

核酸用銀染色キット

CLEAR STAIN Ag

マニュアル

(第2版)

Code No. 311-03961

NIPPON GENE CO., LTD.

目次 _____

I 製品説明	2
内容	3
保存	3
使用上の注意	4
使用例	5
トラブルシューティング	7
データ	9
1. DNA の検出感度	
2. 本品を用いて得られたフィンガープリント像	
Q & A	10
関連製品	10

通常、電気泳動後の核酸は臭化エチジウムなどの蛍光試薬を用いて検出します。しかし、実験の目的によってはさらに高感度な検出が必要となることがあります。銀染色法はポリアクリルアミドゲル中のタンパク質や核酸を検出する非常に感度の高い方法です。

CLEAR STAIN Ag は、核酸 (DNA、RNA) 専用に開発された銀染色キットで、ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の核酸を高感度にかつ低いバックグラウンドで検出できます。臭化エチジウム染色の 50 ~ 100 倍の感度 (302 nm で測定した場合) を持っており、バンドあたり 20 ~ 50 pg の DNA が検出可能です。PCR-SSCP 法、STR 解析、differential display 法などのような高い感度とバンドの分離が求められる実験に非常に有効です。

<本品をご使用になる前に必ずお読み下さい>

- ・ 本品は、核酸専用の銀染色試薬です。タンパク質の染色には使用しないで下さい。
- ・ 試薬の調製あるいは洗浄に用いる水の純度や容器の汚れが原因で、バックグラウンドが高くなる場合があります。必ず純度の高い水 (イオン交換水を蒸留したものなど) を使用し、容器はよく洗浄してからお使い下さい。
- ・ 本品には人体に有害な試薬が含まれており、また素手でゲルを扱うと指紋がつくことがありますので、必ず全ての操作において手袋を着用して下さい。
- ・ 染色液 A には硝酸銀が含まれているので、容器の蓋はしっかりと締めて下さい。使用後の染色液は、必ず濃塩酸を 2 ~ 3 ml 加えて塩化銀の沈殿にしてから銀廃液として処理して下さい。染色後の廃液をそのまま放置しておくと爆発物質を生じる危険性があります。
- ・ TAE buffer、TBE buffer、Tris-glycine buffer を用いたゲルで染色することが可能ですが、バックグラウンドは TBE buffer を用いたゲルで低く、TAE buffer を用いたゲルで高くなる傾向があります。

内容

(140×140×1 mm 6%ポリアクリルアミドゲル 20枚分)

- | | | |
|------------------|----------------------|--------------|
| 1. 固定液 (×20) | : CTAB、エタノール | 200 ml |
| 2. アンモニア溶液 (×20) | : アンモニア | 200 ml |
| 3. 染色液 A (×20) | : 硝酸銀 | 200 ml |
| 4. 染色液 B (×20) | : 水酸化ナトリウム、アンモニア | 200 ml |
| 5. 現像液 A (×10) | : 炭酸ナトリウム | 200 ml × 2 * |
| 6. 現像液 B (×20) | : ホルムアルデヒド、チオ硫酸ナトリウム | 200 ml |
| 7. 保存液 (×20) | : グリセロール、酢酸 | 200 ml |

* 現像液 A のみ 10 倍濃度のため 200 ml × 2 本である。

保存

室温 (開封後は6ヶ月以内に使用して下さい)

- ・ 試薬の濃度が変化すると結果に影響を及ぼす可能性がありますので、開封後はしっかりと蓋を締めて下さい。
- ・ 4 で保存すると結晶が析出する (固定液、現像液 A) ことがありますので、低温で保存しないで下さい。結晶が出た場合には、少し温めてよく溶かしてから使用して下さい。

使用上の注意

本品は試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。また、試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱わないでください。

本品のお取り扱い、マニュアル記載内容通りに行ってください。マニュアル記載内容と異なったお取り扱いによるトラブルにつきましては、弊社では責任を負いかねます。

本品各試薬の有害性情報につきましては、MSDS (製品安全データシート) に記述しておりますので、必ずご一読の上ご使用下さい。MSDS につきましては、弊社ホームページ (アドレス <http://www.nippongene.com/>) からダウンロードしてご覧下さい。

使用例

140 × 140 × 1 mm 6%ポリアクリルアミドゲルを染色する場合

試薬の調製方法

各試薬は、それぞれの工程において希釈した 1×濃度のものを 200 ml 使用する（洗浄の際の水は除く）。ゲルサイズの異なるものを染色する場合には、サイズに合わせて試薬量を加減する（サイズが半分の場合には、全ての試薬量を半分にする）。また、試薬の調製は、使用する直前に必要な量だけ調製する。

各試薬の調製には純度の高い水（イオン交換水を蒸留したものなど）を使用する。純度の低い水を使用するとバックグラウンドが高くなることがある。

気温が低い場合、原液に結晶が析出（固定液、現像液 A）していることがあるので、そのような場合には試薬を少し温めて完全に溶解してから使用する。調製した試薬の温度が低い場合は、現像等に時間がかかることがあるので、試薬を調製する際には使用する水の温度を、25～30 に温めたものを使用する。

1. 1×固定液：190 ml の 30%エタノール溶液に固定液 10 ml を加えてよく攪拌する。
2. 1×アンモニア溶液：190 ml の蒸留水にアンモニア溶液 10 ml を加えてよく攪拌する。
3. 1×染色液：先に染色液 A、B 各 10 ml を混合した後、180 ml の蒸留水を加えてよく攪拌する。（染色液 A、B を混合すると、一時的に茶色い沈殿が現れますが、よく攪拌することによって透明になるので、透明になってから蒸留水を加える。）
4. 1×現像液：170 ml の蒸留水に現像液 A 20 ml と現像液 B 10 ml を加えてよく攪拌する。
5. 1×保存液：190 ml の蒸留水に保存液 10 ml を加えてよく攪拌する。

染色方法

1. 固定 (1×固定液: 200 ml) 20 分間
2. 洗淨 (蒸留水: 300~400 ml) 5 分間
3. 前処理 (1×アンモニア溶液: 200 ml) 15 分間
4. 染色 (1×染色液: 200 ml) 15 分間
5. 洗淨 (蒸留水: 300~400 ml) 2 分間×3 回
6. 現像 (1×現像液: 200 ml) 5~10 分間
7. 保存 (1×保存液: 200 ml) 5 分間以上

1. 電気泳動終了後、ガラス板から剥がしたゲルを、調製した固定液 200 ml を入れた容器の中に静かに入れ、室温で 20 分間振とうする。
2. 固定液を完全に捨て、容器中に蒸留水 300~400 ml を入れた後、室温で 5 分間振とうして、ゲルを洗淨する。洗淨が不十分なまま、次の工程に進むと感度が落ちることがあるので、洗淨を十分に行い、固定液が残らないようにする。
3. 洗淨後、蒸留水を完全に捨て、調製したアンモニア溶液 200 ml を入れ、室温で 15 分間振とうする。
4. アンモニア溶液を捨て、調製した染色液 200 ml を入れ、室温で 15 分間振とうする。
【注意】 染色液には、硝酸銀が含まれているので、染色後の廃液には必ず濃塩酸を 2~3 ml 加えて塩化銀の沈殿にした後、銀廃液として廃棄する。
5. 染色液を別の容器に移した後、蒸留水 300~400 ml を加え、室温で 2 分間振とうし、ゲルを洗淨する。2 分間洗淨した後、蒸留水を捨てる。この操作を全部で 3 回行う。
6. 洗淨後のゲルを調製した現像液 200 ml に浸す。5~10 分間振とうするとバンドが現れてくる。水温等の条件により、多少現像時間が変化する。水温が低い場合には、現像等に時間がかかることがある。試薬を調製する際に、使用する水を少し温めることによって(25~30) 時間を短縮することができる。
7. バンドを見ながら適当な濃さになったら、現像液を捨て保存液を 200 ml 加える。少なくとも 5 分間は振とうする。保存液に浸した状態で、数日間は安定である。

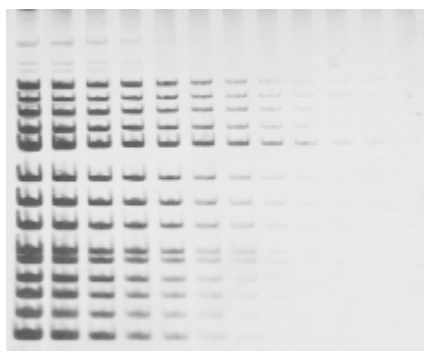
トラブルシューティング

ト ラ ブ ル	原 因	対 策
(A) 感度が低い、またはバンドが現れない	1. 試薬の調製が正しく行われていない	本マニュアルに従い正しく調製する。
	2. 固定、洗浄が不十分	固定、洗浄は決められた時間通りに行う。また、固定あるいは洗浄後の液は後のステップに持ち越さないようにするため、できるだけ取り除く。
	3. 水温が低い (20 以下)	あらかじめ温めた (25 ~ 30) 水を用いて試薬を調製し、染色操作を行う。
	4. ゲル濃度が高い	本マニュアルでは、1 mm 厚の 6% ポリアクリルアミドゲルを染色する方法を示している。 ゲル濃度が高い場合、染色時間を 2 倍 (30 分間) にすることにより、若干感度が上がることもある。
	5. ゲルが厚い (2 mm 以上)	染色時間を 2 倍にすることにより、若干感度が上がるが、1 mm 厚のゲルを染色した場合より感度は落ちる。
	6. 試薬の劣化	試薬の濃度変化は感度、バックグラウンド等に大きな影響を与える。本キットには揮発性の試薬も含まれているので、古くなった試薬はできるだけ使用しない。また、試薬の劣化を防ぐため、使用後はしっかりと蓋をしめて室温で保存する。

(B) バックグラウンドが高い	1.使用している水の純度が低い	イオン交換水を蒸留したもの等の純度の高い水を使用する。
	2.ゲルの洗浄が不十分	染色後の洗浄の際、多めの水で十分に洗浄する。
	3.使用する器具が汚れている	用いる全ての器具はきれいに洗浄してから使用する。また、素手でゲルに触れると指紋等がつくことがあるので、必ず手袋を着用して実験を行う。
	4.TAE buffer を使用したゲルを染色した	TAE buffer を使用したゲルを染色するとバックグラウンドが高くなる傾向がある。TBE buffer を使用することをすすめる。
	5.試薬の劣化	古い試薬を用いるとバックグラウンドが黒ずんだり、茶色に着色したりすることがあるので、古い試薬は使用しない。
	6.染色、現像時間が長すぎる	ある程度染色された後はそれ以上バンドは濃くならず、バックグラウンドのみが高くなってくる。 現像の際にはバンドを見ながら適当な濃さになったら現像液を捨てて、保存液に移す。
(C) バンドがスメアになる	1.サンプルの純度が低い	サンプル中に不純物、例えばタンパク質等が多量に入っていると、タンパク質も染色されてしまいスメアリングの原因になる。できるだけ不純物は除いてから電気泳動を行う。
	2.サンプル量が多すぎる	電気泳動の際に流すサンプル量を減らす。

1. DNA の検出感度

サンプルをレーン左から 2 倍希釈していき、本品による染色で検出可能な DNA のサンプル量を確認した。



サンプル : Marker 9 (X174 / *Hinf* I digest)

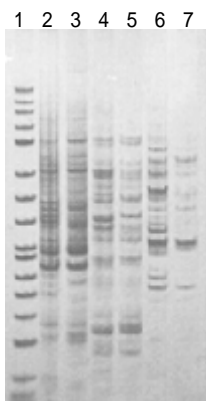
サンプル量 : 左から Lane あたり 500、250、125、
63、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25ng

140×140×1 mm 6%ポリアクリルアミドゲル

バッファー : TBE buffer

2. 本品を用いて得られたフィンガープリント像

弊社製品 mRNA Fingerprinting Kit を用いて、マウスの小脳 total RNA と胸腺 total RNA を鋳型にして RT-PCR を行った。電気泳動後、本品を用いて染色した。



サンプル : マウス小脳 total RNA、胸腺 total RNA

3'-Anchor Primer : GT15C

Arbitrary Primer : Set A (AP-A-2、AP-A-5、AP-A-6)

Lane 1 : Marker 9 (X174 / *Hinf* I digest)

Lane 2 : 小脳 (AP-A-2)

Lane 3 : 胸腺 (AP-A-2)

Lane 4 : 小脳 (AP-A-5)

Lane 5 : 胸腺 (AP-A-5)

Lane 6 : 小脳 (AP-A-6)

Lane 7 : 胸腺 (AP-A-6)

140×140×1 mm 6%ポリアクリルアミドゲル

バッファー : TBE buffer

Q & A

Q1. RNA や ssDNA は染色できますか。

A1. できます。

Q2. 変性ゲルを用いて染色できますか。

A2. できますが、本品は未変性アクリルアミドゲルでクリアーなバンドが検出できるように調製された製品ですので、検出感度は若干落ちることがあります。

Q3. Agarose は染色できますか。

A3. できません。本品は、ポリアクリルアミドゲル専用の銀染色キットです。

関連製品

Code No.	製品名	容量	(円)*
			* 希望納入価格で消費税は含まれておりません。
318-90041	5 × TBE	1 L	9,000
318-90105	Distilled Water, Deionized, Sterile	500 ml	9,000
314-01491	Marker 9 (X174 / <i>Hinf</i> I digest)	15 µg	9,000
316-03151	mRNA Fingerprinting Kit	1 kit	92,000

その他の製品や、最新の製品仕様、希望納入価格については、ニッポンジーンのホームページをご参照ください。

株式会社ニッポンジーン

研究試薬部 学術営業課

〒930-0834 富山市問屋町 1-8-7

TEL (076) 451-6548

FAX (076) 451-6547

E-mail info@nippongene.com

URL <http://www.nippongene.com>

<080926KM>