

MS 用銀染色キット

SP-4020, SP-4021

【目的・用途】

質量分析に適したポリアクリリルアミドゲル電気泳動用銀染色キットです。一般に、銀染色されたタンパク質はゲル内酵素消化されにくく、質量分析で検出しにくい欠点があります。本キットは、タンパク質の染色感度もその後の質量分析での検出も最大となるよう最適化しています。

【特徴】

- 1) 高感度検出が可能 (BSA の場合 0.1ng を検出可能)
- 2) 質量分析に最適化 (ゲルタルアルデヒド不含)
- 3) 操作の煩雑さを軽減
- 4) 一般に銀染色が困難とされる塩基性のタンパク質に対しても効果的 (塩基性タンパク質である Lysozyme の場合 0.5ng を検出可能)
- 5) 廃液は爆発性物質を不含 (成分にアンモニアを含まないため)

【キット内容】

MS 用 銀染色キット (+脱銀染色液) Code No. SP-4020

内容	容量	使用方法
(×50) 前処理液	40mL	プロトコール [1]
(×50) 増感液	40mL	
(×50) 染色液	40mL	
[粉末] 現像試薬	50g	
(×50) 現像液	40mL	
(×50) 停止液	40mL	
IGD用 脱銀液A	50mL	プロトコール [2]
IGD用 脱銀液B	50mL	

ミニゲルサイズ 20 枚分相当の染色キット/1000 ゲル片分相当の脱色キット

MS 用 銀染色キット Code No. SP-4021

内容	容量	使用方法
(×50) 前処理液	40mL	プロトコール [1]
(×50) 増感液	40mL	
(×50) 染色液	40mL	
[粉末] 現像試薬	50g	
(×50) 現像液	40mL	
(×50) 停止液	40mL	

ミニゲルサイズ 20 枚分相当の染色キット

MS 用 脱銀染色液 Code No. SP-4022

内容	容量	使用方法
IGD用 脱銀液A	50mL	プロトコール [2]
IGD用 脱銀液B	50mL	

1000 ゲル片分相当の脱色キット

【使用期限】

冷暗所にて 6 ヶ月

【本品以外に準備が必要な試薬・器具】

- 超純水 : 電気抵抗率が 18MΩ・cm 以上の水をご使用ください
- エタノール : 特級試薬をご使用ください
- 酢酸 : 特級試薬をご使用ください
- 染色用のトレイ : 表面が滑らかで清浄なものをご使用ください
- 振とう器
- 試薬希釈用器具 : 容器・メスシリンダー・ピペット 等
- パウダーフリー ディスポーザブル手袋

【使用方法】 プロトコール[1] SDS-PAGE ゲルの銀染色

本プロトコールはミニゲルサイズ (80mm×100mm、ゲル厚 1mm) の場合を基準にしています。ゲルサイズが異なる場合は、体積比で換算して液量を決定してください。

1) 前処理 <2 分間>

電気泳動終了後、前処理液にゲルを浸し、穏やかに 2 分間 振とうします。

前処理液	
(×50) 前処理液	2mL
超純水	up to 100mL

2) 固定 <15 分間×2>

ゲルを固定液に浸し、穏やかに 15 分間振とうします。液を交換し、もう一度 15 分間以上振とうします。

固定液	
エタノール	30mL
酢酸	10mL
超純水	up to 100mL

3) 増感 <30 分間>

ゲルを増感液に浸し、穏やかに 30 分間 振とうします。

増感液	
(×50) 増感液	2mL
エタノール	30mL
超純水	up to 100mL

4) 洗浄 <5 分間×3>

ゲルを超純水 100mL に浸し、穏やかに 5 分間 振とうし、液を捨てます。3 回繰り返します。

5) 染色 <20 分間>

ゲルを染色液に浸し、穏やかに 20 分間 振とうします。

染色液	
染色原液	2mL
超純水	up to 100mL

6) 洗浄 <1 分間×2>

ゲルを超純水 100mL に浸し、穏やかに 1 分間 振とうします。超純水を交換し、もう一度 1 分間 振とうします。

7) 現像 <10 分間程度>

ゲルを現像液に浸し、適度な染色像が得られるまで (10 分程度)、穏やかに振とうします。適度な現像が得られたら、現像液を捨てます。

現像液	
現像試薬 (粉末)	2.5g
現像原液	2mL
超純水	up to 100mL

8) 停止 <10 分間>

ゲルを停止液に浸し、穏やかに 10 分間 振とうします。

停止液	
停止原液	2mL
超純水	up to 100mL

9) 超純水置換 <10 分間×2>

ゲルを超純水 100mL に浸し、穏やかに 10 分間 振とうします。超純水を交換し、もう一度 10 分間 振とうします。

【使用方法】 プロトコール[2] ゲル内酵素消化前の脱色

基本プロトコールは、1mm×1mm×5mm のゲル片を最大 5 バンド分程度まで同時に処理する場合を基準にしています。ゲル片が基準より少ない場合も、基本プロトコールの通りに実施してください。また、ゲル片が多い場合は、全部のゲル片が浸る液量に変更して実施してください。

1) 洗浄

※ 銀染色後のゲル全体を超純水で洗浄してからゲル片を切り出した場合は、この工程は省略できます。

切り出したゲル片を 1.5mL チューブに入れ、超純水 100 μ L を加えてボルテックスミキサーで攪拌した後、10 分間室温で静置してから液を除きます。もう一度繰り返します。

2) 脱銀染色

脱銀染液 A 50 μ L と脱銀染液 B 50 μ L を混合します（使用直前に混合してください）。混合した溶液 100 μ L をゲル片の入ったチューブに入れ、ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌し続けます。（ゲル片にまだ茶色が残っている場合は、茶色がなくなるまでボルテックスミキサーによる攪拌を続けます。）

液を除きます。

3) 洗浄

洗浄液（50%メタノール/10%酢酸/40%超純水）100 μ L をゲル片の入ったチューブに入れ、ボルテックスミキサーで 2 分間攪拌し続けてから液を除きます。もう一度繰り返します。

4) 洗浄

超純水 100 μ L をゲル片の入ったチューブに入れ、ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌し続けてから液を除きます。もう一度繰り返します。

その後、通常の手法でゲル内酵素消化を行います。

ゲル内トリプシン消化の工程をキット化した XL-TrypKit (ST-3010) の使用をおすすめいたします。独自の Ex 試薬による高いペプチド回収率で、微量のサンプルでも効率的にペプチド断片を得ることができます。

【Q&A】

Q1	二次元電気泳動の場合でも基本プロトコールで行えますか？ carrier ampholytes(両性担体)を含む二次元電気泳動ゲルの場合、carrier ampholytes 自身が銀染色されてしまうため、ゲルのバックグラウンドが上昇する場合がございます。carrier ampholytes をできるだけ除去するために、長時間（数時間から一晩程度）の固定を行うことをお勧めします。ただし、固定工程を長くすると、特に低分子量タンパク質の検出感度が減少する場合がございますのでご注意ください。
Q2	CBB 染色したゲルを再度銀染色する事は可能ですか？ 可能です。基本プロトコールで行ってください。
Q3	SYPRO® Ruby 染色したゲルを再度銀染色する事は可能ですか？ 可能です。基本プロトコールで行ってください。
Q4	バックグラウンドが高くなってしまいます。 各工程の試薬希釈には、電気抵抗率が 18M Ω ・cm 以上の水をご使用ください。酢酸・エタノールは特級試薬をご使用ください。また、carrier ampholytes(両性担体)を含む二次元電気泳動ゲルの場合、carrier ampholytes 自体のアミノ基が銀染色されるのでバックグラウンドが高くなる傾向があります。この場合、固定工程の時間を延長することでバックグラウンドを低く抑えることができます。
Q5	染色時の温度はどの程度がよいのですか？ 反応時の温度が 20°C 以下になると染色感度が著しく低下します。染色液および現像液は、必ず室温以上（25~30°C 程度）に加熱して使用して下さい。
Q6	染色工程を中断したいのですが。 固定工程を最大 1 日程まで延長できますが、固定工程を長くすると、特に低分子量タンパク質の検出感度が減少する場合がございますのでご注意ください。
Q7	固定工程でエタノールではなくメタノールを使用してもよいですか？ メタノールを使用することも可能ですが、エタノールを使用した方がバックグラウンドが低くなる傾向があります。
Q8	検出感を上げたいので、染色時間を延長してもよいですか？ 染色時間を延長することは避けください。その後の洗浄工程で余剰な銀イオンを除去しきれずに、バックグラウンドが上昇してしまいます。
Q9	検出感を上げたいので、現像時間を長くしてもよいですか？ 現像時間は 10 分間程度が最適です。むやみに長くすると、現像液中のホルムアルデヒドの作用によってタンパク質が架橋し、その後の酵素消化率・ペプチド回収率に悪影響となります。
Q10	ゲルが尿素を含んでいると影響がありますか？ 尿素の影響で染色がされにくくなります。固定時間を延長することをおすすめします。
Q11	バンドが白抜けしてしまいます。 タンパク質量が多い場合に白抜けしてしまう場合があります。電気泳動に供するタンパク質量をご検討ください。

【使用上の注意】

- 全工程で必ずディスポーザブル手袋を着用してください。
- 液温は 20~25°C 程度で行ってください。
- ゲルがトレイの底面に付着せずに常に動いているようにしてください。また、ゲルは溶液内に浸し、浮き上がらないようにしてください。
- 激しすぎる振とうはゲルの破損の原因となりますのでお気をつけください。
- 本キットは染色感度もその後の質量分析での検出も最大となるよう最適化しています。試薬の希釈倍率や反応時間は説明書通りにご使用いただくことをお勧めいたします。
- 染色液使用後は、適量の塩酸を加えて沈殿させます。上澄みは中和・希釈して廃液し、沈殿は別途処理してください。



株式会社ファーマフーズ アプロサイエンスグループ

〒770-0865 徳島県徳島市南末広町 4-53 エコービル 4 階

■Tel:088-678-6372 ■Mail:bio@apro-s.com

■Url:https://apro-s.com/

本社 〒615-8245 京都府京都市西京区御陵大原1-49