

ゲルの染色方法

準備する試薬類

CBB 染色用試薬

- ・ CBB 固定液 (50%エタノール、10%酢酸)
- ・ CBB 染色液 (0.25% CBB R250、5%メタノール、7.5%酢酸)
- ・ 脱色液 (25%メタノール、7.5%酢酸)

銀染色 1 用試薬

GE の Silver Staining Kit, Protein (17-1150-01)を利用する。



- ・ 固定液 (40%メタノール、10%酢酸)
- ・ 増感液 (30%メタノール、10ml チオ硫酸ナトリウム (5%)、17g 酢酸ナトリウム、165ml 水)

* 当日調製

- ・ 硝酸銀液 (25ml 硝酸銀 (2.5%)、225ml 水)

* 当日調製

- ・ 現像液 (6.25g 炭酸ナトリウム、100 μ l ホルムアルデヒド (37%)、250ml 水)

* 当日調製、ホルムアルデヒドは使用直前に加えること。

- ・ 停止液 (3.65g EDTA、250ml 水)

* 当日調製

銀染色 2 用試薬

- ・ 固定液 (50%メタノール、5%酢酸)
- ・ 洗浄液 (50%メタノール)
- ・ 増感液 (0.02%チオ硫酸ナトリウム)

* 当日調製

- ・ 硝酸銀液 (0.1%硝酸銀)

* 当日調製し、作成後氷か冷蔵庫で冷やしておく。

- ・ 現像液 (2%炭酸ナトリウム、0.04%ホルムアルデヒド)

* 当日調製し、ホルムアルデヒドは使用直前に加えること。

- ・ 停止液 (5%酢酸)

蛍光染色用試薬

SYPRO RUBY 用

- ・ 固定液 (10%メタノール、7%酢酸)
- ・ SYPRO RUBY

* 5X Sypro Ruby を水で 1X にして使用。使用済み Sypro Ruby 染色液は

遮光して冷蔵庫で保存すれば再利用可能。

洗浄液（10%メタノール、7%酢酸）

Flamingo 用

- ・ 固定液（40%エタノール、10%酢酸）
- ・ Flamingo

* 10X Flamingo を水で 1X にして使用。使用済み Flamingo は遮光して
冷蔵庫で保存すれば再利用可能。



実験方法

CBB 染色

- 1、固定液（50%エタノール、10%酢酸）で1~2時間振とうする。
- 2、固定液を除き、CBB 染色液（0.25% CBB R250、5%メタノール、7.5%酢酸）を加えて30分~1時間振とうする。
- 3、CBB 染色液を除き、CBB 脱色液（25%メタノール、7.5%酢酸）で脱色する（キムワイプを入れておくと液交換の回数が少なくなる）。
- 4、バックグラウンドの色が抜けてきたら CBB 脱色液を除き、水で1~2時間振とうする。

銀染色 1

GE の Silver Staining Kit, Protein (17-1150-01)を利用した系で、感度は銀染色 2 より良い(参考文献;Yan, J.X. et al., Electrophoresis 21:3666-3672)。

- 1、固定液（40%メタノール、10%酢酸）を入れて15分間振とうする。
- 2、固定液を除き、1、の操作をさらに1回繰り返す。
- 3、固定液を除き、増感液（30%メタノール、10ml チオ硫酸ナトリウム（5%）、17g 酢酸ナトリウム、165ml 水）を入れて30分間振とうする。
- 4、増感液を除き、水を入れて5分間振とうする。
- 5、水を除き、4、の操作をさらに2回繰り返す。
- 6、水を除き、硝酸銀液（25ml 硝酸銀（2.5%）、225ml 水）を入れて20分間振とうする。

- 7、硝酸銀液を除き、水で1分間振とうする（長くなりすぎないように注意）。
- 8、水を除き、7、の操作をさらに1回繰り返す（長くなりすぎないように注意）。
- 9、水を除き、現像液（6.25g 炭酸ナトリウム、100 μ l ホルムアルデヒド（37%）、250ml 水）を入れて2~4分程度振とうする（ホルムアルデヒドは使用直前に入れること。バックグラウンドが高くなりすぎないように注意すること）。
- 10、現像液を除き、停止液（3.65g EDTA、250ml 水）を入れて10分間振とうする。
- 11、停止液を除き、水を入れて5分間振とうする。
- 12、水を除き、11、の操作をさらに2回繰り返す。

銀染色 2

- 1、固定液（50%メタノール、5%酢酸）を入れて20分間振とうする。
- 2、固定液を除き、洗浄液（50%メタノール）を入れて10分間振とうする。
- 3、洗浄液を除き、水を入れて10分間振とうする。
- 4、水を除き、増感液（0.02%チオ硫酸ナトリウム）を入れて1分間振とうする。
- 5、増感液を除き、水を入れて1分間振とうする。
- 6、水を除き、5、の操作をさらに2回繰り返す。
- 7、水を除き、氷か冷蔵庫で冷やした硝酸銀液（0.1%硝酸銀）を入れて20分間、低温で振とうする（冷蔵庫やクロマトチャンバーなどを使用）。
- 8、硝酸銀液を除き、水で1分間振とうする（長くなりすぎないように注意）。
- 9、水を除き、8、の操作をさらに1回繰り返す（長くなりすぎないように注意）。
- 10、水を除き、現像液（2%炭酸ナトリウム、0.04%ホルムアルデヒド）を入れて

2~5分程度振とうする（ホルムアルデヒドは使用直前に入れること。バックグラウンドが高くなりすぎないように注意すること）。

- 11、現像液を除き、停止液（5%酢酸）で10分間振とうする。
- 12、停止液を除き、水で5分間振とうする。
- 13、水を除き、12、の操作をさらに2回繰り返す。

蛍光染色

・ Sypro Ruby の場合

- 1、固定液（10%メタノール、7%酢酸）を入れて30分間振とうする。
- 2、固定液を除き、Sypro Rubyを加えて3時間以上振とうする。
- 3、Sypro Rubyを除き、洗浄液（10%メタノール、7%酢酸）を入れて30-60分間振とうする。
- 4、各種画像解析装置で検出（Ex. Peak=300/480nm、Em. Peak=618nm）。

・ Flamingo の場合

- 1、固定液（40%エタノール、10%酢酸）を入れて2時間振とうする。
- 2、固定液を除き、Flamingoを加えて3時間以上振とうする。
- 3、Flamingoを除き、水を加える。
- 4、各種画像解析装置で検出（Ex. Peak=271/512nm、Em. Peak=535nm）。