



Biologische Puffer

Anwendung

Viele biochemische Prozesse werden schon durch schon durch minimale Änderung der freien H^+ -Ionen-Konzentration deutlich beeinträchtigt. Daher ist es in der Regel notwendig, die H^+ -Konzentration in vitro durch Zugabe eines geeigneten Puffers zum Medium zu stabilisieren, ohne jedoch die Funktion des untersuchten Systems zu beeinträchtigen.

Ein Puffer hält den pH-Wert einer Lösung konstant, indem er Protonen aufnimmt, die bei Reaktionen freigesetzt werden, oder indem er Protonen abgibt, wenn sie bei Reaktionen verbraucht werden.

In dieser Broschüre sind die am häufigsten verwendeten Puffersubstanzen und ihre jeweiligen physikalischen und chemischen Eigenschaften zusammengefasst.



Schlüsselwörter

- Eigenschaften des Puffers
- Wirksamer pH-Bereich
- Vorbereitung von Pufferlösungen
- Gängige Pufferlösungen

Praktische Tipps - Vorbereitung von Pufferlösungen

Empfehlungen für die Einstellung des pH-Wertes eines Puffers und der Lagerbedingungen

Temperatur

Je nach Puffersubstanz kann der pH-Wert in Abhängigkeit von der Temperatur variieren. Es ist daher ratsam, den pH-Wert so weit wie möglich auf die für die Untersuchung verwendete Arbeitstemperatur einzustellen.

So liegt beispielsweise der physiologische pH-Wert für die meisten Säugetierzellen bei 37°C zwischen 7,0 und 7,5. Die Temperaturabhängigkeit eines Puffersystems wird als $d(pK_a)/dT$ ausgedrückt, was die Änderung des pK_a bei einer Temperaturerhöhung um 1°C beschreibt.

Titration

1. Im Allgemeinen wird der pH-Wert mit NaOH/KOH oder HCl eingestellt. Durch langsame Zugabe einer starken Säure oder Base unter kräftigem Rühren werden lokal hohe Konzentrationen von H^+ - oder OH^- -Ionen vermieden. Geschieht dies nicht, können die Puffersubstanzen chemische Veränderungen erfahren, die sie inaktivieren oder so verändern, dass sie eine hemmende Wirkung haben (Ellis & Morrison 1982).
2. Unter Rühren löst sich CO_2 in der Lösung. Rühren Sie Lösungen vorsichtig um, um den pH-Wert genau zu messen.
3. Liegt ein Puffer in protonierter Form (Säure) und in nicht-protonierter Form (Base) vor, kann der pH-Wert auch durch Mischen der beiden Substanzen eingestellt werden.
4. Die Einstellung der Ionenstärke einer Pufferlösung (falls erforderlich) sollte in gleicher Weise wie die Einstellung des pH-Wertes bei der Auswahl des Elektrolyten erfolgen, da sich dieser je nach verwendetem Elektrolyten erhöht.
5. Werden dem Puffer andere Komponenten zugesetzt (z. B. EDTA, DTT, Mg^{2+} , β -Mercaptoethanol), so sind auch Änderungen des pH-Werts zu berücksichtigen und der pH-Wert sollte erneut getestet werden.
6. In Gegenwart von zweiwertigen Metallionen können Karbonat- oder Phosphatpuffer Präzipitate bilden.

Wie kann eine mikrobielle Kontamination von Pufferlösungen verhindert werden?

1. Lösungen durch Filtration über eine 0,22 μm -Filtereinheit oder durch Autoklavieren sterilisieren.
2. Zugabe von 0,02% (3 mM) Natriumazid.
3. Lagerung bei +4°C.
4. Bereiten Sie hochkonzentrierte Stammlösungen vor.

| Produkt-Nummer | Produktname | CAS-Nummer | Packungsgrößen | Puffersubstanz (Kurzbezeichnung) | Name der Puffersubstanz | pKa (25°C, 100 mM) | Wirksam pH-Bereich | Autoklavierbar | Temperatur Abhängigkeit [d(pKa)/dT] | Kompatibilität mit Protein-Assays (Konzentrationsgrenzen) | | | Kommentare, Auswirkungen in verschiedenen Versuchen |
|----------------|--|-------------|-------------------------|----------------------------------|--|---|-----------------------|----------------|-------------------------------------|---|----------|----------|--|
| | | | | | | | | | | BCA | Lowry | Bradford | |
| A1060 | ACES für Pufferlösungen | 7365-82-4 | 1 kg, 10 kg | ACES | N-(2-Acetamido)-2-aminoethansulfonsäure | 6.78 | 6.1 - 7.5 | + | -0.020 | | + | | Signifikante Absorption von UV-Licht bei 230 nm; bindet Cu ²⁺ |
| A0838 | 2-Amino-2-methyl-1-propanol für Pufferlösungen | 124-68-5 | 4 kg | AMP | 2-Amino-2-methyl-1-propanol | 9.69 | 8.7 - 10.4 | n.a. | -0.032 | | | | |
| A1025 | Bis-Tris für Pufferlösungen | 6976-37-0 | 250 g, 500 g, 1 kg | BIS-Tris | [Bis-(2-hydroxyethyl)-imino]-tris-(Hydroxymethylmethan) | 6.46 | 5.8 - 7.2 | + | -0.017 | + | | | Ersatz für Cacodylat. Kann autoklaviert oder mit DEPC behandelt werden |
| 131015 | Borsäure zur Analyse, ACS, ISO | 10043-35-3 | 500 g, 1 kg, 5 kg | Borsäure | | 9.23 (pK ₁), 12.74 (pK ₂), 13.80 (pK ₃) | 8.5 - 10.2 | + | -0.008 (pK ₁) | (10mM) | | | Bildet kovalente Komplexe mit Mono- und Oligosacchariden, Ribose Untereinheiten von Nukleinsäuren, Pyridin-Nukleotiden, Glycerin |
| A1067 | Glycin für die Molekularbiologie | 56-40-6 | 1 kg, 5 kg | Glycin | | 2.35 (pK ₁), 9.78 (pK ₂) | 2.2 - 3.6, 8.8 - 10.6 | + | -0.0025 (pK ₂) | (1 M) | (2.5 mM) | (0.1 M) | Stört den Bradford-Protein-Assay |
| A1069 | HEPES für Pufferlösungen | 7365-45-9 | 100 g, 500 g, 1kg, 5 kg | HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethansulfonsäure | 7.48 | 6.8 - 8.2 | +* | -0.014 | - | + | | Kann Radikale bilden, nicht geeignet für Redox-Studien |
| A3724 | HEPES für die Molekularbiologie | | 250 g, 500 g, 1 kg | | | | | | | | | | |
| A1072 | HEPPSO für Pufferlösungen | 68399-78-0 | 100 g | HEPPSO | N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-Hydroxypropansulfonsäure | 7.85 | 7.1 - 8.5 | n.a. | -0.010 | - | + | | Kann Radikale bilden, nicht geeignet für Redox-Studien |
| A1074 | MES - Monohydrat für Pufferlösungen | 145224-94-8 | 250 g, 1 kg | MES | 2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure | 6.10 | 5.5 - 6.7 | + | -0.011 | - | + | | Ersatz für Kakodylat |
| A1076 | MOPS für Pufferlösungen | 1132-61-2 | 250 g, 1 kg, 5 kg | MOPS | 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure | 7.14 | 6.5 - 7.9 | +* | -0.011 | - | + | | Teilweise abgebaut beim Autoklavieren in Gegenwart von Glukose; vernachlässigbare Metallionenbindung. Kann autoklaviert werden (Farbveränderung hat keinen Einfluss auf die Pufferkapazität) |
| A2947 | MOPS für die Molekularbiologie | | 500 g, 1 kg | | | | | | | | | | |
| A1079 | PIPES für Pufferlösungen | 5625-37-6 | 500 g | PIPES | Piperazin-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure) | 6.76 | 6.1 - 7.5 | + | -0.0085 | - | + | | Kann Radikale bilden, nicht für Redoxstudien geeignet. Kann mit DEPC behandelt werden |
| A1084 | TES für Pufferlösungen | 7365-44-8 | 1 kg | TES | 2-[Tris(hydroxymethyl)-methylamino]-Ethansulfonsäure | 7.40 | 6.8 - 8.2 | + | -0.020 | - | + | | Bindet Cu ²⁺ |
| A1085 | Tricin BioChemica | 5704-04-1 | 250 g, 1 kg, 5 kg | Tricin | N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin | 8.05 | 7.4 - 8.8 | + | -0.021 | + | + | | Bindet stark Cu ²⁺ ; die Zugabe von Cu ²⁺ im Lowry-Assay ermöglicht die Verwendung; wird durch Flavine photooxidiert; Ersatz für Barbital (Veronal) |
| A1379 | Tris für Pufferlösungen | 77-86-1 | 1 kg, 5 kg | Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan | 8.06 | 7.5 - 9.0 | + | -0.028 | (0.1 M) | (250 mM) | (2 M) | hohe Temperaturempfindlichkeit; pH-Wert sinkt bei jeder 10-fachen Verdünnung um 0,1 Einheiten; inaktiviert DEPC, kann mit Aldehyden/Ketonen Schiff'sche Basen bilden, da es ein primäres Amin ist; ist an einigen enzymatischen Reaktionen beteiligt (z. B. alkalische Phosphatase); toxisch für viele Zellen, da es aufgrund seiner relativ guten Fettlöslichkeit in Zellen eindringt |
| A1086 | Tris zur Analyse, ACS, ultrapure | | 1 kg, 5 kg, 10 kg | | | | | | | | | | |
| A2264 | Tris für die Molekularbiologie | | 500 g, 1 kg, 5 kg | | | | | | | | | | |

*Bei HEPES, Imidazol, MOPS, TEA und anderen wird die Filtration dem Autoklavieren vorgezogen.



Rezepturen für häufig verwendete Pufferlösungen und -bestände

Zur Herstellung von 1 Liter Pufferlösung die Bestandteile in ca. 800 mL entionisiertem Wasser auflösen, den pH-Wert einstellen, entionisiertes Wasser auf 1000 mL Endvolumen auffüllen und ggf. sterilisieren.

HeBS-Transfektionspuffer (2X)

| | | |
|----------------------------------|----------|-----------|
| HEPES | 11.9 g/L | (0.050 M) |
| Na ₂ HPO ₄ | 0.21 g/L | (1.5 mM) |
| NaCl | 16.4 g/L | (0.280 M) |

Genau (!) pH 7,1 mit NaOH einstellen; filtrieren und sterilisieren; Aliquots bei -20°C lagern

MOPS-Puffer (1X)

| | | |
|---|-----------|----------|
| MOPS | 41.85 g/L | (0.2 M) |
| Na-Acetat | 41.02 g/L | (0.5 M) |
| EDTA-Na ₂ ·2H ₂ O | 3.72 g/L | (0.01 M) |

pH-Wert 7,0 einstellen; filtrieren, nicht autoklavieren; MOPS-Lösungen färben sich beim Erhitzen dunkel; im Dunkeln lagern und verwerfen, wenn sie gelb werden

PBS Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (10X)

| | | |
|----------------------------------|----------|-----------|
| KH ₂ PO ₄ | 2.4 g/L | (0.018 M) |
| Na ₂ HPO ₄ | 14.4 g/L | (0.101 M) |
| NaCl | 80 g/L | (1.369 M) |
| KCl | 2 g/L | (0.027 M) |

pH-Wert (20°C): 7,4; autoklavieren

SDS-Tris-Glycin-Puffer (10X) "Laemmli"-Puffer

Produktnummer A1415

| | | |
|--------|------------|----------|
| Tris | 30.29 g/L | (0.25 M) |
| Glycin | 144.13 g/L | (1.92 M) |
| SDS | 10 g/L | (1%) |

pH ~8,3; pH-Wert nicht mit zusätzlichen Ionen einstellen; leichte Abweichungen können toleriert werden

SSC-Puffer (20X)

Produktnummer A1396

| | | |
|-----------------------------------|------------|---------|
| tri-Na-Zitrat · 2H ₂ O | 88.23 g/L | (0.3 M) |
| NaCl | 175.32 g/L | (3 M) |

pH-Wert auf 7,0 einstellen; autoklavieren

TAE-Puffer (50X)

Produktnummer A4686

| | | |
|---|------------|----------|
| Tris | 242.30 g/L | (2 M) |
| EDTA-Na ₂ ·2H ₂ O | 18.6 g/L | (0.05 M) |
| Essigsäure eisig | 60.05 g/L | (1 M) |

pH-Wert auf 8,5 einstellen

TBE-Puffer (10X)

Produktnummer A3945

| | | |
|---|------------|----------|
| Tris | 107.81 g/L | (0.89 M) |
| Borsäure | 55.03 g/L | (0.89 M) |
| EDTA-Na ₂ ·2H ₂ O | 7.44 g/L | (0.02 M) |

pH-Wert auf 8,3 einstellen; autoklavieren

TBS-Puffer (1X, Tris gepufferte Kochsalzlösung) Rezeptur 1

| | | |
|--|-----------|-----------|
| Tris | 3 g/L | (0.025 M) |
| KCl | 0.2 g/L | (2.68 mM) |
| NaCl | 8 g/L | (0.137 M) |
| Phenolrot (Optionaler pH-Indikator) | 0.015 g/L | |

pH-Wert auf 7,4 einstellen; filtrieren, sterilisieren oder autoklavieren

TBS-Puffer (1X, Tris gepufferte Kochsalzlösung) Rezeptur 2

| | | |
|---------|-----------|----------|
| Tris-Cl | 15.76 g/L | (0.1 M) |
| NaCl | 8.77 g/L | (0.15 M) |

pH-Wert auf 7,5 einstellen; autoklavieren

TE-Puffer (100X)

| | | |
|---|------------|---------|
| Tris | 121.14 g/L | (1 M) |
| EDTA-Na ₂ ·2H ₂ O | 37.22 g/L | (0.1 M) |

pH-Wert auf 8,0 einstellen; üblicherweise werden auch pH-Werte von 7,0, 7,4, 7,5 oder 7,6 verwendet; autoklavieren

Referenzen:

1. Ellis, K.J. & Morrison, J.F. (1982) Methods in Enzymol. 87, 405-426. Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes.
2. Good, N. E. & Izawa, S. (1972) Methods in Enzymol. 24, 53-68. Hydrogen Ion Buffers.
3. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
4. Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (eds.) (2001) Current Protocols in Molecular Biology, page A.2.5. (Suppl. 40) Greene Publishing & Wiley-Interscience, New York.
5. Sambrook, J. & Russel, D.W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, page A1.17. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

IP-022DE

AppliChem GmbH

Ottoweg 4
D-64291 Darmstadt
Germany
Phone +49 6151 9357 0
Fax +49 6151 9357 11
info.de@itwreagents.com

ITW Reagents, S.R.L.

Corso Milano 31
I-20900 Monza (MB)
Italy
Phone +39 039 9530 360
Fax +39 039 9530 361
info.it@itwreagents.com

Panreac Química S.L.U.

C/ Garraf 2, Polígono Pla de la Bruguera
E-08211 Castellar del Vallès (Barcelona)
Spain
Phone +34 937 489 400
Fax +34 937 489 401
info.es@itwreagents.com

