



医学本科院校精品规划实验教材

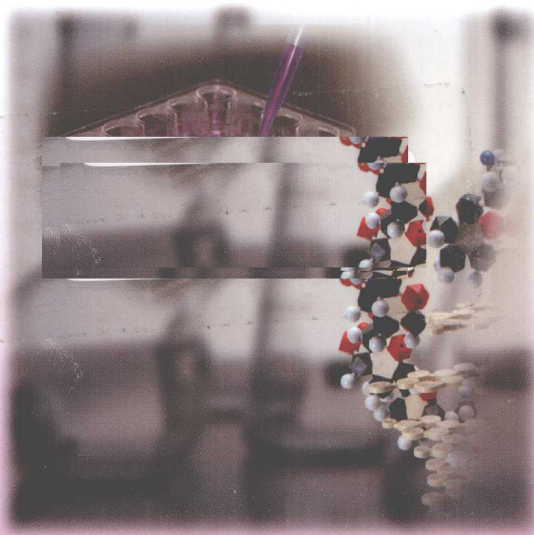
供临床医学、口腔医学、药学、医学
检验、护理、影像等专业使用

生物化学与分子生物学实验教程

SHENGWU HUAXUE YU FENZI SHENGWUXUE SHIYAN JIAOCHENG

● 主审 欧刚卫

● 主编 陆红玲



第四军医大学出版社



教育部推荐教材
普通高等教育生物类教材
教育部推荐教材

生物化学与分子生物学实验教程

（第2版）

主 编 王 健
副 编 王 健 王 健 王 健



人民卫生出版社

医学本科院校精品规划实验教材

供临床医学、口腔医学、药学、医学检验、护理、影像等专业使用

生物化学与分子生物学实验教程

主 审 欧刚卫

主 编 陆红玲

副主编 范 芳

编 者 (按姓氏笔画排序)

李长福 陆红玲

欧刚卫 范 芳

第四军医大学出版社·西安

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验教程/陆红玲主编. —西安:第四军医大学出版社,2010.6
ISBN 978 - 7 - 81086 - 820 - 4

I. 生… II. 陆… III. 生物化学—实验—高等学校—教材;分子生物学—实验—高等学校—教材 IV. Q5 - 33; Q7 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 106442 号

生物化学与分子生物学实验教程

主 编 陆红玲
责任编辑 文 闻
出版发行 第四军医大学出版社
地 址 西安市长乐西路 17 号(邮编:710032)
电 话 029 - 84776765
传 真 029 - 84776764
网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>
印 刷 蓝田立新印务有限公司
版 次 2010 年 6 月第 1 版 2010 年 6 月第 1 次印刷
开 本 787 × 1092 1/16
印 张 8
字 数 200 千字
书 号 ISBN 978 - 7 - 81086 - 820 - 4/ Q · 32
定 价 15.00 元

(版权所有 盗版必究)

前 言

生物化学与分子生物学是医药、生物工程与技术、食品和农业等领域的专业基础学科,不仅具有较强的理论性,而且具有一定的实践性。只有扎实地掌握系统的生物化学与分子生物学基础知识、熟练的实验操作技能,才能在相应的专业技术领域真正地有所造诣和建树。生物化学与分子生物学的发展与实验技术息息相关,每一种新的生化物质的发现与研究都离不开实验技术,实验技术每一次新的发明均大大推动了生物化学研究的进展。因此,实验部分在生物化学与分子生物学这门学科学习中占有重要地位,也是医学类各专业、各层次学生必修的一门基础实验课程,学习并掌握各种生物化学与分子生物学实验技术极为重要,它在生命科学基础研究领域具有广泛应用价值。

本教材一共分为五篇。第一篇是概论,主要介绍实验室的基本规则及生物化学实验的基本操作。第二篇是常用生物化学与分子生物学实验技术,重点介绍目前常用的生物化学与分子生物学研究技术的基本原理与应用。第三篇是基础生物化学实验,主要开设一些经典的生物化学实验,如蛋白质、核酸分离纯化、鉴定、定量方法,酶学实验,生化常规实验等,通过实验帮助学生巩固理论知识和培养学生的基本实验操作技能。第四篇是基础分子生物学实验,通过实验进一步提高学生的实践能力和培养其创新精神,完成对生物化学与分子生物学研究技术的系统认识。第五篇是附录,主要介绍化学试剂的分级和一些缓冲液的配制方法等。

本实验教程主要是配合普通高等教育“十一五”国家级规划教材及卫生部“十一五”规划教材《生物化学》理论课的教学,不仅适合医学院校临床医学等各专业五年制本科生和研究生使用,也可供相关专业的科研、教学和技术人员参考。

由于编者水平有限,教材中难免存在不足之处或错误,敬请各位专家和读者批评指正。

编 者

2010 年 1 月

目 录

第一篇 概 论

第一章 实验室基本要求	(01)
第二章 生物化学实验基本常识	(04)
第一节 实验基本操作	(04)
第二节 实验误差与数据处理	(11)
第三节 实验样品的制备	(15)

第二篇 常用生物化学与分子生物学实验技术

第一章 光度法的原理与分光光度计的使用	(18)
第二章 层析技术	(25)
第三章 电泳技术	(34)
第四章 离心技术	(42)
第五章 分子杂交和印迹技术	(45)
第六章 PCR 技术的原理与应用	(47)

第三篇 基础生物化学实验

第一章 蛋白质	(50)
实验一 蛋白质定量分析(一):紫外线(UV)吸收法	(50)
实验二 蛋白质定量分析(二):BCA 法	(52)
实验三 蛋白质定量分析(三):Folin - 酚试剂法	(53)
实验四 蛋白质定量分析(四):考马斯亮蓝结合法	(55)
实验五 蛋白质定量分析(五):改良微量凯氏定氮法	(57)
实验六 血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	(59)
实验七 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS - PAGE)分离血清蛋白质	(61)
实验八 血清 γ - 球蛋白的提纯	(64)
第二章 酶和维生素	(67)
实验一 碱性磷酸酶的提取及比活性测定	(67)

实验二	酶促反应动力学实验	(69)
实验三	金氏法测定血清谷丙转氨酶活性	(75)
实验四	维生素 C 的提取与定量(2,4 - 二硝基苯肼法)	(77)

第三章 糖

实验一	血糖测定(葡萄糖氧化酶 - 过氧化物酶法)及肾上腺素对血糖浓度的影响	(79)
实验二	高糖膳食、饥饿和激素对肝糖原含量的影响	(81)

第四章 脂类

实验一	血清总胆固醇测定(硫磷铁法)	(83)
实验二	血清甘油三酯测定	(84)

第五章 核酸

实验一	核酸浓度测定(一):紫外线(UV)吸收法	(86)
实验二	核酸浓度测定(二):二苯胺法	(87)
实验三	鼠肝 DNA 的制备	(89)
实验四	细胞核的分离与核酸的鉴定	(92)

第四篇 基础分子生物学实验

实验一	感受态细胞的制备	(96)
实验二	质粒 DNA 的快速提取制备及酶切鉴定	(97)
实验三	聚合酶链式反应(PCR)及产物鉴定	(101)
实验四	蛋白质印迹免疫分析	(104)

第五篇 附 录

附录一	常用洗涤液的种类和用途	(106)
附录二	常用蛋白质分子量标准参照物	(106)
附录三	常用试剂等级表示法和用途	(107)
附录四	常用缓冲溶液浓度及 pH 范围	(107)
附录五	常用三种凝胶的种类型号及性能	(108)
附录六	硫酸铵饱和度的常用表	(109)
附录七	常用酸碱的比重与浓度的关系	(111)
附录八	常用缓冲液的配制方法	(111)
1.	广范围的缓冲液 pH 2.6 ~ 12.0	(111)
2.	柠檬酸 - Na ₂ HPO ₄ 缓冲液, pH 2.6 ~ 7.6	(112)
3.	柠檬酸 - 柠檬酸三钠缓冲液, pH 3.0 ~ 6.2	(113)
4.	醋酸 - 醋酸钠缓冲液, pH 3.7 ~ 5.6	(113)

5. 琥珀酸 - NaOH 缓冲液, pH 3.8 ~ 6.0	(114)
6. Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液, pH 5.8 ~ 8.0	(114)
7. Clark - Lubs 缓冲液(KH_2PO_4 - NaOH), pH 5.8 ~ 8.0	(115)
8. 三羟甲基氨基甲烷(Tris) - 盐酸缓冲液, pH 7.1 ~ 8.9(25℃)	(115)
9. Clark - Lubs 缓冲液(硼酸 - NaOH), pH 8.0 ~ 10.2	(116)
10. 硼酸缓冲液, pH 8.1 ~ 9.0(25℃)	(117)
11. 甘氨酸 - NaOH 缓冲液, pH 8.6 ~ 10.6(25℃)	(117)
12. Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液	(118)
13. 硼酸缓冲液, pH 9.3 ~ 10.7(25℃)	(118)
14. 碳酸缓冲液, pH 9.7 ~ 10.9(25℃)	(119)
15. 磷酸缓冲液, pH 11.0 ~ 11.9(25℃)	(119)
16. 纸上蛋白质电泳常用的几种缓冲液	(120)
参考文献	(120)

第一篇 概 论

第一章 实验室基本要求

一、实验目的

1. 学习基础的生物化学与分子生物学实验方法,为今后的学习与研究打下基础。
2. 培养学生严谨的科学作风、独立工作能力及科学的思维方法。
3. 培养学生爱护国家财物、爱护集体、团结互助的优良道德品质。
4. 培养学生的动手能力、书面及口头表达能力。

二、实验室规则

1. 实验前必须认真预习实验内容,明确本次实验目的,掌握实验原理、操作关键步骤及注意事项。

2. 实验时自觉遵守实验室纪律,保持室内安静。

3. 实验过程中要听从教师指导,认真按照实验步骤和操作规程进行实验,注意观察实验过程中出现的现象和结果,并认真进行实验记录,对实验结果展开讨论,结果不良时,必须重做。实验完毕及时整理数据,按时上交实验报告。

4. 实验中,将移液枪、吸量管、药品等用完后放回原处,实验台面、称量台、药品架、水池以及各种实验仪器内外都必须保持清洁整齐,严禁瓶盖及药勺混杂,切勿使药品(尤其是NaOH等)洒落在天平和实验台面上,毛刷用后必须立即挂好,各种器皿不得丢弃在水池内。

5. 多余的重要试剂和各种有污染的液体和凝胶,要按教师要求进行回收,如昂贵的Sephadex、Sephadex 凝胶、经溴化乙啶(EB)污染的琼脂糖凝胶及其电泳缓冲液等,用后必须及时回收,不得随意丢弃。

6. 配制的试剂和实验过程中的样品,尤其是保存在冰箱和冷室中的样品,必须贴上标签、写上品名、浓度、姓名和日期。放在冰箱中的易挥发溶液和酸性溶液必须严密封口。

7. 配制和使用洗液必须极为小心,强酸强碱必须倒入废液缸或稀释后排放。

8. 使用贵重精密仪器应严格遵守操作规程。使用分光光度计时不得将溶液洒在仪器内外和地面上。使用高速冷冻离心机和HPLC等大型仪器必须经过考核。仪器发生故障应立即报告教师,未经许可不得自己随意检修。

9. 对于酒精、乙醚等易燃性有机溶剂,使用时严禁明火,远离火源,若需加热要用水浴加热,不可直接在火上加热。

10. 离开实验室必须关好门窗,切断电源、水源,以确保安全。

三、实验记录及实验报告

1. 实验记录 详细、准确、如实地做好实验记录是极为重要的,记录如果有误,会导致

整个实验失败,这也是培养学生实验能力和严谨科学作风的一个重要方面。

(1) 每位同学必须准备一个实验记录本,实验前认真预习实验,看懂实验原理和操作方法,在记录本上写好实验预习报告,包括简要的实验流程图和数据记录表格等。

(2) 记录本上要编好页数,不得撕缺和涂改,写错时可以划去重写。不得用铅笔记录,只能用钢笔和圆珠笔。

(3) 实验中应及时准确地记录所观察到的现象和测量的数据,条理清楚,字迹端正,切不可潦草以致日后无法辨认。实验记录必须公正客观,不可夹杂主观因素。

(4) 实验中要记录的各种数据,都应事先在记录本上设计好各种记录格式和表格,以免实验中由于忙乱而遗漏测量和记录,造成不可挽回的损失。

(5) 实验记录要注意有效数字,如吸光度值应为“0.050”,而不能记成“0.05”。每个结果都要尽可能重复观测两次以上,即使观测的数据相同或偏差很大,也都应如实记录,不得涂改。

(6) 实验中要详细记录实验条件,如使用的仪器型号、编号、生产厂家等;生物材料的来源、形态特征、健康状况、选用的组织及其重量等;试剂的规格、化学式、分子质量、试剂的浓度等,都应记录清楚。

2. 实验报告 实验报告是实验的总结和汇报,是培养学生书面表达能力和科学作风的重要手段之一。通过实验报告的写作可以分析总结实验的经验,学会处理各种实验数据的方法,加深对有关生物化学与分子生物学原理和实验技术的理解和掌握,同时也是学习撰写科学研究论文的过程。实验报告的格式应为:①实验目的;②实验原理;③实验步骤;④数据处理;⑤结果讨论。

每份实验报告都要按照上述要求来写,实验报告的写作水平也是衡量学生实验成绩的一个重要方面。实验报告必须独立完成,严禁抄袭。实验报告使用的语言要简明清楚,抓住关键,各种实验数据都要尽可能整理成表格(三线表)并作图表示之,以便比较,一目了然。通常利用 Excel 或 SPSS 软件作图,每个图都要有明显的标题,坐标轴的名称要清楚完整,要注明合适的单位。

实验结果和讨论是实验报告书写的重中之重,一定要充分,尽可能多查阅一些有关的文献和教科书,充分运用已学过的知识,进行深入的探讨,勇于提出自己独到的分析和见解,并欢迎对实验提出改进意见。

四、组织与分组

1. 每一实验室推选学生课代表一名,负责下列工作:①实验报告的收集与分发;②安排清扫值日名单;③反映同学学习情况及对教学工作的意见;④其他临时性工作。

2. 一般实验都为每个学生单独进行。有的实验要两人一组,由相邻两学生组成固定小组。小组的成员在指导教师的同意下,可做适当的调整。

五、器材

1. 每次实验前,实验者应根据黑板上公布本实验使用的玻璃器皿种类与数目,检查分发给实验桌上的各种玻璃器皿,如有缺损应于清洗前立即向准备室负责老师补充、更换。实

验中如有破损,则必须登记,按学院规定处理。实验后应将玻璃器皿洗涤清洁,完整点交管理人员。

2. 公用仪器(包括贵重仪器,如分光光度计、离心机等)使用时间不宜过长,以免妨碍他人工作。设有使用登记薄的仪器,使用后必须登记,以示负责。

六、试剂

1. 每2~3人合用一份试剂,在一般情况下,使用的试剂应该固定。

2. 试剂瓶塞与量取用具(如吸管或滴管)不应与试剂瓶分开放置,用后应立即放回原处,量取用具应按规定放置。瓶塞与量具一旦弄错,试剂即受污染,实验就可能失败。

3. 标准试剂不应用潮湿吸管与之直接接触,取出后不得再放入原瓶。

第二章 生物化学实验基本常识

第一节 实验基本操作

一、玻璃仪器的清洗

实验中所用的玻璃仪器清洁与否,直接影响实验结果,往往由于仪器的不清洁或被污染而造成较大的实验误差,有时甚至会导致实验的失败。

1. 初用玻璃仪器的清洗 新购买的玻璃仪器表面常附着有游离的碱性物质,可先用洗涤剂或洗衣粉洗刷,再用自来水洗净,然后浸泡在1%~2%(体积分数)盐酸溶液中过夜(时间不可少于4h),再用自来水冲洗,最后用蒸馏水洗两次,在100℃~120℃烘箱内烘干备用。

2. 使用过的玻璃仪器的清洗 先用自来水洗刷至无污物,再用合适的毛刷蘸洗衣粉洗刷,或浸泡在洗涤剂中超声清洗(比色皿绝不可超声),然后用自来水彻底洗净去污剂,用蒸馏水洗两次,烘干备用(计量仪器不可烘干)。清洗标准是玻璃仪器洗净后,以倒置后内壁不挂有水珠为清洁标准。

3. 石英和玻璃比色皿的清洗 比色皿用毕后立即用自来水冲洗干净,再用蒸馏水反复冲洗,决不可用强碱清洗,因为强碱会腐蚀抛光的比色皿,也不可用试管刷或粗布擦拭。

二、塑料器皿的清洗

聚乙烯、聚丙烯等制成的塑料器皿,已经越来越多被使用。第一次使用塑料器皿时,可先用8mol/L尿素(用浓盐酸调pH值为1)清洗,接着依次用自来水1mol/L KOH和蒸馏水清洗,然后用 10^{-3} mol/L的EDTA除去金属离子的污染,最后用蒸馏水彻底清洗,以后每次使用时,可直接用洗涤剂清洗,然后用自来水和蒸馏水洗净即可。

三、铬酸洗液的配制

因已确定铬有致癌作用,因此配制和使用洗液时要极为小心,常用两种配制方法如下:

1. 取100mL浓硫酸置于烧杯内,小心加热,然后慢慢加入5g重铬酸钾粉末,边加边搅拌,待全部溶解并缓慢冷却后储存在容器内。

2. 称取5g重铬酸钾粉末,置于250mL烧杯中,加5mL水使其溶解,然后慢慢加入100mL浓硫酸,待其冷却后储存于容器内。

铬酸洗液一般呈棕色黏稠溶液,遇到有机溶剂或水过多时变为绿色,此时需要更换洗液。

四、移液操作

吸量管是生化实验最常用的仪器之一,测定的准确度和吸量管的正确选择和使用有密切关系。

(一) 吸量管的分类

常用的吸量管可以分为三类(图 1-1):

1. **奥氏吸量管** 供准确量取 0.5mL、1.0mL、2.0mL、3.0mL 液体所用。此种吸量管只有一个刻度,当放出所量取的液体时,管尖余留的液体必须吹入容器内。

2. **大肚吸管** 常用来量取 50mL、25mL、10mL、5mL、2mL、1mL 的液体,这种吸量管只有一个刻度,放液时,量取的液体自然流出后,管尖需在盛器内壁停留 15s,注意管尖残留液体不要吹出。

3. **刻度吸量管** 供量取 15mL 以下任意体积的溶液。一般刻度包括尖端部分。将所量液体全部放出后,还需要吹出残留于管尖的溶液。

此类吸量管为“吹出式”,吸量管上端标有“吹”字或“B”符号。未标“吹”字或“B”符号的吸量管,则不必吹出管尖的残留液体。

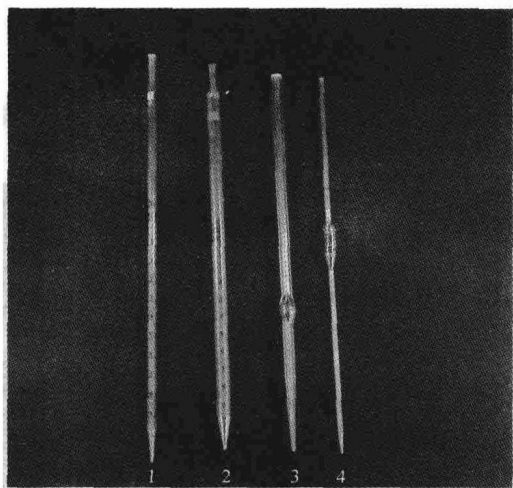


图 1-1 三类吸量管简图

1、2. 刻度吸量管 3. 奥氏吸量管 4. 大肚吸管

(二) 吸量管的使用

1. **选用原则** 准确量取整数量液体,应选用奥氏吸量管。量取大体积时要用大肚吸管。量取任意体积的液体时,应选用取液量最接近的刻度吸量管。如欲取 0.15mL 液体,应选用 0.2mL 的刻度吸量管。同一定量试验中,如欲加同种试剂于不同管中,并且取量不同时,应选择一支与最大取液量接近的刻度吸量管。如各试管应加的试剂量为 0.30mL、0.50mL、0.70mL、0.90mL 时,应选用一支 1.0mL 刻度吸量管。

2. **吸量管的使用** 使用吸量管时,用拇指和中指夹近顶端部分,将管的下端插入液体,用吸耳球吸入液体到需要刻度标线上 1~2cm 处(插入液面下的部分不可太深,也不可太浅,防止空气突然进入管内,将溶液吸入吸耳球内),用食指封闭上口将已充满液体的吸量管提出液面,把吸量管提到与眼睛同一水平线上,然后小心松开上口,调节液面至需要的刻度处。将吸量管移到另一容器,松开上口,使液体自由流出。最后再根据规定吹出或不吹出尖端的液体(图 1-2)。

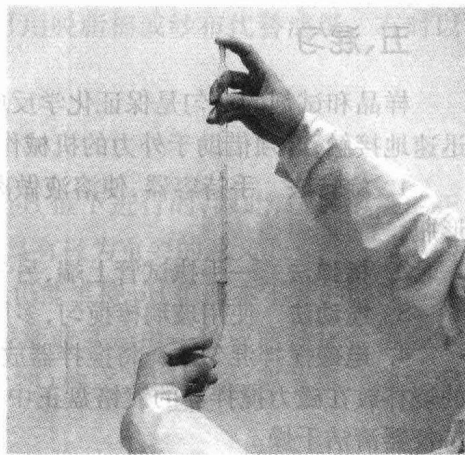


图 1-2 拿取吸量管的姿势

(三) 可调式移液器的使用

1. 可调式移液器的结构(图 1-3)

2. 可调式移液器的操作(图 1-4)

(1) 旋转调节轮至所需体积值;

(2) 套上吸头,旋紧;

(3) 垂直持握可调式移液器用大拇指按至第一档;

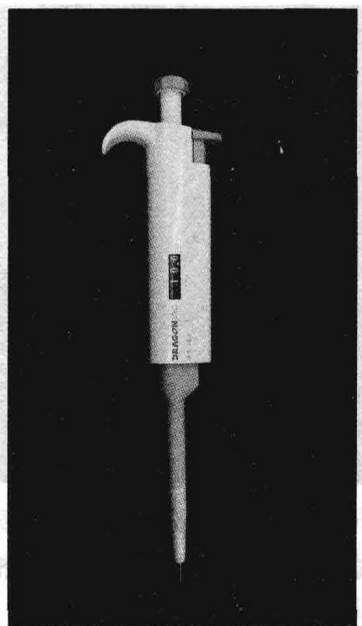


图 1-3 可调式移液器的结构



图 1-4 持移液器的姿势

注:推动按钮内部的活塞分两段行程,第一档为吸液,第二档为放液,手感十分清楚

(4)将吸头插入溶液,徐徐松开大拇指,使其复原;

(5)将可调式移液器移出液面,必要时可用纱布或滤纸拭去附于吸头表面的液体(注意:不要接触吸头孔口);

(6)排放时,重新将大拇指按下,至第一档后,继续按至第二档以排空液体。

注意:移取另一样品时,按卸尖按钮弃掉吸头并更换新吸头。

五、混匀

样品和试剂的混匀是保证化学反应充分进行的一种有效措施。为使反应体系内各物质迅速地接触,必须借助于外力的机械作用。常用的混匀方法有以下几种:

1. **旋转法** 手持容器,使溶液做离心旋转。适用于未盛满液体的试管或小口器皿如锥形瓶。

2. **指弹法** 一手执试管上端,另一只手轻弹试管下部,使管内溶液做旋涡运动。

3. **搅动法** 使用玻璃棒搅匀,多用于溶解烧杯中的固体。

4. **电磁搅拌混匀法** 将搅拌器放在平稳的工作台上,插上电源。将装有搅拌子和溶液的烧杯放在磁力搅拌器的镀铬盘正中,打开电源开关,调节转速或温度,开始搅拌。注意保持仪器清洁干燥。

5. **混匀器法** 将容器置于混匀器的振动盘上,逐渐用力下压,使内容物旋转。

注意:混匀时谨防容器内液体溅出或被污染;严禁用手堵塞管口或瓶口振摇。

六、保温

将容器放入恒温水浴箱,调节温度设定钮至所需温度。水浴箱中水量要充足,实验过程中要随时监测温度,并及时调节。

七、离心沉淀法

颗粒小而不均一、沉淀黏稠或容积小又需精确定量时,往往采取离心沉淀法。

低速离心机的使用:

1. **离心前检查** 取出所有套管,启动空载的离心机,观察是否转动平稳;检查套管有无软垫,是否完好,内部有无异物;离心管与套管是否匹配。

2. 离心原则

(1)平衡:将一对离心管放入一对套管中,置于已平衡好的天平两侧,用滴管向较轻一侧的离心管与套管之间滴水至两侧平衡。

(2)对称:将已平衡好的一对管置于离心机中的对称位置。

3. **离心操作** 对称放置配平后的套管,取出多余的套管,盖严离心机盖。调节转速调节钮,逐渐增加转速至所需值,计时。离心完毕后,缓慢将转速调回零。待离心机停稳后取出离心管,并将套管中的水倒净,所有套管放回离心机中。

4. 注意事项

(1)离心的启动、停止都要慢,否则离心管易破碎或液体从离心管中溅出。

(2)离心过程中,若听到特殊响声,应立即停止离心,检查离心管。若离心管已碎,应清除并更换新管;若管未碎,应重新平衡。

八、过滤

用于收集滤液,收集沉淀或洗涤沉淀。在生化实验中如用于收集滤液应选用干滤纸,不应将滤纸先弄湿,湿滤纸将影响滤液的稀释比例。滤纸过滤一般采用平析法(即对折后,再对折)并且使滤纸上缘与漏斗壁完全吻合,不留缝隙。向漏斗内加液时,要用玻棒引导而且不应倒入过快,勿使液面超过滤纸上缘。较粗的过滤可用脱脂棉或纱布代替滤纸。有时以离心沉淀法代替过滤法可达到省时、快捷的目的。

九、缓冲溶液与 pH 值测定

生物体内进行的各种生物化学过程都是在精确的 pH 值下进行的,因此,缓冲溶液的正确配制和 pH 值的准确测定,在生物化学的研究工作中具有极为重要的意义。

缓冲溶液是一类能够抵制外界少量酸和碱的影响,仍能维持 pH 值基本不变的溶液。该溶液的这种抗 pH 值变化的作用称为缓冲作用。缓冲溶液通常是由一种或两种化合物溶于溶剂(即纯水)所得的溶液,溶液内所溶解的溶质(化合物)称之为缓冲剂,调节缓冲剂的配比即可制得不同 pH 值的缓冲液。

(一)生物化学常用缓冲液

1. **磷酸盐缓冲液** 磷酸盐(H_2PO_4^- 和 HPO_4^{2-})是生物化学研究中使用最广泛的一种缓冲剂,由于它们是二级解离,有 2 个 pK_a 值,所以用它们配制的缓冲液, pH 范围最宽。

酸性缓冲液: H_2PO_4^- , pH 值为 1~4。

中性缓冲液:用混合的两种磷酸盐, pH 值为 6~8。

碱性缓冲液:用 HPO_4^{2-} , pH 值为 10~12。

磷酸盐缓冲液的优点为:①容易配制成各种浓度的缓冲液;②适用的 pH 范围宽;③pH 受温度的影响小;④缓冲液稀释后 pH 变化小,如稀释 10 倍后 pH 的变化小于 0.1。其缺点为:①易与常见的钙 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子以及重金属离子缔合生成沉淀;②会抑制某些生物化学过程,如对某些酶的催化会产生某种程度的抑制作用。

2. Tris 缓冲液 Tris 缓冲液在生物化学研究中多用于电泳缓冲液。SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳中都使用 Tris 缓冲液,而很少再用磷酸盐缓冲液。

Tris 缓冲液的常用有效 pH 范围是在“中性”范围,例如:

Tris - HCl 缓冲液: pH 值为 7.5 ~ 8.5;

Tris - 磷酸盐缓冲液: pH 值为 5.0 ~ 9.0。

Tris - HCl 缓冲液的优点是:①因为 Tris 的碱性较强,所以可以只用这一种缓冲体系,配制 pH 范围由酸性到碱性的大范围 pH 值的缓冲液;②对生物化学过程干扰很小,不与钙、镁离子及重金属离子发生沉淀。其缺点是:①缓冲液的 pH 值受溶液浓度影响较大,缓冲液稀释 10 倍, pH 值的变化大于 0.1;②温度效应大,温度变化对缓冲液 pH 值的影响很大,例如:4℃时缓冲液的 pH 值为 8.4,则 37℃时的 pH 值为 7.4,所以一定要在使用温度下进行配制,室温下配制的 Tris - HCl 缓冲液不能低于 0℃ ~ 4℃;③易吸收空气中的 CO_2 ,所以配制的缓冲液要盖严密封;④此缓冲液对某些 pH 电极发生一定的干扰作用,所以要使用与 Tris 溶液具有兼容性的电极。

3. 有机酸缓冲液 这一类缓冲液多数是用羧酸与它们的盐配制而成, pH 值范围为酸性,即 pH 值为 3.0 ~ 6.0,最常用的是甲酸 - 甲酸盐缓冲液、乙酸 - 乙酸钠和柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲体系。

有机酸缓冲液的缺点是:①所有这些羧酸都是天然的代谢产物,因而对生化反应过程可能发生干扰作用;②柠檬酸盐和琥珀酸盐可以和金属离子(Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 等)结合而使缓冲液受到干扰;③这类缓冲液易与 Ca^{2+} 离子结合,所以样品中有 Ca^{2+} 离子时,不能用这类缓冲液。

4. 硼酸盐缓冲液 常用的有效 pH 范围是 8.5 ~ 10.0,因而它是碱性范围内最常用的缓冲液,其优点是配制方便,只使用一种试剂;缺点是能与很多代谢产物形成络合物,尤其是能与糖类的羟基反应生成稳定的复合物而使缓冲液受到干扰。

5. 氨基酸缓冲液 此缓冲液使用的范围宽,可用于 pH 值为 2.0 ~ 11.0,最常用的有甘氨酸 - HCl 缓冲液: pH 值为 2.0 ~ 5.0;甘氨酸 - NaOH 缓冲液: pH 值为 8.0 ~ 11.0;甘氨酸 - Tris 缓冲液: pH 值为 8.0 ~ 11.0。

此类缓冲体系的优点是:为细胞组分和各种提取液提供更接近的天然环境。其缺点是①与羧酸盐和磷酸盐缓冲体系相似,也会干扰某些生物化学反应过程;②试剂的价格较高。

(二) pH 值的测定

测定溶液 pH 值通常有两种方法。

1. pH 试纸法 最简便但较粗略的方法是用 pH 试纸,其分为广泛和精密 pH 试纸两种。广泛 pH 试纸的变色范围是 pH 值为 1 ~ 14、6 ~ 8、9 ~ 14 等,只能粗略确定溶液的 pH 值。另一种是精密 pH 试纸,可以较精确地测定溶液的 pH 值,其变色范围是 2 ~ 3 个 pH 单位并可以通过不同指示剂进行比对,例如有 pH 值为 4.0 ~ 7.0、8.0 ~ 10.0 等多种,可根据待测溶液的酸、碱性选用某一范围的试纸。测定的方法是将试纸条剪成小块,用镊子夹一小块试纸

(不可用手拿,以免污染试纸),用玻璃棒蘸少许溶液与试纸接触,试纸变色后与色阶板对照,估读出所测 pH 值,切不可将试纸直接放入溶液中,以免污染样品溶液,也可将试纸块放在白色点滴板上观察和估测。试纸要存放在有盖的容器中,以免受到实验室内各种气体的污染。

2. pH 计法 精确测定溶液 pH 值要使用 pH 计,其精确度可达 0.005 个 pH 单位,关键是要正确选用和校对 pH 电极。过去是使用两个电极,即玻璃电极和参比电极,目前已被淘汰,被两种电极合一的复合电极所代替,即将它们共同组装在一根玻璃管或塑料管内,下端玻璃泡处有保护罩,使用十分方便,尤其是便于测定少量液体的 pH 值。

使用时应注意:

(1)经常检查电极内的 4mol/L KCl 溶液的液面,如液面过低则应补充 4mol/L 的 KCl 溶液。

(2)玻璃泡极易破碎,使用时必须极为小心。

(3)复合电极长期不用,可浸泡在 2mol/L 的 KCl 溶液中,平时可浸泡在无离子水或缓冲溶液中,使用时取出,用蒸馏水冲洗玻璃泡部分,然后用吸水纸吸干余水,将电极浸入待测溶液中,稍加搅拌,读数时电极应静止不动,以免数字跳动不稳定。

(4)使用时复合电极的玻璃泡和半透膜小孔要浸入到溶液中。

(5)使用前要用标准缓冲液校正电极,常用的 3 种标准缓冲液 pH 值 4.00、6.88 和 9.23 (20℃),精度为 ± 0.002 pH 单位。校正时先将电极放入 6.88 的标准缓冲液中,用 pH 计上的“标准”旋钮校正 pH 读数,然后取出电极洗净,再放入 pH 值为 4.00 或 9.23 的标准缓冲液中,用“斜率”旋钮校正 pH 读数,如此反复多次,直至两点校正正确,再用第三种标准缓冲液检查。现在有的 pH 计可以自动校正,按“yes”确定即可,标准缓冲液不用时应冷藏。

(6)电极的玻璃泡容易被污染。若测定浓蛋白质溶液的 pH 值时,玻璃泡表面会覆盖一层蛋白质膜,不易洗净而干扰测定,此时可用 0.1mol/L 的 HCl 和 1mg/mL 胃蛋白酶溶液浸泡过夜。若被油脂污染,可用丙酮浸泡。若电极保存时间过长,校正数值不准时,可将电极放入 2mol/L 的 KCl 溶液中,40℃ 加热 1h 以上,进行电极活化。

(7)溶液 pH 值取决于溶液中的离子活度而不是浓度,只有在很稀的溶液中,离子的活度才与其浓度相等。生化实验中经常配制比使用浓度高 10 倍的“贮液”,使用时再稀释到所需浓度,由于浓度变化很大,溶液 pH 会有变化,因而,稀释后仍需对其 pH 进行调整。

(8)有的缓冲液(如“Tris”)的 pH 值受温度影响很大,所以配制和使用都要在同一温度下进行。

十、舍弃物的处理

实验舍弃物必须依照其性质作适当处理,以免造成实验材料浪费,损坏水槽及下水管道,或污染实验环境。

1. 所有固体舍弃物(例如用过的滤纸、损坏的软木塞及橡皮物、玻璃碴、火柴梗等),必须放入废物筒或篓中,切勿丢于水槽中。

2. 废硫酸或洗液,应先倾入大量水中,再倒入水槽中,并以大量水冲走。

3. 实验完成后的沉淀或混合物,若含有可提取或收回的贵重物品者,不可随意舍弃,应放入教师指定的回收器中。