

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

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 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°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)。