通过基于抗体的凝胶位移法(Gel-shift method)测定多蛋白复合物的化学计量比(Stoichiometry), 分析蛋白质-蛋白质相互作用, 用于2D结晶(2D-Crystallization)和电子显微镜检测, 凝胶内活性检测(In-gel activity assay), 非变性电印迹和免疫检测, 用于神经递质组装、蛋白质输入和凋亡的研究, 以及分离超分子蛋白复合体等[1]。
- 在Blue Native PAGE中, 生物膜样品使用一些温和的非离子去垢剂溶解, 从而使复合物以近似天然的状态分离。特定的非离子去垢剂的选择取决于相关蛋白质复合物对去垢剂的稳定性, 常用的去垢剂有洋地黄皂苷(Digitonin) (ST1272) [2]、十二烷基麦芽糖苷(Dodecylmaltoside, DDM)、Triton X-100 (ST795) [3]等。生物膜溶解和离心后, 将阴离子染料考马斯亮蓝G-250加入到上清液中。G-250易溶于水, 但由于其疏水性, 也可以与蛋白质复合物相结合。BN-PAGE以考马斯亮蓝G-250代替SDS使蛋白质复合物带负电荷, 由于带负电的蛋白相互排斥, 蛋白质复合物聚集的可能性也大大降低。此外, 与染料结合后蛋白质复合物失去疏水性, 转化为水溶性。这意味着一旦G-250占据蛋白表面, BN凝胶中就无需添加SDS等去垢剂, 因此, BN-PAGE中, 对去垢剂敏感的蛋白变性的风险大大降低。最终, 蛋白质复合物根据分子量的不同从而在胶中得到分离, 在凝胶中以蓝色条带等形式呈现。若需要进一步分析复合物各个亚基的成分, 还可以采用BN-PAGE结合SDS-PAGE的方式[1]。
- 推荐使用碧云天的BeyoGel™ Blue Native PAGE Sample Buffer (2X) (P0761)、BeyoGel™ Blue Native PAGE阴极电泳缓冲液I (5X) (P0765)、BeyoGel™ Blue Native PAGE阴极电泳缓冲液II (5X) (P0767)和BeyoGel™ Blue Native PAGE阳极电泳缓冲液(5X) (P0769), 或参考使用说明自行配制相应的上样缓冲液或电泳液。
- 本试剂盒约可配制30-50块常规大小的Blue Native PAGE 4-13%梯度凝胶。具体可以配制的凝胶数量和凝胶的厚薄以及凝胶的大小有关。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P0543S-1	49.5% Acr-Bis (32:1)	60ml
P0543S-2	Gel Buffer (3X)	120ml
P0543S-3	80% Glycerol	40ml
P0543S-4	凝胶聚合催化剂	0.5g
P0543S-5	TEMED Substitute	0.5ml
—	说明书	1份

保存条件:

4°C保存, 一年有效。49.5% Acr-Bis (32:1)和TEMED Substitute须避光保存。Gel Buffer (3X)、80% Glycerol和凝胶聚合催化剂也可以室温保存。凝胶聚合催化剂用蒸馏水配制成10%溶液后, 分装成小管-20°C保存, 通常半年内有效。

注意事项:

- 虽然使用本凝胶配制试剂盒配制的4-13%梯度凝胶可覆盖的蛋白质分子量范围为10kDa-10,000kDa, 但小于100kDa或大于700kDa的蛋白质可能不能很好地被分离[1]。如果需要检测这两类蛋白, 需要进行一定的条件摸索, 特别是对于60kDa以下的蛋白, 应根据情况及时停止电泳, 避免小分子量蛋白跑出凝胶。

- Blue Native PAGE凝胶较常使用梯度胶，所以需要自备梯度胶制备器，或者需要自备两个恒流泵配合磁力搅拌器实现梯度胶的配制。
- 凝胶聚合催化剂用水配制成10%溶液后，应当分装成小管-20℃保存。同时应尽量减少室温存放时间，以防失效。
- TEMED Substitute易挥发，使用后请盖紧瓶盖。另外凝胶凝聚的速度和温度及光照关系密切，可通过适当调节凝胶聚合催化剂和TEMED Substitute的用量，控制在不同的室内环境下凝胶凝聚的速度。
- TEMED Substitute易燃，有腐蚀性，操作时请小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或腐蚀其他物品。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 准备倒胶的模具。可以使用常规的制备蛋白电泳胶的模具，如碧云天的MiniProGel™蛋白制胶与电泳系统(E6001/E6005)或其它适当模具。最好选择可以灌制较薄胶的模具(如0.75mm厚度)，以便于干胶等后续操作。为得到更好的结果，可以选择可灌制较大Blue Native PAGE凝胶的模具。制胶前必须把制胶模具冲洗干净，需特别注意不能有SDS残留。
2. 10%凝胶聚合催化剂的配制：例如称取0.1g凝胶聚合催化剂，用蒸馏水溶解，并定容至1ml，即为10%凝胶聚合催化剂。
3. 常用蛋白电泳胶的模具(胶板宽度为10厘米)所需下层胶和上层胶体积(下层胶按6厘米高度计算，上层胶按1.5厘米高度计算，均含约0.3ml的冗余量)参见下表。

Gel Thickness	Volume of Resolving Gel	Volume of Stacking Gel
0.75mm	4.0ml	1.0ml
1.0mm	5.4ml	1.5ml
1.5mm	8.0ml	2.0ml

注：下层胶体积已包含适量冗余，请勿全部用于灌制下层胶，以免灌胶时上层胶高度不够。

4. 根据下表配制4%和13%的Blue Native PAGE分离胶(即下层胶)：

成分	配制不同体积Blue Native PAGE分离胶所需各成分的体积(毫升)					
4%胶	5	10	20	30	40	50
Ultrapure water	2.88	5.75	11.56	17.36	23.11	28.75
Gel Buffer (3X)	1.67	3.33	6.67	10.00	13.33	16.67
49.5% Acr-Bis (32:1)	0.40	0.81	1.62	2.42	3.23	4.04
10%凝胶聚合催化剂	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.50
TEMED Substitute	0.004	0.008	0.012	0.016	0.024	0.04
成分	配制不同体积Blue Native PAGE分离胶所需各成分的体积(毫升)					
13%胶	5	10	20	30	40	50
Ultrapure water	0.72	1.44	2.92	4.41	5.85	7.18
Gel Buffer (3X)	1.67	3.33	6.67	10.00	13.33	16.67
49.5% Acr-Bis (32:1)	1.31	2.63	5.25	7.88	10.51	13.13
80% Glycerol	1.25	2.50	5.00	7.50	10.00	12.50
10%凝胶聚合催化剂	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.50
TEMED Substitute	0.002	0.004	0.006	0.008	0.012	0.02

5. 将4%的低浓度胶和13%的高浓度胶各4ml加入梯度胶制备器相应的位置中，并缓慢、完全注入制胶模具中，注意不能有气泡产生。根据梯度胶制备器的操作要求，提前或最后加入1ml超纯水进行水封。

注：此处按常规蛋白电泳胶模具的一片胶为例。低浓度胶和高浓度胶的实际体积需要根据实际情况进行调整。

6. 按照如下表格配制Blue Native PAGE的浓缩胶(也称堆积胶、积层胶或上层胶)：

成分	配制不同体积Blue Native PAGE浓缩胶所需各成分的体积(毫升)					
3.5%胶	2	3	4	6	8	10
Ultrapure water	0.67	1.00	1.33	2.00	2.67	3.33
Gel Buffer (3X)	1.08	1.62	2.16	3.23	4.31	5.39
49.5% Acr-Bis (32:1)	0.23	0.35	0.47	0.70	0.93	1.17
10%凝胶聚合催化剂	0.02	0.03	0.04	0.06	0.08	0.10
TEMED Substitute	0.002	0.003	0.004	0.006	0.008	0.01

注1：按照上述顺序依次加入各种试剂，加入TEMED Substitute前先混匀，加入TEMED Substitute后立即混匀，并马上加入到制胶的模具中。避免产生气泡，并加上梳齿。如果发现非常容易形成气泡，可以把一块制胶的玻璃板进行硅烷化处理。

注2：通常10-30分钟内胶会凝固。具体的凝固时间和温度及光照有关，上表中10%凝胶聚合催化剂和TEMED Substitute的正常推荐用量是室温为25℃时的推荐用量。为达到与25℃时相近的凝固时间，当室温低于25℃时，可以适当增加10%凝胶聚合催化剂和TEMED Substitute的用量，例如20℃时建议使用正常推荐用量的1.5倍，15℃时建议使用正常推荐用量的2倍。

注3：浓缩胶中可加入适量蓝色、红色或黄色PAGE上层胶染料(500X, 无迁移) (P0710/P0712/P0715)便于上样。

7. 样品准备可参考NATURE PROTOCOLS的 ‘Blue native PAGE’ [1]。

8. 具体的电泳步骤, 可参考碧云天BeyoGel™ Blue Native PAGE预制胶(4-13%)系列产品的使用说明(P0545-P0546)。

参考文献:

1. Wittig I, Braun HP, Schägger H. Nat Protoc. 2006. 1(1):418-28.
2. Cogliati S, Herranz F, Ruiz-Cabello J, Enríquez JA. Biochim Biophys Acta Bioenerg. 2021. 1862(1):148332.
3. Schägger H, Pfeiffer K. EMBO J. 2000. 19(8):1777-83.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
P0543S	Blue Native PAGE凝胶配制试剂盒	30-50gels
P0545S	BeyoGel™ Blue Native PAGE预制胶(4-13%, 10孔)	10块
P0546S	BeyoGel™ Blue Native PAGE预制胶(4-13%, 15孔)	10块
P0761S	BeyoGel™ Blue Native PAGE Sample Buffer (2X)	1ml
P0761M	BeyoGel™ Blue Native PAGE Sample Buffer (2X)	5ml
P0765S	BeyoGel™ Blue Native PAGE阴极电泳缓冲液I (5X)	500ml
P0767S	BeyoGel™ Blue Native PAGE阴极电泳缓冲液II (5X)	500ml
P0769S	BeyoGel™ Blue Native PAGE阳极电泳缓冲液(5X)	500ml

Version 2024.08.21