

天
净
沙
系
列

CAT#:220102-10
常温运输及保存

BINGENE

质谱兼容 PAGE 胶蛋白银染试剂盒

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6005850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	银染是目前检测 PAGE 胶蛋白质条带的最灵敏的方法，MS（质谱）是确定未知蛋白最常用和最快捷的方法,但将银染得到的蛋白直接用于 MS 分析有很多问题，其中最主要问题是常规银染所使用的试剂（包括强氧化剂和醛类）容易使蛋白质发生共价化学修饰，MS 分析得到的修饰后的氨基酸信息跟蛋白质实际的没有修饰的氨基酸信息并不相同。为了使银染得到的蛋白质可以用于 MS 分析，为此本公司开发 MS 兼容型银染试剂盒，其特点如下： 1. 跟 MS 兼容。整个过程不使用能对蛋白质进行化学修饰的试剂，所得蛋白质没有发生化学修饰，故可直接用于后续的 MS（包括 MALDI-TOF-MS 和 ESI-MS）分析。 2. 银染的染色灵敏度比考马斯亮蓝染色高 100 倍左右，可达 0.2-0.6 ng 蛋白质/条带。 3. 可用于各种 PAGE 胶，包括变性 PAGE 胶（如 SDS-PAGE，尿素-PAGE），非变性 PAGE 胶，IEF 胶（等电电泳胶），2D 胶等。 4. 四种溶液都是现用现配，实验结果的可重复性好。 5. 本试剂盒足够染色 10 块 10×10cm PAGE 胶。 6. 本试剂盒只能用于科研。																																				
规格及成分	本试剂盒使用大扁盒包装 <table><tr><th>成 份</th><th>编 号</th><th>规 格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>银染溶液 A 组分一</td><td>220102a1</td><td>5g</td><td>10 mL 本色瓶</td></tr><tr><td>银染溶液 A 组分二</td><td>220102a2</td><td>100 mL</td><td>125 mL 本色瓶</td></tr><tr><td>银染溶液 A 组分三</td><td>220102a3</td><td>22.5g×10</td><td>60 mL 本色瓶</td></tr><tr><td>银染溶液 B 组分</td><td>220102b</td><td>5 g</td><td>10 mL 棕色瓶</td></tr><tr><td>银染溶液 C 组分一</td><td>220102c1</td><td>5g×10</td><td>10 mL 本色瓶</td></tr><tr><td>银染溶液 C 组分二</td><td>220102c2</td><td>2 mL</td><td>5 mL 本色瓶</td></tr><tr><td>银染溶液 D 组分</td><td>220102d</td><td>2.92g×10</td><td>10 mL 本色瓶</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>220102sc</td><td>1 份</td><td>无色</td></tr></table>	成 份	编 号	规 格	包装材料	银染溶液 A 组分一	220102a1	5g	10 mL 本色瓶	银染溶液 A 组分二	220102a2	100 mL	125 mL 本色瓶	银染溶液 A 组分三	220102a3	22.5g×10	60 mL 本色瓶	银染溶液 B 组分	220102b	5 g	10 mL 棕色瓶	银染溶液 C 组分一	220102c1	5g×10	10 mL 本色瓶	银染溶液 C 组分二	220102c2	2 mL	5 mL 本色瓶	银染溶液 D 组分	220102d	2.92g×10	10 mL 本色瓶	使用手册	220102sc	1 份	无色
成 份	编 号	规 格	包装材料																																		
银染溶液 A 组分一	220102a1	5g	10 mL 本色瓶																																		
银染溶液 A 组分二	220102a2	100 mL	125 mL 本色瓶																																		
银染溶液 A 组分三	220102a3	22.5g×10	60 mL 本色瓶																																		
银染溶液 B 组分	220102b	5 g	10 mL 棕色瓶																																		
银染溶液 C 组分一	220102c1	5g×10	10 mL 本色瓶																																		
银染溶液 C 组分二	220102c2	2 mL	5 mL 本色瓶																																		
银染溶液 D 组分	220102d	2.92g×10	10 mL 本色瓶																																		
使用手册	220102sc	1 份	无色																																		
运输及保存	常温运输及保存，有效期一年。																																				
自备试剂	MilliQ 水（或电导在 5MΩ以上的去离子水），分析纯甲醇和分析纯乙酸。																																				
使用方法	说明 所有溶液均需现配现用。以下操作是针对一块 10×10cm PAGE 胶需要 200 mL																																				

各种溶液的比例配制，用户可以根据自己 PAGE 胶的大小增减溶液的配制量。整个过程一定戴手套操作，避免皮肤脱落角质蛋白对实验的干扰。所用容器（如托盘）最好是干净的玻璃容器。

一：配制 400mL 固定液

1. 将 160 mL 甲醇、40 mL 乙酸和 200 mL MilliQ 水充分混合后即得 400 mL 固定液，常温放置待一次性使用。按一次银染需要固定 2 次，每次需使用 200 mL 固定液。

二：配制 200 mL 银染溶液 A

2. 先配制银染溶液 A 组分一母液：将银染溶液 A 组分一干粉 5g（本试剂盒提供）加入到装有 100 mL 银染溶液 A 组分二的塑料瓶中，盖紧盖子后充分摇晃溶解即可。常温放置待用。此溶液剩余的可 4℃ 长期保存。
3. 将 60 mL 自备甲醇、8 mL 上步所得银染溶液 A 组分一母液、1 瓶银染溶液 A 组分三千粉（试剂盒提供）和 132 mL 自备的 MilliQ 水充分混合后即得 200 mL 银染溶液 A。常温放置待一次性使用。

三：配制 200 mL 银染溶液 B

4. 称 0.5g 银染溶液 B 干粉，溶于 200 mL 自备的 MilliQ 水中，充分混合后即得 200 mL 银染溶液 B。常温放置待一次性使用。

四：配制 200 mL 银染溶液 C

5. 将 1 份银染溶液 C 干粉溶解在 200 mL 自备的 MilliQ 水（干粉不容易溶解，需充分摇晃）即得银染溶液 C（使用前还需要再加入 160 uL 溶液 C 组分二，但此时暂不加）。常温放置待一次性使用。

五：配制 200 mL 溶液 D

6. 将 1 份银染溶液 D 干粉溶解在 200 mL 自备的 MilliQ 水中即得银染溶液 D。常温放置待一次性使用。

六：银染

7. PAGE 电泳（包括非变性 PAGE，SDS-PAGE，尿素-PAGE，2D-PAGE，IEF-PAGE 等）结束后，将 PAGE 胶转移到装有 200 mL 固定液的瓷盘或玻璃盘中，摇晃 30 分钟以去除干扰银染的组分（如甘氨酸、SDS、尿素、DTT、甘油等），倒掉固定液。注：此步非常重要，否则银染背景会很高。
8. 重复上步一次。
9. 将 PAGE 胶转移到 200 mL 新鲜配制的银染溶液 A 中，室温摇晃 30 分钟。

	10. 用 200 mL 自备的 MilliQ 水漂洗 3 次，每次 5 分钟（不要延长或缩短）。 11. 将 PAGE 胶转移到 200 mL 的银染溶液 B 中，室温摇晃 20 分钟。 12. 用 200 mL 自备的 MilliQ 水漂洗 2 次，每次 1 分钟（不要延长或缩短）。 13. 将 PAGE 胶转移到 200 mL 的银染溶液 C 中（使用前还需要往装有银染溶液 C 的瓶中再加入 160 uL 溶液 C 组分二并充分混匀），室温摇晃直到蛋白电泳条带显现，此步一般需要 10 分钟左右，具体时间取决于蛋白的浓度。 14. 将 PAGE 胶转移到 200 mL 的银染溶液 D 中，室温摇晃终止反应。 15. 用 200 mL 自备的 MilliQ 水漂洗 3 次，每次 5 分钟（不要延长或缩短）。 16. 切下蛋白电泳条带或胶块进行后续的脱银，原位 trypsin 酶解，多肽沉淀和 MS 分析（略）。 附 MS 前处理步骤（仅供参考，本试剂盒不含相关试剂） 17. 脱银：将切下的银染斑点或条带用脱银液（30 mM $K_3Fe(CN)_3$ 和 100 mM $Na_2S_2O_3$ 的 1: 1 的混合液）处理直到黑色消失。 18. 还原：将胶块或胶条置于 10 mM DTT（溶剂为 50 mM NH_4HCO_3），56℃处理一小时。 19. 烷化：将胶块或胶条置于 55 mM 碘乙酰胺（溶剂为 50 mM NH_4HCO_3），室温避光处理 45 分钟。 20. 原位 trypsin 酶解：将胶块或胶条置于 10 ng/uL 测序级别的 trypsin 溶液中（溶剂为 25 mM NH_4HCO_3），37℃处理过夜。 21. 多肽提取：用 5%三氟乙酸抽提酶解液，再用 2.5%三氟乙酸-50%ACN 混合液抽提酶解液，上清真空干燥，沉淀物（多肽）最后溶于 0.5%三氟乙酸中。 22. MS 分析：参考相关 MS 仪器使用手册。
关联产品	核酸银染试剂盒