

FUJIFILM

Wako

Code No. 291-50301

For Electrophoresis

Silver Stain II Kit *Wako*

Silver staining provides a method for the highly sensitive detection of proteins and nucleic acids following separation with polyacrylamide gel electrophoresis. However, conventional procedures involve typical time-consuming procedures that are often difficult. “Silver Stain II Kit *Wako*” has been developed to overcome these problems, providing more sensitive and rapid detection than Coomassie Brilliant Blue R-250 (C. I. 42660).

[FEATURES]

- 1. Involves simple preparations and simple procedures.
- 2. After electrophoresis, staining can be completed within an hour.
- 3. The sensitivity is generally 50 to 100 times higher than that of Coomassie Brilliant Blue Stain.
- 4. Contains no harmful substances such as heavy metals.
- 5. Can be used for double – stain with CBB.
- 6. Adding Stopper eliminates the need for destaining.

[REAGENTS]

- One kit includes :
- 1. Fixing Stock Solution 100 mL (Methanol, Acetic acid)
 - 2. Enhancing Stock Solution 100 mL (Dithiothreitol, Glutaraldehyde)
 - 3. Staining Solution A 100 mL (Silver nitrate)
 - 4. Staining Solution B 100 mL (Ammonia, Sodium hydroxide)
 - 5. Developing Stock Solution 100 mL (0.4w/v% Formaldehyde, Citric acid)
 - 6. Stopper 100 mL (Citric acid)

[PREPARATION OF REAGENTS]

- Preparation**
- Volumes of reagents described below are calculated based on a 140 mm × 140mm × 1.0 mm sized polyacrylamide slab gel.
- Amounts of reagents prepared are 10 times the volume of the gel.
- 1. Fixing solution-1** (400 mL)
Mix 200 mL methanol and 40 mL acetic acid with 160 mL deionized water. (190 mL of this solution will be used in the next step.)
 - 2. Fixing solution-2** (200 mL)
Add 10 mL Fixing Stock Solution to 190 mL of Fixing soln. – 1.
 - 3. Enhancing solution** (200 mL)
Mix 95 mL methanol, 10 mL Enhancing Stock Solution, and 95 mL deionized water.
 - 4. Staining solution** (200 mL)
Add 10 mL Staining Solution B to 10 mL Staining Solution A and mix well. Then add 180 mL deionized water.
 - 5. Developer** (200 mL)
Add 10 mL Developing Stock Solution to 190 mL deionized water and mix.

- Notes**
- 1. Use only deionized or distilled water approximately 25℃.
 - 2. Prepare the solutions just prior to staining the gel and use high quality solvents (methanol, acetic acid).
 - 3. Labware used should be washed thoroughly prior to use.

[STAINING PROCEDURE]

The following procedure is for staining a 140 mm × 140 mm × 1.0 mm polyacrylamide slab gel. Please read notes before staining.

- Procedure**
- 1. Soak gel in a tray containing 200 mL of Fixing soln. -1 and shake gently for 10 minutes.
 - 2. Discard the Fixing soln. -1 and pour 200 mL of Fixing soln. -2 in the tray. Shake gently for 10 minutes.
 - 3. Discard the Fixing soln. -2 and pour 200 mL of Enhancing soln. in the tray. Shake gently for 10 minutes.
 - 4. Discard the Enhancing soln. and pour 300 to 400 mL of deionized water in the tray. Shake gently for 5 minutes.
 - 5. Discard the water and pour 200 mL of Staining soln. in the tray. Shake gently for **exactly 15 minutes**. (*See Note 6)
 - 6. Remove the Staining soln. to a glass equipment and pour 300 to 400 mL of deionized water in the tray. Rinse gently for 2 to 5 minutes. Repeat this step three times. (Add 3 mL of conc. -hydrochloric acid to the removed Staining solution. *See Note 7)
 - 7. Discard the water and pour 200 mL of Developer in the tray. Immerse it completely and shake gently. When satisfactory chromatic pictures were obtained, stop the developing. See next step. (Developing time may be different depending on the concentration of the sample.)
 - 8. Pour 10 mL of Stopper into 200 mL Developer in the tray above. Shake gently for 2 to 3 minutes to stop the developing.
 - 9. Discard the solution and pour 300 to 400 mL deionized water in the tray. Shake gently for 2 minutes. Repeat this step three times to wash the gel thoroughly.

- Notes**
- 1. Use deionized or distilled water.
 - 2. Before staining, ensure that all labware and equipment (i.e. trays) to be used are clean and have smooth surfaces.
 - 3. If a shaker is not available, shake the tray manually.
 - 4. Be careful not to damage the gel, and use disposable gloves during the procedure to avoid direct contact with the gel.
 - 5. Ensure that the gel is completely immersed in each solution throughout the procedure.
 - 6. At Procedure 5, ensure that the gel is shaken gently but enough to avoid sticking to the tray during subsequent step.
 - 7. Avoid leaving Staining solution out. As soon as staining is completed, acidify the removed Staining solution with hydrochloric acid to obtain stable silver chloride precipitate. The Staining solution may form explosive compounds if not treated with HCl.

[TECHNICAL NOTES]

- 1. Effects of temperature**
 - a. At low temperature (as low as 20℃)
High sensitivity cannot be obtained with extended staining period.
 - b. At high temperature (as high as 30℃)
Causes background staining and overstaining of gel in general.
- 2. For next day staining** – Store electrophoresed gel in Fixing soln. -1 for next day staining.
- 3. For double staining following CBB staining** – Decolorize the background completely by soaking the CBB stained gel for at least one hour in Fixing soln. -1. Then proceed on with STAINING PROCEDURE 2.
- 4. Background staining may be caused by one of the following reasons :**
 - a. Insufficient rinsing in STAINING PROCEDURE 4 and 6.
 - b. Insufficient shaking in STAINING PROCEDURE 5 and 7.
Wash or shake thoroughly.
- 5. 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 Na₂S₂O₃ and 40 mg of Na₂CO₃ in 200 mL of deionized water.
 - b. Soak the gel in a tray containing 200 mL of destaining solution and shake for several minutes. Discard the solution and wash the gel several times within 300 to 400 mL of deionized water.
- 6. Storage of gel** – After rinsing the stained gel with deionize 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.
- 7. For faster staining** – Staining under following condition is faster but results may not be as satisfactory as with the standard method.
 - 1) Fixing solution-1 Shake for 5 minutes.
 - 2) Fixing solution-2 Shake for 5 minutes.
 - 3) Enhancing solution Shake for 5 minutes.
 - 4) Rinsing Shake for 2 minutes.
 - 5) Staining solution Shake well for exactly 10 minutes.
 - 6) Rinsing Shake well for 2 minutes.
Repeat this step three times.
 - 7) Developer Shake for 5 minutes.
 - 8) Stopper Shake for 1 minute.

SILVER STAINING CHECKLIST			
Procedure			CHECK
Preparation of fixing soln. -1	Methanol	200 mL	
	Acetic acid	40 mL	
	Deionized water	160 mL	
Fixing soln. -1	Shake the gel for 10 min.		
Preparation of fixing soln. -2	Fixing Stock Soln.(*)	10 mL	
	Fixing soln. -1	190 mL	
Fixing soln. -2	Shake the gel for 10 min.		
Preparation of enhancing soln.	Enhancing Stock Soln.(*)	10 mL	
	Methanol	95 mL	
	Deionized water	95 mL	
Enhancing soln.	Shake the gel for 10 min.		
Preparation of staining soln.	Staining Soln. A(*)	10 mL	
	Staining Soln. B(*)	10 mL	
	Deionized water	180 mL	
Rinsing	Shake the gel for 5 min.		
Staining soln.	Shake the gel exactly for 15 min.		
	Treat and dispose of staining soln.		
Preparation of developer	Developer Stock Soln.(*)	10 mL	
	Deionized water	190 mL	
Rinsing	Shake the gel for 5 min.		
	Shake the gel for 5 min.		
	Shake the gel for 5 min.		
Develop	Shake the gel.		
Stopper	Stopper.(*)	10 mL	
Stop	Shake the gel for 2 min.		
Rinsing	Shake the gel for 2 min.		
	Shake the gel for 2 min.		
	Shake the gel for 2 min.		

(*) Reagents contained in the kit.

[STORAGE]

Keep at 2-10℃ in the dark

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://fwk.fujifilm.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

電気泳動用

銀染色Ⅱキットワコー

10枚用（140×140×1.0 mmポリアクリルアミドスラブゲル）

【はじめに】

銀染色法は、ポリアクリルアミドスラブゲル上での蛋白質や核酸の高感度検出法として用いられています。
本キットは既に販売しております銀染色キットワコー（コードNo.299-13841）に更に改良を加え、より簡便な調液、より短時間での染色操作を実現したポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動用染色キットです。

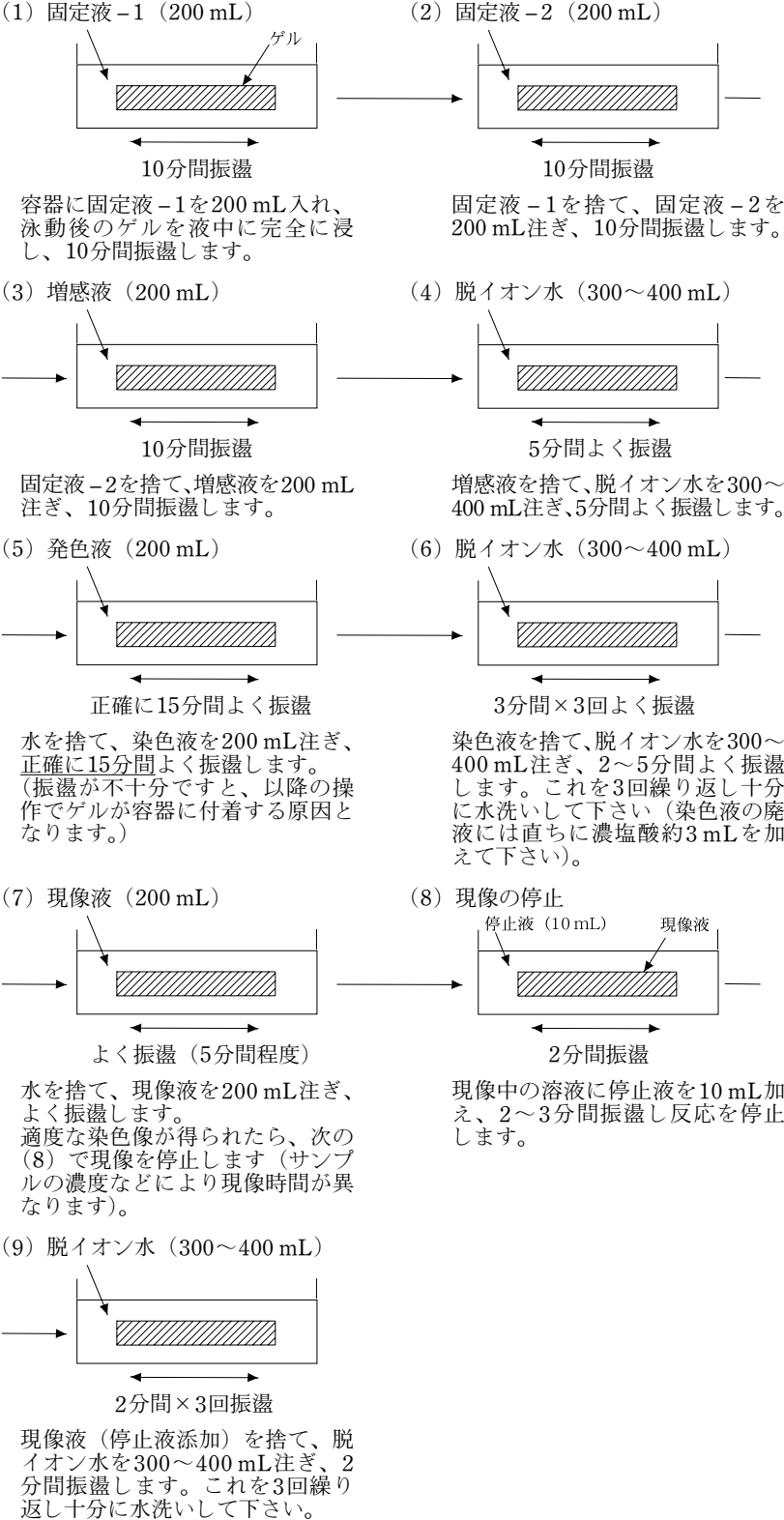
【特 長】

- 1. 試液の調製（全て20倍希釈）、染色操作が簡単です。
- 2. 電気泳動後、約1時間で染色操作が完了します。
- 3. Coomassie Brilliant Blue（CBB）法の約50～100倍の感度が得られます。
- 4. 有害金属は含まれていませんので、処理が容易です。
- 5. CBB法染色後のゲルの二重染色が容易にできます。
- 6. 停止液の添加により、染色の進みすぎ（バックグラウンドの着色）が防止できます。

【染色操作法】

操作に用いる各試液は右上の試液の調製法に基づき調製して下さい。以下の操作はポリアクリルアミドスラブゲル140×140×1.0 mmを染色する場合の標準操作法です。

操作法



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）した水を使用して下さい。
- 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下さい。
- 3. 専用の振盪器がない場合には手で振盪して下さい。
- 4. 直接皮膚にゲルが触れないよう、またゲルの破損には十分注意して下さい（全操作中、ビニール手袋を使用して下さい）。
- 5. 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下さい。
- 6. 染色操作（5）に於て振盪が不十分ですと、以降の操作でゲルが容器に付着する原因となります。
- 7. 染色液（廃液を含む）は放置すると爆発性アミドを生ずる危険性がありますので、使用後は直ちに塩酸を加えて塩化銀の沈殿物にして下さい。

試 薬 名	容 量	数 量	主 成 分
固 定 原 液	100 mL	1	メタノール、酢酸
増 感 原 液	100 mL	1	ジチオトレイトール、グルタルアルデヒド
染 色 液 A	100 mL	1	硝酸銀
染 色 液 B	100 mL	1	アンモニア、水酸化ナトリウム
現 像 原 液	100 mL	1	0.4w/v%ホルムアルデヒド、くえん酸
停 止 液	100 mL	1	くえん酸

【試液の調製法】

試液の調製

- 下記試液の調製液量は、140×140×1.0 mmポリアクリルアミドスラブゲルを基準としています。
ゲルの厚さ、大きさが異なる場合にはゲルの体積比で換算し、調製量を決めて下さい（ゲル体積の約10倍量が目安です）。
- 1. 固定液-1（調製液量400 mL）
メタノール200 mL、酢酸40 mL、脱イオン水160 mLを混和します。（注）固定液-1（190 mL）は、次の固定液-2の調製に使用します。
 - 2. 固定液-2（調製液量200 mL）
固定原液10 mLに上記固定液-1（190 mL）を加え混和します。
 - 3. 増感液（調製液量200 mL）
増感原液10 mL、メタノール95 mL、脱イオン水95 mLを混和します。
 - 4. 染色液（調製液量200 mL）
染色液A 10 mLに染色液B 10 mLを加えよく振りまぜた後、脱イオン水180 mLを加え混和します。
 - 5. 現像液（調製液量200 mL）
現像原液10 mLに脱イオン水190 mLを加え混和します。

試液調製上の注意

- 1. 使用する水は、脱イオン水または蒸留水を使用し、水温は25℃前後にて調製して下さい。
- 2. 使用する器具類はよく洗浄したものを使用して下さい。
- 3. 各試液は用時調製し、また使用する試薬（メタノール、酢酸）は特級以上の高純度品をお使い下さい。

【参 考】

- 1. 水温による染色性への影響
 - 1 水温が低い（20℃以下）場合
染色時間を長くしても高純度な染色像が得られません。
 - 2 水温が高い（30℃以上）場合
短時間で染色が進み、バックグラウンドの着色の原因となります。
- 2. 翌日染色する場合
泳動後のゲルを翌日染色する場合には、ゲルを固定液-1に浸して保存して下さい。
- 3. CBB染色後の二重染色
CBB染色（和光Quick-CBBも同様）後のゲルを固定液-1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）以降を実施して下さい。
- 4. バックグラウンドが着色する場合
原因として次の事が考えられます。
 - 1 水温が高く、操作（8）の現像停止が間に合わない。
 - 2 操作（4）及び（6）での水洗不十分。
 - 3 操作（5）及び（7）での振盪不十分。水温のチェック及び水洗、振盪を十分に行って下さい。
- 5. ゲルの現像が進みすぎた場合の脱染色
バックグラ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（Na₂S₂O₃）3.2 g、炭酸ナトリウム（Na₂CO₃）40 mgを脱イオン水200 mLに溶解し脱色液とします。
 - 2 脱色操作
容器に脱色液を200 mL注ぎ、ゲルを入れて振盪します。適当なところで液を捨て、脱イオン水300～400 mLで数回水洗を繰り返して下さい。
- 6. 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5分間振盪した後、ゲル乾燥器で乾燥し密封保存して下さい。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。
- 7. さらに短時間での染色条件を下記に示します。
ただし、染色実施例が少ないため、確実に染色したい場合には前述の標準操作法で行って下さい。
 - 1. 固定液-1 5分間振盪
 - 2. 固定液-2 5分間振盪
 - 3. 増感液 5分間振盪
 - 4. 水洗 2分間振盪
 - 5. 染色液 正確に10分間よく振盪
 - 6. 水洗 2分間×3回よく振盪
 - 7. 現像液 5分間振盪
 - 8. 停止 1分間振盪

【保存方法】 2～10℃・遮光保存

【関連商品】

299-50101	クイック-CBB	2L用
-----------	----------	-----

- CBB R-250色素を用いた蛋白質染色キット
- 約50分で染色が完了します（脱色操作は不要）。
- 二液（染色液A、B）を混ぜるだけ（希釈操作不要）の簡単なキットです。

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