

参考資料 8

基本的な緩衝液の調製方法

PBS(-)

りん酸緩衝生理食塩水 (Ca, Mg 不含)

- ・調整 pH7.4
- ・調製量 1 L

< 準備試薬 >

試薬	使用量	最終濃度
塩化ナトリウム	8 g	137 mmol/l
塩化カリウム	0.2 g	2.68 mmol/l
りん酸水素二ナトリウム	1.44 g	10 mmol/l
りん酸二水素カリウム	0.24 g	2 mmol/l
塩酸	少量	-
超純水	1 L	-

< 調製方法 >

- ① 4 種類の塩を混合し、超純水約 900 ml に溶解後、塩酸で pH を 7.4 に調整する。
- ② 1 L にメスアップ後、オートクレーブもしくはフィルターにより滅菌する。

< 用途 >

細胞の洗浄や懸濁、トリプシン処理前の細胞洗浄などに用いる。Dulbecco によりつくられた代表的生理塩溶液で、生理食塩水 (0.9% 塩化ナトリウム) より生理的である。

< 保存 >

冷蔵保存

1M Tris-HCl Buffer

1 mol/l トリス塩酸緩衝液

- ・調整 pH8.0
- ・調製量 500 ml

< 準備試薬 >

試薬	使用量	最終濃度
トリス塩基 Tris(hydroxymethyl)aminomethane	60.55 g	1 mol/l
超純水	500 ml	-

< 調製方法 >

- ① トリス塩基 60.55 g を 400 ml の水に溶かし、塩酸を加えながら pH を 8.0 に合わせ、500 ml にメスアップする。
- ② オートクレーブもしくはフィルターにより滅菌する。

< 用途 >

使用 pH 範囲 : pH7.1 ~ 8.9.

この範囲を超える Buffer もつくれるが、緩衝作用は弱い。バイオ実験でもっとも汎用される Buffer である。

< 保存 >

室温保存

0.5 mol/l EDTA

エチレンジアミン四酢酸

- ・調整 pH8.0
- ・調製量 500 ml

< 準備試薬 >

試薬	使用量	最終濃度
EDTA2Na · 2H ₂ O (エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物)	93.06 g	0.5 mol/l
水酸化ナトリウム	約 10 g	-
超純水	500 ml	-

< 調製方法 >

- ① 400 ml の超純水に EDTA 粉末を懸濁し、攪拌しながら pH を測定する。
- ② 水酸化ナトリウムを除々に加える。
- ③ pH が除々に上昇し、やがて完全に溶けるので、水酸化ナトリウム溶液で pH を 8.0 に合わせ、500 ml にメスアップする。
- ④ オートクレーブもしくはフィルターにより滅菌する。

< 用途 >

使用 pH 範囲 : pH7.0 ~ 8.0.

Buffer や酵素反応液に添加して、重金属による影響を抑えたり、酵素を不活化させたりする。0.1 ~ 1 mmol/l の濃度で使用する。

< 保存 >

室温保存

TE

トリス EDTA 緩衝液

- ・調製量 500 ml

< 準備試薬 >

試薬	使用量	最終濃度
1M トリス塩酸 Buffer	5 ml	10 mmol/l
0.5 mol/l EDTA	1 ml	1 mmol/l
超純水	494 ml	-

< 調製方法 >

- ① 各試薬をそれぞれはかり、500 ml にメスアップする。
- ② オートクレーブもしくはフィルターにより滅菌する。

< 用途 >

DNA を溶解、保存するための最も基本的な溶液。

< 保存 >

室温保存

50×TAE

50× トリス酢酸 EDTA 緩衝液

・調製量 1 L

<準備試薬>

試薬	使用量	最終濃度
トリス塩基 Tris(hydroxymethyl)- aminomethane	242 g	2 mol/l
酢酸	57.1 ml	1 mol/l
0.5 mol/l EDTA (pH8.0)	100 ml	50 mmol/l
超純水	1 L メスアップ	—

<調製方法>

①上記試薬種を超純水で溶かし、1 L にメスアップする。

<用途>

核酸のアガロースゲル電気泳動用の泳動用バッファーで、50 倍に薄めて使用する。アガロースゲルの溶解にも用いる。

<保存>

室温保存

10×TBE

10× トリスホウ酸 EDTA 緩衝液

・調製量 1L

<準備試薬>

試薬	使用量	最終濃度
トリス塩基 Tris(hydroxymethyl) amino-methane	60.55 g	500 mmol/l
ホウ酸	30 g	485 mmol/l
0.5 mol/l EDTA (pH8.0)	40 ml	20 mmol/l
超純水	1 L メスアップ	—

<調製方法>

①上記試薬種を超純水で溶かし、1 L にメスアップする。

②オートクレーブもしくはフィルターにより滅菌する。

<用途>

DNA 実験におけるポリアクリルアミドゲルや電気泳動用のバッファーとして使われる。10 倍に薄めて使用する。

<保存>

室温保存

20×SSC

20× 濃縮 SSC 緩衝液

・調整 pH7.0

・調製量 1 L

<準備試薬>

試薬	使用量	最終濃度
塩化ナトリウム	175.32 g	3 mol/l
クエン酸三ナトリウム二水 和物	88.23 g	300 mmol/l
水酸化ナトリウム	少量	—
超純水	1 L	—

<調製方法>

①試薬を約 800 ml の超純水に溶かし、水酸化ナトリウムで pH を 7.0 に合わせる。

②超純水で 1 L にメスアップする。

③数日以上保存する場合は、オートクレーブする。

<用途>

サザンハイブリダイゼーションのトランスファー液、ハイブリダイゼーション液、及び洗浄液として使用する。超純水で希釈し、5×～0.1×濃度で使用する。クエン酸にはキレート効果があるため、DNA の安定化に効く。

<保存>

室温保存

20×SSPE

20× 濃縮 SSPE 緩衝液

・調整 pH7.4

・調製量 1 L

<準備試薬>

試薬	使用量	最終濃度
塩化ナトリウム	175.32 g	3 mol/l
りん酸二水素ナトリウム一 水和物	27.6 g	200 mmol/l
0.5mol/l EDTA (pH8.0)	40 ml	20 mmol/l
水酸化ナトリウム	少量	—
超純水	1 L	—

<調製方法>

①試薬を約 800 ml の超純水に溶かし、水酸化ナトリウムで pH を 7.4 に合わせる。

②超純水で 1 L にメスアップする。

③数日以上保存する場合は、オートクレーブする。

<用途>

サザンハイブリダイゼーションのトランスファー液、ハイブリダイゼーション液、及び洗浄液として使用する。超純水で希釈し、5×～0.1×濃度で使用する。

<保存>

室温保存

200 mmol/l リン酸緩衝液

- ・調整 pH6.8
- ・調製量 ～ 500ml

<準備試薬>

試薬	使用量	最終濃度
りん酸二水素ナトリウム・二水和物	31.21 g	0.2 mol/l
りん酸水素二ナトリウム・十二水和物	71.64 g	0.2 mol/l
超純水	2 L	—

<調製方法>

- ① 0.2 mol/l りん酸二水素ナトリウム
りん酸二水素ナトリウム・二水和物を 1 L の超純水に溶かす。
- ② 0.2 mol/l りん酸水素二ナトリウム
りん酸水素二ナトリウム・十二水和物を 1 L の超純水に溶かす。
- ③ ビーカーにおよそ 250 ml のりん酸二水素ナトリウム溶液を入れる。
- ④ pH を測定しながら、りん酸水素二ナトリウム溶液を添加して pH を合わせ、オートクレーブする。

<用途>

使用 pH 範囲は 5.8 ～ 8.0。ヒドロキシアパタイトやリン酸セルロースのカラムクロマトグラフィーなどで使用される。

<保存>

室温あるいは冷蔵保存

1 mol/l クエン酸ナトリウム緩衝液

- ・調整 pH7.0
- ・調製量 ～ 200 ml

<準備試薬>

試薬	使用量	最終濃度
クエン酸三ナトリウム・二水和物	147 g	1 mol/l
クエン酸	19.2 g	1 mol/l
超純水	600 ml	—

<調製方法>

- ① 1 mol/l クエン酸三ナトリウム
クエン酸三ナトリウム・二水和物を 500 ml の超純水に溶かし、オートクレーブする。
- ② 1 mol/l クエン酸
クエン酸を 100 ml の超純水に溶かし、オートクレーブする。
- ③ ビーカーにおよそ 200 ml のクエン酸三ナトリウム溶液を入れる。
- ④ pH を測定しながら、クエン酸溶液を添加して pH を合わせ、オートクレーブする。

<用途>

クエン酸にはキレート作用があり、核酸を溶かす溶液に使用される。

<保存>

室温あるいは冷蔵保存

0.1 mol/l 炭酸 - 重炭酸緩衝液

- ・調整 pH10.0
- ・調製量 ～ 500 ml

<準備試薬>

試薬	使用量	最終濃度
炭酸ナトリウム	10.6 g	100 mol/l
炭酸水素ナトリウム	8.4 g	100 mol/l
超純水	2 L	—

<調製方法>

- ① 0.1 mol/l 炭酸ナトリウム
炭酸ナトリウムを 1 L の超純水に溶かし、オートクレーブする。
- ② 0.1 mol/l 炭酸水素ナトリウム
炭酸水素ナトリウムを 1 L の超純水に溶かし、オートクレーブする。
- ③ ビーカーにおよそ 300 ml の炭酸ナトリウム溶液を入れる。
- ④ pH を測定しながら、炭酸水素ナトリウム溶液を添加して pH を合わせ、オートクレーブする。

<用途>

使用 pH 範囲は 9.2 ～ 10.6。
細胞培養から化学分析にいたるまで、幅広く使用されている。

<保存>

室温あるいは冷蔵保存

125 mmol/l ホウ酸ナトリウム緩衝液

- ・調整 pH10.0
- ・調製量 1 L

<準備試薬>

試薬	使用量	最終濃度
ホウ酸ナトリウム十水和物	4.76 g	125 mmol/l
0.1 mol/l 水酸化ナトリウム溶液	少量	—
超純水	1 L	—

<調製方法>

- ① ホウ酸ナトリウム十水和物を約 900 ml の超純水に溶解する。
- ② pH を測定しながら、0.1 mol/l 水酸化ナトリウム溶液を添加して pH を合わせる。
- ③ 超純水で 1 L にメスアップする。

<用途>

使用 pH 範囲は 9.2 ～ 10.8。

<保存>

室温あるいは冷蔵保存