

实验室常用试剂、缓冲液的配制方法

1 M Tris-HCl (pH7.4, 7.6, 8.0)

- 组份浓度 1 M Tris-HCl
- 配制量 1 L
- 配制方法
1. 称量121.1 g Tris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. 按下表量加入浓盐酸调节所需要的pH值。

| pH值 | 浓HCl |
|-----|--------|
| 7.4 | 约70 ml |
| 7.6 | 约60 ml |
| 8.0 | 约42 ml |

4. 将溶液定容至1 L。
 5. 高温高压灭菌后，室温保存。
- 注意：应使溶液冷却至室温后再调定pH值，因为Tris溶液的pH值随温度的变化差异很大，温度每升高1℃，溶液的pH值大约降低0.03个单位。

1.5 M Tris-HCl (pH8.8)

- 组份浓度 1.5 M Tris-HCl
- 配制量 1 L
- 配制方法
1. 称量181.7 g Tris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. 用浓盐酸调节pH值至8.8。
 4. 将溶液定容至1 L。
 5. 高温高压灭菌后，室温保存。

注意：应使溶液冷却至室温后再调定pH值，因为Tris溶液的pH值随温度的变化差异很大，温度每升高1℃，溶液的pH值大约降低0.03个单位。

10×TE Buffer (pH7.4, 7.6, 8.0)

- 组份浓度 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA
- 配制量 1 L
- 配制方法
1. 量取下列溶液，置于1 L烧杯中。

| | |
|---------------------------------------|--------|
| 1 M Tris-HCl Buffer (pH7.4, 7.6, 8.0) | 100 ml |
| 500 mM EDTA (pH8.0) | 20 ml |

2. 向烧杯中加入约800 ml的去离子水，均匀混合。
3. 将溶液定容至1 L后，高温高压灭菌。
4. 室温保存。

3 M 醋酸钠 (pH5.2)

- 组份浓度 3 M 醋酸钠
- 配制量 100 ml
- 配制方法
1. 称量40.8 g NaOAc · 3H₂O置于100~200 ml烧杯中，加入约40 ml的去离子水搅拌溶解。
 2. 加入冰醋酸调节pH值至5.2。
 3. 加去离子水将溶液定容至100 ml。
 4. 高温高压灭菌后，室温保存。

PBS Buffer

- 组份浓度 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄
- 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 g |
| KCl | 0.2 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.42 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.27 g |

2. 向烧杯中加入约800 ml的去离子水, 充分搅拌溶解。
 3. 滴加浓盐酸将pH值调节至7.4, 然后加入去离子水将溶液定容至1 L。
 4. 高温高压灭菌后, 室温保存。
- 注意: 上述PBS Buffer中无二价阳离子, 如需要, 可在配方中补充1 mM CaCl₂和0.5 mM MgCl₂。

10 M 醋酸铵

- 组份浓度 10 M 醋酸铵
 - 配制量 100 ml
 - 配制方法 1. 称量77.1 g醋酸铵置于100~200 ml烧杯中, 加入约30 ml的去离子水搅拌溶解。
 - 2. 加去离子水将溶液定容至100 ml。
 - 3. 使用0.22 μm滤器过滤除菌。
 - 4. 密封瓶口于室温保存。
- 注意: 醋酸铵受热易分解, 所以不能高温高压灭菌。

Tris-HCl平衡苯酚

- 配制方法 1. 使用原料: 大多数市售液化苯酚是清亮无色的, 无需重蒸馏便可用于分子生物学实验。但有些液化苯酚呈粉红色或黄色, 应避免使用。同时也应避免使用结晶苯酚, 结晶苯酚必须在160℃对其进行重蒸馏除去诸如醌等氧化产物, 这些氧化产物可引起磷酸二酯键的断裂或导致RNA和DNA的交联等。因此, 苯酚的质量对DNA、RNA的提取极为重要, 我们推荐使用高质量的苯酚进行分子生物学实验。
- 2. 操作注意: 苯酚腐蚀性极强, 并可引起严重灼伤, 操作时应戴手套及防护镜等。所有操作均应在通风橱中进行, 与苯酚接触过的皮肤部位应用大量水清洗, 并用肥皂和水洗涤, 忌用乙醇。
- 3. 苯酚平衡: 因为在酸性pH条件下DNA分配于有机相, 因此使用苯酚前必须对苯酚进行平衡使其pH值达到7.8以上, 苯酚平衡操作方法如下:
 - ① 液化苯酚应贮存于-20℃, 此时的苯酚呈结晶状态。从冰柜中取出的苯酚首先在室温下放置使其达到室温, 然后在68℃水浴中使苯酚充分融解。
 - ② 加入羟基喹啉 (8-Quinolol) 至终浓度0.1%。该化合物是一种还原剂, RNA酶的不完全抑制剂及金属离子的弱螯合剂, 同时因其呈黄色, 有助于方便识别有机相。
 - ③ 加入等体积的1 M Tris-HCl (pH8.0), 使用磁力搅拌器搅拌15分钟, 静置使其充分分层后, 除去上层水相。
 - ④ 重复操作步骤③。
 - ⑤ 加入等体积的0.1 M Tris-HCl (pH8.0), 使用磁力搅拌器搅拌15分钟, 静置使其充分分层后, 除去上层水相。
 - ⑥ 重复操作步骤⑤, 稍微残留部分上层水相。
 - ⑦ 使用pH试纸确认有机相的pH值大于7.8。
 - ⑧ 将苯酚置于棕色玻璃瓶中4℃避光保存。

苯酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1)

- 配制方法 1. 说明: 从核酸样品中除去蛋白质时常常使用苯酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1)。氯仿可使蛋白质变性并有助于液相与有机相的分离, 而异戊醇则有助于消除抽提过程中出现的气泡。
- 2. 配制方法: 将Tris-HCl平衡苯酚与等体积的氯仿/异戊醇 (24 : 1) 混合均匀后, 移入棕色玻璃瓶中4℃保存。

10% (W/V) SDS

- 组份浓度 10% (W/V) SDS
- 配制量 100 ml
- 配制方法 1. 称量10 g高纯度的SDS置于100~200 ml烧杯中, 加入约80 ml的去离子水, 68℃加热溶解。
- 2. 滴加浓盐酸调节pH值至7.2。
- 3. 将溶液定容至100 ml后, 室温保存。

2 N NaOH

- 组份浓度 2 N NaOH
- 配制量 100 ml
- 配制方法
 - 量取80 ml去离子水置于100~200 ml塑料烧杯中 (NaOH溶解过程中大量放热, 有可能使玻璃烧杯炸裂)。
 - 称取8 g NaOH小心地逐渐加入到烧杯中, 边加边搅拌。
 - 待NaOH完全溶解后, 用去离子水将溶液定容至100 ml。
 - 将溶液转移至塑料容器中后, 室温保存。

2.5 N HCl

- 组份浓度 2.5 N HCl
- 配制量 100 ml
- 配制方法
 - 在78.4 ml的去离子水中加入21.6 ml的浓盐酸 (11.6 N), 均匀混合。
 - 室温保存。

5 M NaCl

- 组份浓度 5 M NaCl
- 配制量 1 L
- 配制方法
 - 称取292.2 g NaCl置于1 L烧杯中, 加入约800 ml的去离子水后搅拌溶解。
 - 加去离子水将溶液定容至1 L后, 适量分成小份。
 - 高温高压灭菌后, 4°C保存。

20% (W/V) Glucose

- 组份浓度 20% (W/V) Glucose
- 配制量 100 ml
- 配制方法
 - 称取20 g Glucose置于100~200 ml烧杯中, 加入约80 ml的去离子水后, 搅拌溶解。
 - 加去离子水将溶液定容至100 ml。
 - 高温高压灭菌后, 4°C保存。

Solution I (质粒提取用)

- 组份浓度 25 mM Tris-HCl (pH8.0), 10 mM EDTA, 50 mM Glucose
- 配制量 1 L
- 配制方法
 - 量取下列溶液, 置于1 L烧杯中。

| | |
|----------------------|--------|
| 1 M Tris-HCl (pH8.0) | 25 ml |
| 0.5 M EDTA (pH8.0) | 20 ml |
| 20% Glucose (1.11 M) | 45 ml |
| dH ₂ O | 910 ml |

- 高温高压灭菌后, 4°C保存。
- 使用前每50 ml的Solution I中加入2 ml的RNase A (20 mg/ml)。

Solution II (质粒提取用)

- 组份浓度 200 mM NaOH, 1% (W/V) SDS
- 配制量 500 ml
- 配制方法
 - 量取下列溶液, 置于500 ml烧杯中。

| | |
|----------|-------|
| 10% SDS | 50 ml |
| 2 N NaOH | 50 ml |

- 加灭菌水定容至500 ml, 充分混匀。
 - 室温保存。此溶液保存时间最好不要超过一个月。
- 注意: SDS易产生气泡, 不要剧烈搅拌。

Solution III (质粒提取用)

- 组份浓度 3 M KOAc, 5 M CH₃COOH
- 配制量 500 ml
- 配制方法 1. 称量下列试剂, 置于500 ml烧杯中。

| | |
|----------------------|---------|
| KOAc | 147 g |
| CH ₃ COOH | 57.5 ml |

2. 加入300 ml去离子水后搅拌溶解。
3. 加去离子水将溶液定容至500 ml。
4. 高温高压灭菌后, 4°C 保存。

0.5 M EDTA (pH8.0)

- 组份浓度 0.5 M EDTA
- 配制量 1 L
- 配制方法
 1. 称取186.1 g Na₂EDTA · 2H₂O, 置于1 L烧杯中。
 2. 加入约800 ml的去离子水, 充分搅拌。
 3. 用NaOH调节pH值至8.0 (约20 g NaOH)。
注意: pH值至8.0时, EDTA才能完全溶解。
 4. 加去离子水将溶液定容至1 L。
 5. 适量分成小份后, 高温高压灭菌。
 6. 室温保存。

1 M DTT

- 组份浓度 1 M DTT
- 配制量 20 ml
- 配制方法
 1. 称取3.09 g DTT, 加入到50 ml塑料离心管内。
 2. 加20 ml的0.01 M NaOAc (pH5.2), 溶解后使用0.22 μm滤器过滤除菌。
 3. 适量分成小份后, -20°C 保存。

10 mM ATP

- 组份浓度 10 mM ATP
- 配制量 20 ml
- 配制方法
 1. 称取121 mg Na₂ATP · 3H₂O, 加入到50 ml塑料离心管内。
 2. 加20 ml的25 mM Tris-HCl (pH8.0), 搅拌溶解。
 3. 适量分成小份后, -20°C 保存。