

銀イオンはアンモニア性アルカリ溶液中で銀ジアミン錯体を形成します。銀イオンや銀錯体イオンはタンパク質と結合(-SH基に最も結合しやすい)し、これをクエン酸、ホルマリンの作用により還元して金属銀を析出し、タンパク質のバンドの黒化像を得ます。核酸の場合は、プリン、ピリミジン塩基の-NH₂基に結合します。

1. タンパク質をサンプルとした場合

I. 使用機器、器具、試薬

使用機器・器具

	品名
1	振とう器
2	スパーテル
3	染色トレイ
4	ディスポーザブル手袋

試薬

(1) 銀染色試薬

品番	品名	包装	貯法
423413	2D-銀染色試薬・II	10枚用	2~10℃

(2) 試薬の調製

試薬の調製は、スラブゲル140mm×140mm×1.0mm 1枚分（マルチゲル[®] II ミニの場合2枚分）を基準としていますので、ゲルの大きさ、厚さが異なる場合は体積比で調製してください。また、各試薬は用時調製してください。（マルチゲル[®] II はRNAの電気泳動にはご使用できません。）




調製法	留意点
(1) 固定液 I メタノール 100 ml 酢酸 20 ml 精製水で全量 200 ml 攪拌混合して固定液 I とする。	○精製水は、10 ⁻⁶ mho以下のものを使用してください。 ○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。 [固定液 I は本キット中に用意しておりませんので自製してください。 尚、等電点ゲルの場合は、固定液 I のかわりにスルホサリチル酸固定液を自製してください。*]
(2) 固定液 II メタノール 60 ml 酢酸 20 ml ① 固定化剤 10 ml 精製水で全量 200 ml 攪拌混合して固定液 II とする。	
(3) 前処理液 メタノール 100 ml ② 前処理剤 10 ml 精製水で全量 200 ml 攪拌混合して前処理液とする。	○銀染色後にMS解析を行う場合は、前処理剤を除いてお使いください。 前処理液 メタノール 100 ml 精製水で全量 200 ml






調製法	留意点
(4) 銀染色液 ③ 染色液 A 10 mlに ④ 染色液 B 10 mlを 混合後 精製水で全量 200 mlを 攪拌混合して銀染色液とする。	○銀染色液は放置すると爆発性の銀アミドを生じる可能性がある ので用時調製とし、また使用後はconc.HCl (2~3 ml)、 NaCl 等を加えAgClの沈殿物としてください。 ○染色液Aの量が多い場合には感度が高くなりますが、ゲルの 黒化も生じ、また銀鏡の原因にもなります。
(5) 現像液 ⑤ 現像原液 10 ml 精製水で全量 200 ml 攪拌混合して現像液とする。	
(6) 停止液 ⑥ 停止液をそのまま使用します。	
*スルホサリチル酸固定液 スルホサリチル酸 7 g トリクロロ酢酸 23 g 精製水で全量 200 ml 攪拌溶解して使用する。	○等電点ゲルの場合、固定液 I のかわりに使用します。 ○精製水は、 10^{-6} mho以下のものを使用してください。 ○スルホサリチル酸、トリクロロ酢酸は、特級以上のものを使 用してください。

操作手順

- ・以下の操作は**ディスパーザブル手袋を着用**して行ってください。
- ・精製水は **10^{-6} mho以下のもの**を使用してください。
- ・使用液量はスラブゲル140mm×140mm×1.0mmを基準としているため、ゲルの大きさにより体積比で換算して調製してください。

*マルチゲル[®] II ミニ1枚使用の場合は100 mlです。

1 固定液 I 200 ml 	表面の平滑で清浄な容器に固定液 I 200 mlを注ぎ、ゲルを浸し、10分間振とうします。 ○操作中ゲルが液面より出ないように注意してください。 ○容器は表面が平滑で清浄なものを使用してください。 ○専用の振とう器がない場合は、時々手で振とうしてください。
2 固定液 II 200 ml 	固定液 I を捨て、固定液 II 200 mlを注ぎ、15分間振とうします。
3 前処理液 200 ml 	固定液 II を捨て、前処理液200 mlを注ぎ、10分間振とうします。

<p>4</p> <p>精製水 200 ml</p>  <p>5分</p>	<p>前処理液を捨て、精製水 200 mlを注ぎ、5分間振とうします。</p>
<p>5</p> <p>銀染色液 200 ml</p>  <p>15分</p>	<p>精製水を捨て、銀染色液 200 mlを注ぎ、15分間振とうします。</p> <ul style="list-style-type: none">○銀染色注入時、液が着色あるいは濁りが生じても染色に影響ありません。○時間を延長するに従い、現像に要する時間がある程度早くなります。
<p>6</p> <p>精製水 200 ml</p> <p>2分 ×3回水洗</p>  <p>×3回水洗</p>	<p>銀染色液を廃液容器*に捨て、精製水 200 mlを注ぎ、2分間振とうします。この操作を3回繰り返します。</p> <p>* 廃液処理についてはp28を参照してください。</p> <ul style="list-style-type: none">○ゲル中の余分な銀ジアミンイオンを除去します。水洗不足は、バックグラウンドの着色及びゲル銀鏡の原因となります。○水洗時間を延長しすぎると現像に長時間を要します。
<p>7</p> <p>現像液 200 ml</p>  <p>5~10分</p>	<p>精製水を捨て、現像液 200 mlを注ぎ、5~10分間振とうします。</p> <ul style="list-style-type: none">○現像液を加えた際に褐色に濁る場合には、その現像液を捨て、新たに調製した 200 mlの現像液を加えます。○現像が不十分な場合、退色の原因となりますので、必ず5分以上現像してください。
<p>8</p> 	<p>適度の染色像が得られたら (5~10分) 停止液 10 ml (マルチゲル® II ミニ 1 枚の場合は 5 ml) を注ぎ、よく振とうします。</p>
<p>9</p>	<p>現像を停止したら (~10分) 十分水洗して保存してください。</p>

～ ワンポイントアドバイス ～

MALDI-TOF MS感度アップに伴い、銀染色で解析できる程度の微量タンパク質も銀染色後のMS解析が可能になりました。

2D-銀染色試薬・Ⅱでは、前処理剤としてグルタルアルデヒドを使用しているため、そのまま使用した場合は、MS解析に適していません。

MS解析を行う場合には、前処理剤を除いて前処理液を調製してください。その他の試薬の調製、染色時間は通常の方法と同じです。

前処理液

メタノール 100 ml

精製水で全量 200 ml

攪拌混合して前処理液とする。