

EzWay™ Protein-Silver Staining Kit, Ver. 2.0

1. 제품 번호 K14040D
2. 용량 Tests for 20 mini-gels
3. 보관 및 안정성 실온 보관
4. 설명 EzWay™ Protein-Silver Staining Kit 는 단백질 밴드 위에 은이온이 화학적으로 환원되어 금속으로 침착되는 것을 기반으로 합니다. 이 Kit 는 polyacrylamide gel 내에 존재하는 단백질을 염색하는 신속하고 쉬운 방법을 제공합니다. Silver staining 은 대부분의 단백질을 검출하며 Coomassie G-250 염색 대비 30 배 이상의 민감도를 나타냅니다. 또한, 이 Kit 는 특별히 MASS spectrometry analysis 에 적합한 민감도를 제공하도록 설계되었습니다.

silver staining 실험방법의 요약:

Step 1: 고정	방해하는 이온과 세제성분을 Gel 에서 제거하고 단백질이 gel 조직 밖으로 이동하는 것을 제한합니다.
Step 2: 증폭	증폭 용액은 염색의 민감도 및 대비를 증가시킵니다.
Step 3: 세척	민감화 용액을 제거하고 그 이후의 염색을 위해 초순수를 사용하여 gel 을 다시 물로 치환시킵니다.
Step 4: 염색	염색 용액을 이용하여 은 이온을 단백질에 결합시켜 잠재된 단백질 band 를 형성합니다.
Step 5: 세척	초순수를 이용하여 염색 용액을 제거합니다.
Step 6: 발색	은이온이 금속으로 환원되어 단백질 밴드에 침착되어 확인 가능하도록 드러냅니다.
Step 7: 반응정지	추가적인 잉여 은이온과 결합하여 추가적인 환원을 막습니다.

5. 특징
 - 민감도: 0.3 ng BSA
 - Background 는 옅은 노란색을 띠고 검은 점이 나타나지 않습니다.
 - 염색은 균일하게 되고 시약에서 오염된 band 는 없습니다.

6. Kit 구성품

구성품	용량
Sensitizer	50 ml
Sensitizer F	7 ml
Stainer A	5 ml
Stainer B	5 ml
Developer A	50 ml
Developer B	5 ml

7. 기본염색법

A. 완충용액 준비

사용자 준비물:

- 초순수
- 100 % ethanol
- 100 % Acetic acid

Buffer preparations:

1. 고정 용액: 10 ml 의 acetic acid 를 40 ml 의 Ethanol 에 넣고 초순수를 더하여 100 ml 용량을 만듭니다. 1 L 용량의 보관 용액을 만드는 것을 권장합니다.
2. 2 차 고정 용액: 50 ml of Ethanol 에 초순수를 더하여 100 ml 용량을 만듭니다. 1 L 용량의 보관 용액을 만드는 것을 권장합니다.
3. 증폭 용액: 0.338 ml 의 Sensitizer F 를 2.5 ml 의 Sensitizer 에 넣고 초순수를 더하여 25 ml 용량을 만듭니다.
4. 염색 용액 0.25 ml 의 Stainer A 를 0.25 ml 의 Stainer B 에 넣고 초순수를 더하여 25 ml 용량을 만듭니다.
5. 발색 용액: 2.5 ml 의 Developer A 를 0.25 ml 의 Developer B 에 넣고 초순수를 더하여 25 ml 용량을 만듭니다.

참고: 실험 시작 전에 용액들을 준비하거나 실험을 진행하면서 다음 단계용 용액을 준비합니다.

B. Silver Staining 과정

1. 전기영동 후 cassette 에서 gel 을 꺼내어 적당한 크기의 깨끗한 염색용기에 넣습니다. 짧게 초순수로 3-4 회 헹궈줍니다.
2. 1 mm 두께 gel 을 기준으로 50 ml 의 고정 용액으로 15 분씩 2 회 orbital shaker 로 부드럽게 흔들어 주면서 gel 을 고정합니다.
주의: 염색시간이 충분하지 않으면 gel 을 고정상태에서 하룻밤 보관해도 됩니다. 긴 고정시간은 민감도를 증가시키고 background 를 줄일 수 있습니다.
3. 고정 용액을 제거하고 2 차 고정 용액을 5 분간 2 회 처리하여 gel 을 씻어 냅니다.
4. 2 차 고정 용액을 버리고 25 ml of 의 증폭 용액에 gel 을 넣고 2 분간 처리합니다.
5. 증폭 용액을 버리고 50 ml 의 2 차 고정 용액으로 gel 을 넣고 2 분간 처리합니다.
6. 100 ml 의 초순수로 1 분간 3 차례 씻어 냅니다.
7. 초순수를 버리고 준비해 둔 25 ml 의 염색 용액을 넣은 후 20 분간 처리합니다.
8. 염색 용액을 버리고 100 ml 초순수로 1 분간 2 회 세척합니다.
9. 초순수를 버리고 준비해 둔 25 ml 의 발색 용액을 넣은 후 1-10 분간 원하는 진하기의 단백질 band 가 발색 되도록 처리합니다.
 - i. 주의: 과발색은 진한 노랑색 background 의 원인이 됩니다.
10. 적절히 원하는 진하기 까지 단백질 band 가 발색되면, 즉시 0.5 ml 의 100% acetic acid 를 첨가하여 반응을 멈춥니다. 10 분간 gel 을 부드럽게 흔들어 줍니다.
11. 발색 용액을 버리고 100 ml 의 초순수에 30 분간 세척합니다.

주의: 염색에 문제가 있거나 약간의 background 를 얻었다면 8. 문제해결지침 부분을 참고 하세요.

8. 문제해결지침

문제점	원인	해결방법
진하거나 비정상적인 background	초순수 품질 불량	18 MΩ/cm 저항 이상의 초순수를 사용합니다.
	염색용기가 더럽거나 이전 실험에 사용한 염색용액이 잔류	silver staining 전용용기를 사용하고 실험 후엔 용기를 비누와 물로 씻어내고 초순수로 헹궈 냅니다.
	충분하지 않은 세척	세척단계를 빼거나 줄이지 마십시오. 필요하다면 처리시간을 늘리거나 물의 양을 늘리십시오.
	Gel 이 구부러지거나 찢어짐.	전기영동 후에 찢어지지 않도록 조심스레 gel 을 분리하고 실험 과정 중에 gel 을 옮길 때 주의 하세요.
	Gel 이 염색용액에 충분히 잠기지 않음	Gel 을 완전히 염색 용액에 잠기게 한 후 모든 과정에 orbital shaker 를 사용합니다.
Band 발색 불량과 낮은 민감도	Gel 로부터 은이온의 소실	염색 후 세척시간은 1 분을 넘기지 않습니다.
	염색 용액과 발색 용액이 적절치 않음	용액 제작 시 정상적인 초순수가 사용되었는지 확인합니다.
	Gel 에 처리된 단백질의 양이 작음	Gel 에 처리한 단백질 양을 늘립니다. 최소 1ng 의 단백질을 well 에 처리합니다.
	증폭 단계에서 처리 시간이 짧음	증폭 용액 처리 시간을 늘립니다.
너무 진하게 염색된 gel	적절한 발색 시간에 acetic acid 를 처리 하지 않음	원하는 단백질 밴드 진하기에 이르기 전에 acetic acid 를 첨가하세요.
	Gel 에 처리한 단백질이 과량임	Gel 에 처리한 단백질 양을 줄입니다.
큰 검은 점과 손가락 자국	부적절한 gel 관리	gel 은 항상 장갑을 끼고 처리합니다. gel 이동 중에 압력을 주지 않습니다.
50-68 kDa band 가 gel 을 가로 지름	Keratin 오염	전기영동과 염색과정 모두 장갑을 착용하고 진행 합니다. 전기영동 전 gel 의 모든 well 을 초순수로 헹궈줍니다.
긴 발색시간에 따른 진한 background	Gel 에 처리된 단백질의 양이 작음	Gel 에 처리한 단백질 양을 늘립니다. 최소 1ng 의 단백질을 well 에 처리합니다.
	특정 단백질은 고정시간이 길게 필요함	고정시간을 2 시간이나 하룻밤으로 늘립니다.
역상으로 염색	Gel 에 처리한 단백질이 과량임	Gel 에 처리한 단백질 양을 줄입니다.