

核酸、蛋白质杂交用相关试剂、缓冲液的配制方法

20 × SSC

- 组份浓度 3.0 M NaCl, 0.3 M 柠檬酸钠
- 配制量 1 L
- 配制方法
 1. 称量下列试剂, 置于 1 L 烧杯中。

NaCl	175.3 g
柠檬酸钠 · 2H ₂ O	88.2 g
 2. 向烧杯中加入约 800 ml 的去离子水, 充分搅拌溶解。
 3. 滴加 14 N HCl, 调节 pH 值至 7.0 后, 加去离子水将溶液定容至 1 L。
 4. 高温高压灭菌后, 室温保存。

20 × SSPE Buffer

- 组份浓度 3.0 M NaCl, 0.2 M NaH₂PO₄, 0.02 M EDTA
- 配制量 1 L
- 配制方法
 1. 称量下列试剂, 置于 1 L 烧杯中。

NaCl	175.3 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	27.6 g
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	7.4 g
 2. 向烧杯中加入约 800 ml 的去离子水, 充分搅拌溶解。
 3. 加 NaOH 调节 pH 值至 7.4 (约 6.5 ml 的 10 N NaOH)。
 4. 加去离子水将溶液定容至 1 L。
 5. 高温高压灭菌后, 室温保存。

50 × Denhardt' s 溶液

- 组份浓度

1% (W/V)	Ficoll 400
1% (W/V)	Polyvinylpyrrolidone
1% (W/V)	BSA
- 配制量 500 ml
- 配制方法
 1. 称量下列试剂, 置于 500 ml 烧杯中。

Ficoll 400	5 g
Polyvinylpyrrolidone	5 g
BSA	5 g
 2. 加去离子水约 400 ml, 充分搅拌溶解。
 3. 加去离子水将溶液定容至 500 ml。
 4. 用 0.45 μm 滤器过滤后, 分装成每份 25 ml。
 5. -20°C 保存。

0.5 M 磷酸盐 Buffer

- 组份浓度 0.5 M Na₂HPO₄
- 配制量 1 L
- 配制方法
 1. 称量 134 g Na₂HPO₄ · 7H₂O 置于 1 L 烧杯中。
 2. 加入约 800 ml 的去离子水充分搅拌溶解。
 3. 加入 85% 的 H₃PO₄ (浓磷酸) 调节溶液 pH 值至 7.2。
 4. 加去离子水定容至 1 L。
 5. 高温高压灭菌后, 室温保存。

Salmon DNA

(鲑鱼精 DNA)

- 组份浓度 10 mg/ml Salmon DNA
- 配制量 约 100 ml
- 配制方法
 1. 称取鲑鱼精 DNA 2 g 置于 500 ml 烧杯中, 加入约 200 ml 的 TE Buffer。
 2. 用磁力搅拌器室温搅拌 2~4 小时, 溶解后加入 4 ml 的 5 M NaCl, 使其终浓度为 0.1 M。
 3. 用苯酚和苯酚/氯仿各抽提 1 次。
 4. 回收水相溶液后, 使用 17 号皮下注射针头快速吸打溶液约 20 次, 以切断 DNA。
 5. 加入 2 倍体积的预冷乙醇进行乙醇沉淀。
 6. 离心回收 DNA 后, 溶解于 100 ml 的去离子水中, 测定溶液的 OD₂₆₀ 值。
 7. 计算溶液的 DNA 浓度后, 稀释 DNA 溶液至 10 mg/ml。
 8. 煮沸 10 分钟后, 分装成小份 (1 ml/份)。-20°C 保存。
 9. 使用前在沸水浴中加热 5 分钟后, 迅速冰浴冷却。

DNA 变性缓冲液

- 组份浓度 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH
- 配制量 1 L
- 配制方法
 1. 称量下列试剂, 置于 1 L 烧杯中。

NaCl	87.7 g
NaOH	20 g
 2. 向烧杯中加入约 800 ml 的去离子水, 充分搅拌溶解。
 3. 加去离子水将溶液定容至 1 L 后, 室温保存。

预杂交液/杂交液

(DNA 杂交用)

■ 组份浓度	6×	SSC (或 SSPE)
	5×	Denhardt' s
	0.5% (W/V)	SDS
	100 μg/ml	Salmon DNA

■ 配制量 100 ml

- 配制方法 1. 称量下列试剂, 置于 200 ml 烧杯中。
- | | |
|---------------------|-------|
| 20×SSC (或 SSPE) | 30 ml |
| 50×Denhardt' s | 10 ml |
| 10% SDS | 5 ml |
| 10 mg/ml Salmon DNA | 1 ml |
| dH ₂ O | 54 ml |
2. 充分混匀后, 使用 0.45 μm 滤器滤去杂质后使用。

预杂交液/杂交液

(RNA 杂交用)

■ 组份浓度	6×	SSC (或 SSPE)
	5×	Denhardt' s
	0.5% (W/V)	SDS
	100 μg/ml	Salmon DNA
	50% (V/V)	Formamide

■ 配制量 100 ml

- 配制方法 1. 称量下列试剂, 置于 200 ml 烧杯中。
- | | |
|---------------------|-------|
| 20×SSC (或 SSPE) | 30 ml |
| 50×Denhardt' s | 10 ml |
| 10% SDS | 5 ml |
| 10 mg/ml Salmon DNA | 1 ml |
| Formamide | 50 ml |
| dH ₂ O | 4 ml |
2. 充分混匀后, 使用 0.45 μm 滤器滤去杂质后使用。

膜转移缓冲液
(Western 杂交用)

- 组份浓度 39 mM Glycine, 48 mM Tris, 0.037% (W/V) SDS, 20% (V/V) 甲醇
- 配制量 1 L
- 配制方法
 1. 称量下列试剂, 置于 1 L 烧杯中。

Glycine	2.9 g
Tris	5.8 g
SDS	0.37 g
 2. 向烧杯中加入约 600 ml 的去离子水, 充分搅拌溶解。
 3. 加去离子水将溶液定容至 800 ml 后, 加入 200 ml 的甲醇。
 4. 室温保存。

TBST Buffer
(Western 杂交膜清洗液)

- 组份浓度 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% (V/V) Tween 20
- 配制量 1 L
- 配制方法
 1. 称量下列试剂, 置于 1 L 烧杯中。

NaCl	8.8 g
1 M Tris-HCl (pH8.0)	20 ml
 2. 向烧杯中加入约 800 ml 的去离子水, 充分搅拌溶解。
 3. 加入 0.5 ml Tween 20 后充分混匀。
 4. 加去离子水将溶液定容至 1 L 后, 4°C 保存。

封闭缓冲液
(Western 杂交用)

- 组份浓度 5% (W/V) 脱脂奶粉/TBST Buffer
- 配制量 100 ml
- 配制方法
 1. 称量 5 g 脱脂奶粉加入到 100 ml 的 TBST Buffer 中, 充分搅拌溶解。
 2. 4°C 保存待用 (本封闭液应该现配现用)。