

(105 × 230mm Size)

FUJIFILM

Wako

Code No. 299-58901 (For 20 sheets)

Silver Stain MS Kit

This silver staining kit is produced for mass spectrometric sequencing of protein separated by polyacrylamide gel electrophoresis. By the silver staining, protein is rarely modified chemically due to omitting treatment of glutaraldehyde and is detected at several nanograms level on the electrophoretic gel.

[Contents]

1. Enhancing Stock Solution	200 mL × 1 vial
2. Staining Stock Solution	200 mL × 1 vial
3. Developing Stock Solution	100 mL × 1 vial
4. Developing Powder	20 g × 1 vial
5. Stopper	200 mL × 1 vial
6. De-staining Solution A	50 mL × 1 vial
7. De-staining Solution B	50 mL × 1 vial

[Notes]

1. Use deionized or distilled water.
2. Before staining, ensure that all labware and equipment to be used are clean and have a smooth surfaces.
3. Be careful not to damage the gel, and use disposable gloves during the procedure to avoid direct contact with the gel.
4. Ensure that the gel is completely immersed in each solution throughout the procedure.
5. At Procedure 5, ensure that the gel is shaken gently but enough to avoid sticking to the tray during subsequent step.
6. The used staining solution may form explosive silver amide if it is left as it is. As soon as staining is completed, add sodium chloride or 1N hydrochloric acid to the used staining solution until it becomes white and discard it.

[Staining Procedure]

<Preparation>

The following solutions are prepared for staining a 100 × 100 mm polyacrylamide gel in 1 mm thickness.

1. Fixing solution-1 : Mix 50 mL methanol, 5 mL acetic acid and 45 mL deionized water.
2. Fixing solution-2 : Mix 50 mL methanol with 50 mL deionized water.
3. Enhancing solution : Mix 10 mL Enhancing Stock Solution with 90 mL deionized water.
4. Staining solution : Mix 10 mL Staining Stock Solution with 90 mL deionized water.
5. Developing solution : Mix 5 mL Developing Stock Solution and 1 g Developing Powder with 95 mL deionized water.

<Staining Procedure>

The following solutions are prepared for staining a 100 × 100 mm polyacrylamide gel in 1 mm thickness.

1. Soak the gel in 100 mL Fixing solution-1 in the tray and shake it gently for 20 minutes.
2. After discarding the solution, shake the gel gently for 10 minutes in 100 mL Fixing solution-2.
3. After discarding the solution, shake the gel gently for 10 minutes in 100 mL deionized water.
4. After discarding the solution, shake the gel gently for 1 minutes in 100 mL Enhancing solution.
5. After discarding the solution, shake the gel gently for 1 minutes in 100 mL deionized water. Repeat this step two times.
6. After discarding the solution, shake the gel gently for 20 minutes in 100 mL Staining solution.
7. After discarding the solution^{*1}, shake the gel gently for 1 minute^{*2} in 100 mL deionized water. Repeat this step two times.

*1···The used staining solution may form explosive silver amide if it is left as it is. As soon as staining is completed, add sodium chloride or 1N hydrochloric acid to the used staining solution until it becomes white and discard it.

*2···Do not shake the gel in deionized water for more than 1 minute, or detection sensitivity may decrease in a detection step.

8. After discarding the solution, shake the gel gently for 3 to 10 minutes until protein bands become moderate intensity in 100 mL Developing solution. During the development, change the Developing solution when the solution become turbid.
9. After protein bands become moderate intensity, immediately add 10 mL Stopper to the tray and shake gently for 1 minutes.
10. After discarding the Developing solution, shake the gel gently for 1 minutes in 100 mL deionized water. Repeat this step 3 times.
11. For mass spectrometric sequencing, excited band from the gel can be de-stained by treating with 0.1 mL mixture of De-staining Solution A and De-staining Solution B in equal quantity for 15 minutes at room temperature.

[Technical Notes]

1. When intensity's of the protein bands are weaker, shorten the washing time shorter than those describe in 5 and 7 of staining Procedure.
2. For double staining following CBB staining – Decolorize the background completely by soaking the CBB stained gel for at least 1 hour in Fixing solution-1. Then proceed on with staining procedure 2.
3. Background staining may be caused by one of the following reasons :
 - a. Insufficient rinsing in staining procedure 5 and 7.
 - b. Insufficient shaking in staining procedure 6 and 8.

4. In the case of overstaining – Destain using following method. Avoid destaining chromatic picture at the same time.
 - a. Preparation of destaining solution
Dissolve 3.2 g of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ and 40 mg of Na_2CO_3 in 200 mL deionized water.
 - b. Soak the gel in a tray containing 200 mL destaining solution and shake for several minutes. Discard the solution and wash the gel several times within 300 to 400 mL deionized water.
5. Storage of gel – After rinsing the staining gel with deionized water, shake it for 5 minutes in 1% glycerin solution.
Dry with a gel dryer and seal it when storing. If a gel dryer is not used, the gel with the deionized water should be sealed and stored in a plastic bag without contact with air or hands directly.

[Storage] Keep at 2~10 °C

[Package] For 20 sheets

[Reference] Shevchenko, A. *et al.* : *Anal. Chem.*, **68**, 850 (1996)

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation
1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : + 1-804-271-7677
Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH
Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-3111-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

(105×230mm Size)

コード No. 299-58901 (20 枚用)

銀染色 MS キット

本製品は、質量分析用タンパク質銀染色キットです。電気泳動後のタンパク質を染色できます。この銀染色では、グルタルアルデヒド処理を除いているため、タンパク質の化学的修飾をほとんど受けず、数 ng レベルのタンパク質を検出することができます。

〔キット構成〕

1. Enhancing Stock Solution (増感原液)	200 mL×1本
2. Staining Stock Solution (染色原液)	200 mL×1本
3. Developing Stock Solution (現像原液)	100 mL×1本
4. Developing Powder (現像粉末)	20 g×1本
5. Stopper (停止液)	200 mL×1本
6. De-staining Solution A (脱色液A)	50 mL×1本
7. De-staining Solution B (脱色液B)	50 mL×1本

〔操作上の注意〕

1. 使用する水は、脱イオン水または蒸留水を使用し、場合によっては脱イオン化後蒸留（ガラス器具で）した水を使用してください。
2. 使用する容器（例えば写真用バット）は表面が平滑で清浄なものを使用してください。また、金属性容器の使用は避けて下さい。
3. 直接ゲルに触れないよう、またゲルの破損には十分注意してください（全操作中、ビニール手袋を使用してください）。
4. 操作中ゲルは必ず完全に溶液中に浸し、浮き上がらないよう注意してください。
5. 染色操作（5）で振とうが不十分ですと、以降の操作でゲルが容器に付着する原因となります。
6. 使用後の染色液を放置すると、爆発性銀アミドを生ずる危険性があります。使用後すぐに塩化ナトリウムもしくは1Nの塩酸を使用後の染色液に加え、染色液を白濁させてから廃棄してください。

〔染色方法〕

〈試液の調製〉

下記の調製液量は、100×100×1 mm のミニゲルを1枚を染色するのに適した量です。（調製液量はゲル体積の約10倍量が目安です。）

1. 固定液1：メタノール 50 mL、酢酸 5 mL、脱イオン水 45 mLを混和します。
2. 固定液2：メタノール 50 mL、脱イオン水 50 mLを混和します。

3. 増感液：増感原液 10 mL を脱イオン水 90 mL で希釈します。
4. 染色液：染色原液 10 mL を脱イオン水 90 mL で希釈します。
5. 現像液：現像粉末 1 g を脱イオン水 95 mL に溶解し、現像原液 5 mL を加えます。

〈染色〉

下記は電気泳動後のポリアクリルアミドゲル（100×100×1 mm のミニゲル）を染色する場合の標準染色法です。

1. 電気泳動したゲルを100 mLの固定液1に浸し、20分間振とうします。
2. 固定液1を捨て、ゲルを100 mLの固定液2に浸し、10分間振とうします。
3. 固定液2を捨て、ゲルを100 mLの脱イオン水に浸し、10分間洗浄します。
4. 脱イオン水を捨て、ゲルを100 mLの増感液に浸し、1分間振とうします。
5. 増感液を捨て、ゲルを100 mLの脱イオン水に浸し、1分間振とう洗浄します。これを2回繰り返します。
6. 脱イオン水を捨て、ゲルを100 mLの染色液に浸し、20分間振とうします。
7. 染色液を捨て*1、ゲルを100 mLの脱イオン水に浸し、1分間*2振とうします。これを2回繰り返します。

*1…使用後の染色液を放置すると、爆発性銀アミドを生ずる危険性があります。使用後すぐに塩化ナトリウムもしくは1 Nの塩酸を使用後の染色液に加え、染色液を白濁させてから廃棄してください。

*2…1分間以上振とうすると、現像時に著しく感度が低下する恐れがあります。

8. 脱イオン水を捨て、ゲルを100 mLの現像液中に浸し、適当な染色像が得られるまで、3～10分間振とうします。途中で現像液が濁った場合、新しい現像液に変えて下さい。
9. 適当な染色像が得られたら、10 mLの停止液を加え、約1分間振とうします。
振とう時間が長いと退色してくる場合がありますので、長くても3分間以内にして下さい。
10. 現像液を捨て、ゲルを100 mLの脱イオン水に浸し、1分間振とう洗浄します。これを3回繰り返します。
11. 質量分析に使用する場合は、ゲルから切り出したタンパク質バンドを0.1 mLの脱色液Aと脱色液Bの等量混合溶液に15分間浸して脱色します。

〔参考〕

1. 染色が弱い場合には、染色方法5、7の洗浄時間を短くして下さい。（15秒間×2回など）
2. CBB染色後の二重染色
CBB染色（和光 Quick-CBBも同様）後のゲルを50%メタノール、5%酢酸溶液中に1時間以上浸した（バックグラウンドを完全に脱色した）後、染色操作2以降を実施してください。

3. バックグラウンドが着色する場合

次のことが考えられます。

- 1. 水温が高く操作9の現像停止が間に合わない。
 - 2. 操作5および7での水洗が不十分
 - 3. 操作6および8での振とうが不十分
- 水温のチェックおよび水洗、振とうを十分に行ってください。

4. ゲルの現像が進みすぎた場合の脱染色

バックグラウンドの着色が激しい場合、次の要領で脱染色をして下さい。ただしこの操作により染色像も同時に脱色されていきますので注意して下さい。

- 1 脱色液の調製

チオ硫酸ナトリウム（無水）（ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ）3.2g、炭酸ナトリウム（ Na_2CO_3 ）40mgを脱イオン水200mLに溶解し脱色液とします。

- 2 脱色操作

容器に脱色液を200mL注ぎ、ゲルを入れて振とうします。適当なところで液を捨て、脱イオン水300～400mLで数回水洗を繰り返して下さい。

5. ゲルの保存

染色後のゲルは十分に水洗し、1%グリセリン溶液中で5分間浸透した後、ゲル乾燥器で乾燥し密閉保存して下さい。また乾燥させない場合には、脱イオン水に浸したままビニール袋等で密封し、直接、空気、手などに触れないように保存して下さい。

〔貯 法〕 2～10℃保存

〔包 装〕 20枚用

〔参考文献〕 Shevchenko, A. *et al.* : *Anal. Chem.*, **68**, 850 (1996)

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社
大阪市中央区道修町三丁目1番2号
Tel : 06-6203-3741

1801KA1