

基础医学实验系列教材

总主编 肖子曾 严杰 总主审 黄政德



新世纪全国高等中医药院校创新教材

XIN SHI JI QUAN GUO GAO DENG ZHONG YI YAO YUAN XIAO
CHUANG XIN JIAO CAI

生物化学与分子生物学实验教程

(供医药类各专业用)

主 编 张 波

全国百佳图书出版单位

中国中医药出版社



新世纪全国高等中医药院校创新教材
基础医学实验系列教材

总主编 肖子曾 严 杰 总主审 黄政德

生物化学与分子生物学实验教程

(供医药类各专业用)

主 编 张 波

中国中医药出版社

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学与分子生物学实验教程/张波主编. —北京: 中国中医药出版社, 2013. 2
基础医学实验系列教材

ISBN 978 - 7 - 5132 - 1326 - 4

I. ①生… II. ①张… III. ①生物化学 - 实验 - 中医学院 - 教材②分子生物学 - 实验 - 中医学院 - 教材 IV. ①Q5 - 33②Q7 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 025426 号

中国中医药出版社出版

北京市朝阳区北三环东路 28 号易亨大厦 16 层

邮政编码 100013

传真 010 64405750

北京市泰锐印刷有限责任公司印刷

各地新华书店经销

*

开本 787 × 1092 1/16 印张 12.5 字数 274 千字

2013 年 2 月第 1 版 2013 年 2 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978 - 7 - 5132 - 1326 - 4

*

定价 25.00 元

网址 www.cptcm.com

如有印装质量问题请与本社出版部调换

版权专有 侵权必究

社长热线 010 64405720

购书热线 010 64065415 010 64065413

书店网址 csln.net/qksd/

官方微博 <http://e.weibo.com/cptcm>

《基础医学实验系列教材》

专家指导委员会

总 主 编 肖子曾 严 杰
总 主 审 黄政德
编 委 (以姓氏笔画为序)

万红姣	文礼湘	邓冰湘	艾碧琛
卢芳国	成细华	伍参荣	刘群良
刘慧萍	孙贵香	严 杰	杜 可
杨胜辉	李 杰	李新华	李鑫辉
李迎秋	肖子曾	吴长虹	何 倩
余望贻	宋 岚	张 波	张国民
陈 安	欧阳建军	赵爱明	胡 梅
胡方林	郭春秀	唐 群	曾 辉
曾 嵘	雷久士	廖 君	熊艾君

编委会秘书 刘慧萍

《生物化学与分子生物学实验教程》编委会

主 编 张 波

副主编 宋 岚 成细华 胡 梅

编 委 (以姓氏笔画为序)

尹抗抗 成细华 刘文龙 刘群良

许光明 李 玲 李孟贤 何桂霞

宋 岚 张 波 张月娟 陈伶利

周芳亮 周赛男 胡 梅 程莉娟

前 言

随着现代医学科学技术、教育科学技术的进步与发展,医学教学理念也发生了深刻变化。尤其是在基础医学教学领域,不仅要求在教学过程中传授理论知识,更要求加强学生动手能力的训练,而且还要求教学方法、内容、手段规范和先进,以适应高等中医药院校发展的要求。

为此,湖南中医药大学在近20年基础医学实验教学改革的基础上,借鉴其他院校的经验,依照教育部对实验教学改革的要求,编写了本套基础医学实验系列教材,包括《人体解剖学实验教程》、《医学显微形态学实验教程》、《医学免疫学与病原生物学实验教程》、《生物化学与分子生物学实验教程》、《医学机能学实验教程》、《中医学基础实验教程》6本,主要适用于高等中医药院校各专业基础医学实验课程的教学。本系列教材打破了传统的学科界限,将性质相似的实验课重新组合;改变了传统的实验模式,提高了综合性实验和设计性实验的比例;用现代实验方法验证中医的经典理论。

由于我校基础医学实验教学条件所限,该套教材难免存在不足之处,恳请读者、教师和学生提出宝贵意见,以便再版时修订提高。

《基础医学实验系列教材》

编委会

2012年9月

编写说明

随着生命科学的迅猛发展，生物化学与分子生物学技术已越来越多的应用到了医学，成为医学领域检测与研究的常规技术手段。为了培养中医药学创新型人才，与世界接轨，我们在生物化学与分子生物学的实验教学中进行了改革：根据实验室条件，尽可能删除一些落后的实验方法，引进先进的实验技术；在原有实验教材的基础上，减去了部分验证性实验，加强了生物化学与分子生物学技术训练的实验；为了突出本教材的中医药特色，我们还将研究中较成熟的中医药实验编写为实验项目，希望对中医药作用机理的研究起到抛砖引玉的作用。

本教材分两个部分。第一部分是生物化学技术原理与实验，首先对生物化学实验的基本技能、基本原理进行系统介绍，然后利用实验进一步阐释原理与技术，以使学生掌握生物化学的基本技术与基本技能，并尽量使实验项目贴近临床。第二部分是分子生物学技术原理与实验，在系统介绍常用的分子生物学技术原理后，通过系统的实验项目，详细介绍了目前常用的分子生物学实验方法，这中间多数实验是编写人员反复验证的。我们希望这些实验项目能够为进行中医药机理研究的教师与研究生提供切实可行的指导与参考。

本教材由主编拟定大纲，各作者分工编写，集体审阅、讨论、定稿，是各位同仁精诚合作、辛勤劳动的共同结果。尽管我们尽了最大努力编写本教材，但疏漏、不妥之处在所难免，敬望广大师生批评并提出宝贵意见。

在本书的编写过程中，得到了湖南师范大学生命科学院转基因动物室老师和研究生的大力支持，北京中医药大学的唐炳华教授也为本书提出了宝贵意见，在此表示最诚挚的谢意。

《生物化学与分子生物学实验教程》

编委会

2012年12月

目 录

第一篇 生物化学技术原理与实验

第一章 基本操作与试剂的配制	1
第一节 实验器皿的洗涤	1
第二节 试剂的配制	3
第三节 试剂的分类与保存	13
第二章 离心技术	16
第三章 层析分离技术原理	22
第一节 层析的基本原理	22
第二节 层析方法	23
第四章 质谱分析	30
第一节 质谱基本原理及质谱仪	30
第二节 质谱中的主要离子及质谱解析	36
第三节 层析-质谱联用技术	39
第五章 电泳技术	41
第一节 概述	41
第二节 电泳的基本原理	42
第三节 区带电泳技术	46
第四节 染色方法	61
第六章 光谱分析技术	65
第一节 分光光度法	65
第二节 荧光光谱分析法	70
第七章 生物化学实验方法	72
实验一 血红蛋白吸收曲线的绘制	72
实验二 茚三酮反应与蛋白质等电点的测定	73
实验三 蛋白质的沉淀	76
实验四 肝组织中核酸的分离与鉴定	78
实验五 pH、激活剂、抑制剂对酶活性的影响	81
实验六 丙二酸对琥珀酸脱氢酶活性的影响	83
实验七 血清胆固醇测定	84
实验八 维生素 C 的测定	86

实验九	邻甲苯胺法测定血糖浓度	88
实验十	醋酸纤维薄膜电泳观察严重肝硬化病人与正常人血清蛋白的区别	90
实验十一	血清丙氨酸转氨酶活性检测	93
实验十二	平板聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白	95
实验十三	核黄素荧光定量测定	97
实验十四	麻杏石甘汤对流感病毒神经氨酸酶活性的影响 ...	98
实验十五	碱性磷酸酶米氏常数的测定(双倒数法)	100
实验十六	考马斯亮蓝法测定蛋白质含量	102
实验十七	乳酸脱氢酶及其辅酶的作用	103
实验十八	亲和层析纯化胰蛋白酶	105

第二篇 分子生物学技术原理与实验

第一章	聚合酶链反应技术原理	109
第一节	PCR 技术的基本原理	109
第二节	PCR 反应体系	111
第三节	PCR 过程与应用	114
第二章	重组 DNA 技术原理	119
第一节	重组 DNA 技术中的工具	119
第二节	DNA 重组的过程	123
第三章	核酸分子杂交技术	128
第一节	核酸的变性、复性与核酸探针	128
第二节	核酸分子杂交	132
第四章	生物大分子相互作用技术原理	135
第五章	分子生物学实验方法	141
实验一	大肠杆菌感受态的制备及质粒转化	141
实验二	外周血白细胞 DNA 提取(微量法)	143
实验三	肝组织总 RNA 的提取与电泳鉴定	145
实验四	GAPDH mRNA 的逆转录 PCR	146
实验五	从琼脂糖凝胶中回收目的 DNA	148
实验六	质粒 DNA 的微量快速提取	149
实验七	利用 PCR 产物构建真核生物表达载体	151
实验八	克隆化基因在大肠杆菌的诱导表达	154
实验九	细胞培养实验	156
实验十	SDS-PAGE 测定蛋白质分子量	157
实验十一	蛋白质的 Western 印迹实验	162
实验十二	DNA 印迹(Southern Blot) 杂交实验	164

实验十三	荧光定量 PCR 检测乙型肝炎病毒含量	168
实验十四	琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡.....	171
实验十五	染色质免疫沉淀实验 (ChIP)	173
实验十六	酵母双杂交系统确定蛋白质相互作用实验.....	175
实验十七	RNA 干扰实验	178
实验十八	电泳迁移率实验.....	181
实验十九	荧光素酶报告检测 TRAF2 对 NF κ B 活化的影响	184

的器皿。

7. 1mmol/L EDTA 溶液, 用于除去塑料容器内壁污染的金属离子。

8. 5% ~ 10% 磷酸三钠溶液, 用于洗涤污物。

9. KOH 的乙醇溶液和含有高锰酸钾的氢氧化钠 (NaOH) 溶液, 适用于清除容器内壁污垢。这两种强碱性洗涤液对玻璃仪器的侵蚀性很强, 故洗涤时间不宜过长, 使用时应小心慎重。

10. 有机溶剂如丙酮、乙醇、乙醚等, 可用于洗脱油脂、脂溶性染料等污痕; 二甲苯可洗脱油漆类污垢。

二、初用玻璃器皿的洗涤

新购置的玻璃器皿表面常附有游离的碱性物质, 可先用含 0.5% 去垢剂溶液洗刷, 再用自来水洗净, 然后浸泡在 1% ~ 2% HCl 溶液中过夜, 次日取出用自来水充分冲洗, 最后再用蒸馏水漂洗 3 次, 置烘箱内烘干或倒置晾干备用。

三、使用过的玻璃器皿的洗涤

1. 一般玻璃器皿洗涤

污染物易黏附于玻璃容器的内壁上, 每次使用后均须及时清洗。一般先用自来水冲洗至无污物, 再用去垢剂洗涤或浸泡于 0.5% 去垢剂溶液中, 将器皿 (特别是内壁) 仔细刷洗后, 用自来水充分洗净, 最后用蒸馏水漂洗 3 次, 置烘箱烘干后放置在清洁处备用。凡洗净的玻璃器皿, 其壁上不沾水珠, 否则表明尚未洗净, 应按上述方法重新洗涤。

对于高灵敏度的分析及检测实验所用的器皿, 除用上述方法清洗外, 还需其他方法彻底清除污染物。玻璃器皿应浸泡于铬酸洗液中 4 ~ 6 小时, 再用自来水充分冲洗和蒸馏水漂洗, 烘干或晾干备用。如有必要还可用浓 HNO_3 洗涤及处理, 最后用双蒸水充分漂洗, 这样可使器壁上污染的金属离子得以清除。

具有传染性样品的容器, 如病毒、传染病患者的血清等污染的容器, 先进行消毒处理后再进行清洗。盛过毒物的容器, 特别是盛过剧毒药品和放射性同位素物质的容器, 必须经过专门处理, 确知没有残余毒物或放射性物质存在方可进行清洗。

2. 吸量管、量筒等玻璃量具的洗涤

吸量管、量筒等玻璃量具每次使用后须及时用流水冲洗或浸泡于冷水中, 特别是吸取黏滞性较大的液体后应立即用流水充分冲洗, 以免物质干涸甚至造成堵塞。通常使用过的玻璃量具经自来水冲洗后, 可浸泡于 0.5% 去垢剂溶液或铬酸洗液中 (不少于 4 小时), 然后依次用自来水充分冲洗和蒸馏水漂洗, 晾干备用。玻璃量具不能烘烤, 只能晾干或风干。

3. 玻璃与石英比色皿的清洗

比色皿使用后应立即用蒸馏水充分冲洗, 倒置在清洁处晾干备用。所有比色皿均可先用含 0.5% 去垢剂溶液的脱脂棉小心地清洗, 然后用大量蒸馏水充分漂洗干净, 倒置

晾干。切忌用氢氧化钾的乙醇溶液及其他强碱性洗涤液清洗比色皿,否则会严重腐蚀比色皿。

四、塑料器皿的洗涤

新购买的塑料器皿一般先用自来水清洗,然后以 pH 为 1.0 的 8mol/L 尿素溶液洗涤,蒸馏水漂洗,再用 1mol/L KOH 溶液洗涤,蒸馏水漂洗,接着用 1mmol/L EDTA 溶液洗涤,以除去金属离子,最后用蒸馏水充分漂洗,倒置晾干备用。经过上述洗涤步骤处理的器皿,每次使用后可用 0.5% 去垢剂溶液洗涤,再依次用自来水充分冲洗和蒸馏水漂洗,晾干后使用。也可按碱→尿素→EDTA 洗涤液顺序处理,以除去器皿上的污染物。

多数塑料器皿可在烘箱中烘干,但温度不宜过高。硝酸纤维制品不能用烘箱干燥,因为硝酸纤维是一种易爆物。

第二节 试剂的配制

在试剂的配制过程中,常用的仪器有吸量管、可调移液管、天平和酸度计。缓冲溶液是很多实验中使用的的基本溶液,为了方便实验的准备,本节对常用缓冲溶液的配制也进行了介绍。

一、吸量管

吸量管是用来转移一定体积溶液的量器。

1. 吸量管的分类

生化实验中常用的吸量管有以下三种:

(1) 刻度吸量管 刻度吸量管有刻度刻到尖端的及不刻到尖端的两种,使用前要仔细辨认。如使用刻度刻到尖端者,将液体放出后,应吹出最后留在管内的少量液体。

(2) 移液吸量管 一般只在上端有一个刻度,将所量取的液体放出后,只需将吸量管的尖端触及受器壁约半分钟即可,不得吹出尖端的液体。

(3) 奥氏吸量管 准确度最高,使用时必须吹出留在尖端的液体。

2. 吸量管的使用

首先应选择合适量程的吸量管。所选用吸量管的最大刻度一般应等于或略大于需要量取溶液的体积,因为吸量管相对于所需量取的体积太大或太小均会造成较大误差。

拿吸量管时,标有刻度的一侧要向着自己,以便于读取刻度。用右手中指和拇指拿住吸量管上部,把管的尖端插入要取的液体中。左手持洗耳球把容器内液体吸至刻度上方后立即用右手食指按住吸量管管口,使吸量管内的液面不下降。提起吸量管离开容器液面,将吸量管尖端接触容器内壁,以清除吸量管外壁所沾液体,再慢慢放松食指使液面下降,当眼睛与选取的刻度线处于同一水平面上时使吸量管内液面的最低点下降至刻度处,立即用食指堵紧。然后将吸量管插到需加液体的容器中,让其尖端与容器内壁靠

紧, 松开食指让液体流出。液体流完后再等约 15 秒, 捻动一下吸量管后移去。如需吹的吸量管, 则吹出尖端的液体后再捻转一下吸量管移去。

二、可调移液器

可调移液器由塑料制成, 使用方便, 取、加样迅速, 计量准确, 不易破损, 能吸取多种样品, 只需更换吸嘴。在一定范围内, 可根据需要调节移液量, 如 $0 \sim 200 \mu\text{l}$ 。

具体使用方法如下: 吸液前先把吸嘴套在吸引管上, 套上后要轻轻地旋紧一下, 以保证接合严密。持法见图 1-1-1。用大拇指按下按钮到第一停止点, 以排出一定容积空气, 此时已可吸液。吸液时把吸嘴尖浸入取样液面下约 0.5 cm 处, 慢慢放松大拇指, 让按钮自行复原, 再将吸嘴尖接触容器内壁, 以清除吸嘴外壁所沾液体, 即完成取样。排液时, 将移液器的吸嘴尖置于加样容器壁上, 用拇指慢慢地将按钮按下到第一停止点, 停留约 3 秒 (黏性较高的溶液停留时间长些)。然后把按钮按到第二停止点, 再让吸嘴沿着容器内壁向上滑动。当吸嘴尖与容器壁或溶液不接触时释放按钮, 使其返回到初始位置。



图 1-1-1 可调移液器的持法

三、分析天平

分析天平是定量分析工作中不可缺少的重要仪器, 充分了解仪器性能及熟练掌握其使用方法, 是获得可靠分析结果的保证。分析天平的种类很多, 现在普通使用的分析天平为电子分析天平。下面就电子分析天平的使用方法及注意事项做一简要介绍。

1. 电子分析天平的使用方法

- (1) 检查并调整天平至水平位置。
- (2) 检查电源电压是否匹配 (必要时配置稳压器), 按仪器要求通电预热至所需时间。
- (3) 预热足够时间后打开天平开关, 天平则自动进行灵敏度及零点调节。待稳定标志显示后, 可进行正式称量。
- (4) 称量时将洁净称量瓶或称量纸置于称盘上, 关上侧门, 轻按一下去皮键, 天平将自动校对零点, 然后逐渐加入待称物质, 直到所需重量为止。
- (5) 被称物质的重量是显示屏数值稳定后所显示的数值。
- (6) 称量结束后应及时除去称量瓶 (纸), 关上侧门, 切断电源, 并做好使用情况登记。

2. 电子分析天平使用时的注意事项

- (1) 天平应放置在牢固平稳水泥台或木台上, 室内要求清洁、干燥及较恒定的温

度, 同时应避免光线直接照射到天平上。

(2) 称量时应从侧门取放物质, 读数时应关闭箱门以免空气扰动影响称量。前门仅在检修或清除残留物质时使用。

(3) 电子分析天平若长时间不使用, 则应定时通电预热, 每周一次, 每次预热 2 小时, 以确保仪器始终处于良好状态。

(4) 天平箱内应放置吸潮剂(如硅胶), 当吸潮剂吸水变色, 应立即高温烘烤更换, 以确保吸湿性能。

(5) 挥发性、腐蚀性、强酸强碱类物质应盛于带盖称量瓶内称量。

(6) 称量物如散落在天平箱内, 应及时清除, 否则容易腐蚀损坏天平。

四、酸度计

酸度计又称 pH 计, 由电极和电计两部分组成, 是测量 pH 值的精密仪器, 也可用来测量电动势。测量某溶液的 pH 值前, 需先用特定的标准缓冲溶液对酸度计进行校正。使用过程中, 应注意保护电极。

1. 标准缓冲溶液的配制与保存

酸度计所用标准缓冲溶液的试剂容易提纯, 也比较稳定。配制时应力求精准, 配制后应妥善保存。

(1) 配制的常用方法 ①pH = 4.00 的标准缓冲溶液: 称取在 105℃ 干燥 1 小时的邻苯二甲酸氢钾 5.07g, 加双蒸水溶解, 定容至 500ml。②pH = 6.88 的标准缓冲溶液: 称取在 130℃ 干燥 2 小时的磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 3.401g, 无水磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) 3.549g, 加双蒸水溶解, 定容至 500ml。③pH = 9.18 的标准缓冲溶液: 称取无水硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) 2.02g, 加双蒸水溶解, 定容至 100ml。

(2) 配制与保存的注意事项 ①pH 标准物质应保存在干燥的地方。如混合磷酸盐 pH 标准物质在空气湿度较大时会发生潮解, 一旦出现潮解, pH 标准物质即不可使用。②配制 pH 标准溶液, 一般应使用二次蒸馏水或者去离子水。如果是用于 0.1 级 pH 计测量, 则可以用普通蒸馏水。③配制 pH 标准溶液时, 应使用较小的烧杯来溶解标准物质, 以减少沾在烧杯壁上的液体量。对于市售时已称量好并独立包装于塑料袋或其他容器中的 pH 标准物质, 在尽量倒干净以后, 还需用双蒸水多次冲洗, 将洗液一并倒入溶液中, 以保证配制的 pH 标准溶液准确无误。④配制好的标准缓冲溶液一般可保存 2~3 个月。如发现有浑浊、发霉或沉淀等现象, 不能继续使用。⑤碱性标准溶液应装在聚乙烯瓶中密闭保存。防止二氧化碳进入标准溶液后形成碳酸, 降低其 pH 值。

2. pH 计的使用与电极保养

(1) 电极不用时, 可充分浸泡在 3mol/L 氯化钾溶液中, 切忌用洗涤液或其他吸水性试剂浸泡。

(2) 使用前, 检查玻璃电极前端的球泡。正常情况下, 电极应该透明、无裂纹, 球泡内要充满溶液, 不能有气泡存在。

(3) 使用时, 将电极从保护套中取出, 蒸馏水冲洗, 再用滤纸吸去水分后, 用标准液对 PH 计进行校准。

(4) pH 计经过校准后, 即可对溶液进行测量 (不同 pH 计有各自的标准操作方法)。

(5) 测量浓度较大的溶液时, 应尽量缩短测量时间, 用后仔细清洗, 防止被测液黏附在电极上而污染电极。

(6) 清洗电极后, 不要用滤纸擦拭玻璃膜, 而应用滤纸吸干, 避免损坏玻璃薄膜并防止交叉污染, 影响测量精度。

(7) 电极不能用于强酸、强碱或腐蚀性溶液。严禁在脱水性介质如无水乙醇、重铬酸钾溶液中使用。

五、溶液的混匀与过滤

1. 溶液的混匀

欲使一反应充分进行, 必须使反应体系内各种物质分子很好地互相接触, 因此, 每加一种试剂后, 都必须充分混匀。当溶液稀释时, 亦需充分混匀, 才能获得浓度均一的溶液。

混匀的方法通常有以下几种: ①手持试管上端, 使管内溶液作旋转运动; ②利用漩涡混合器混匀; ③用干燥清洁的玻璃棒搅匀; ④用磁力搅拌器混匀。

无论用何种方法混匀, 均需防止盛器内液体溅出或被污染, 严禁用手指堵塞管口或瓶口震荡混匀。

2. 溶液的过滤

为了将液体中的固体微粒与液体分离, 除去液体中掺杂的不溶于溶剂的杂质, 我们常采用过滤的方法。过滤有普通过滤、减压过滤及保温过滤等, 在此仅介绍普通过滤。

(1) 过滤前的准备 取一张圆形的滤纸, 对折两次, 打开 (一边为三层, 一边为一层) 得一圆锥体, 将其放入干燥干净的漏斗中。漏斗的边缘要比滤纸边缘高出大约 0.5 ~ 1cm。漏斗壁与滤纸应完全密合。可用欲过滤的液体润湿一下滤纸, 并用玻璃棒小心地按压滤纸, 使滤纸各处紧密地贴在漏斗壁上, 不要留有小气泡。

(2) 过滤 过滤时漏斗必须放正, 它的边缘应处于水平面上。漏斗下部的尖端应与接收溶液的容器内壁接触, 这样可避免溶液流下时飞溅。向漏斗内倾注液体时, 用一只手拿着玻璃棒 (通常是左手), 让玻璃棒差不多与滤纸垂直, 液体一定要顺着玻璃棒往下流。液体最多允许加到距滤纸边缘下 5mm 处, 若液体加得过高, 沉淀物会随溶液浮起, 黏附于漏斗壁而混入滤液中。向漏斗内加完液体后, 要把盛有待滤液体的容器沿着玻璃棒向上滑动一下, 以免待滤液体流到容器外面。

六、常用缓冲溶液的配制

生物体内进行的各种生物化学反应都是在精确的 pH 值下进行的, 改变 pH 值可以

影响反应的速度与进程,因此缓冲溶液的正确配制是进行生物化学实验的基础。

1. 磷酸盐缓冲溶液

磷酸盐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,有两个 pK_a 值,所以用它们配制的缓冲溶液, pH 范围最宽,在 1~12 之间。

通常情况下,用钾盐比钠盐更好,因为低温时钠盐难溶,钾盐易溶。但当溶液中含有十二烷基硫酸钠(SDS)时,只能用磷酸钠而不能用磷酸钾,因为 SDS 会与钾盐生成难溶的十二烷基硫酸钾。

磷酸盐缓冲溶液的优点:①容易配制成各种浓度的缓冲溶液;②适用的 pH 范围宽;③pH 受温度的影响小;④缓冲溶液稀释后 pH 变化小,当稀释十倍后 pH 的变化小于 0.1。

磷酸盐缓冲溶液的缺点:①易与常见的钙离子(Ca^{2+})、镁离子(Mg^{2+})以及重金属离子结合生成沉淀;②会抑制某些生物化学过程,如对某些酶的催化效率会产生一定程度的抑制。

下面,我们把常用磷酸盐缓冲溶液的配方给大家列举出来,详见表 1-1-1 至表 1-1-5。

表 1-1-1 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液
(X ml 0.2 mol/L 磷酸氢二钠 + Y ml 0.1 mol/L 柠檬酸)

pH	X (ml)	Y (ml)	pH	X (ml)	Y (ml)
2.2	0.400	19.60	5.2	10.72	9.28
2.4	1.240	18.76	5.4	11.15	8.85
2.6	2.180	17.82	5.6	11.60	8.40
2.8	3.170	16.83	5.8	12.09	7.91
3.0	4.110	15.89	6.0	12.63	7.37
3.2	4.940	15.06	6.2	13.22	6.78
3.4	5.700	14.30	6.4	13.85	6.15
3.6	6.440	13.56	6.6	14.55	5.45
3.8	7.100	12.90	6.8	15.45	4.55
4.0	7.710	12.29	7.0	16.47	3.53
4.2	8.280	11.72	7.2	17.39	2.61
4.4	8.820	11.18	7.4	18.17	1.83
4.6	9.350	10.65	7.6	18.73	1.27
4.8	9.860	10.14	7.8	19.15	0.85
5.0	10.30	9.70	8.0	19.45	0.55

Na_2HPO_4 分子量 = 141.98, 0.2 mol/L 溶液为 28.40 g/L; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 分子量 = 178.05, 0.2 mol/L 溶液含 35.61 g/L; $C_4H_2O_7 \cdot H_2O$ 分子量 = 210.14, 0.1 mol/L 溶液为 21.01 g/L。

表 1-1-2 磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钠缓冲溶液 (0.2mol/L)

(Xml 0.2mol/L 磷酸氢二钠 + Yml 0.2mol/L 磷酸二氢钠)

pH	X (ml)	Y (ml)	pH	X (ml)	Y (ml)
5.8	8.0	92.0	7.0	61.0	39.0
5.9	10.0	90.0	7.1	67.0	33.0
6.0	12.3	87.7	7.2	72.0	28.0
6.1	15.0	85.0	7.3	77.0	23.0
6.2	18.5	81.5	7.4	81.0	19.0
6.3	22.5	77.5	7.5	84.0	16.0
6.4	26.5	73.5	7.6	87.0	13.0
6.5	31.5	68.5	7.7	89.5	10.5
6.6	37.5	62.5	7.8	91.5	8.50
6.7	43.5	56.5	7.9	93.0	7.00
6.8	49.5	50.5	8.0	94.7	5.30
6.9	55.0	45.0			

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 分子量 = 178.05, 0.2mol/L 溶液为 85.61g/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 分子量 = 358.22, 0.2mol/L 溶液为 71.64g/L; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 分子量 = 156.03, 0.2mol/L 溶液为 31.21g/L; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 分子量 = 138.01, 0.2mol/L 溶液为 27.6g/L。

表 1-1-3 磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钾缓冲溶液 (1/15mol/L)

(Xml 1/15mol/L 磷酸氢二钠 + Yml 1/15mol/L 磷酸二氢钾)

pH	X (ml)	Y (ml)	pH	X (ml)	Y (ml)
4.92	0.10	9.90	7.17	7.00	3.00
5.29	0.50	9.50	7.38	8.00	2.00
5.91	1.00	9.00	7.73	9.00	1.00
6.24	2.00	8.00	8.04	9.50	0.50
6.47	3.00	7.00	8.34	9.75	0.25
6.64	4.00	6.00	8.67	9.90	0.10
6.81	5.00	5.00	8.18	10.0	0
6.98	6.00	4.00			

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 分子量 = 178.05, 1/15mol/L 溶液为 11.876g/L; KH_2PO_4 分子量 = 136.09, 1/15mol/L 溶液为 9.078g/L。

表 1-1-4 磷酸二氢钾 - 氢氧化钠缓冲溶液 (50mmol/L, 20℃)

(Xml 0.2mol/L 磷酸氢二钾 + Yml 0.2mol/L 氢氧化钠, 加水稀释至 200ml)

pH	X (ml)	Y (ml)	pH	X (ml)	Y (ml)
5.8	50	3.72	7.0	50	29.63
6.0	50	5.70	7.2	50	35.00
6.2	50	8.60	7.4	50	39.50
6.4	50	12.6	7.6	50	42.80
6.6	50	17.8	7.8	50	45.20
6.8	50	23.65	8.0	50	46.80