

ご使用に際しては、本添付文書をよくお読みください。

## 電気泳動用 2D-銀染色試薬・II

### 〔はじめに〕

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって泳動されたタンパク質や核酸の高感度検出法として、銀染色法が注目されています。しかし、操作が煩雑な上、長時間を要するという欠点があります。

2D-銀染色試薬・IIは、試薬の調製及び操作法にわずらわしさがなく、短時間で鮮明な染色パターンが得られるように開発された電気泳動用銀染色試薬です。

### 〔特長〕

- 1) 電気泳動後、短時間で染色できます。
- 2) 高感度でタンパク質、核酸の染色ができます。  
タンパク質：CBB法の50～100倍  
核酸：EB法の50～100倍の感度が得られております。
- 3) 試薬の調製及び染色操作が簡便です。
- 4) 重金属等法規制を受ける試薬を使用しておりません。
- 5) CBB法で染色した後のゲルの染色もできます。
- 6) 適度な染色像が得られた時点で、現像を停止することができます。

### 〔適応〕

スラブ型ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)、及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)後のタンパク質及び核酸の染色。

### 〔内容〕

試薬名	主成分	容量
①固定化剤	チオ尿素	100mL
②前処理剤	ジチオスライトール、グルタルアルデヒド、チオ尿素	100mL
③染色液A	硝酸銀	100mL
④染色液B	水酸化アンモニウム、水酸化ナトリウム	100mL
⑤現像原液	クエン酸、ホルムアルデヒド、チオ硫酸ナトリウム	100mL
⑥停止液	クエン酸	100mL

### 〔使用法〕

・タンパク質をサンプルとした場合

#### I. 使用試薬・器具

1. メタノール (特級以上のもの)
2. 酢酸 (特級以上のもの)
3. 脱イオン水 (10<sup>-6</sup>mho以下のもの)
4. メスシリンダー
5. 写真用バット
6. メスピベット

#### II. 試薬の調製法

試薬の調製はスラブゲル(140mm×140mm×1.0mm)を基準として、ゲルの大きさにより体積比で換算調製します。

各試薬は、用時調製して下さい。

##### 1. 固定液 I

下記の処方に従って自製して下さい。

メタノール100mL、酢酸20mL及び脱イオン水80mLを加え全量を200mLとし、攪拌混合して固定液 I とします。

##### 2. 固定液 II

メタノール60mL、酢酸20mL、①固定化剤10mL、及び脱イオン水110mLを加え全量200mLとし、攪拌混合して固定液 II とします。

##### 3. 前処理液

メタノール100mL、②前処理剤10mL及び脱イオン水90mLを加え全量を200mLとし、攪拌混合して前処理液とします。

##### 4. 銀染色液

③染色液A 10mLと④染色液B 10mLを混合し、脱イオン水180mLを加え全量を200mLとし、攪拌混合して銀染色液とします。

##### 5. 現像液

⑤現像原液10mLに脱イオン水190mLを加え全量を200mLとし、攪拌混合して現像液とします。

#### III. 染色操作法

(タンパク質  
ゲル厚1mmの場合)

固定液 I 200mL、ゲル

10分

↓

固定液 II 200mL

15分

↓

前処理液 200mL

10分

↓

脱イオン水 200mL

5分

↓

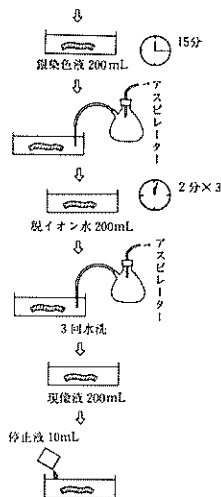
水洗

1. 表面が平滑で清浄な容器に固定液 I 200mLを注ぎ、ゲルを浸し、10分間振とうします。

2. 固定液を捨て、固定液 II 200mLを注ぎ、15分間振とうします。

3. 固定液 II を捨て、前処理液 200mLを注ぎ、10分間振とうします。

4. 前処理液を捨て、脱イオン水 200mLを注ぎ、5分間振とうします。



5. 水を捨て、銀染色液200mLを注ぎ、15分間振とうします。
6. 銀染色液を廃液容器に捨て、脱イオン水200mLを注ぎ、2分間振とうします。これを3回繰り返します。(廃液には直ちに濃塩酸2～3mLを加え、塩化銀とします。)
7. 水を捨て、現像液200mLを注ぎ、振とうします。
8. 適度の染色像が得られたら(5～10分)、⑥停止液10mLを注ぎよく振とうします。
9. 現像が停止したら(～10分)十分水洗して保存してください。

・核酸染色の場合は、本キット中の固定化剤、前処理剤を使用せず、10%トリクロロ酢酸、50%メタノールを調製してお使いください。詳細につきましては、弊社試薬統括部までお問い合わせください。

試薬	使用量 (140mm×140mm×1.0mmの場合)	振とう時間*		
		ゲル厚1mm	ゲル厚2mm	等電点ゲル
1. 固定液 I	200mL	10分	20分	60分*
2. 固定液 II	200mL	15分	30分	30分
3. 前処理液	200mL	10分	20分	30分
4. 脱イオン水	200mL	5分	10分	5分
5. 銀染色液	200mL	15分	25分	30分
6. 脱イオン水	200mL×3	各2分	各5分	各2分
7. 現像液	200mL	5～10分	5～10分	5～10分
8. 停止液	10mL			

\*a 時間は処理時の試薬温度20～23℃を基準としたものです。

\*b 各試薬の使用量は2倍になります。

\*c 等電点ゲルの場合には、3.5%スルホサリチル酸11.5%トリクロロ酢酸200mLを固定液 I として使用して下さい。

### 〔使用上の注意〕

- 1) 調製した銀染色液は放置すると爆発性の銀アミドを生成する危険性がありますので、使用後は必ず塩酸や塩化ナトリウム等で、塩化銀の沈殿物にしてください。〔操作法6〕
- 2) 本製品の構成試薬中、染色液Bはアルカリ物質として水酸化ナトリウム、水酸化アンモニウムを含有していますので、目や皮膚につかないよう注意してください。もし、目に入った場合は速やかに流水で洗眼した後、医師の手当を受けてください。皮膚や衣服については速やかに水で洗い流してください。
- 3) 染色液A等その他の構成試薬も粘膜、皮膚等を刺激する場合があります。もし、目、皮膚や衣服についたときは速やかに洗い流してください。また炎症を起こした場合は医師の手当を受けてください。
- 4) 銀染色液を加えたと、液が着色あるいは濁りを生じることがありますが、染色には影響しません。〔操作法5〕
- 5) 使用する水は10<sup>-6</sup>mho以下の脱イオン水を使用してください。
- 6) 染色に使用する容器は表面が平滑で清浄なものを使用してください。
- 7) CBB法染色後、さらに銀染色を実施する場合は、脱色をしっかりと行う(3時間以上数回脱色液を交換しながら脱色した後)、銀染色の操作を行ってください。
- 8) 操作中ゲルにきずをつけないよう注意してください。
- 9) 操作中ゲルが液面より出ないように注意してください。
- 10) ゲルが直接皮膚に触れないよう、操作中はディスポーズブルの手袋を使用してください。
- 11) 振とう器がない場合は、時々手で振とうしてください。
- 12) ゲル厚が1mm以上の場合は、多少検出感度が低下します。
- 13) 試薬は密栓冷蔵保存してください。開封後は6カ月以内で使用してください。
- 14) 使用する試薬(メタノール、酢酸)は特級以上の高純度品を用いてください。

### 〔包装〕

スラブゲル (140mm×140mm×1.0mm) 10枚用

### 〔貯法〕

2～10℃ 遮光

### 〔使用期限〕

外装に記載

### 〔参考文献〕

- 1) K. Ohsawa et al. : Silver Stain for Detecting 10-Femtogram Quantities of Protein after Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Anal. Biochem., 135, 409 (1983)
- 2) 入江伸吉 : ゲル内のタンパク質の高感度銀染色法、生化学, 52, 411 (1980)
- 3) B.R. Oakley et al. : A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels, Anal. Biochem., 105, 361 (1980)
- 4) H. M. Poehling et al. : Visualization of proteins with silver "stain", a critical analysis, Electrophoresis, 2, 141 (1981)
- 5) U.K. Laemmli : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>, Nature, 227, 680 (1970)

(2004年11月改訂)



コスモ・バイオ株式会社

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル

Reagent for electrophoresis  
**2D-SILVER STAIN-II**

● **Introduction**

For detection of proteins and nucleic acids migration by polyacrylamide gel electrophoresis, silver staining is now being highlighted as a sensitive staining method. However the original silver staining method is not necessarily easy to work and takes long-time.

**2D-SILVER STAIN-II** is an improved reagent kit developed to provide simple and fast staining.

● **Features**

- 1) Rapid staining results in a short time after electrophoresis.
- 2) Staining with higher sensitivity  
For proteins: 50 to 100 times more sensitive than CBB staining  
For nucleic acids: 50 to 100 times more sensitive than EB staining
- 3) Simple preparation and simple operation.
- 4) No use of such materials as heavy metals controlled by regulations.
- 5) Capable of restaining CBB-stained gels. (Double-staining)
- 6) Staining process can be stopped any time during development for desired chromatic figures.

● **Applications**

**2D-SILVER STAIN-II** is applicable to the detection of proteins and nucleic acids subjected to polyacrylamide and SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis.

● **Components**

Reagents	Main ingredients	Volume
① Fixing Reagent	Thiourea	100mL×1
② Pretreatment reagent	Dithiothreitol, Glutar-aldehyde, Thiourea	100mL×1
③ Staining Solution A	Silver nitrate	100mL×1
④ Staining Solution B	Ammonium hydroxide, Sodium hydroxide	100mL×1
⑤ Concentrated developer	Citric acid, Formaldehyde, Sodium thiosulfate	100mL×1
⑥ Stopper	Citric acid	100mL×1

● **Procedure**

For protein staining

In addition to the reagents supplied with the kit, the following materials are required.

- 1) Methanol
- 2) Acetic acid
- 3) Deionized water (less than  $10^{-6}$  mho conductivity)
- 4) Measuring cylinder
- 5) Flat-bottomed tray for developing gels
- 6) Measuring pipette

1. **Preparation of reagents**

Prepare the following solutions just before staining the gel. The volume of reagents used for preparation shown below is based on the size of 140 mm × 140 mm × 1.0 mm slab gel. For any different sizes of slab gels, the volume of reagents should be prepared in proportion to the size of the gel to be used.

1) **Fixing solution I**

Mix 100mL of methanol and 20 mL of acetic acid with 80 mL of deionized water. Stir and use the mixture as fixing solution I.

2) **Fixing solution II**

Mix 60 mL of methanol, 20 mL of acetic acid and 10 mL of ① Fixing Reagent with 110 mL of deionized water. Stir and use the mixture as fixing solution II.

3) **Pretreatment solution**

Mix 100 mL of methanol, 10 mL of ② Pretreatment Reagent and 90 mL of deionized water. Stir and use the mixture as pretreatment solution.

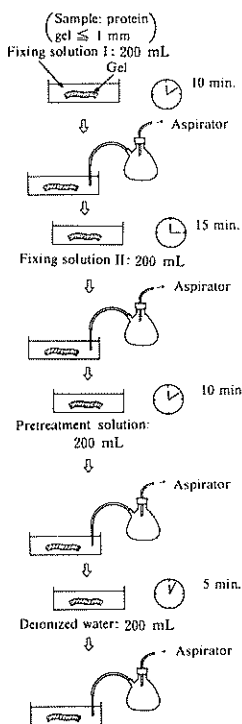
4) **Silver staining solution**

Mix 10 mL of ③ Staining Solution A and 10 mL of ④ Staining Solution B and stir. Then add 180 mL of deionized water and stir. Use the mixture as silver staining solution.

5) **Developer**

Add 10 mL of ⑤ Concentrated Developer to 190 mL of deionized water and stir. Use the mixture as developer.

2. **Staining Procedure**

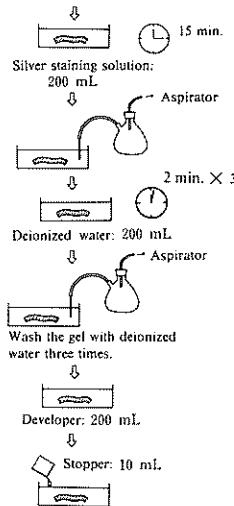


1) Soak the gel in fixing solution I in a clean flat-bottomed tray, and shake it for 10 min-utes.

2) Remove the solution, and then pour 200 mL of fixing solution II to the tray and shake it for 15 minutes.

3) Remove the solution, and then pour 200 mL of pretreatment solution to the tray and shake it for 10 minutes.

4) Remove the solution, and then pour 200 mL of the deionized water to the tray and shake it for 5 minutes.



- 5) Remove the solution, and then pour 200 mL of silver staining solution to the tray and shake it for 15 minutes.
- 6) Remove the silver staining solution into a container. Immediately add 2 ~ 3 mL of concentrated hydrochloric acid to the waste solution, to convert the silver into silver chloride. (This procedure must be followed.) Pour 200 mL of deionized water to the tray and shake it for 2 minutes, and then remove the water. Repeat this step three times.
- 7) Pour 200 mL of developer to the tray and shake it well.
- 8) When appropriate chromatic figures are obtained, pour 10 mL of ⑥ Stopper Solution to the same tray and shake it for a moment.
- 9) Leave it about 10 minutes and then wash the gel with deionized water two or three times, and keep it.

In case of nucleic acids staining, Please use 10% Trichloroacetic acid and 50% Methanol in stead of fixing solution and pretreatment solution supplied.

Reagents	Volume (For 140mm×140 mm×1.0 mm slab gel)	Duration of shaking**		
		Gel ≤ 1mm	Gel ≤ 2 mm**	IEF
1. Fixing solution I	200 mL	10 min.	20 min.	60 min.**
2. Fixing solution II	200 mL	15 min.	30 min.	30 min.
3. Pretreatment solution	200 mL	10 min.	20 min.	30 min.
4. Deionized water	200 mL	5 min.	10 min.	5 min.
5. Silver staining solution	200 mL	15 min.	25 min.	15 min.
6. Deionized water	200 mL × 3 times	2 min. every time	5 min. every time	2 min. every time
7. Developer	200mL	5 to 10 min.	5 to 10 min.	5 to 10 min.
8. Stopper	10 mL			

Cautions: \*a The duration of shaking is based on the temperature of 20 to 23°C.

\*b The quantity of the each reagent be twice that of gel ≤ 1 mm.

\*c In case of staining after IEF, use 200 mL of 3.5% Sulfosalicylic acid/11.5% TCA solution as fixing solution I.

● **Notes**

- 1) As the silver staining solution produces explosive silver amide when left to stand, the solution must be treated with hydrochloric acid or sodium chloride, to convert the silver into silver chloride. (See Procedure 6.)
- 2) Since Staining Solutions B among the components of 2D-Silver Stain-II, contains ammonium hydroxide and sodium hydroxide as an alkali substance respectively, take care to prevent them from contacting the eye and the skin. In case of eye contact, rapidly wash the eye with flowing water, and consult a doctor. In case of contact with the skin and clothes, rapidly wash away with water, and consult a doctor if inflammation is caused.
- 3) Staining Solution A and other components may also cause a stimulus to the mucous membrane and the skin. In case of contact with the eye, skin, and clothes, rapidly wash away with water, and consult a doctor if inflammation should be caused.
- 4) Addition of the silver staining solution to the sample gel may color or make turbid the solution. Such coloration and turbidity do not affect the stain. (See Procedure 5.)
- 5) Deionized water or distilled water of less than  $10^{-6}$  mho conductivity is recommended.
- 6) The tray to be used for the staining should be clean and have a smooth surface.
- 7) When a sample gel stained by the CBB staining is to be subjected to the silver staining, the sample gel should be washed with deionized water thoroughly, (3 hours or longer while changing deionized water several times prior to the silver staining.)
- 8) Care should be taken not to damage the gel during operation.
- 9) Care should be taken to see that the gel may not come out of the surface of solution.
- 10) Use a pair of disposable gloves in staining operation not to touch the gel.
- 11) If a proper shaker is not available, shake the tray by hand.
- 12) The sensitivity of a gel thicker than 1 mm declines somewhat as compared with a thinner gel.
- 13) Keep the reagents in a tightly closed container and refrigerated, and use within 6 months after unsealing.
- 14) Use the reagents (methanol, acetic acid) of superior quality.

● **Package size**

Enough to stain 10 slab gels (140 mm×140 mm×1.0mm)

● **Storage**

The kit should be stored in a dark place at 2-10°C.

● **The term of validity**

Printed on the package.

● **References**

- 1) K. Ohsawa et. al.: Silver Stain for Detecting 10-Femtogram Quantities of Protein after Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Anal. Biochem., **135**, 409 (1983)
- 2) S. Irie: A highly sensitive Silver Staining for detection of proteins in polyacrylamide gels, Biochemistry (Japan), **52**, 411 (1980)
- 3) B.R. Oakley et. al.: A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem., **105**, 361 (1980)
- 4) H.M. Poehling et. al.: Visualization of proteins with silver "stain", a critical analysis, Electrophoresis, **2**, 141 (1981)
- 5) U.K. Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature, **227**, 680 (1970)

For research use only



**COSMO BIO CO., LTD.**

URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

銀イオンはアンモニア性アルカリ溶液中で銀ジアミン錯体を形成します。銀イオンや銀錯体イオンはタンパク質と結合(-SH基に最も結合しやすい)し、これをクエン酸、ホルマリンの作用により還元して金属銀を析出し、タンパク質のバンドの黒化像を得ます。核酸の場合は、プリン、ピリミジン塩基の-NH<sub>2</sub>基に結合します。

# 1. タンパク質をサンプルとした場合

## I. 使用機器、器具、試薬

### 使用機器・器具

	品名
1	振とう器
2	スパーテル
3	染色トレイ
4	ディスポーザブル手袋

### 試薬

#### (1) 銀染色試薬

品番	品名	包装	貯法
423413	2D-銀染色試薬・II	10枚用	2~10℃

#### (2) 試薬の調製

試薬の調製は、スラブゲル140mm×140mm×1.0mm 1枚分（マルチゲル® II ミニの場合2枚分）を基準としていますので、ゲルの大きさ、厚さが異なる場合は体積比で調製してください。また、各試薬は用時調製してください。（マルチゲル® II はRNAの電気泳動にはご使用できません。）




調製法	留意点
(1) 固定液 I メタノール 100 ml 酢酸 20 ml 精製水で全量 200 ml 攪拌混合して固定液 I とする。	○精製水は、10 <sup>-6</sup> mho以下のものを使用してください。 ○メタノール、酢酸は特級以上の高純度品を用いてください。 [ 固定液 I は本キット中に用意しておりませんので自製してください。 尚、等電点ゲルの場合は、固定液 I のかわりにスルホサリチル酸固定液を自製してください。* ]
(2) 固定液 II メタノール 60 ml 酢酸 20 ml ① 固定化剤 10 ml 精製水で全量 200 ml 攪拌混合して固定液 II とする。	
(3) 前処理液 メタノール 100 ml ② 前処理剤 10 ml 精製水で全量 200 ml 攪拌混合して前処理液とする。	○銀染色後にMS解析を行う場合は、前処理剤を除いてお使いください。 前処理液   メタノール 100 ml 精製水で全量 200 ml





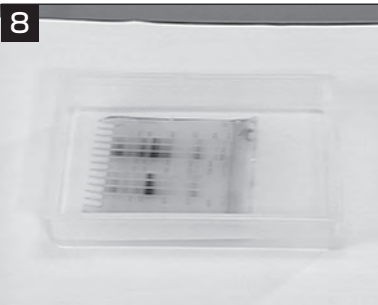
調製法	留意点
(4) 銀染色液 ③ 染色液 A 10 mlに ④ 染色液 B 10 mlを 混合後 精製水で全量 200 mlを 攪拌混合して銀染色液とする。	○銀染色液は放置すると爆発性の銀アミドを生じる可能性がある ので用時調製とし、また使用後はconc.HCl (2~3 ml)、 NaCl 等を加えAgClの沈殿物としてください。 ○染色液Aの量が多い場合には感度が高くなりますが、ゲルの 黒化も生じ、また銀鏡の原因にもなります。
(5) 現像液 ⑤ 現像原液 10 ml 精製水で全量 200 ml 攪拌混合して現像液とする。	
(6) 停止液 ⑥ 停止液をそのまま使用します。	
*スルホサリチル酸固定液 スルホサリチル酸 7 g トリクロロ酢酸 23 g 精製水で全量 200 ml 攪拌溶解して使用する。	○等電点ゲルの場合、固定液 I のかわりに使用します。 ○精製水は、 $10^{-6}$ mho以下のものを使用してください。 ○スルホサリチル酸、トリクロロ酢酸は、特級以上のものを使用 してください。

## 操作手順

- ・以下の操作は**ディスパーザブル手袋を着用**して行ってください。
- ・精製水は **$10^{-6}$ mho以下のもの**を使用してください。
- ・使用液量はスラブゲル140mm×140mm×1.0mmを基準としているため、ゲルの大きさにより体積比で換算して調製してください。

\*マルチゲル<sup>®</sup> II ミニ1枚使用の場合は100 mlです。

<p><b>1</b></p> <p>固定液 I 200 ml</p>  <p>10分</p>	<p>表面の平滑で清浄な容器に固定液 I 200 mlを注ぎ、ゲルを浸し、10分間振とうします。</p> <p>○操作中ゲルが液面より出ないように注意してください。 ○容器は表面が平滑で清浄なものを使用してください。 ○専用の振とう器がない場合は、時々手で振とうしてください。</p>
<p><b>2</b></p> <p>固定液 II 200 ml</p>  <p>15分</p>	<p>固定液 I を捨て、固定液 II 200 mlを注ぎ、15分間振とうします。</p>
<p><b>3</b></p> <p>前処理液 200 ml</p>  <p>10分</p>	<p>固定液 II を捨て、前処理液200 mlを注ぎ、10分間振とうします。</p>

<p>4</p> <p>精製水 200 ml</p>  <p>5分</p>	<p>前処理液を捨て、精製水 200 mlを注ぎ、5分間振とうします。</p>
<p>5</p> <p>銀染色液 200 ml</p>  <p>15分</p>	<p>精製水を捨て、銀染色液 200 mlを注ぎ、15分間振とうします。</p> <ul style="list-style-type: none"><li>○銀染色注入時、液が着色あるいは濁りが生じても染色に影響ありません。</li><li>○時間を延長するに従い、現像に要する時間がある程度早くなります。</li></ul>
<p>6</p> <p>精製水 200 ml</p> <p>2分 ×3回水洗</p>  <p>×3回水洗</p>	<p>銀染色液を廃液容器*に捨て、精製水 200 mlを注ぎ、2分間振とうします。この操作を3回繰り返します。</p> <p>*廃液処理についてはp28を参照してください。</p> <ul style="list-style-type: none"><li>○ゲル中の余分な銀ジアミンイオンを除去します。水洗不足は、バックグラウンドの着色及びゲル銀鏡の原因となります。</li><li>○水洗時間を延長しすぎると現像に長時間を要します。</li></ul>
<p>7</p> <p>現像液 200 ml</p>  <p>5~10分</p>	<p>精製水を捨て、現像液 200 mlを注ぎ、5~10分間振とうします。</p> <ul style="list-style-type: none"><li>○現像液を加えた際に褐色に濁る場合には、その現像液を捨て、新たに調製した 200 mlの現像液を加えます。</li><li>○現像が不十分な場合、退色の原因となりますので、必ず5分以上現像してください。</li></ul>
<p>8</p> 	<p>適度の染色像が得られたら (5~10分) 停止液 10 ml (マルチゲル® II ミニ 1 枚の場合は 5 ml) を注ぎ、よく振とうします。</p>
<p>9</p>	<p>現像を停止したら (~10分) 十分水洗して保存してください。</p>

## ～ ワンポイントアドバイス ～

MALDI-TOF MS感度アップに伴い、銀染色で解析できる程度の微量タンパク質も銀染色後のMS解析が可能になりました。

2D-銀染色試薬・IIでは、前処理剤としてグルタルアルデヒドを使用しているため、そのまま使用した場合は、MS解析に適していません。

MS解析を行う場合には、前処理剤を除いて前処理液を調製してください。その他の試薬の調製、染色時間は通常の方法と同じです。

前処理液

メタノール 100 ml

精製水で全量 200 ml

攪拌混合して前処理液とする。

# 2. 核酸をサンプルとした場合

## I. 使用機器、器具、試薬

### 使用機器・器具

	品名
1	振とう器
2	スパーテル
3	染色トレイ
4	ディスポーザブル手袋

### 試薬

#### (1) 銀染色試薬

品番	品名	包装	貯法
423413	2D-銀染色試薬・II	10枚用	2~10℃

(注) 核酸染色の場合は、本キット中の①固定化剤、②前処理剤は使用しませんので、ご注意ください。

#### (2) 試薬の調製

試薬の調製は、スラブゲル140mm×140mm×1.0mm 1枚分（マルチゲル® II ミニの場合2枚分）を基準として  
いますので、ゲルの大きさ、厚さが異なる場合は体積比で調製してください。また、各試薬は用時調製してください。

	調製法	留意点
10% トリクロロ酢酸溶液	トリクロロ酢酸 20 g 精製水で全量 200 ml 攪拌混合する。	○精製水は、 $10^{-6}$ mho以下のものを使用してください。 ○メタノール、トリクロロ酢酸は特級以上の高純度品を用いてください。
50% メタノール溶液	メタノール 100 ml 精製水で全量 200 ml 攪拌混合する。	
銀染色液	③ 染色液 A 10 mlに ④ 染色液 B 10 mlを 混合後 精製水で全量200 mlを攪拌混 合して銀染色液とする。	○銀染色液は放置すると爆発性の銀アミドを生じる可能性がある るので用時調製とし、また使用後はconc.HCl (2~3 ml)、 NaCl 等を加えAgClの沈殿物としてください。 ○染色液Aの量が多い場合には感度が高くなりますが、ゲル の黒化も生じ、また銀鏡の原因にもなります。
現像液	⑤ 現像原液 10 ml 精製水で全量 200 ml 攪拌混合して現像液とする。	
停止液	⑥ 停止液をそのまま使用します。	





1

3. 銀染色

## 操作手順

- ・以下の操作は**ディスポーザブル手袋を着用して**行ってください。
- ・精製水は**10<sup>6</sup>mho以下のもの**を使用してください。
- ・使用量はスラブゲル140mm×140mm×1.0mmを基準としているため、ゲルの大きさにより体積比で換算して調製してください。

**\* マルチゲル<sup>®</sup> II ミニ1枚使用の場合は100 mlです。**

<p><b>1</b></p> <p>10%トリクロロ酢酸 200 ml</p> <p>10分</p> 	<p>表面の平滑で清浄な容器に10%トリクロロ酢酸溶液 200 mlを注ぎ、ゲルを浸し、10分間振とうします。</p>
<p><b>2</b></p> <p>50%メタノール 200 ml</p> <p>10分</p> 	<p>10%トリクロロ酢酸溶液を捨て、50%メタノール 200 mlを注ぎ、10分間振とうします。</p>
<p><b>3</b></p> <p>精製水 200 ml</p> <p>5分</p> 	<p>50%メタノールを捨て、精製水 200 mlを注ぎ、5分間振とうします。</p>
<p><b>4</b></p> <p>銀染色液 200 ml</p> <p>15分</p> 	<p>精製水を捨て、銀染色液 200 mlを注ぎ、15分間振とうします。</p> <ul style="list-style-type: none"><li>○銀染色液注入時、液が着色あるいは濁りが生じても染色に影響ありません。</li><li>○時間を延長するに従い、現像に要する時間がある程度早くなります。</li></ul>

1


3.  
銀  
染  
色



**5**

精製水  
200 ml

2分  
×3回水洗



銀染色液を廃液容器\*に捨て、精製水 200 mlを注ぎ、2分間振とうします。この操作を3回繰り返します。


\*廃液処理についてはp28を参照してください。

- ゲル中の余分な銀ジアミンイオンを除去します。水洗不足は、バックグラウンドの着色及びゲル銀鏡の原因となります。
- 水洗時間を延長しすぎると現像に長時間を要します。

**6**

現像液  
200 ml

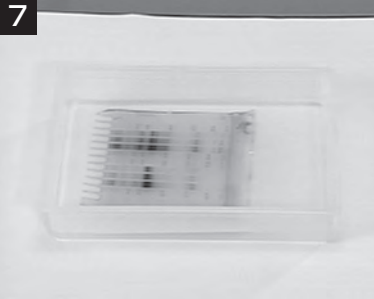
10~20分



精製水を捨て、現像液 200 mlを注ぎ、10~20分間振とうします。

- 現像液を加えた際に褐色に濁る場合には、その現像液を捨て、新たに調製した200 mlの現像液を加えます。
- 現像が不十分な場合、退色の原因となりますので、必ず10分以上現像してください。

**7**



適度の染色像が得られたら（10~20分）停止液10 mlを注ぎ、よく振とうします。

**8** 現像を停止したら（~20分）十分水洗して保存してください。

### ～ ワンポイントアドバイス ～

銀染色に使用するバットは、使用を重ねるうちに銀が付着して茶色になってきます。これは、濃硝酸で洗えばきれいに落ちます。また、銀染色に使用するバットを市販のビニール袋で覆って染色操作を行い、毎回取り替えれば洗浄の必要もありませんし、毎回新しい染色バットを使用するのと同じです。

## 銀染色操作のまとめ

試薬	使用量 (140 mm×140 mm×1.0 mm)*	振とう時間 (試薬温度20~23℃基準)			
		ゲル≤1 mm	ゲル≤2 mm*	等電点ゲル**	片面接着ゲル
1. 固定液 I	200 ml	10分	20分	60分	30分
2. 固定液 II	200 ml	15分	30分	30分	30分
3. 前処理液	200 ml	10分	20分	30分	30分
4. 脱イオン水	200 ml	5分	10分	5分	5分
5. 銀染色液	200 ml	15分	30分	30分	30分
6. 脱イオン水	200 ml×3	各2分	各5分	各2分	各2分
7. 現像液	200 ml	5~10分	5~10分	5~10分	5~10分
8. 停止液	10 ml				

\* 2 mmゲルの場合、各試薬の使用量を2倍にしてください。

\*\* 等電点ゲルの場合、固定液 I としてスルホサリチル酸固定液を使用してください。

## 泳動条件と銀染色の適用

### ●タンパク質を主とする電気泳動条件

	電気泳動法	ゲルの種類	泳動Buffer系
適用 できる 泳動 条件	Davisらの方法及び変法	PAG (polyacrylamide gel) Urea- PAG	トリス-グリシン
	Weber & Osbornの方法	SDS- PAG	リン酸
	Swank & Munkerの方法	SDS- PAG	トリス-リン酸
	Laemmli の方法	SDS- PAG	トリス-グリシン
	奥山らの方法	一次元 IEF、二次元 { SDS- PAG PAG	トリス-グリシン
	等電点電気泳動法	アンフォライン入 PAG	水酸化ナトリウム、リン酸
	_____	SDS- PAG	イミダゾール*
難溶性タンパク質の二次元電気泳動 (O'farrellの系)	一次元 detergent入 IEF 二次元 SDS- PAG	トリス-グリシン	
不適用 条件	Panyim & Chalkleyの方法	Acid-Urea- PAG	酢酸

\* イミダゾールの場合、過ヨウ素酸処理は行わないでください。

### ●核酸を主とする電気泳動条件

	ゲルの種類	泳動Buffer系
適用 できる 泳動 条件	PAG (polyacrylamide gel)	Tris-酢酸- EDTA (TAEbuffer)
	PAG (polyacrylamide gel)	Tris-ホウ酸- EDTA (TBEbuffer)
	PAG (polyacrylamide gel)	トリス-グリシン
	アガロース- PAG (混成ゲル)	Tris-ホウ酸- EDTA (TBEbuffer)
	PAG (Urea入)	Tris-ホウ酸- EDTA (TBEbuffer)
不適用 条件	PAG (ホルムアミド入)	_____

1

3. 銀  
染  
色

# 3. トラブルシューティング, FAQ

## トラブルシューティング

分子量70 KDa付近に偽バンド (artifact) が見られた・・・

原因	対策
表皮のタンパク質であるケラチンのバンドである可能性が高い。	手袋をつけずにコームを抜いたりウエルを触ったり、泳動バッファの中に指を入れたりすると起こります。必ず手袋をはめて操作してください。

40-70 KDa付近にタンパク質によらない黒い筋が発生した・・・

原因	対策
$\beta$ -メルカプトエタノール ( $\beta$ -ME) やジチオスライトール (DTT)	タンパク質を還元した後、ヨードアセトアミドを加えてください。

バンドが出ない・・・

原因	対策
ゲルの容積に対して使用した試薬の量が少ない。	説明書に従って適正な試薬量で染色を実施してください。
特にゲル濃度が低いゲルや、ゲル厚が1 mm以下のゲルの場合、銀染色後の水洗時間が長すぎる。	水洗時間を短縮してください。
実施した電気泳動の系で、銀と反応する物質が入っていた。	電気泳動の系を変更してください。(p23参照)
アプライしたタンパク量が多すぎた。	水洗後、銀染色液のステップからもう一度行ってください。

ゲルが銀鏡する・・・

原因	対策
水洗が不足している。	銀染色後の水洗を延長してください。(ただし、長すぎるとバンドが出ない場合がありますのでご注意ください。)
使用した容器が汚れていた。	現像操作で使用する容器を新しい清浄なものにしてください。
振とうが不十分だった。	現像操作中、ゲルが容器表面に密着しないように良く振とうして下さい。
使用した試薬の量、特に銀染色、現像時での試薬量が規定通りでない。	説明書に従って、決められた通りの量で操作してください。
ホルムアミド入りPAGEあるいは酸性系のPAGEに適用した。	使用できませんので別の系を使用してください。(p23参照)

バックグラウンドの着色が激しい・・・

原因	対策
使用した試薬の純度が不十分。	使用する試薬は、特級を使用してください。
使用した脱イオン水の純度不足。	$10^{-6}$ mho以下の脱イオン水を使用してください。

## FAQ

### Q 1. グリセロールとホルムアルデヒドが入っているゲルを銀染色できますか？

A 1. 核酸を銀染色する場合は、ゲル中にホルムアルデヒドが入っているものは染色できません。グリセロールだけ入っているゲルは染色できます。

### Q 2. アガロースゲルを銀染色することができますか？

A 2. ゲル全体が染まってしまうので使用できません。

### Q 3. 4M尿素入りのポリアクリルアミドゲルは、銀染色できますか？

A 3. 銀染色試薬では、可能です。2D-銀染色試薬・IIではデータがありませんが可能だと思われます。

### Q 4. タンパク質の場合で2D-銀染色試薬・IIの操作を中断したいのですが、どの時点で中断すれば良いですか？

A 4. 固定液 I あるいは固定液 II に浸した状態で中断してください。長時間中断する場合は、試薬の蒸発を防ぐため蓋をしてください。

### Q 5. 銀染色を行いました但染まり方が淡かったり、逆に現像時間が長すぎたり、銀鏡反応を生じて黒褐色に染まったりした場合、染め直すことができますか？

A 5. 脱色してもう一度染め直すことができます。この時使用する脱色液の処方は下記の通りです。

A液	NaCl	14.8 g	B液	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	174.4 g
	CuSO <sub>4</sub>	14.8 g		精製水で全量	400 ml
	H <sub>2</sub> O	340 ml			
	NH <sub>4</sub> OH	適量*			
	精製水で全量	400 ml			

\*沈殿物が溶けるまで加えて下さい。

A液とB液を1：1に混合し、更に精製水で10倍希釈したものを脱色液とします。

なお、脱色しすぎた場合、染色像も同時に消えますので注意してください。

脱色液中で振とうして、染色像が適当になったところで10%酢酸溶液を加えて脱色を停止してください。その後、十分水洗いして保存してください。

### Q 6. CBBで染色した後に銀染色が出来るでしょうか？

A 6. 脱色液（75 ml酢酸、50 mlメタノールに精製水を加え全量1 lにする）で十分脱色してから銀染色の操作を行ってください。

### Q 7. 核酸を2D-銀染色試薬・IIで染色する時、操作を中断する場合は、どの時点で中断すれば良いですか？

A 7. 1時間程度なら10%トリクロロ酢酸に浸しておくことができます。一昼夜中断する場合は50%メタノールに浸した状態で中断してください。この場合、試薬の蒸発を防ぐため蓋をしてください。また、振とうはしないでください。

### Q 8. 一本鎖DNAと二本鎖DNAは同程度に染色できますか？

A 8. 同程度に染色できます。

### Q 9. 2D-銀染色試薬・IIは、質量分析（MALDI-TOF MS解析）は可能ですか？

A 9. 可能です。

但し、2D-銀染色試薬・IIの構成試薬の中で、前処理剤にはグルタルアルデヒドが入っていますので、試薬調整時に前処理剤を除いてお使いいただくことになります。

構成試薬の中で前処理剤は、タンパク質の種類による染色ムラを防ぎ、ある程度同じ色調に染めるために使用します。従って前処理剤を使用しなくても検出感度が変わるということはありません。

従って前処理剤をしない場合、色調が多少茶～黄色っぽくなるかもしれません。また、タンパク量が多い場合、染まりにくいものがあるかもしれませんのでご了承ください。

試薬の調整及び染色時間（マルチゲル® IIミニ 2枚分）

(1) 固定・ 10分

メタノール 100 ml + 酢酸 20 ml + 精製水 ⇒ 200 ml

(2) 固定・ 15分

メタノール 60 ml + 酢酸 20 ml + 固定化剤 10 ml + 精製水 ⇒ 200 ml

- (3) 前処理 10分  
メタノール 100 ml + 精製水 ⇒ 200 ml  
\*・前処理剤は使用しません。
- (4) 水洗 5分
- (5) 銀染色 15分  
・染色液A 10 ml + ・染色液B 10 ml + 精製水 ⇒ 200 ml
- (6) 水洗 2分 × 3回
- (7) 現像 10分以上  
・現像原液 10 ml + 精製水 ⇒ 200 ml
- (8) 停止  
・停止液をそのまま使用します

**Q 10. 銀染色試薬の廃液はどのように処理すればよいでしょうか？**

A 10. 銀染色試薬中の銀含有量は低濃度であり、有害性は極めて低いものですが、BOD、COD等の排水基準を考慮し、弊社では塩化銀の沈殿物にさせていただいた後、専門業者への引き取りを推奨しております。染色液を間違えて流した場合は、大量の水で洗い流してください。濃塩酸を流してしまった場合、排水のpHなど、別の問題が発生する可能性があります。トリクロロ酢酸を使用した場合、弊社ではアルカリと中和して大量の水とともに流しております。

**Q 11. 2D-銀染色試薬・Ⅱを用いてタンパク質と核酸の染色を行いたいのですが、タンパクと核酸を同時に染色することは可能でしょうか？**

A 11. 核酸染色の場合、タンパク質とは異なる固定（トリクロロ酢酸固定）を行います。またキット中の固定化剤及び前処理剤を使用すると反応を阻害するため、固定の後はすぐ銀染色にうつります。逆にタンパク質を染色する場合、固定化剤及び前処理剤を使用しないと、バンドが黒く染まらないという弊害が発生します。従いまして弊社としては、両者の同時染色というものは推奨しておりません。尚、弊社ではゲルの材質はアクリルアミドで、泳動バッファーは、トリス-グリシン系を使用しております。泳動条件が上記以外の場合、タンパク質と核酸をそれぞれのプロトコールで染色しても2D-銀染色試薬・Ⅱが適用できない場合がありますのでご注意ください。

**Q 12. CBB染色液の廃液はどのように処理すればよいでしょうか？**

A 12. MSDSには、「酢酸、メタノールを含む色素製品であるため、排水溝には絶対流さぬこと。産業廃棄物処理認定業者に委託して処理すること。該当法規に従い廃棄物を処理すること」と明記しており、実際弊社でも染色液及び脱色液廃液は専用タンクに保管して、定期的に業者に引き取ってもらっています。

**Q 13. 2D-銀染色試薬・Ⅱに法規制物質は含まれていますか？**

A 13. 含まれていません。構成試薬③の染色液Aに硝酸銀が入っていますが、濃度が低いため、該当しません。

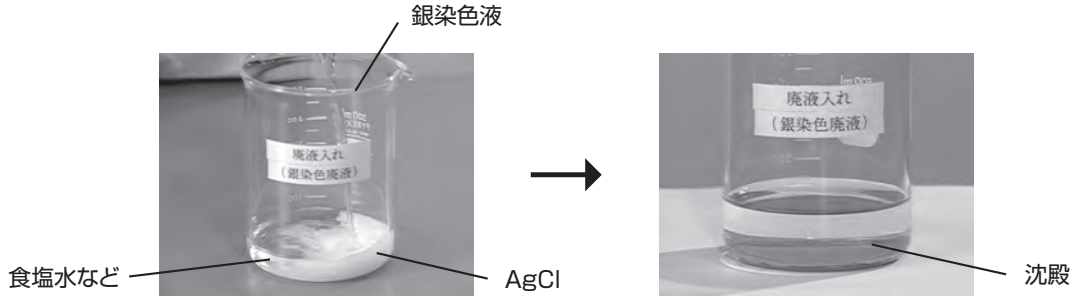
## 使用後の試薬の処理

### ●銀染色で使用する固定液、前処理液

有機溶媒を含みますので、廃液処理にはご注意ください。

### ●銀染色液

使い終わった銀染色液は、操作完了後直ちに塩酸や塩化ナトリウムを加えて塩化銀の沈殿物にして処理します。そのまま放置すると爆発性の銀アミドを生成する危険がありますから、この処理は忘れずに行ってください。



## 参考文献

- (1) K. Ohsawa & N. Ebata : Silver Stain for Detecting 10-Femtogram Quantities of Protein after Polyacrylamide Gel Electrophoresis, *Anal. Biochem.*, **135**, 409 (1983)
- (2) 入江伸吉 : ゲル内のタンパク質の高感度銀染色法, *生化学*, **52**, 411 (1980)
- (3) B. R. Oakley et al. : A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.*, **105**, 361 (1980)
- (4) H. M. Poehling et al. : Visualization of proteins with silver "stain" a critical analysis, *Electrophoresis*, **2**, 141(1981)
- (5) U. K. Laemmli : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680 (1970)
- (6) Park and Labbe. *Anal. Biochem.* **180**: 55-58 (1989)
- (7) *Bath Electrophoresis* **9**: 148 (1988)

# 4. 商品案内 (銀染色試薬)

## 銀染色試薬

### 染色性にムラのない高感度銀染色試薬

#### 特長

- 迅速：電気泳動後、1時間以内に染色が完了します。
- 高感度：タンパク質…CBB法の50~100倍、核酸…EB法の50~100倍の感度が得られます。
- 簡便：試薬の調製及び染色操作が簡単です。
- 安全：銀以外の重金属は含有しておりません。
- 二重染色：CBBで染色した後のゲルの染色も可能です。
- 応用：片面接着ゲル、等電点ゲルの染色もできます。

#### 適用

スラブ型ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 及び SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後のタンパク質及び核酸の染色。



試薬名	主成分	容量
①固定化剤	チオ尿素	100 ml
②前処理剤	ジチオスライトール、グルタルアルデヒド、チオ尿素	100 ml
③染色液A	硝酸銀	100 ml
④染色液B	水酸化アンモニウム、水酸化ナトリウム	100 ml
⑤現像原液	クエン酸、ホルムアルデヒド、チオ硫酸ナトリウム	100 ml
⑥停止液	クエン酸	100 ml

[メーカー略号 : DCB]

品名	品番	包装
2D-銀染色試薬・II	423413	1パック(10枚用)