

质粒 DNA 的提取

一、原理

采用碱变性法提取质粒 DNA。该法是基于染色体 DNA 与质粒 DNA 的变性复性的差异而达到分离目的的。在 pH 大于 12 的碱性条件下，染色体 DNA 的氢键断裂，双螺旋结构解开变性。质粒 DNA 的大部分氢键也断裂，但超螺旋共价闭环结构的两条互补链不会完全分离，当以 pH5.2 的乙酸钠高盐缓冲液调节其 pH 至中性时，变性的质粒 DNA 又恢复到原来的构型，保存在溶液中。而染色体 DNA 不能复性而形成缠连的网状结构。通过离心，染色体 DNA 与不稳定的大分子 RNA，蛋白质-SDS 复合物等一起沉淀下来而被除去。

二、方法

1. 挑取一环在 LB 固体培养基平板上生长的含 PUC57 质粒的大肠杆菌，接在含有 100μg/ml 氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 液体培养基 (5ml/15ml 试管) 中，37℃ 震荡培养过夜。
2. 将 1.5ml 菌液加入微离心管中，14000r/min，离心 10 秒，其取上清液。反复数次，收集全部菌体。
3. 倾去上清，滤纸吸干。
4. 加 30μl TE 缓冲液 (10mmol/L Tris—HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0)，振荡起菌体。
5. 加 30μl TENS 溶液 (10mmol/L Tris—HCl, pH8.0, 1mmol/L EDTA, 0.1mol/L NaOH, 0.5% SDS)，震荡 10 秒至溶液变粘稠。
6. 加 150μl 3.0mol/L NaAC，震荡 3—5s，14000r/min，离心 3 分钟，沉淀细胞碎片及染色体 DNA。
7. 上清液转移至另一微离心管中，加等体积酚，混匀，12000r/min，离心 2 分钟。
8. 上层水相转移至另一微离心管，加 2 倍量冷水乙醇，14000r/min，离心 20 分钟。
9. 倾去乙醇，加入 70% 冷乙醇淋洗。
10. 倾去乙醇，滤纸吸干，真空抽吸 2~3 分钟。
11. 加入 50μl TE 缓冲液，溶解 DNA。
12. 加入 1μl 核糖核酸酶 (10mg / ml)，14000r/min，离心 2s，使核糖核酸酶与管底液体混匀。
13. 37℃ 水浴 30min。
14. 样品放 -20℃ 冰箱保存备用。

三、试剂

1. TE 缓冲液 (10mmol/L Tris—HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0)

配制方法：

Tris 1.211g

EDTA.Na 0.037g

用 800ml 重蒸水溶解，用分析纯盐酸调整 pH 至 8.0，加重蒸水定容至 1000ml。

2. TENS 溶液：(10mmol/L Tris—HCl, pH8.0, 1mmol/L EDTA, 0.1mol/L NaOH, 0.5% SDS)

配制方法:

NaOH 0.4 g

SDS 0.5 g

加 80ml TE 缓冲液溶解。加 TE 缓冲液定容至 100ml.

3. 3.0mol / l 醋酸钠溶液(pH5.2)

配制方法: 醋酸钠 24.6g

用 70ml 重蒸水溶解, 再用冰乙酸大约调 pH 至 5.2,加重蒸水定容至 100ml。

纯净的酚使用时不需要重蒸。市售的酚一般为红色或黄色结晶体, 使用之前必须重蒸, 除去能引起 DNA 和 RNA 断裂和聚合的杂质。将苯酚置于 65°C 水浴中溶解, 重新进行蒸馏, 当温度升至 183°C 时, 开始收集在若干个棕色瓶中。纯酚和重蒸酚都应贮存在 -20°C 使用前取一瓶重蒸酚于分液漏斗中, 加入等体积的 1mol / L Tris-HCl(pH8.0)缓冲液, 立即加盖, 激烈振荡, 并加入固体 Tris 摇匀调 pH(一般 100ml 苯酚约加 1 克固体 Tris)分层后测上层水相 pH 至 7.6 — 8.0。从分液漏斗中放出下层酚相于棕色瓶中, 并加一定体积 0.1mol / L Tris-HCl(pH8.0)覆盖在酚相上, 置 4°C 冰箱贮存备用。酚是一种强腐蚀剂, 能引起腐蚀性损伤, 操作时应戴上眼镜和手套。如果皮肤上溅上了酚, 应用大量水冲洗或用肥皂水冲洗。酚在空气极易氧化变红, 要随时加盖, 也可加入抗氧化剂 0.1%8-羟基喹啉及 0.2%β-巯基乙醇。

5. 无水乙醇

置 -20°C 冰箱中保存备用

6. 70%乙醇

置 -20°C 冰箱中保存备用

7. 核糖核酸酶(10mg / ml)

配制方法: 称取 10mg 核糖核酸酶 A(RNaseA, 美国 SIGMA 或中科院上海生物化学研究所东风试剂厂)。于灭菌的微离心管内, 加 1 ml 100mmol / pH5.0 的 NaAC 溶液(完全溶解), 即为 10mg / ml RNase, 为了破坏脱氧核糖核酸酶(DNase, 置 80°C 水浴中 10min 或 100°C 水浴 2 min, 然后置 -20°C(或家用冰箱的冰格内)保存。

四、材料

1. 菌种:

大肠杆菌(pUC57)

2. 培养基

LB 液体培养基

精解蛋白胨 3g

酵母浸出粉 1.5g

氯化钠 3 g

葡萄糖 0.6g

按上述配方用重蒸水(ddH₂O 或 dH₂O 表示, 下同)溶解至 300ml。用 10mol / L NaOH 调 pH 至 7.2~7.4。分装于 15ml 试管中, 每支 5ml。然后置高压蒸汽消毒锅以 1.1kg / cm² 灭菌 20min。

I 抗菌素:

氨苄青霉素(Amp)临用时用无菌水配制在无菌有盖试管中, 浓度为 100mg / ml。

五、仪器:

恒温振荡器。

低温冰箱-20℃

真空泵。

台式高速离心机

六、说明

1. 质粒 DNA 提取的方法很多, 有碱变性法、羟基磷灰石柱层析法、溴化乙锭-氯化铯梯度超离心法等。本次实验是一种小量快速提取法。小量快速提取法也有多种, 但基本原理和步骤是一致的。包括下述步骤: (1)裂解菌体细胞; (2)质粒和染色体 DNA 的分离; (3)除去蛋白质。RNA 及其他影响限制性酶活性的细胞成分; (4)除去提纯过程中使用的去垢剂、盐等。

2. 在基因操作实验中。保存或提取 DNA 过程中, 一般都采用 TE 缓冲液, 而不选用其它的缓冲液。虽然很多缓冲系统。如磷酸盐缓冲系统, 硼酸系统都符合细胞内环境的生理范围, 可以作为 DNA 的保存液, 但在某些实验中, 这些缓冲液会影响实验。如在转化实验中, 要用到 Ca²⁺, 如果用磷酸盐缓冲液, 磷酸根将与 Ca²⁺产生 Ca(PO₄)₂沉淀; 在各种工具酶反应时, 不同的酶对辅助因子的种类及数量要求不同, 有的要求高盐离子浓度, 有的则要求低盐浓度, 采用 Tris—HCl 缓冲系统, 不存在金属离子的干扰作用; 其中的 EDTA 是二价离子

Mg²⁺、Ca²⁺等的螯合剂, 可降低系统中的这些离子浓度, 而这些离子是脱氧核糖核酸酶的辅

助因子, 所以 EDTA 可以抑制脱氧核糖核酸酶对 DNA 的降解作用。

3、TENS 中 NaOH: 核酸在 pH 大于 5, 小于 9 的溶液中稳定, 但当 pH 大于 12 或小于 3 时, 就会引起 DNA 两条链之间氢键的解离而变性。TENS 中有 NaOH 使其 pH 大于 12, 因而

使染色体 DNA 与质粒 DNA 变性。

TENS 中的 SDS: SDS 是离子型表面活性剂。它主要功能有: (1)溶解细胞膜上的脂肪与蛋白质, 因而溶解膜蛋白而破坏细胞膜; (2)解聚细胞中的核蛋白; (3)SDS 能与蛋白质结合成为 R₁—O—SO₃⁻...R₂⁺—蛋白质的复合物, 使蛋白质变性而沉淀下来。但是 SDS 能抑制核

糖核酸酶的作用, 所以在以后的提取过程中, 必须把它去干净, 防止在下一步操作中(用

Rnase 去除 RNA 时)受干扰。

4、3. 0mol / L NaAC(pH5.2)使 pH 大于 12 的 DNA 抽提液回到中性, 使变性的质粒 DNA

能够复性, 并能稳定存在。染色体 DNA 不能复性(染色体 DNA 不存在超螺旋共价闭环结构) 而高盐的 3mol/L NaAC 有利于变性的大分子染色体 DNA、RNA、以及 SDS—蛋白质复合物凝聚沉淀。pH5. 2 也能中和核酸上的电荷, 减少相互斥力而互相聚合。同时, 钠盐能与

SDS 一蛋白质复合物作用后, 形成溶解度较小的钠盐形式复合物, 使沉淀更完全。

5. 饱和酚: 酚是一种表面变性剂, 属非极性分子。水是极性分子。当蛋白质溶液与酚混合时, 蛋白质分子之间的水分子被酚挤走, 使蛋白质失去水合状态而变性。经过离心。变性蛋白质的密度比水的密度大, 因而与水相分离, 沉淀在水相下面, 酚比重更大, 保留在最下层。酚作为变性剂. 也有一些缺点: (1)酚与水有一定程度的互溶, 酚相中水的溶解可达大约 10%~15%, 溶解在这部分水相中有 DNA 会损失, (2)酚很容易氧化, 变成粉红色, 氧化的酚容易降解 DNA, 解决酚氧化和带水的办法是将酚重蒸, 除去氧化的部分, 再用 Tris—HCl 缓冲液饱和, 使酚不至于夺去 DNA 中的水, 带走部分 DNA。饱和酚中加上 8—羟基硅啉及巯基乙醇, 防止酚氧化, 还是弱的螯合剂. 可抑制 DNase。由于有颜色. 溶解在酚中后, 使酚带上

颜色, 便于酚相与水相的分肉, 酚饱和后, 表面盖上一层 Tris 水溶液, 隔绝空气, 阻止酚氧化。

6. 关于无水乙醇沉淀 DNA 的说明:

用无水乙醇沉淀 DNA, 是实验中最常用的沉淀 DNA 的方法。乙醇的优点是具有极性, 可以以任意比例和水相混溶, 乙醇与核酸不会起化学反应, 对 DNA 很安全, 因此是理想的沉淀剂。

乙醇之所以能沉淀 DNA, 是由于 DNA 溶液是以水合状态稳定存在的 DNA, 当加入乙醇. 乙醇会夺去 DNA 周围的水分子, 使 DNA 失水而易于聚合沉淀, 一般实验中, 用 2 倍体积

的无水乙醇与 DNA 相混合。使乙醇的最终含量占 67%左右。由此可预见, 也可用 95%乙醇

沉淀 DNA, 但是用 95%乙醇使总体积增大. 而 DNA 在醇溶液中总有一定程度的溶解。因而

DNA 损失也增大, 影响收率。

乙醇沉淀 DNA 溶液时, DNA 溶液中应该有一定的盐浓度, 中和 DNA 表面电荷。如果溶液中盐浓度太低, 要加 NaAC 或 NaCl 至最终浓度 0.1—0.25mol / l 在 pH 8 左右的 DNA 溶液中, DNA 分子带负电荷, 加一定浓度的 NaAC 或 NaCl 使 Na⁺中和 DNA 分子上的负电荷, 减少 DNA 分子之间的同性电荷相斥力, 易于互相聚合而形成 DNA 钠盐沉淀。当加入的盐溶液浓度太低时。只有部分 DNA 形成 DNA 钠盐而聚合, 这样就造成 DNA 沉淀不

完全。但当加入的盐溶液浓度太高时，其效果也不好，在沉淀的 DNA 中，由于过多的盐杂质存在，影响 DNA 的酶切等反应，必须进行洗涤或重沉淀。

乙醇沉淀 DNA。一般采用低温条件，这是由于在低温条件下，分子运动大大减少，DNA 易于聚合而沉淀。为了使质粒 DNA 能充分沉淀，一般保存时间总是过长的，同时也要视样品的体积而异，在微量离心管中的样品要比 40 毫升离心管中 DNA 样品的量少，冷却就较迅速。大量提取 DNA 时，目前习惯上常采用如下几种方法：

保存在家用冰箱结冰盒内 过夜

保存在-2℃冰箱内 过夜

保存在-70℃冰箱内 30min ~ 2h

放置干冰中（约-20℃） 30min

放置干冰加酒精中（约-70℃） 16min

放置在液氮缸中液氮的气相内，不可以浸在液氮中（温度在-198℃左右）5 ~ 15min。

除了用乙醇外还可用 1 倍体积丙醇（相当于 2 倍体积乙醇）使 DNA 沉淀。用异丙醇的好处是要求离心的液体体积小，但异丙醇挥发性不如乙醇，最终除去其残留部分的难度更大。此外，异丙醇能促使蔗糖、氯化钠等溶质与 DNA 一起沉淀，在-70℃时，更易发生，所以

一般以乙醇沉淀为宜，除非要求液体体积很小。

7. 影响质粒 DNA 提纯质量和产率因素的说明。

(1) 菌株

质粒的宿主菌菌株的不同对质粒 DNA 纯化的质量和产率很大。一般最好选用 enA 基因突变的宿主菌，即 enA⁻ 菌株，如 DH5 α , JM109 和 XL1—Blue 等。使用含野生型 enA 基因的菌株会影响质粒 DNA 的纯度。

enA 基因是核酸内切酶 I。核酸内切酶 I 是一种 12kDa 的壁膜蛋白，受镁离子激活，可被 EDTA 抑制，对热敏感。双链 DNA 是核酸内切酶 I 的底物，但 RNA 是该酶的竞争性抑制剂。能改变酶的特异性，使其由水解产生 7 个碱基的寡聚核苷酸的双链 DNA 内切酶活性，变为平均每底物每次切割一次的切口酶活性。核酸内切酶 I 的功能仍不清楚，enA 基因突变的菌株没有明显的表现改变，但质粒产量及稳定性明显提高。细菌不同生长期核酸内切酶 I 的

表达水平不同。生长的指数期较稳定期核酸内切酶 I 水平高 300 倍。此外，培养基中促进快速生长的成分如高葡萄糖水及补充氨基酸都会使核酸内切酶 I 水平增高。

此外，菌株的其他性质有时也应加以考虑。如 XL1—Blue 生长速度较慢，HBI01 及其衍生菌株如 TG1 及 JM100 序列，含大量的糖，这些糖如果在质粒纯化过程中不除去，在菌体裂解后释放出来，可能抑制酶活性。

(2) 质粒的拷贝数

细菌中质粒的拷贝数是影响质粒产量的最主要的因素。质粒的拷贝数主要由复制起点 (replication origin) 如 pMB1 及 pSC101 及其附近的 DNA 序列决定。这些被称作复制点的区域通过细菌的酶复合物控制质粒 DNA 的复制。当插进一些特殊的载体时，能降低质粒的拷贝

数。此外，太大的 DNA 插入也能使质粒拷贝数下降。一些质粒，如 pUC 序列，由于经过了突变和改造，在细菌细胞内的拷贝数很大。以 pBR322 质粒为基础的质粒拷贝数较低，粘粒(cosmid)及特别大的质粒通常拷贝数极低(表 1)。

表 1 各种质粒和粘粒的复制起点和拷贝数

载体	复制起点	拷贝数	特点
质粒			
pUC 载体	ColE1	500 ~ 700	高拷贝
pBluescript 载体	ColE1	300 ~ 500	高拷贝
pGEM 载体	pMB1	300 ~ 400	高拷贝
pTZ 载体	pMB1	>1000	高拷贝
pBR322 及其衍生质粒	pMB1	15 ~ 20	低拷贝
pACYC 及其衍生质粒	p15A	10 ~ 12	低拷贝
pSC101 及其衍生质粒	pSC101	~ 5	极低拷贝
粘粒			
SuperCos	ColE1	10 ~ 20	低拷贝
PWE15	ColE1	10 ~ 20	低拷贝

(3)细菌培养

用于制备质粒的细菌培养应该从选择性培养的平板中挑取单个菌落培养。不应该直接从甘油保存菌，半固体培养基及液体培养基中挑菌，这可能导致质粒丢失。也不该从长期保存的平板上直接挑菌，这也可能使质粒突变或使质粒丢失。挑取单个菌落至 3ml 选择性培养基中，培养至饱和状态(12 ~ 14 小时)就可进行小量质粒提取。

8. 除了本实验采用的小量质粒 DNA 提取法外，很多生物试剂公司还提供试剂盒用于小量质粒 DNA 的提取。通常情况下，采用试剂盒都能获得较高质量的 DNA，所得到的 DNA 都可直接用于传染、测序及限制酶分析等。下面介绍三种试剂盒。

A.用 Bio—Rad 质粒小量制备试剂盒提取质粒 DNA

- (1)取过夜培养的菌液 1 ~ 2ml 至微离心管中。离心 30s 沉淀细胞，吸去所有上清。
- (2)加 200μl 细胞悬浮液(Cell Rcsuspension Solution) 并吹打数次(或旋涡振荡)，使沉淀完全悬浮。
- (3)加 250μl 细胞裂解液(Cell Lysis Solution)，轻轻颠倒管 10 次(不旋涡振荡)如果细胞裂解了，溶液应变得粘稠且稍清亮。如果仍然浑浊，继续混合。
- (4)加 250μl 中和液(Neutralization Solution)，轻轻颠倒管 10 次(不旋涡振荡)混合(此时应该形成可见沉淀)。
- (5)在微离心机上以最高转速(12 000 ~ 14 000g)沉淀细胞碎片 5min。在管底或沿着管壁有紧密白色沉淀。

- (6)将一支过滤柱(Spin Filter)插在一支新离心管上。
- (7)直接吸 200μl 基质悬液(Quantum Prep Matrix)到含白色沉淀的管中(吸基质中成份前, 彻底混合基质), 为避免管壁有沉淀, 吹吸 2 次混合, 立即直接将悬液倒在过滤柱(Spin Filter)内, 当所有样品转移到过滤柱内后, 离心 30s。
- (8)从微离心管上移开过滤柱, 弃去离心管底的滤液。
- (9)再放过滤柱到同一管上。加 500μl 洗涤液(Wash Solution)洗涤基质(第一次使用前加 63ml 95%乙醇到洗涤液中), 离心 30s。
- (10)从微离心管上移开过滤柱, 弃去离心管底的滤液, 再放过滤柱到同一管上。
- (11)加 500μl 洗涤液洗涤基质, 离心 2min, 除去残存的乙醇。移开过滤柱, 弃去离心管。
- (12)放过滤柱在一新离心管上, 加 100μl 去离子水或 TE, 离心 30s 洗脱 DNA。弃去过滤柱, 将洗脱的 DNA 保存在-20℃。
- B. 用泛特津公司的日常型质粒 DNA 小量制备试剂盒提取质粒 DNA**
- (1)取 5ml 过夜培养的菌液, 用台式离心机最高速度离心 1min, 弃尽上清。
- (2)加入 250μl S1 溶液悬浮细菌, 加入 250 μl S2 溶液, 混和但充分地上下混合均匀 3~4 次。
- (3)加 400μl 4℃预冷的 S3 溶液, 温和但充分地上下混合均匀。静置 2min。
- (4)将溶液连同凝结核一起转入到微量滤器中, 1000r / min 离心 30s, 使溶液直接过滤到 2ml 离心管中。
- (5)将过滤液从 2ml 离心管中转入到 DNA 小量制备管中, 3600r / min 离心 1min。
- (6)弃 2ml 离心管中溶液。将 DNA 小量制备管重新置回到 2ml 离心管中。
- (7)加 500μl W1 溶液, 3600r / min 离心 1min, 弃 2ml 离心管中溶液, 将 DNA 小量制备管重新置回到 2ml 离心管中。
- (8)加 650μl S5 溶液, 3600r / min 离心 1min。
- (9)将 DNA 制备管移入另一 2ml 离心管中, 再加 650μl S5 溶液, 1200r / min 离心 2min。
- (10)将小量制备管移到 1.5ml 离心管上, 加 60μl 65℃预热的 TE 缓冲液于 DNA 结合膜中间, 室温下置 1min, 1200r / min,离心 1min,洗脱质粒 DNA。

C.用 Qiegan 质粒 DNA 小量制备试剂盒(P1asmid Mini Kit)提取质粒 DNA
试剂盒组成

质粒提取试剂盒(Plasmid Kits)	小量 25 次 (Mini 25)	小量 100 次 (mini 100)
厂家目录号(Catalog No.)	12123	12125

纯化柱(QIAGEN—tip 20)	25	100
P1 缓冲液(Buffer, P1)	20ml	40ml
P2 缓冲液(Buffer, P2)	20ml	40ml
P3 缓冲液(Buffer, P3)	20ml	40ml

QBT 缓冲液(Buffer QBT)	40ml	110ml
QC 缓冲液(Buffer QC)	120ml	480ml
QF 缓冲液(Buffer QF)	30ml	110ml
RNase A(100mg / ml)	2mg	4mg
使用手册(Handbook)	1	1

实验步骤

(1)取 3nd 过夜培养的菌液，用台式离心机最高速度离心，弃去上清。沉淀用 0.3ml 含 RNase A 的 P1 缓冲液(Buffer P1)溶解。

注：P1 缓冲液在使用前应该加入试剂盒中提供的 RNase A 溶液。RNase A 溶液加入 P1 缓冲液前，可先短时高速离心至管底。含 RNase A 的 P1 缓冲液可于 2~8℃保存 6 个月。

(2)加 0.3ml P2 缓冲液(Buffer P2)，轻轻颠倒管 4~6 次混匀(不要漩涡振荡)，室温放置 5 min。

注：裂解反应时间不要大于 5 min。P2 缓冲液开盖取完试剂后，立即重新；旋上盖子，以免试剂中的 NaOH 与空气中的 CO₂ 反应。

(3)加 0.3ml 预冷的 P3 缓冲液(Buffer P3)，立即轻轻颠倒管

(4)再次混匀样品，在台式离心机上以最大转速(10 000—13 000r/ min 或 14 000~18 000r/ min)离心 10 min，移出上清，

注：离心后，上清应该时清亮的。如果上清不清亮，再次离心至上清清亮，不清亮的成分将堵塞柱子，使流速清亮。

(5)用 1ml QBT 缓冲液(Buffer QBT)平衡 QIAGEN—tip 20，让补上液体自然(以重力)流干。

(6)向 QIAGEN-tip 20 柱上加入步 4 收集的上清，让上清自然(以重力)流入柱中。

上清尽快加入到柱中。如果存放时间太久，由于蛋白质沉淀变混，上样前应重新离心，以免堵塞柱

(7)用 4 X 1ml，缓冲液(Buffer QC)洗涤 QIAGEN—tip 20 柱。

(8)用 0.8ml 缓冲液(Buffer QF)洗脱 DNA。

(9)用 0.7 体积(0.8ml 洗脱流出液则为 0.56ml)室温放置的异丙醇沉淀离心机上≥10 000r / min 离心 30 min，小心倒出上清。

(10)用 1ml 70%乙醇洗涤 DNA，空气干燥 5 min，以适当体积缓冲液重新溶解 DNA。

试剂

(1)P1 缓冲液(菌体重悬缓冲液)：50mmol / l Tris-HCl, pH8.0;10mmol / L EDTA; 100 / μg / ml RNaseA 4℃保存。

配制方法：Tris 6.06 g, EDTA·2H₂O 3.72 g, 用 800ml ddH₂O 溶解，用 HCl 调 pH 至 8.0 加 ddH₂O 至 1000 ml。1000 ml P1 缓冲液中加入 100 mg RNaseA。

(2)P2 缓冲液(裂解缓冲液)：200mmol / L NaOH, 1%SDS。室温保存。

配制方法: NaOH 8.0g 溶于 950ml ddH₂O 中, 加入 50 ml 20%SDS 溶液加 ddH₂O 至 1000 ml。

(3)P3 缓冲液(中和缓冲液): 3.0mmo] / L 乙酸钾, pH5. 5。室温或 4°C保存

配制方法: 乙酸钾 294.5g 溶于 500 ml ddH₃O 中, 用冰乙酸(约 110ml)调 pH 至 5.5 加 ddH₂O 至 1000 ml。

(4)QBT 缓冲液(平衡缓冲液): 750mmol / L NaCl; 50mmol / L MOPS, pH7.0;15%异丙醇; 0.15% Triton X—100。室温保存。

配制方法: NaCl 43.83g, MOPS(自由酸)10.46g 溶于 860ml ddH₂O。调 pH 至 7.0。加 150 ml 纯异丙醇及 15 ml 10% TritonX—100 溶液, 加 ddH₂O 至 1000ml。

(5)QC 缓冲液(冲洗缓冲液): 1.0mmol / L NaCl; 50mmol / L MOPS, pH7.0; 15%异丙醇。室温保存。

配制方法: NaCl 58.44g; MOPS(自由酸)10.46g 溶于 800 ml ddH₂O。调 pH7.0。加 150ml 纯异丙醇, 加 ddH₂O 至 1000ml。

(6)QF 缓冲液(洗脱缓冲液): 1.25mol / L NaCl; 50mmol / L Tris HCl, pH8.5; 15%异丙醇。室温保存。

配制方法: NaCl 73. 05g, Tris 6. 06g, 溶于 800ml ddH₂O。用 HCl 调 pH 至 8.5。加 150ml 纯异丙醇, 加 ddH₂O 至 1000ml。

(7)TE: 10mmol / L Tris-HCl, pH8.0, 1mmol / L EDTA。室温保存。

(8)STE: 100mmol / L NaCl, 10mmol / L Tris-HCl, pH8.0, 1mmol / L EDTA。室温保存。

配制方法: NaCl 5.84g, Tris 1.21g, EDTA·2H₂O 0.37g, 溶于 800ml ddH₂O 中, 用 HCl 调 pH8.0, 加 ddH₂O 至 1000ml。