

Product Information

ProteoSilver™ Plus
Silver Stain Kit製品番号 PROT-SIL2
室温で保存してください

TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)

製品概要

ProteoSilver™ Plus Silver Stain Kit はきわめて高感度で、MALDI-MS と互換性のある、タンパク質検出のための銀染色キットです。プロテオミクスで多く使われる特性解析法である複雑なタンパク質溶液の二次元(2D)ポリアクリルアミドゲル解析を行えるよう最適化されています。さらに、ProteoSilver Plus は銀染色したタンパク質スポットの特性解析に役立ち、本キットのコンポーネントで脱染色することができ、MALDI-MS によって同定することもできます。

ProteoSilver Plus は硝酸銀を使用していますが、これが弱酸性 pH または中性 pH の条件下でタンパク質のアミノ酸に選択的に結合します。アルカリ pH 下ではこのタンパク質結合銀イオンがホルムアルデヒドによって還元され、ゲル中に金属銀が形成されます。脱染色の間、金属銀は酸化されて銀フェリシアン化物となり、これがチオ硫酸ナトリウムと反応して水不溶性の複合体を形成します。このキットにより、0.1 ng の BSA/mm² が検出されます (12 ウェル上で 0.2 ng BSA を含むタンパク質のバンド、一次元)。

キット内容

ProteoSilver Plus Silver Stain Kit には、25 個のミニゲルを染色できる十分な内容が含まれています。キットには下記が含まれます：

ProteoSilver Silver Solution (製品番号 P3739)
ProteoSilver Sensitizer (製品番号 P3614)
ProteoSilver Developer 1 (製品番号 P3864)
ProteoSilver Developer 2 (製品番号 P3989)
ProteoSilver Stop Solution (製品番号 P4114)
ProteoSilver Destainer A (製品番号 P4239)
ProteoSilver Destainer B (製品番号 P4364)

本製品以外にご用意いただく試薬および器具
エタノール (製品番号 27,074-1)
酢酸 (製品番号 A9967)
超純水 (16~18 MΩ•cm または同等品)
ガラス製またはプラスチック製の染色トレイ
マイクロチューブ (ゲル切片の脱染色)

注意事項と免責事項

本製品は試験研究用のみを目的として販売されています。医薬品、家庭用その他試験研究以外の用途には使用できません。危険性や安全な取り扱いに関しては化学物質安全データシート (MSDS) をご覧ください。

使用前の準備

染色のバックグラウンドを下げ感度を上げるためには、超純水の使用が不可欠です。

1. **固定液** 超純水 40 mL にエタノール 50 mL と酢酸 10 mL を加えます。
2. **30% エタノール溶液** エタノール 30 mL を 超純水 70 mL に加えます。
3. **増感液** 1 mL の ProteoSilver Sensitizer を超純水 99 mL に加えます。調製した溶液は 2 時間以内に使用してください。ProteoSilver Sensitizer で沈澱が生じることがあります。このような沈澱が溶液の性能に影響することはありません。沈澱物をただ沈ませて、上清 1 mL を取り出してください。
4. **銀溶液** 1 mL の ProteoSilver Silver Solution を超純水 99 mL に加えます。調製した溶液は 2 時間以内に使用してください。
5. **現像液** 5 mL の ProteoSilver Developer 1 と 0.1 mL の ProteoSilver Developer 2 を超純水 95 mL に加えます。この現像液は使用直前 (20 分以内) に調製してください。

保存/安定性

キットのコンポーネントはすべて、室温で 1 年以上安定しています。

手順

A. 直接銀染色

- ステップはすべて、60～70 rpm のオービタルシェーカー上で室温で行ってください。
- ゲルは、洗剤で洗い十分にすすいだ、ガラス製またはステンレス製トレイで染色してください。
- ゲルに指紋が残らないよう、清潔な使い捨て手袋を装着し、次のステップに進む前には必ず交換してください。
- この手順で示している量はミニゲルを対象としています。大きいフォーマット (13×16 cm) のゲルには 3 倍の量を使ってください。
- 染色手順の完了までに十分な時間がとれない場合は、染色プロセスをこの固定段階でいったん止め、固定液中でゲルを一晩おくこともできます。

染色

1. 固定 - ミニ・ポリアクリルアミドゲルでタンパク質を電気泳動した後に、固定液 100 mL の入った清浄なトレイにゲルを入れ、20 分おきます。
注意点: 固定時間が長いほど(40 分～一晩)バックグラウンドがきれいになります。
2. エタノール洗浄 - 固定液をデカントし、30%エタノール溶液でゲルを 10 分間洗浄します。
3. 水洗浄 - 30%エタノール溶液をデカントし、超純水 200 mL でゲルを 10 分間洗浄します。
4. 増感 - 水をデカントし、増感液 100 mL 中でゲルを 10 分間インキュベートします。
5. 水洗浄 - 増感液をデカントし、超純水 200 mL でゲルを 10 分間洗浄し、これを 2 回繰り返します。
6. 銀の平衡化 - 水をデカントし、銀溶液 100 mL でゲルを 10 分間平衡化させます。
7. 水洗浄 - 銀溶液をデカントし、超純水 200 mL でゲルを 1～1.5 分間洗浄します。
注意点: 1.5 分以上洗浄すると、感度が低下します。

8. ゲルの現像 - 水をデカントし、現像液 100 mL でゲルを現像します。大半のゲルでは、期待される染色強度を得るのに 3～7 分の現像時間で十分です。非常に低いタンパク質濃度 (0.1 ng/mm²) のバンドやスポットを検出したい場合は、10～12 分という長さの現像時間が必要なこともあります。

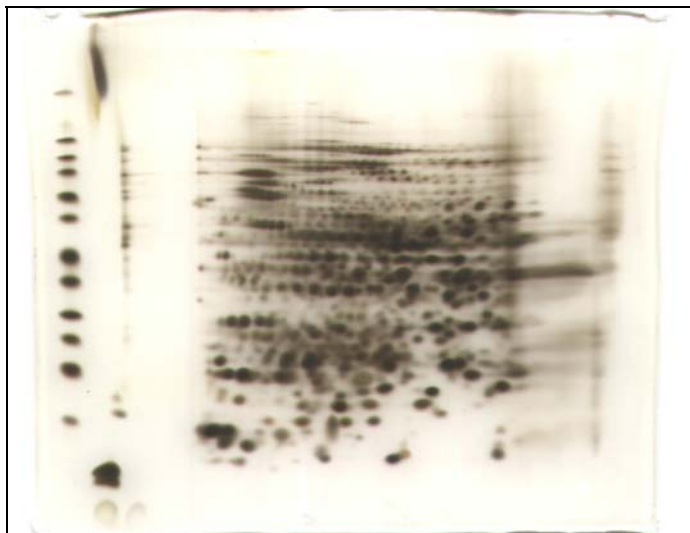
注意点: ゲルを過剰に現像させると、バックグラウンドの染色が強くなります。

9. 停止 - 5 mL の ProteoSilver Stop Solution を現像液に加え、現像反応を停止させ、5 分間インキュベートします。混合液中で CO₂ ガスが生成します。
10. 保存 - 現像/停止液をデカントし、超純水 200 mL でゲルを 15 分間洗浄します。新たな超純水中でゲルを保存します。

脱染色

1. 対象とする染色スポットまたはバンドを、清潔なメスを使って切り出し、清浄なマイクロチューブにゲル片を入れます。
注意点: 脱染色中にゲル断片が損なわれないように、切り出したスライスには注意して保管してください。
2. このマイクロチューブに ProteoSilver Destainer A 0.1 mL と ProteoSilver Destainer B 0.1 mL を加えます。ゲルスライスが完全に浸らない場合は、さらに ProteoSilver Destainer A 0.1 mL と ProteoSilver Destainer B 0.1 mL をマイクロチューブに加えます。チューブを弱くボルテックスにかけ、室温で 2 分間または染色が消えるまでインキュベートします。
注意点: マイクロチューブに入れる前に、あらかじめ脱染色液 A と B を混ぜることはしないでください。
3. チューブを短時間 (5 秒) 遠心してゲルスライスを沈澱させ、上清をピペットで抜き取ります。
4. ゲルスライスに超純水 0.2 mL を加え 5 分間洗浄します。水をピペットで抜き取り、この水洗浄を 2 回繰り返します。5 分間の水洗浄の間に、数回弱く混和します。
5. このゲルスライスを、トリプシン消化および MALDI MS などのプロテオミクス解析に用います。ゲル内トリプシン消化は、Proteomics Sequencing Grade Trypsin (製品番号 T6567) を用いて行うことができます。

図 1.
2D SDS-PAGE ゲルの ProteoSilver 染色



凍結乾燥した *E. coli* (製品番号 EC-1) のサンプル (21 µg) を ProteoPrep® Total Extraction Sample Kit (製品番号 PROT-TOT) を用いて抽出し、トリブチルホスフィンで還元し、ヨードアセトアミドでアルキル化します。7 cm IPG ストリップ (pH 4~7) 上で IEF による抽出液を分離しました。ストリップを、マーカーウェル中で 2.5 µL の SigmaMarker (製品番号 M4038、100 倍希釈) を用いて 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE ゲルに移しました。

電気泳動後、ゲルを A 法で銀染色しました。

B. 二重染色 - Coomassie® ブリリアントブルー染色後の銀染色

二重染色 (Coomassie ブリリアントブルーと銀) によって、銀染色のみに比べてその検出感度は 2~4 倍になります。初めにゲルを EZBlue™ Gel Staining Reagent (製品番号 G1041) で染色することもできます。Coomassie ブリリアントブルー染色ゲルは、バックグラウンド (タンパク質がないゲル) が基本的にクリアになるまで脱染色してください。Coomassie ブリリアントブルーを脱染色した後、染色手順の固定ステップ(A 法、ステップ 1) から銀染色を始めます。

参考文献

1. Gharahdaghi, F. et al., Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis*, **20**, 601-605 (1999).
2. Rabilloud, T. et al., Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. *Cell. Mol. Biol.*, **40**, 57-75 (1994).

トラブルシューティングガイド

問題	原因	対策
バックグラウンドが暗すぎる。	ゲルの現像時間が長すぎた。	染色は 7 分以内にしてください。染色時間が長いとバックグラウンドが高くなります。脱染色剤 A と B の 1:1 混合液で 30 秒未満インキュベーションし、さらに水洗浄を行うことで、過剰に現像したゲルの強度を弱めることができます。
	混和が不十分、またはトレイのサイズが不適切であったために、洗浄が有効でなかった。	ゲルが完全に浸り、ゲル周辺の溶液の動きが十分になるような、適当な大きさのトレイを使ってください。
	固定段階でゲルバッファーや泳動バッファーが完全に除去されなかった。	ゲルを激しく洗浄するためには、60～70 rpm のオービタルシェーカーで処理されることをお勧めします。
	純水でなかった。	Bis-Tris をバッファーとしたゲルでは、バックグラウンドを抑えるために固定時間を長くする必要があります。超純水 (16～18 MΩ・cm または同等品) をお使いください。
タンパク質の感度が低い。	タンパク質にはわずかなシステイン残基が含まれる場合があります、これが銀染色に重要になります。	銀染色前に Coomassie ブリリアントブルーで染色することで、タンパク質への銀の結合が強くなります(二重染色、B 法参照)。
	ゲルから銀イオンが流れてしまった。	銀平衡化後の水洗浄時間を 1.5 分以内とします。
	ゲルにロードされたタンパク質量が少なすぎた。	ProteoSilver Plus によって、BSA のバンドについて 0.2 ng が検出されます。他のタンパク質では、より高いタンパク質ロード量が必要なこともあります (1 バンドまたは 1 スポットあたり 1 ng)。
ゲル表面に染みの点がある。	ゲルが完全に浸っていない。	適当な大きさのトレイを使って、十分に混和させてください。
	染色トレイが汚れている。	染色トレイを洗剤 (SigmaClean Liquid Laboratory Glassware Concentrate、製品番号 S4107) とスポンジでよく洗い、超純水ですすいでください。銀染色専用のトレイとスポンジを用意してください。
	指紋が付着している。	使い捨ての手袋を使い、次のステップに進む際は必ず交換してください。

トラブルシューティングガイド (続き)

問題	原因	対策
ゲル全体で 60～70 kDa 周囲にタンパク質のバンドがあり、そのラインの上でバックグラウンドがスミア状になっている。	皮膚のケラチンが泳動バッファーに混入した。	泳動バッファーの調製時に新しくきれいな手袋を装着し、開封した容器の上に身を乗り出さないでください。清潔な手袋を使って新たにストック溶液やサンプルバッファーを作る必要がある場合もあります。
ゲルのトップ部分のバックグラウンドが黄色い。	サンプル中のジチオスレイトール (DTT) 濃度が高い。	他の還元剤に変更してください。例えば、10 mM リン酸トリブチル(TBP, 製品番号 T7567)、10 mM Tris (carboxyethyl) phosphine (TCEP, 製品番号 C4706)、100 mM 2-Mercaptoethanesulfonic acid (MESNA, 製品番号 M1511)。
		サンプルを 2～5 倍モルのヨードアセトアミドでアルキル化し、15 分間インキュベートしてください。ヨードアセトアミドは DTT とタンパク質をアルキル化します。タンパク質をアルキル化することで、検出能が若干低下します。
		タンパク質サンプルの還元到低濃度の DTT (30 mM) を用いて、ロードする直前にサンプルバッファー (5 mM DTT を含む) で希釈してください。
	Tris-Glycine-SDS 泳動バッファー中のグリシンによって、ゲルのトップ部分が黄色っぽくなる場合があります。	Tris-Tricine-SDS 泳動バッファーに変更してください。

ProteoSilver 染色チェックリスト

次のチェックリストをコピーして、染色ステップの確認にご利用いただき、すべてのステップが行われるようしてください。
そのステップを始めたとき O に印を付け、開始時間を記入してください。

日付 _____	日付 _____
固定	固定
固定液 20 分 O _____	固定液 20 分 O _____
エタノール洗浄 10 分 O _____	エタノール洗浄 10 分 O _____
水洗浄 10 分 O _____	水洗浄 10 分 O _____
増感	増感
増感液 10 分 O _____	増感液 10 分 O _____
水洗浄 10 分 O _____	水洗浄 10 分 O _____
水洗浄 10 分 O _____	水洗浄 10 分 O _____
銀平衡化	銀平衡化
銀溶液 10 分 O _____	銀溶液 10 分 O _____
水洗浄 1 分 O _____	水洗浄 1 分 O _____
現像液 3~7 分 O _____	現像液 3~7 分 O _____
停止液 5 分 O _____	停止液 5 分 O _____
水洗浄 O _____	水洗浄 O _____

Coomassie は Imperial Chemical Industries, PLC.の登録商標です。

MDS,MAM 03/05-1

Sigma ブランド製品は Sigma-Aldrich, Inc.を通じて販売されています。

Sigma-Aldrich, Inc.は同社製品がこの文書およびその他の Sigma-Aldrich 発行文書に含まれる情報に合致していることを保証します。お客様の個別の用途と製品の適合性についてはお客様にてご判断ください。収載の品目、製品情報、価格などは予告なく変更される場合がございます。納品伝票または同梱の内容明細書の裏面をご覧ください。