

快速银染试剂盒

产品编号	产品名称	规格
BL620A	快速银染试剂盒	25 T

产品简介:

快速银染试剂盒(Fast Silver Stain Kit)是一种快速简单、可用于 SDS-PAGE 或非变性 PAGE 等蛋白银染的试剂盒。本试剂盒也可以用于 2D 凝胶的银染,并且染色后兼容后续的质谱检测。本试剂盒只需约 90 分钟内可以完成凝胶的银染。对于 BSA 蛋白,检测灵敏度可以达到 0.3ng 蛋白。

本试剂盒可足够用于 25 块常规的 8×10cm 凝胶的银染。

说明书后附有实验记录表格,方便记录实验步骤。

产品组份:

产品编号	产品名称	规格	贮存
RTD6401-1	银染增敏液(100×)	26 ml	常温
RTD6401-2	银溶液(100×)	26 ml	常温,避光
RTD6401-3	银染基本显色液(10×)	250 ml	常温
RTD6401-4	银染显色加速液(2000×)	1.5 ml	常温,避光
RTD6401-5	银染终止液(20×)	125 ml	常温

注意事项:

1、由于银染非常灵敏,操作时请注意尽量使用高纯度的水,并确保所使用的器皿非常清洁,最好使用洁净的玻璃器皿。操作时必须戴手套,避免皮肤和凝胶直接接触。

2、需自备乙醇、冰醋酸及 MilliQ 级纯水或双蒸水。

3、下述使用说明中各种溶液的使用量适用于大小为 8×10cm 厚度为 0.75-1mm 的凝胶。对于更大的凝胶,各种溶液的使用量需按凝胶面积的比例放大,对于更厚的凝胶,作用时间需按照厚度的比例适当延长。

4、本说明书所指的常温为 20-25℃,操作温度较低时由于溶液的扩散能力下降,各步骤需适当延长时间。

5、银染基本显色液(10×)在低温环境下可能会出现沉淀,可在 30-37℃ 水浴中溶解,并充分混匀后使用。

使用方法:

一、固定步骤:

1、电泳结束后,取凝胶放入约 100ml 固定液中,在摇床上室温摇动 20 分钟,摇动速度为 60-70rpm。固定 40 分钟以上甚至过夜可以进一步降低背景。

固定液的配制:

固定液配制量	无水乙醇	冰醋酸	超纯水
100 ml	50 ml	10 ml	40 ml

2、30%乙醇洗涤:

弃固定液,加入 100ml 30%乙醇,在摇床上室温摇动 10 分钟,摇动速度为 60-70rpm。

30%乙醇的配制:

70ml MilliQ 级纯水或双蒸水中加入 30ml 乙醇,混匀后即成 100ml 30%乙醇。

3、水漂洗:

弃 30%乙醇, 加入 200ml MilliQ 级纯水或双蒸水, 在摇床上室温摇动 10 分钟, 摇动速度为 60-70rpm。

二、增敏步骤:

1、弃水, 加入 100ml 银染增敏液(1×), 在摇床上室温摇动 2 分钟, 摇动速度为 60-70rpm。

银染增敏液(1×)的配制:

99 ml MilliQ 级纯水或双蒸水中加入 1ml 银染增敏液(100×), 混匀后即为银染增敏液(1X)。银染增敏液(1×)配制后需在 2 小时内使用。

2、水漂洗(共 2 次):

弃原有溶液, 加入 200ml MilliQ 级纯水或双蒸水, 在摇床上室温摇动 1 分钟, 摇动速度为 60-70rpm。重复此步骤一次。

三、银染步骤:

1. 弃水, 加入 100ml 银溶液(1×), 在摇床上室温摇动 10 分钟, 摇动速度为 60-70rpm。

银溶液(1X)的配制:

99ml MilliQ 级纯水或双蒸水中加入 1ml 银溶液(100X), 混匀后即为银溶液(1X)。银溶液(1X)配制后需在 2 小时内使用。

2、水洗涤:

弃原有溶液, 加入 100ml MilliQ 级纯水或双蒸水, 在摇床上室温摇动 1-1.5 分钟, 摇动速度为 60-70rpm。

注意: 水洗涤的时间不能超过 1.5 分钟。

四、显色步骤:

弃水, 加入 100ml 银染显色液, 在摇床上室温摇动 3-7 分钟, 直至出现比较理想的预期蛋白条带, 摇动速度为 60-70rpm。

银染显色液的配制:

银染显色液配制量	银染基本显色液(10×)	超纯水	银染显色加速液(2000X)
100 ml	10 ml	90 ml	0.05 ml

注: 银染显色加速液(2000X)有刺激性气味, 建议在通风橱内操作; 银染显色液配制后需在 20 分钟内使用。

五、终止步骤:

1、弃银染显色液, 加入 100ml 银染终止液(1×), 在摇床上室温摇动 10 分钟, 摇动速度为 60-70rpm。终止时有气体产生属正常现象, 产生的气体为二氧化碳。

银染终止液(1×)的配制:

95ml MilliQ 级纯水或双蒸水中加入 5ml 银染终止液(20×), 混匀后即为银染终止液(1X)。银染终止液(1X)配制后宜当天使用。

2、水洗涤:

弃银染终止液, 加入 100ml MilliQ 级纯水或双蒸水, 在摇床上室温摇动 5 分钟, 摇动速度为 60-70rpm。

六、保存:

可在 MilliQ 级纯水或双蒸水中保存。或采用适当的方式制备成干胶。

常见问题:

1、背景太深:

(1) 显色时间过长。通常显色反应会在 10 分钟内结束, 显色反应时间过长会导致背

景很深。

(2) 洗涤不充分。洗涤时间过短，或洗涤液加入的量不足，或者容器过于狭小导致摇动时溶液不易充分混合，或摇动速度过慢，导致混匀不充分。请按照说明书的建议确保各种溶液的用量和作用时间，摇床的推荐速度为 60-70rpm。

(3) 凝胶中原有的缓冲液等未在固定步骤中去除干净。一方面需确保固定的时间和固定液的用量，另一方面对于不是最常用的 Bis-Tris 缓冲的凝胶需要更长的固定时间以充分去除凝胶中的原有缓冲成分，以降低背景。

(4) 水的纯度太低。需使用大于 $16\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 的高纯度水。

2、蛋白条带非常浅：

(1) 蛋白的半胱氨酸(Cysteine)残基的含量特别低或几乎没有。半胱氨酸残基的存在对于银染非常重要，半胱氨酸残基的含量过低会导致检测灵敏度下降。

(2) 银染后水洗涤时间过长。在银溶液染色时需严格控制水洗涤的时间，水洗涤的时间不能超过 1.5 分钟，否则会导致过多的银离子被洗去，导致检测灵敏度下降。

(3) 样量不足。本试剂盒检测 BSA 的灵敏度可以达到 0.3ng，对于不同的蛋白检测灵敏度可能不同。对于一些蛋白可能需要大于 1ng 的蛋白量才能被检测到。

(4) 固定步骤后的洗涤不够充分。导致少量乙酸残留，影响后续检测。确保 30%乙醇洗涤和水洗涤的用量和时间，可以适当延长洗涤时间。

3、凝胶上出现小点或其它非蛋白的痕迹：

(1) 凝胶没有充分被溶液浸没。请注意选择大小合适的容器，并加入足量的各种溶液，同时需保持适当的混匀速度确保凝胶可以被溶液浸没。

(2) 用于银染的容器没有充分洗涤干净。容器需先用洗涤剂充分洗涤，随后用自来水充分冲洗，最后用高纯度水再洗涤数次。该容器最好能专用于银染，并注意避免各种可能的蛋白污染。为确保充分洗涤干净，对于耐硝酸的容器，例如玻璃容器，可以在上述洗涤剂及自来水洗涤后用 50%硝酸洗涤，随后用高纯度水充分洗涤。

(3) 指纹或其它压痕。请注意戴手套操作，切勿直接接触皮肤。操作时请注意尽量勿挤压、折叠或摩擦凝胶。

(4) 有金属物质接触凝胶。金属物质例如金属镊子等接触凝胶会出现非特异性痕迹。

4、在 60-70 kD 处出现一片模糊的蛋白染色背景：

皮肤上脱落的角蛋白(keratin)污染了蛋白样品。一方面需注意戴手套操作，另一方面需注意盛放蛋白样品的容器盖子尽量不要敞开，甚至在取放蛋白样品时在超净台内进行以避免可能的角蛋白污染。

5、在凝胶的顶端处出现黄色背景：

(1) 样品中 DTT 浓度很高。采用其它适当的还原试剂，或者在许可范围内适当减少 DTT 的用量。

(2) 采用 Tris-Glycine-SDS 电泳体系。Tris-Glycine-SDS 电泳体系中的 Glycine 会导致背景凝胶的顶端出现轻微黄色背景。

6、银在染色器皿中出现沉淀：

染色器皿中可能含有残余的洗涤剂或上次银染时的残余试剂。需确保把染色器皿洗涤干净。

保存条件：

常温保存，开封后一年有效。

银染实验记录表格：

实验日期：

		约 80 分钟	标记 √	起始时间
一 固定步骤				
	固定	20 min		
	乙醇漂洗	10 min		
	水漂洗	10 min		
二 增敏步骤				
	增敏	2 min		
	水漂洗	1 min		
	水漂洗	1 min		
三 银染步骤				
	银染	10 min		
	水漂洗	<1.5 min		
四 显色步骤	显色	3-7 min		
五 终止步骤				
	终止	10 min		
	水漂洗	5 min		
六 保存				