



快速银染试剂盒

说明书

【产品简介】

本产品是一种快速简单、可用于SDS-PAGE或非变性PAGE等蛋白银染的试剂盒。也可以用于2D凝胶的银染，并且染色后和后续的质谱检测兼容。只需一小时左右即可观察到蛋白条带，90分钟内可以完成2块凝胶的银染。对于BSA蛋白，检测灵敏度可以达到0.3ng蛋白。可足够用于25块常规的8×10cm凝胶的银染。

【试剂盒组成】

试剂盒组成	PWE-008
银染增敏液(100X)	25ml
银溶液(100X)	25ml
银染基本显色液(10X)	500ml
银染显色加速液(2000X)	1.5ml
银染终止液(20X)	125ml
说明书	1份

【运输及储存条件】

常温条件下运输，室温保存，至少一年有效。银溶液(100X)和银染显色加速液(2000X)需避光保存。

【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、乙酸及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. 本说明书所指的室温为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(10X)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。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

【使用说明】

1. 固定：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：依次加入50ml乙醇、10ml乙酸和40ml MilliQ级纯水或双蒸水，混匀后即成100ml固定液。
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. 水洗涤：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。
4. 增敏：弃水，加入100ml银染增敏液(1X)，在摇床上室温摇动2分钟，摇动速度为60-70rpm。
银染增敏液(1X)的配制：99ml MilliQ级纯水或双蒸水中加入1ml银染增敏液(100X)，混匀后即为银染增敏液(1X)。银染增敏液(1X)配制后需在2小时内使用。
5. 水洗涤(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。
弃水，再加入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。
6. 银染：弃水，加入100ml银溶液(1X)，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。
7. 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。
8. 显色：弃水，加入100ml银染显色液，在摇床上室温摇动3-10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：90ml MilliQ级纯水或双蒸水中加入10ml银染基本显色液(10X),再加入0.05ml银染显色加速液(2000X)，混匀后即为银染显色液。银染显色液配制后需在20分钟内使用。



9. 终止: 弃银染显色液, 加入100ml银染终止液(1X), 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(1X)的配制: 95ml MilliQ级纯水或双蒸水中加入5ml银染终止液(20X), 混匀后即成为银染终止液(1X)。银染终止液(1X)配制后宜当天使用。

10. 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2-5分钟, 摇动速度为60-70rpm。

11. 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:

a. 显色时间过长。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。

b. 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。

c. 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。

d. 水的纯度太低。需使用大于16 MΩ·cm的高纯度水。

2. 蛋白条带非常浅:

a. 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。

b. 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。

c. 上样量不足。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。

d. 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. 凝胶上出现小点或或其它非蛋白的痕迹:

a. 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。

b. 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。

c. 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。

d. 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:

a. 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。

b. 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。换用Tris-Tricine-SDS电泳体系则可显著消除此黄色背景。

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。

注: 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。