

# 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

■ 配制量

■ 配制方法

3.0 M NaCl, 0.3 M 柠檬酸钠

1 L

1. 称量下列试剂, 置于 1 L 烧杯中。

NaCl	175.3 g
柠檬酸钠 · 2H <sub>2</sub> 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

■ 配制量

■ 配制方法

3.0 M NaCl, 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02 M EDTA

1 L

1. 称量下列试剂, 置于 1 L 烧杯中。

NaCl	175.3 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	27.6 g
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> 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

■ 配制量

■ 配制方法

1% (W/V)	Ficoll 400
1% (W/V)	Polyvinylpyrrolidone
1% (W/V)	BSA

500 ml

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℃保存。

---

## 0.5 M 磷酸盐 Buffer

- 组份浓度 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 配制量 1 L
- 配制方法
  1. 称量 134 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 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 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (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 OD<sub>260</sub> 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℃ 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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℃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℃保存待用 (本封闭液应该现配现用)。