

Gebrauchsanweisung



ROTI® Black P

Silberfärbungskit für Proteine

Proteinfärbung in foliengestützten und freien PAA-Gelen für Gelvolumina bis 10 ml (bis 40 ml)

I Technische Hinweise

I.1 Allgemeine Tipps zur Silberfärbung

Achten Sie bitte auf die Sauberkeit der verwendeten Glasplatten, Glasgefäße und Schalen.

Tragen Sie bitte Handschuhe.


Verwenden Sie bitte doppelt destilliertes, deionisiertes Wasser (H₂O_{dd}).

Halten Sie für reproduzierbare Ergebnisse die vorgeschlagenen Zeiten bitte möglichst genau ein. Beachten Sie bitte, dass die Temperatur der verwendeten Lösungen bei ca. 20 °C liegt.

I.2 Inhalt für 10 Silberfärbungen


- 10 x Natriumthiosulfat (L534) in Reaktionsgefäßen mit der Bezeichnung: **A**

- 10 x Silbernitrat (L535) in Reaktionsgefäßen mit der Bezeichnung: **B**


 Gefahr H272-H290-H314-H410
P273-P280-P303+P361+P353-P305+P351+P338-P310

- 10 x leeres Reaktionsgefäß (L536) mit der Bezeichnung: **C**

- 2 x (3 x) Formaldehyd (L537) in Reaktionsgefäßen mit der Bezeichnung: **D**

 Gefahr H301+H311+H331-H314-H317-H335-H341-H350-H370
P260-P280-P303+P361+P353-P304+P340-P305+P351+P338-P308-P311

- Natriumcarbonat **E** (L538)

 Achtung H319
P305+P351+P338-P337+P313

(Wir empfehlen zur Aufbewahrung das Autoklavieren der frisch angesetzten Lösung.)

Die Einzelbestandteile dieses Kits können nicht separat nachgekauft werden.

I.3 Zusätzlich zum Kit benötigte Chemikalien

- H₂O_{dd}, Best.-Nr. 3478.1
- Essigsäure 100 % p.a., Best.-Nr. 3738.1
- Glycerin 99,5 %, Best.-Nr. 3783.1

- Alkohol:

bei freien Gelen:

Ethanol p.a., Best.-Nr. 9065.1
oder Methanol p.a., Best.-Nr. 4627.1
oder als günstige Alternativen:

Ethanol vergällt, Best.-Nr. K928.1
ROTISOL®, Best.-Nr. 7917.1

bei foliengestützten Gelen:

Methanol p.a., Best.-Nr. 4627.1

II Arbeitsanleitung

Für Gelvolumina bis 10 ml, z.B. 10 cm x 10 cm x 1 mm (40 ml, z.B. 20 cm x 20 cm x 1 mm)

Führen Sie die Färbungsschritte unter sanftem Schütteln durch. Für optimale Ergebnisse empfehlen wir unsere ROTILABO®-Färbekammern (Best.-Nr. H591.1). Das folgende Rezept ist sowohl für foliengestützte als auch für freie Gele geeignet. Die Lösungen in den Schritten 1, 3, 10, 11 beinhalten 20 % Methanol (V/V). Falls Sie mit freien Gelen arbeiten, können Sie das Methanol durch 15 % Ethanol (V/V) ersetzen.

II.1. Fixierung der Proteine im Gel:

nach der Elektrophorese in 100 ml Fixierlösung, Fixierzeit: ≥1 h

Falls Sie über Nacht fixieren wollen, empfehlen wir die Lagerung ohne Schütteln bei 4 °C.

Fixierlösung:

20 ml (40 ml) Methanol
+ 12 ml (24 ml) Eisessig
+ 50 µl (100 µl, Formaldehyd aus Reaktionsgefäß D auf 100 ml (200 ml) mit H₂O_{dd} auffüllen.

alternative Fixierlösung (nur für freie Gele):

15 ml (30 ml) Ethanol
+ 12 ml (24 ml) Eisessig
+ 50 µl (100 µl) Formaldehyd aus Reaktionsgefäß D auf 100 ml (200 ml) mit H₂O_{dd} auffüllen.

II.2. Vorbereitungen:

- Zentrifugieren Sie ein Reaktionsgefäß mit der Beschriftung A kurz ab. Pipettieren Sie 1 ml H₂O_{dd} dazu. Lösen Sie das Natriumthiosulfat unter Vortexen vollständig.

- Entnehmen Sie dieser Lösung 20 µl (40 µl) und pipettieren diese in das leere Reaktionsgefäß mit der Beschriftung C. Geben Sie dazu 480 µl (960 µl) H₂O_{dd} und mischen Sie gut durch.

- Zentrifugieren Sie ein Reaktionsgefäß mit der Beschriftung B kurz ab. Pipettieren Sie 1 ml H₂O_{dd} dazu und lösen Sie das Silbernitrat unter Vortexen vollständig.

- Lösen Sie das Natriumcarbonat (E) bitte in 250 ml (500 ml) H₂O_{dd}.

II.3. Waschschrirte:

3 x 10 min mit je 100 ml (200 ml) Waschlösung

Waschlösung:

60 ml (120 ml) Methanol + 240 ml (480 ml) H₂O_{dd}

alternative Waschlösung nur für freie Gele:

45 ml (90 ml) Ethanol + 255 ml (510 ml) H₂O_{dd}

Setzen Sie bitte während der Waschschrirte die Sensibilisierungslösung (s. Pkt 4) und die Imprägnierungslösung (s. Pkt 6) an.

II.4. Sensibilisierung:

1 min in 100 ml (200 ml) Sensibilisierungslösung

Sensibilisierungslösung:

Pipettieren Sie den Inhalt des Reaktionsgefäßes A in 100 ml (200 ml) H₂O_{dd} und mischen Sie gut durch.

II.5. Waschschritte:

3 x 20 s mit je 100 ml (200 ml) H₂O_{dd}

II.6. Silberimprägnierung:

40 min in der Imprägnierungslösung
Bei freien Gelen können Sie die Zeit auf 20 min verringern.

Imprägnierungslösung:

Pipettieren Sie den Inhalt des Reaktionsgefäßes B in 100 ml (200 ml) H₂O_{dd}. Pipettieren Sie dazu 75 µl (150 µl, Formaldehyd aus Reaktionsgefäß D, mischen Sie gut durch.

Setzen Sie bitte während der Imprägnierung die Entwicklungslösung (s. Pkt 8) und die Stopplösung (s. Pkt 10) an.

II.7. Waschschritte:

2 x 20 s mit je 100 ml (200 ml) H₂O_{dd}

II.8. Entwicklung:

Inkubieren Sie das Gel in der Entwicklungslösung, bis die Proteinbanden gefärbt sind. Verwerfen Sie dann die Entwicklungslösung und gehen bitte zügig zu Schritt 9.

Entwicklungslösung:

Mischen Sie diese Lösung bitte unter permanentem Rühren.

20 ml (40 ml) Natriumcarbonat-Lösung (E)
+ 60 ml (120 ml) H₂O_{dd}, gut durchmischen.
+ Inhalt des Reaktionsgefäßes C
+ 75 µl (150 µl) Formaldehyd aus Reaktionsgefäß D
auf 100 ml (200 ml) mit H₂O_{dd} auffüllen.

II.9. Waschschritte:

2 x 20 s mit je 100 ml (200 ml) H₂O_{dd}

II.10. Stoppen:

2 x 30 s in je 100 ml (200 ml) Stopplösung P.
Inkubieren Sie das Gel anschließend für weitere 10 min in dieser Lösung.

Stopplösung P:

60 ml (120 ml) Methanol
+ 36 ml (72 ml) Eisessig
auf 300 ml (600 ml) mit H₂O_{dd} auffüllen.

Alternative Stopplösung nur für freie Gele:

45 ml (90 ml) Ethanol
+ 36 ml (72 ml) Eisessig
auf 300 ml (600 ml) mit H₂O_{dd} auffüllen.

II.11. Lagerung:

Inkubieren Sie das Gel für ≥ 20 min in 100 ml (200 ml) Waschlösung (siehe II.3). Über einen längeren Zeitraum lagern Sie das Gel am besten bei 4 °C.

II.12. Trocknung:

Inkubieren Sie das Gel für ≥ 30 min in der Trocknerlösung. Anschließend können Sie das Gel zwischen zwei Cellophanfolien trocknen. Wir empfehlen dazu unsere Geltrocknungsrahmen (Best.-Nr. K420.1, K421.1).

Trocknerlösung:

10 ml (20 ml) Glycerin
+ 15 ml (30 ml) EtOH
auf 100 ml (200 ml) mit H₂O_{dd} auffüllen.

III Literaturhinweis

Der ROTI®Black-Silberfärbungskit basiert auf einer Veröffentlichung von Blum et al., *Electrophoresis* 1987, 8: 93-99.

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe
Postfach 100121 • 76231 Karlsruhe
Telefon: +49 (0) 721/ 5606-0
Fax: +49 (0) 721/ 5606-149
info@carlroth.de • www.carlroth.de

ip 07/2021

Die Firma ist eine Kommanditgesellschaft mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRA 100055. Persönlich haftende Gesellschafterin ist die Roth Chemie GmbH mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRB 100428.
Geschäftsführer: André Houdelet

ROTI®Black P	bis 10 ml Volumen	L533.1
	bis 40 ml Volumen	L533.2

Instructions for use



ROTI® Black P

Silver staining kit for proteins

Staining of proteins in film supported and conventional PAA-gels with a maximum gel volume of 10 ml (40 ml)

I Technical Information

I.1 General information about silver staining

Please use only clean glass plates, vessels and bowls.
Please wear gloves.

Use double distilled, deionized water (H₂O_{dd}).

For reproducible results, please carry out the procedure as indicated in the protocol.

Please ensure that the temperature of the required solutions is approximately 20 °C.

I.2 Kit components sufficient to stain 10 gels

- 10 x sodium thiosulphate (L534) in test tubes, labelled: **A**

- 10 x silver nitrate (L535) in test tubes, labelled: **B**

Danger H272-H290-H314-H410
P273-P280-P303+P361+P353-P305+P351+P338-P310

- 10 x empty test tubes (L536), labelled: **C**

- 2 x (3 x) formaldehyde (L537) in test tubes, labelled: **D**

Danger H301+H311+H331-H314-H317-H335-H341-H350-H370
P260-P280-P303+P361+P353-P304+P340-P305+P351+P338-P308-P311

- Sodium carbonate **E** (L538)

Warning H319
P305+P351+P338-P337+P313

(For long-time storage we recommend autoclaving of the freshly prepared sodium carbonate solution.)

Contents of this Kit may not be bought separately.

I.3 Further chemicals required

- H₂O_{dd}, ref. 3478.1
- Acetic acid 100 % p.a., ref. 3738.1
- Glycerol 99.5 %, ref. 3783.1
- Alcohol:

For conventional gels

Ethanol p.a., ref. 9065.1
or methanol p.a., ref. 4627.1

Or as a cheaper alternative:

Denatured ethanol, ref. K928.1
or ROTISOL®, ref. 7917.1

For film supported gels

methanol p.a., ref. 4627.1

II Instructions for use

For a maximum gel volume of 10 ml, e.g. 10 cm x 10 cm x 1 mm, (40 ml, e.g. 20 cm x 20 cm x 1 mm)

Please carry out the various staining steps under gentle shaking. For best results, we recommend using our ROTILABO®-staining chambers (ref. H591.1).

The following procedure is appropriate for both, film supported and conventional gels.

Basically, the solutions described here use 20 % methanol (v/v) as ingredient. However, if working with conventional gels, you may alternatively use 15 % ethanol (v/v) instead of methanol.

II.1 Fixation of proteins:

Following electrophoresis in 100 ml (200 ml) fixative for ≥1h. Should fixation take place overnight, we recommend incubation at 4 °C without shaking.

Fixative:

20 ml (40 ml) methanol
+ 12 ml (24 ml) acetic acid
+ 50 µl (100 µl) formaldehyde from test tube D
Adjust the volume to 100 ml (200 ml) with H₂O_{dd}.

Alternative Fixative (conventional gels only):

15 ml (30 ml) ethanol
+ 12 ml (24 ml) acetic acid
+ 50 µl (100 µl) formaldehyde from test tube D
Adjust the volume to 100 ml (200 ml) with H₂O_{dd}.

II.2 Preparation:

- Briefly centrifuge test tube A. Pipette 1 ml H₂O_{dd} to it. Vortex and dissolve the sodium thiosulphate completely.
- Remove 20 µl (40 µl) from this solution and pipette into the empty test tube C. Add 480 µl (960 µl) H₂O_{dd} and mix well.
- Briefly centrifuge test tube B. Pipette 1 ml H₂O_{dd} to it. Vortex and dissolve the silver nitrate completely.
- Dissolve the sodium carbonate (E) in 250 ml (500 ml) H₂O_{dd}.

II.3 Washing:

3 x 10 min in 100 ml (200 ml) washing solution.

Washing solution:

60 ml (120 ml) methanol + 240 ml (480 ml) H₂O_{dd}

Alternative Washing solution (conventional gels only):

45 ml (90 ml) ethanol + 255 ml (510 ml) H₂O_{dd}

Prepare the sensitizing solution (see step 4) and the impregnation solution (see step 6) during the washing steps.

II.4 Sensitizing:

1 min in 100 ml (200 ml) sensitising solution.

Sensitizing solution:

Pipette the contents of test tube A to 100 ml (200 ml) H₂O_{dd} and mix thoroughly.

II.5 Washing:

3 x 20 s in 100 ml (200 ml) H₂O_{dd}

II.6 Silver impregnation:

40 min in the impregnation solution.
For conventional gels one may reduce incubation time to 20 min.

Impregnation solution:

Pipette the contents of test tube B to 100 ml (200 ml) H₂O_{dd}
Add 75 µl (150 µl) formaldehyde from test tube D and mix thoroughly.

Prepare the developing solution (see step 8) and the stopping solution (see step 10) during silver impregnation.

II.7 Washing:

2 x 20 s in 100 ml (200 ml) H₂O_{dd}

II.8 Developing:

Incubate the gel in the developing solution until the protein bands are stained. Discard the developing solution and immediately move on to step 9.

Developing solution:

Mix solution under constant stirring.
20 ml (40 ml) sodium carbonate solution (E)
+ 60 ml (120 ml) H₂O_{dd}, mix thoroughly.
+ contents of test tube C
+ 75 µl (150 µl) formaldehyde from test tube D
Adjust the volume to 100 ml (200 ml) with H₂O_{dd}.

2 x 20 s in 100 ml (200 ml) H₂O_{dd}

II.10 Stopping:

2 x 30 s in 100 ml (200 ml) stop solution P.
Subsequently incubate the gel for a further 10 min in this solution.

Stop solution P:

60 ml (120 ml) methanol
+ 36 ml (72 ml) acetic acid
Adjust the volume to 300 ml (600 ml) with H₂O_{dd}.

Alternative Stop solution (conventional gels only):

45 ml (90 ml) ethanol
+ 36 ml (72 ml) acetic acid
Adjust the volume to 300 ml (600 ml) with H₂O_{dd}.

II.11 Washing/Storage:

Incubate the gel for ≥ 20 min in 100 ml (200 ml) washing solution (see II.3). For a longer storage, store at 4 °C.

II.12 Drying:

Incubate the gel for ≥ 30 min in the drying solution. The gel can then be dried between two sheets of cellophane film. We recommend using our drying frame (ref. K420.1, K421.1).

Drying solution:

10 ml (20 ml) glycerol
+ 15 ml (30 ml) ethanol
Adjust the volume to 100 ml (200 ml) with H₂O_{dd}.

III Reference

The ROTI®Black Silver Staining Kit is based on a publication by Blum et al., *Electrophoresis* 1987, 8: 93-99.

ROTI®Black P	10 ml Volume	L533.1
	40 ml Volume	L533.2

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe
P.O. Box 100121 • 76231 Karlsruhe
Phone: +49 (0) 721/ 5606-0
Fax: +49 (0) 721/ 5606-149
info@carlroth.com • www.carlroth.com ip 07/2021

The company is a limited partnership with headquarters in Karlsruhe, reg. court Mannheim HRA 100055. Roth Chemie GmbH, with headquarters in Karlsruhe, reg. court Mannheim HRB 100428, is the personally liable partner. Managing Director: André Houdelet. Sales tax identification number: DE 143621073.

KURZÜBERSICHT

ROTI®Black P - für die Silberfärbung von Proteinen in freien und foliengestützten PAA-Gelen L533.1/2

Für Gelvolumina bis 10 ml, z.B. 10 cm x 10 cm x 1 mm (40 ml, z.B. 20 cm x 20 cm x 1 mm)

Ausführliche Anleitung siehe **II der Gebrauchsanweisung**

Die 20 % Methanol der Lösungen können bei freien Gelen durch 15 % Ethanol ersetzt werden.



1. Fixierung	≥ 60 min in 100 ml (200 ml) Fixierlösung <u>Fixierlösung:</u> 20 ml (40 ml) Methanol + 12 ml (24 ml) Eisessig + 50 µl (100 µl) Formaldehyd aus Reaktionsgefäß D auf 100 ml (200 ml) mit H ₂ O _{dd} auffüllen	≥ 60 min
2. Vorbereitung (während 1.)	I. 1 ml H ₂ O _{dd} zu Reaktionsgefäß A, vortexen II. 20 µl (40 µl) von A in Reakt.gefäß C + 480 µl (960 µl) H ₂ O _{dd} III. 1 ml H ₂ O _{dd} zu Reaktionsgefäß B, vortexen IV. Natriumcarbonat (E) in 250 ml (500 ml) H ₂ O _{dd} lösen <u>Waschlösung ansetzen:</u> 60 ml (120 ml) Methanol + 240 ml (480 ml) H ₂ O _{dd}	-
3. Waschschritte während 3.	3 x 10 min mit je 100 ml (200 ml) Waschlösung <u>Sensibilisierungslösung ansetzen:</u> Inhalt des Reaktionsgefäßes A in 100 ml (200 ml) H ₂ O _{dd} verdünnen <u>Imprägnierungslösung ansetzen:</u> Inhalt des Reaktionsgefäßes B in 100 ml (200 ml) H ₂ O _{dd} verdünnen + 75 µl (150 µl) Formaldehyd aus Reakt.gefäß D, mischen	30 min
4. Sensibilisierung	1 min in 100 ml (200 ml) Sensibilisierungslösung	1 min
5. Waschschritte	3 x 20 sec mit je 100 ml (200 ml) H ₂ O _{dd}	1 min
6. Silber- imprägnierung während 6.	40 min in 100 ml (200 ml) Imprägnierungslösung (kann bei freien Gelen auf 20 min verringert werden) <u>Entwicklungslösung ansetzen:</u> 20 ml (40 ml) Natriumcarbonat-Lösung (E) + 60 ml (120 ml) H ₂ O _{dd} , gut durchmischen + Inhalt des Reaktionsgefäßes C + 75 µl (150 µl) Formaldehyd aus dem Reaktionsgefäß D auf 100 ml (200 ml) mit H ₂ O _{dd} auffüllen <u>Stopplösung P ansetzen:</u> 60 ml (120 ml) Methanol + 36 ml (72 ml) Eisessig auf 300 ml (600 ml) mit H ₂ O _{dd} auffüllen	40 min
7. Waschschritt	2 x 20 s in je 100 ml (200 ml) H ₂ O _{dd}	40 s
8. Entwicklung	Inkubieren in Entwicklungslösung bis die Protein-Banden gefärbt sind.	ca. 2-5 min
9. Waschschritt	2 x 20 s in je 100 ml (200 ml) H ₂ O _{dd}	40 s
10. Stoppen	2 x 30 s in je 100 ml (200 ml) Stopplösung P spülen, dann ≥ 10 min in 100 ml (200 ml) Stopplösung P inkubieren	40 s 10 min
Lagerung / Trocknung	Lagerung in Waschlösung (siehe 3.) Zur Trocknung ≥ 30 min in 100 ml (200 ml) Trocknerlösung inkubieren. Anschließend können Sie das Gel zwischen zwei Cellophanfolien trocknen. <u>Trocknungslösung:</u> 10 ml (20 ml) Glycerin + 15 ml (30 ml) Ethanol auf 100 ml (200 ml) mit H ₂ O _{dd} auffüllen	≥ 30 min

Für Schritt 1-10 benötigen Sie ca. 140 min.

SUMMARY

ROTI®Black NSeq – for silver staining of proteins in conventional and film supported PAA gels L533.1/2

For gel volumes up to 10 ml, e.g. 10 cm x 10 cm x 1 mm (40 ml, e.g. 20 cm x 20 cm x 1 mm)

See **II** for detailed instructions.

Methanol (20 %) may be replaced with 15 % Ethanol when staining conventional gels.



1. Fixiation	≥ 60 min in 100 ml (200 ml) fixative <u>Fixative:</u> 20 ml (40 ml) methanol + 12 ml (24 ml) acetic acid + 50 µl (100 µl) formaldehyd from tube D adjust the volume to 100 ml (200 ml) with H ₂ O _{dd}	≥ 60 min
2. Preparation (during 1.)	V. 1 ml H ₂ O _{dd} to tube A, vortex VI. 20 µl (40 µl) von A to tube C + 480 µl (960 µl) H ₂ O _{dd} VII. 1 ml H ₂ O _{dd} to tube B, vortex VIII. Dilute sodium carbonate (E) in 250 ml (500 ml) H ₂ O _{dd} <u>Prepare Washing solution:</u> 60 ml (120 ml) methanol + 240 ml (480 ml) H ₂ O _{dd}	-
3. Washing during 3.	3 x 10 min in 100 ml (200 ml) washing solution, each <u>Prepare Sensitizing solution:</u> Dilute content of tube A in 100 ml (200 ml) H ₂ O _{dd} <u>Prepare Impregnation solution:</u> Dilute contents of tube B in 100 ml (200 ml) H ₂ O _{dd} Add 75 µl (150 µl) formaldehyde from tube D, mix	30 min
4. Sensitizing	1 min in 100 ml (200 ml) sensitizing solution	1 min
5. Washing	3 x 20 sec in 100 ml (200 ml) H ₂ O _{dd} , each	1 min
6. Silver impregnation during 6.	40 min in 100 ml (200 ml) impregnation solution (may be reduced to 20 min for conventional gels) <u>Prepare Developing solution:</u> 20 ml (40 ml) sodium carbonate solution (E) + 60 ml (120 ml) H ₂ O _{dd} , mix thoroughly + Content of tube C + 75 µl (150 µl) formaldehyde from tube D adjust the volume to 100 ml (200 ml) with H ₂ O _{dd} <u>Prepare Stop solution P:</u> 60 ml (120 ml) methanol + 36 ml (72 ml) acetic acid adjust the volume to 300 ml (600 ml) with H ₂ O _{dd}	40 min
7. Washing	2 x 20 s in 100 ml (200 ml) H ₂ O _{dd} , each	40 s
8. Developping	Incubation in developing solution until protein bands are visible.	ca. 2-5 min
9. Washing	2 x 20 s in 100 ml (200 ml) H ₂ O _{dd} , each	40 s
10. Stop	Rinse 2 x 30 s in 100 ml (200 ml) stopping solution P, each then incubate ≥ 10 min in 100 ml (200 ml) stop solution P	40 s 10 min
Storage / Drying	Store in washing solution (see 3.) For drying, incubate ≥ 30 min in 100 ml (200 ml) drying solution. The gel can then be dried between two sheets of cellophane foil. <u>Prepare Drying solution:</u> 10 ml (20 ml) glycerol + 15 ml (30 ml) ethanol adjust the volume to 100 ml (200 ml) with H ₂ O _{dd}	≥ 30 min

Approximately 140 minutes are required for steps 1 – 10.