



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

10×BN 转膜缓冲液

Ver.760751-3.0

产品编号	产品名称	规格
BC600P	10×BN 转膜缓冲液（粉末）	1 升

● 产品简介：

10×BN 转膜缓冲液适用于 BN 蛋白电泳后凝胶上非变性蛋白的转膜。本转膜液配制便捷，稀释后无需调节 pH 值，pH 约为 7.2-7.7。由于 BN 电泳凝胶系统的特殊性，BN 转膜缓冲液不建议用于传统 Tris-甘氨酸系统以及 Bis-Tris 系统凝胶电泳后的转膜。

该缓冲液最终可配成 10 升即用型 1×缓冲液（根据需求补加甲醇或乙醇）。以每次湿转膜使用一升溶液计算，该产品可以进行 10 次转膜实验。

● 贮存、运输及效期：

粉末装常温贮存，常温运输，两年有效；配成 10×转膜缓冲液后 4℃贮存，一年有效；加入醇的即用型转膜缓冲液 4℃贮存，一个月有效；即用型转膜缓冲液不建议重复使用。

● 一. 配制方法：

1.1 10×BN 转膜缓冲液（溶液型）配制：

原料	10×BN 转膜缓冲液（溶液型）1 升
10×BN 转膜缓冲液（粉末）	取 BC600P 全部粉末溶于 1000 ml 超纯水中，彻底溶解，即配制成 1 升 10×BN 转膜缓冲液（溶液型）

1.2 1×即用型 BN 转膜缓冲液配制：

		1×即用型 BN 转膜缓冲液 配制量 1 升
	10×BN 转膜缓冲液	100 ml
	超纯水	约 500 ml
<20 kD 蛋白	无水甲醇或乙醇	20%（200 ml）
20-200 kD 蛋白		10%（100 ml）
>200 kD 蛋白		0%（不添加）
	超纯水	定容至 1 升，不要调节 pH
		四度预冷 1 小时

注：转膜缓冲液中加入甲醇对蛋白有固定作用，转膜分子量较大的蛋白少加或不加醇，转膜分子量较小的蛋白要加至多 20% 的醇；为确保转膜效果，转膜缓冲液不建议重复使用。

● 二. 使用方法：

2.1 BN 电泳凝胶选择：

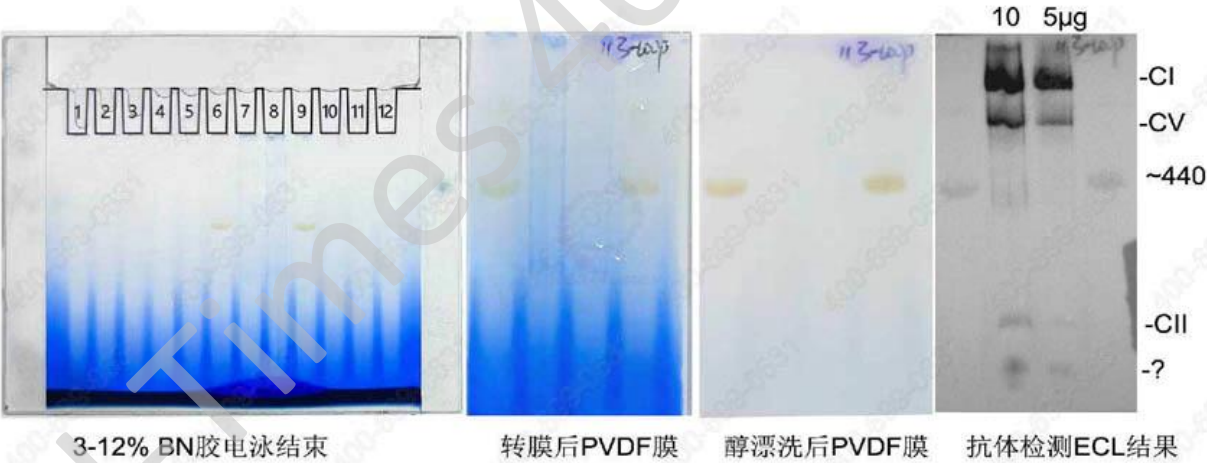
BN 电泳可以选择 Blue/Clear 非变性凝胶电泳试剂盒（货号：RTD6139-0312 或 RTD6139-0416）。

2.2 转膜:

- 2.2.1 转膜方法: BN 电泳后的转膜建议用湿转法, 不推荐半干转方法。
- 2.2.2 膜的选择: **BN 电泳转膜必须使用 PVDF 膜, 不能用 NC 膜** (NC 膜会与考马斯亮蓝 G-250 不可逆结合, 很难清除干净)。根据蛋白大小选择膜的孔径。一般说来, 大于 20 kD 蛋白选择 0.45 μm 孔径, 低于 20 kD 选择 0.22 μm 孔径。**PVDF 膜使用前要用无水甲醇或乙醇润湿活化。**
- 2.2.3 三明治结构: 转膜三明治结构与传统转膜相同, 即根据“黑胶白膜”制作三明治, 即膜置于转膜夹芯正极一侧, 凝胶置于转膜夹芯负极一侧, 这样凝胶上带负电荷的蛋白才能转移到膜上。
- 2.2.4 转膜条件:
- 由于在非变性条件下, 不同蛋白的空间结构, 聚合状态, 电荷数量都有不同, 以下转膜条件仅供参考, 客户针对自己的目的蛋白, 最好经过 1-2 次预实验后, 确定最佳的转膜条件。

即用型转膜缓冲液	检测蛋白大小	稳流	电压变化	建议时间	降温措施
1×转膜液+20%甲醇或乙醇	低于 20 kD	200 mA	70-75 V	~1 小时	全程冰浴
1×转膜液+10%甲醇或乙醇	20-200 kD		65-75 V	1-2 小时	
1×转膜液+0%甲醇或乙醇	高于 200 kD		80-95 V	2-3 小时	

- 注: 恒流转膜时, 电压不可调节, 是变化的, 记录电压变化值, 如果出现电压剧烈偏差出变化数值, 检测转膜体系后排除原因。
- 2.3 洗膜:
- PVDF 膜用甲醇或乙醇清洗 2-3 次, 每次 3-5 分钟, 彻底去除蓝色 G250 (残余 G250 会影响后续封闭和抗体结合)。
- 2.4 进行后续 WB 操作: 封闭-一抗-二抗-检测。
- 三 实验示例:



小鼠线粒体复合物 BN 电泳后 Cocktail 抗体检测

样品处理: 小鼠肾脏膜蛋白样品 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (BN 电泳样品制备试剂盒, RTD8304 提取), 取 50 μl 16000g 5 min, 沉淀中加入 45 μl 膜蛋白重悬液 (PN1020M), 加 5 μl 10%DDM (BN2005M), 四度旋转 30min, 16000g 15min, 45 μl 上清中加等体积 2×膜蛋白 A 型上样缓冲液 (PL131), 浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 上样液, 上样 10 μl 和 20 μl ;

凝胶: 3-12%RealPAGE Native BN/CN 预制胶 (RTD6138-0312), 1×蓝色 BN 电泳缓冲液 (1×BC500P+加终浓度 0.02%G-250), 恒压 200V, 电泳 40 min, 至 G-250 到达距离凝胶下沿 1/3 处时, 换为 1×BC500P (无色), 继续电泳 35min, 至 G250 到达凝胶底部, 结束电泳;

转膜: 0.45 μm PVDF 膜, 1×BC600P 不加醇 (提前四度预冷 1 小时), 恒流 200mA 120 min, 电压

变化 80-95 V，全程冰浴转膜；

洗膜：PVDF 膜转膜后结合了 G-250，用甲醇漂洗两次，每次 5 min；

封闭：快速封闭液常温封闭 5min；

一抗：线粒体氧化磷酸化 Cocktail 抗体 1：1000（一抗稀释液，WP1080））；

二抗：羊抗兔 IgG-HRP 1：5000（二抗稀释液，WS1056）；

检测：RealECL 发光液（EC2520），曝光 1s480ms。