



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@vip.163.com

BN 电泳样品制备试剂盒（动物组织样品）

Ver260180-1.0

产品编号	产品名称	规格
RTD8304	BN 电泳样品制备试剂盒（动物组织样品）	50 次

● 产品包装:

货号	组份	规格	贮存
RTD8304-01	裂解缓冲液	50 ml	-20°C
RTD8304-02	重悬缓冲液	20 ml	-20°C
RTT2106-02	Benzonase (250 U/μl)	0.25 ml	-20°C
DM1080S	10%DDM	5 ml	-20°C
PL131-01	2×膜蛋白 A 型上样缓冲液	1 ml	-20°C
PL124-01	2×BN/CN-PAGE 蛋白上样缓冲液	1 ml	-20°C
BC270-1ml	2% G-250 染料	1 ml	4°C
	说明书	一份	

● 产品简介:

Blue Native PAGE (BN -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)将蛋白复合体从生物膜中以近似天然的状态分离出来，使用考马斯亮蓝 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，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) 和酸性蛋白 (pI<7)。

该产品含有 BN 电泳样品制备及电泳上样所需的试剂，可以在约 90 分钟内完成动物组织样品中胞浆蛋白和膜蛋白的提取。提取原理：动物组织在裂解缓冲液中匀浆处理得到细胞悬液，离心分离得到上清和沉淀；上清为胞浆蛋白，沉淀为细胞核，线粒体，内质网，未裂解的细胞碎片等；随后用温和去垢剂增溶沉淀，离心后提取增溶后的蛋白（主要包含质膜蛋白，细胞器膜蛋白，核膜蛋白）；提取的蛋白适用于蛋白多聚体分析，酶活测定以及 WB 检测等。

该产品不建议用于细胞 BN 样品的制备，细胞 BN 样品的制备可选择货号：RTD8305。

以每次处理 100 mg 动物组织样品计算，该试剂盒可以使用 50 次。

● 保存、效期及运输:

-20°C 保存，有效期一年，湿冰运输。

● 使用说明:

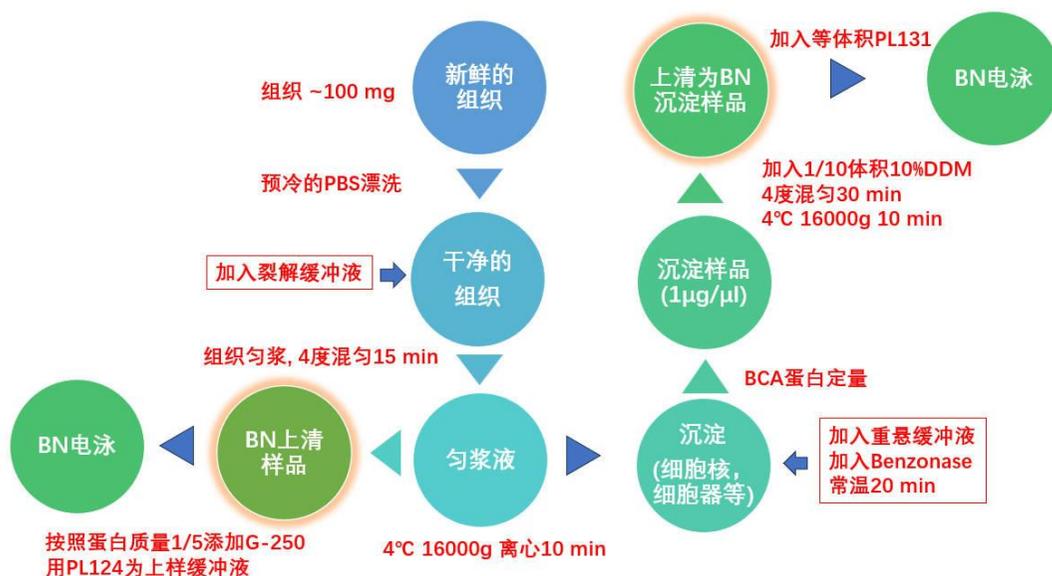
自备材料:

1×PBS; 1 ml 玻璃匀浆器; 台盼蓝染色液; 蛋白酶抑制剂; 磷酸酶抑制剂; 剪刀或刀片; BCA 蛋白定量试剂盒; 冰浴; 低温离心机。

一. 用前必读:

1. 离心机请调整成 RCF/g 模式，按照离心力设置离心机（不要根据转速 rpm 模式设置），所有离心步骤都需要在 4°C 低温离心机中进行。
2. 蛋白提取推荐添加蛋白酶抑制剂如 100 mM PMSF（100×）（自备，试剂盒不提供），添加时按照 1:100 添加。研究蛋白磷酸化，需要添加磷酸酶抑制剂（自备，试剂盒不提供）。
3. 蛋白定量推荐使用 BCA 方法，可以选择 BCA 蛋白浓度测定试剂盒（货号：RTP7102）。

实验流程图：



二. 提取步骤：

2.1 组织漂洗：

取约 100 mg 新鲜动物组织，用 1×PBS 清洗两次，弃净清洗液。

2.2 组织匀浆（关键步骤）：

用剪刀或刀片尽量小心剪切成细小的组织碎片，置于 1.5 ml 离心管中，先加入 0.5 ml 裂解液，随后转移到 1 ml 玻璃匀浆器内冰浴充分匀浆~5 次；随后再补加入 0.5 ml 裂解液冰浴继续匀浆~5 次，**每 100 mg 组织总共需要使用 1 ml 裂解缓冲液。**

注：此匀浆步骤为关键环节。玻璃匀浆器（紧致型）上下推拉一次为一次完整匀浆，匀浆本着宁少勿多，不够再补的原则，不要过度匀浆。匀浆破碎效果与组织类型有关，不同的样品所需匀浆次数不同，软组织如肺，脾脏，肾脏，脑等需要 10 次左右，硬组织如心脏，骨骼肌等需要 15 次左右。鉴定方法：取 10 µl 匀浆后的样品，加入等体积的台盼蓝溶液，混匀，在显微镜下观察台盼蓝溶液染色阳性（蓝色）细胞数目的比例，当阳性（蓝色）细胞破碎达到 80% 即可停止匀浆，请勿过度匀浆。若阳性（蓝色）细胞比例未达到 80%，适当增加 1-2 次匀浆，随后按照同样的方法使用台盼蓝溶液进行鉴定。

2.3 胞浆蛋白提取：

2.3.1 把匀浆液转移到 1.5 ml 离心管内，冰浴放置 15 分钟（间歇混匀）或者 4°C 旋转混匀 15 分钟；

2.3.2 16000 g 4°C 离心 10 分钟，取 80% 上清保存备用；

注：上清主要包含胞浆蛋白。吸取上清时不要触及沉淀，可以只取 80% 体积上清，避免和沉淀交叉污染。100 mg 组织得到的胞浆蛋白浓度约 2-5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，不同组织略有不同。

2.4 沉淀样品制备：

2.4.1 彻底去除步骤 2.3.2 中的上清，**100 mg 组织得到的沉淀中加入 0.5 ml 重悬缓冲液**，吸头重悬沉淀。注：重悬沉淀时，溶液可能会变粘稠，会有堵吸头现象，经过 2.4.2 步骤处理后再次重悬。

2.4.2 蛋白溶液中加入 5 μl （1/100 溶液体积）Benzonase，常温 20 min，间歇混匀；

注：加入核酸酶处理能有效降低溶液粘度，提高蛋白得率；此步骤需要常温进行，如低温孵育，需延长长时间到 40 min。

2.4.3 关键步骤-定量沉淀样品浓度：

BCA 方法测定蛋白溶液的蛋白浓度（货号：RTP7102）；

注：必须测定蛋白浓度后再进行如下操作，不能根据经验估算蛋白浓度。

100 mg 组织得到沉淀重悬于 0.5 ml 重悬缓冲液中，蛋白浓度约 5-10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，不同组织略有不同；

2.4.4 用重悬缓冲液调整蛋白浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

注：溶液可以按需分装，建议每管 50-100 μl ，-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用；

2.4.5 关键步骤-沉淀样品增溶：

取合适体积的蛋白溶液（浓度 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ），加入 1/10 体积 10% DDM，轻柔混匀，冰浴 30 分钟（间歇混匀）或者 4 $^{\circ}\text{C}$ 旋转混匀 30 min。如取 50 μl 蛋白溶液（浓度 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ），加 5 μl 10% DDM。

注：此步骤是把沉淀（包含细胞核，线粒体，内质网以及细胞碎片）中的蛋白（包括膜蛋白）用去垢剂溶解出来，由于去垢剂溶解能力需要和蛋白含量严格对应，故加入溶液体积要精准，不能随意变更。

2.4.6 16000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 分钟，取上清至一干净 1.5 ml 离心管中即为增溶后蛋白溶液（小心不要吸取沉淀），此时得到的蛋白浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，其中去垢剂 DDM 终浓度为 1%。

三. BN 电泳上样液制备：

3.1 胞浆蛋白：

由于胞浆蛋白不含有去垢剂，按照蛋白含量的 1/5（质量比）添加考马斯亮蓝 G-250 染料后进行电泳。举例说明：配制 100 μl 浓度 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的胞浆 BN 上样液，内含蛋白 100 μg ，需要添加 20 μg G-250，即添加 1 μl 2% G-250。

	100 μl (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 胞浆蛋白上样液
胞浆样品	100 μg
2 \times BN/CN-PAGE 蛋白上样缓冲液	50 μl
2% G-250	1 μl
水	补至 100 μl
	不要加热，上样 5-20 μl (5-20 μg)

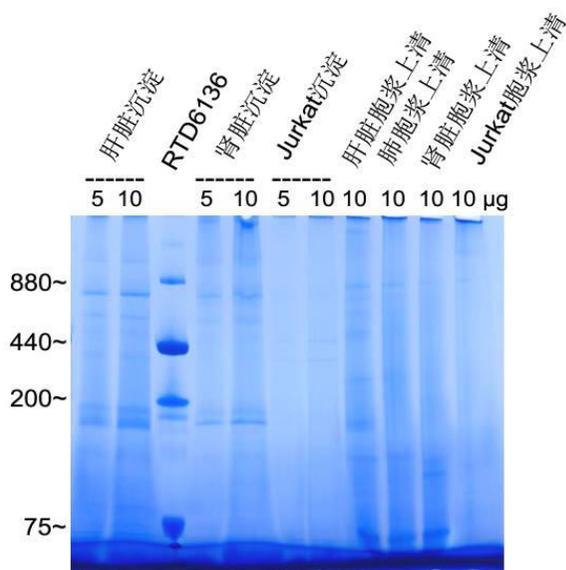
3.2 沉淀样品：

步骤 2.4.6 蛋白溶液中加入等体积 2 \times 膜蛋白 A 型上样缓冲液（货号：PL131-01），此时蛋白浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，不要加热，上样 5-20 μg 。

四. BN 电泳凝胶选择:

BN 电泳可以选用 Blue/Clear 非变性凝胶电泳试剂盒(预制胶,通用型)(货号:RTD6139)或 Blue/Clear 非变性凝胶电泳试剂盒(手灌胶)(货号:RTD6140);转膜缓冲液选择 10×BN 转膜缓冲液(货号:BC600P);蛋白 Marker 可以使用宽分子量非变性电泳蛋白质 Marker II (21-880 kD)(货号:RTD6136)。

五. 实验示例:



小鼠组织和 Jurkat 细胞 BN 样品制备电泳图

凝胶: 3-12% RealPAGE Native BN/CN 预制胶 (RTD6138-0312);

样品提取: 50 mg 冻存小鼠组织, 加 0.5 ml 裂解缓冲液, 匀浆 10 次; 四度旋转 10min; 16000g 15 min, 上清为胞浆蛋白, BCA 定量浓度为 8 μg/μl;

沉淀中加 0.2 ml 重悬缓冲液; 加入 2 μl Benzonase (250U/μl), RT 20 min;

BCA 定量, 浓度 15 μg/μl, 用重悬缓冲液稀释为 1 μg/μl;

沉淀样品增溶: 取 100 μl 重悬蛋白 (1μg/μl) +10 μl 10%DDM, 四度旋转 30min; 16000g 15min, 取上清即为增溶后的沉淀样品。

上清样品上样处理: 上样液体积 100μl (浓度 1μg/μl), 包含 100μg 蛋白 (12.5 μl), 50 μl 2×BN/CN 上样缓冲液, 1μl 2%G-250; 上样 10μl/10μg;

沉淀样品上样处理: 上样液体积 100μl (浓度 0.5 μg/μl), 取 50 μl 增溶后的上清加 50 μl PL124, 上样 10 μl/5μg 和 20 μl/μg