

2D-Silver Stain Reagent II

-For Electrophoresis-

Cat. No. DCB-423413

Last Updated: 2016/1/7

www.cosmobio.com

【 I 】 Background

Detection of proteins and nucleic acids migration by polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining are now being highlighted as one of the most sensitive staining methods. However the original silver staining method is not necessarily easy to work and takes a long-time to complete. 2D-SILVER STAIN-II is an improved reagent kit developed to provide simple and fast staining.

【 II 】 Features

- 1) Rapid staining results in a short time after electrophoresis
- 2) Staining with higher sensitivity
For Proteins: 50 to 100 times more sensitivity than CBB staining
For Nucleic Acids: 50 to 100 times more sensitivity than EB staining
- 3) Simple preparation and simple operation
- 4) No use of materials such as heavy metals which need to be controlled by regulations.
- 5) Staining process can be stopped any time during development for desired chromatic figures.

【 III 】 Applications

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

【 IV 】 Components

Reagents	Main Ingredients	Volume
Fixing Reagent	Thiourea	100 ml x 1
Pretreatment reagent	Dithiothreitol, Glutar-aldehyde, Thiourea	100 ml x 1
Staining Solution A	Silver nitrate	100 ml x 1
Staining Solution B	Ammonium hydroxide, Sodium hydroxide	100 ml x 1
Concentrated developer	Citric acid, Formaldehyde, Sodium thiosulfate	100 ml x 1
Stopper	Citric Acid	100 ml x 1

【V】Procedures

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) Measured cylinder
- 5) Flat-bottomed tray for developing gels
- 6) Measuring pipette

【V-1】Preparation of Reagents

Prepare the following solutions just before staining the gel. The volume of reagents use for preparation shown below is based on the size of 140 mm x 140 mm x 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 100 ml 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 the developer.

【V-2】Staining Procedure

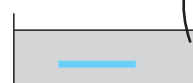
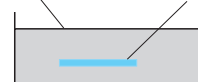
- 1 Soak the gel in fixing solution I in a clean flat-bottomed tray and shake it for 10 minutes.

Sample: protein gel < 1 mm

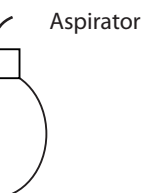
Fixing solution I: 200 ml



10 min



Fixing solution II: 200 ml



Aspirator



15 min

- 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.

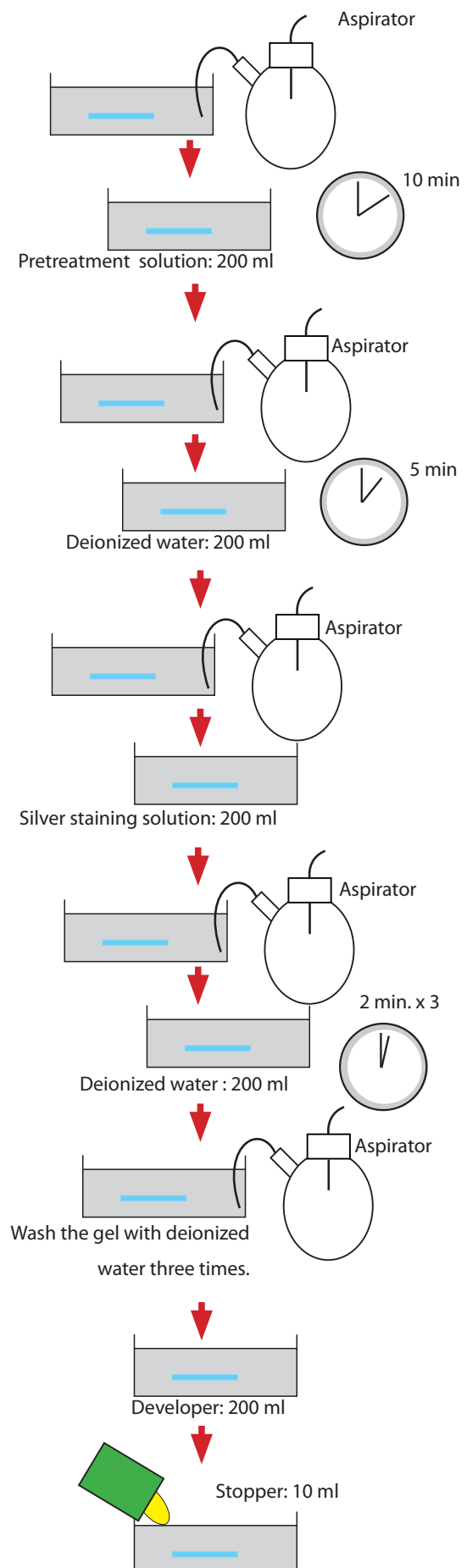
- 5 Remove the solution, and then pour 200 ml of silver staining solution to the tray and shake it for 15 minutes

- 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 accurately). Pour 200 ml of deionized water to the tray and shake it for 2 minutes and then remove the water. Repeat this step 3 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 for about 10 minutes and then wash the gel with deionized water two or three time and keep it.



【V-3】Notes

- ◆ 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.)
- ◆ 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 occurs.
- ◆ 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.
- ◆ 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.)
- ◆ Deionized water or distilled water of less than 10⁻⁸ mho conductivity is recommended.
- ◆ The tray to be used for the staining should be clean and have a smooth surface.
- ◆ 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.)
- ◆ Care should be taken not to damage the gel during operation.
- ◆ Care should be taken to see that the gel may not come out of the surface of solution.
- ◆ Use a pair of disposable gloves in staining operation not to touch the gel.
- ◆ If a proper shaker is not available, shake the tray by hand.
- ◆ The sensitivity of a gel thicker than 1mm declines somewhat as compared with a thinner gel.
- ◆ Keep the reagents in a tightly closed container and refrigerated, and use within 6 months after unsealing.
- ◆ Use the reagents in a tightly closed container and refrigerated, and use within 6 months after unsealing.
- ◆ Use the reagents (methanol, acetic acid) of superior quality

【V-4】Package Size and Storage

Enough to stain 10 slabs of gels (140 mm x 140 mm x 1.0 mm)

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

The term of validity: Printed on the package.

【V-5】References

1. K. Ohsawa et. Al.: Silver Stain for Detecting 10-Femogram 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.: Visualization of proteins with 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)

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^{-6} mho以下のもの)
4. メスシリンダー
5. 写真用バット
6. メスビベット

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

↓

15分

↓

10分

↓

5分

↓

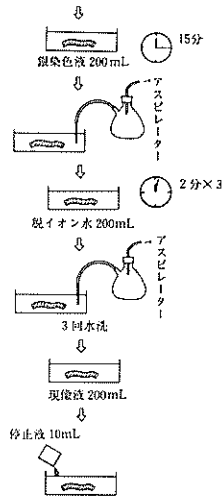
水洗

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 I 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 ^a		
		ゲル厚1mm	ゲル厚2mm ^b	等電点ゲル
1. 固定液 I	200mL	10分	20分	60分 ^c
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。皮膚や衣服についた場合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き、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^{-6} 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、脱色をじゅうぶんに(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に注意してください。
- 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ザ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以上の場合には、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カ月以内に使用してください。
- 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 T₄, 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