

# 第二章 生物实验基本技术规程

---

## 第二节 母液的配制

南昌大学生物学实验教学中心  
蔡奇英 13319409916; QQ: 1732554777

# 第二节 母液的配制

---

- 当要配制不同浓度系列的溶液或含有相同成分的溶液时，配制母液（原液或浓缩液）可以节省时间。
- 母液比最终工作溶液的浓度大（ $5\times$ 、 $10\times$ 、 $20\times$ 、 $50\times$ 、 $100\times$ 、 $200\times$ ），经过适当稀释配制成最终溶液。
- 现以植物组织培养MS营养液配制为例介绍母液配制的方法和过程。
- 实验5—7人一组，每组配制 MS大量元素的母液100mL（ $10\times$ ）。

# MS培养基成分

(1) MS大量元素	工作浓度g/L
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1.65
$\text{KNO}_3$	1.9
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.17
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.37
$\text{CaCl}_2$	0.332
(2) MS微量元素	工作浓度mg/L
KI	0.83
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025

# MS培养基成分

(3) 铁盐	工作浓度mg/L
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8
Na <sub>2</sub> -EDTA·2H <sub>2</sub> O	37.3
(4) 复合维生素	工作浓度mg/L
烟酸	0.5
VB6	0.5
VB1	0.4
甘氨酸	2
肌醇	100
(5) 蔗糖	2—4%
(6) 琼脂粉	0.7%
(7) 生长调节剂	

# MS大量元素母液的配制

1. 大量元素	工作浓度g/L	母液g/L (10×)	100mL (10×)
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1.65	16.5	1.65
$\text{KNO}_3$	1.9	19	1.9
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.17	1.7	0.17
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.37	3.7	0.37
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.44 (0.332)	4.4(3.32)	0.44 (0.332)

# MS大量元素母液的配制

---

- 1. 计算并称取各成分的用量。注意：如何是称取无水 $\text{CaCl}_2$ 时，只称取0.332g，称量时动作稍快一点，防过度吸湿。
- 2. 按表格顺序依次，在小烧杯中分别用15ml的纯水完全溶解（彻底），依次转移入另一烧杯混合。注意：将 $\text{CaCl}_2$ 转移时，缓慢加入，同时以玻棒搅拌，尽快使 $\text{Ca}^{2+}$ 分散，防止沉淀产生。
- 3. 将混合液导入100mL的容量瓶，润洗烧杯两次，一并导入容量瓶，定容。
- 4. 贴标签（溶液名、浓度、时间、姓名或组别）
- 5. 贮存。

# 第三节 pH与缓冲液

---

## 1. pH值的意义和来由

- pH值是用来衡量溶液中氢离子（ $H^+$ ）浓度的指标，它将影响许多物质的溶解性和大多数生物系统的活性，包括从单个小分子到整个有机体。多数细胞仅能在很窄的pH范围内进行活动，因此在很多生物实验中，常常需要控制溶液的pH值不发生大的变化，如酶活性、代谢实验和细胞培养的培养基等。

- **水的解离**  $\text{H}_2\text{O}=\text{H}^++\text{OH}^-$
- **酸的解离**  $\text{H-A}=\text{H}^++\text{A}^-$  其中H-A代表酸，A<sup>-</sup>是相应的共轭基团。酸在水中解离会增加质子的数量，所以**酸**是一种在水溶液中作为**质子供体**的化合物。
- **碱的解离**  $\text{B-OH}=\text{B}^++\text{OH}^-$  其中B-OH 代表未解离的强碱，由于水的解离是可逆的，在水溶液中碱产生的氢氧根离子会有效地与质子结合，从而减低质子的浓度。**碱**是一种在水溶液中作为**质子受体**的化合物。

- 在水溶液中，绝大多数水分子不发生解离。事实上，在任何温度下，纯水的离子化程度是恒定的，水中离子解离常数表示：

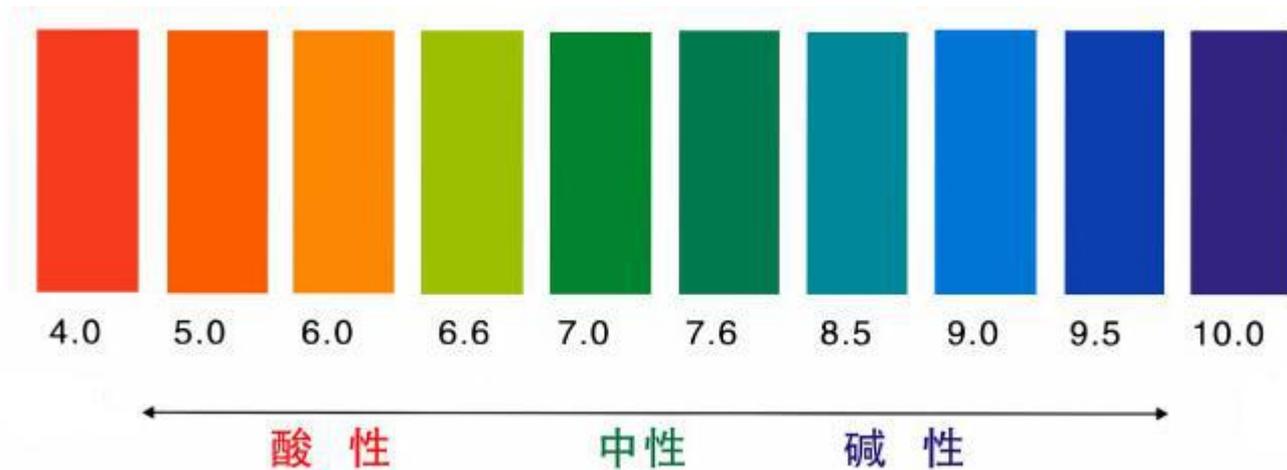
$$K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-]$$

- 在25℃时，纯水的离子产额为 $10^{-14}\text{mol}^2 \cdot \text{L}^{-2}$  意思是溶液中质子的浓度为 $10^{-7}\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ ，氢氧根离子浓度与之相同。因为这些数值都很小且都是10的负数幂，因此习惯上用pH来表示：

$$\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+]$$

其中 $[\text{H}^+]$ 是质子的活度

- 当 $H^+$ 和 $OH^-$ 的离子数量相等时溶液为中性：在 $25^{\circ}C$ 时，纯水在pH为7.0是中性，pH值在7.0以下为酸性，在7.0以上则为碱性(如图)。但是溶液的pH值会随温度而改变，因为水的解离随温度升高而增强，所以在测定溶液的pH值及其结果解释时，一定要考虑这一点。



## 2. pH值的测定

### (1) pH指示剂

某些化合物会因pH值变化改变颜色，他们可以少量加入溶液或制成pH试纸条，作为溶液的pH指示剂，每种指示剂通常在限定的pH范围内改变颜色（如下表）

指示剂	酸碱指示剂变色范围		
甲基橙	< 3.1 红色	3.1 — 4.4 橙色	> 4.4 黄色
石蕊	< 5.0 红色	5.0 — 8.0 紫色	> 8 蓝色
酚酞	< 8.0 无色	8.0 — 10.0 浅红色	> 10 红色

## 2. pH值的测定

### pH指示剂适用范围：

广泛指示剂/试纸由多种染料混合而成，可以测定较宽范围的pH。但不能精确测定pH值。可用于：

- A. 估计溶液的近似pH
- B. 建立细胞内不同细胞器的近似pH值，如中性红用于“活体”染色。
- C. 测定pH的变化，如指示滴定终点



## 2. pH值的测定

---

### (2) pH电极测定

- pH计可以直接精确测出溶液中pH值。
- 工作原理：

pH电极通常是一个组合电极，它由两个独立系统组成：一个对 $H^+$ 敏感的玻璃电极和一个不受 $H^+$ 浓度影响的参比电极，将电极浸入溶液中，电位计能测出两个电极之间的电压，从而换算成对应的pH显示出来。

- 许多pH计上有温度补偿装置，以便校正温度差异。

# pH计



# pH计的使用方法

---

- ①使用前准备工作：  
按照仪器使用说明书准备。
- 记下所测定的每一溶液的温度，包括所有标样和样品，因为温度会影响 $K_w$ ，中性点及pH值。
- a. 设置温度补偿值  
在电位计上设置适当的温度补偿值，这一控制可补偿温度对电位计测得电位差的影响，简单的pH计没有温度补偿功能，只能在特定温度下（如25度）使用，否则测量结果不准确，复杂的pH具有自动温度补偿器。
- b. 用蒸馏水冲洗电极，并用干净吸水纸轻轻吸干电极表面的水，检测玻璃电极是否破损或污染，检测溶液是否完全浸没电极。

- c.校准pH计
- 通常有一点校正和两点校正法，一般采用两点校正法。调整电位计到pH模式。
- 第一检测点：复合电极放入已知pH（通常为7.0或6.86）的标准溶液中，等读数稳定后，调节校正控制钮（有的仪器可以自动校正）得到为标准溶液的pH值读数；
- 然后从校正标准溶液中取出pH电极，再次用蒸馏水冲洗，吸水纸吸干；
- 第二检测点：复合电极浸入到相同温度下的第二种标准溶液中。使用哪种标准液取决于样品的预期pH值，如果样品的预期pH值偏酸，第二点校正用pH4.0标准缓冲溶液，如果预期偏碱则采用pH9.0缓冲液，调节斜率控制钮，直到达到第二标准溶液的精确pH值。注意：校正标准液只能在特定的温度下给出特定的pH值，可以从文献或者标准液供应商查得不同温度下标准液的pH值。

# pH计的使用方法

---

- ②校正好的仪器可以测量待测溶液的pH值，将电极重新用蒸馏水冲洗后，浸入到待测样品溶液中，待pH计读数稳定后，再读数。
- ③使用完毕后，再用蒸馏水冲洗电极，然后把电极保存在饱和KCl溶液中，千万不能用蒸馏水作为保存液。如果长时间不用，可以把pH计电源关闭。

# 3. 如何控制pH值——缓冲溶液

---

- 控制溶液pH值最有效的方法之一就是应用pH缓冲溶液。
- 缓冲液通常是一种弱酸及其共轭碱的混合物。额外的质子可由阴离子基团中和，质子的减少(如OH<sup>-</sup>加入)，会由酸的解离来弥补，因此这一共轭对就是pH值改变的“缓冲器”



共轭酸      共轭碱

# 如何选择缓冲溶液

---

- 实验室常用的缓冲系主要有磷酸、柠檬酸、碳酸、醋酸、巴比妥酸、Tris（三羟甲基氨基甲烷）等系统，
- 实验或研究工作中要慎重地选择缓冲体系。因为有时影响实验结果的因素并不是缓冲液的pH值，而是缓冲液中的某种离子。如硼酸盐、柠檬酸盐、磷酸盐和Tris等缓冲剂都可能产生不需要的化学反应。

# 如何配制缓冲溶液

---

- 选择了合适的缓冲液后，需要将溶液调节到希望的pH值。必须考虑两个因素：
  - (1) 达到准确pH值所需共轭酸和共轭碱的比例。
  - (2) 缓冲液的需要量，多数情况下，缓冲液含有的共轭对在0.05mol/L-0.2mol/L之间。

缓冲能力依赖于以上这两种因素。多数常规缓冲液配方在很多文献中都给出了，因此可以直接按照配制。

# 例子：磷酸盐缓冲溶液配制

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液 (0.2 mol/L)

<b>pH</b>	<b>0.2M <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math>(mL)</b>	<b>0.2M <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4</math>(mL)</b>
6.5	31.5	68.5
6.6	37.5	62.5
6.7	43.5	56.5
6.8	49.0	51
6.9	55	45
7.0	61	39
7.1	67	33
7.2	72	28

# 如何配制缓冲溶液

---

- 按照表格中配方，用量筒分别量取0.2M两种磷酸盐母液所需体积，配制成100 mL，混合均匀。
- 用pH计测量缓冲溶液的pH值，看是否达到了所需的pH，如果没有达到，滴加两种磷酸盐进行调节，如果偏酸，加入 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ，如果偏碱，则加入 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ，直到调节到所需的pH。

# 第四节 培养基的配制与灭菌

---

- 1.找全培养基所需母液或药品。
  - (1) 大量元素； (2) 微量元素； (3) 铁盐； (4) 有机成份； (5) 蔗糖； (6) 琼脂粉（条）； (7) 生长调节剂（6-BA 0.5、NAA 0.5）。
- 2.检查母液的倍数或浓度，计算一定体积培养基所需药剂用量。
- 3.称量药剂，依次加入烧杯。注意烧杯使用前要用容量瓶或量筒量水重新定容，在烧杯壁上标记一定的体积对应位置。

- 每组配制300ml培养基。
- i MS+6-BA0.4 +NAA0 (第一组)
- ii MS+6-BA0.4+NAA0.2 (第二组)
- iii MS+6-BA0.4+NAA0.4 (第三组)
- iv MS+6-BA0.4+NAA0.6 (第四组)
- v MS+6-BA0.4+NAA0.8 (第五组)
- vi MS+6-BA0.4+NAA1.0 (第六组)

# 300ml MS基本培养基各成分用量

序号	成分及母液浓度	1L培养基的用量	0.3L培养基的用量
1	大量元素 (10×)	100ml	30ml
2	微量元素 (100×)	10ml	3ml
3	铁盐 (200×)	5ml	1.5ml
4	有机成份 (200×)	5ml	1.5ml
5	蔗糖	30g	9g
6	琼脂粉	7g	2.1g
7	生长调节剂		

# 300ml MS培养基生长调节剂用量

以NO.2 为例：MS+6-BA0.4mg/L+NAA0.2mg/L

$$6\text{-BA: } 0.4\text{mg/L} \times 0.3\text{L} = 0.5\text{mg/ml} \times X$$

$$X = 0.24\text{ml}$$

调节剂及浓度		6-BA (0.5mg/ml)		NAA (0.5mg/ml)	
培养基体积	终浓度	0.3L培养基	终浓度	0.3L培养基	
NO.1	0.4mg/L	0.24ml	0mg/L	0	
NO.2	0.4mg/L	0.24ml	0.2mg/L		
NO.3	0.4mg/L	0.24ml	0.4mg/L		
NO.4	0.4mg/L	0.24ml	0.6mg/L		
NO.5	0.4mg/L	0.24ml	0.8mg/L		
NO.6	0.4mg/L	0.24ml	1.0mg/L		

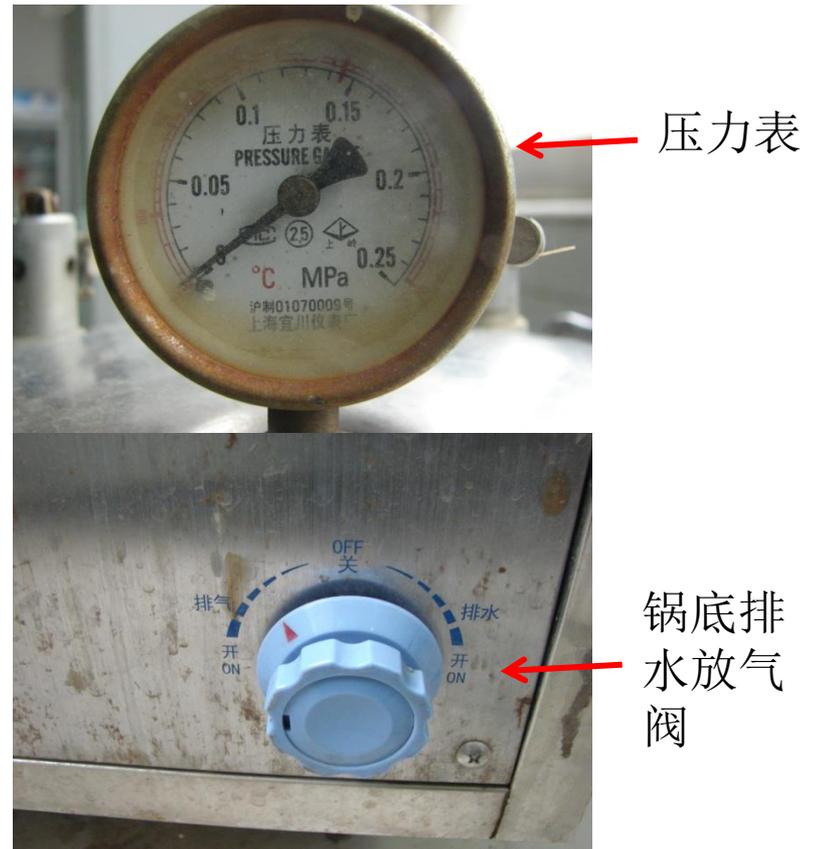
# 第四节 培养基的配制与灭菌

---

- 4.所有成分，除蔗糖外，可先混合在烧杯中，将琼脂粉煮至透明（注意防止沸腾，备好冷水和滴管），再将蔗糖倒入混合。定容到0.3L。
- 5.用pH试纸检测酸碱度，如偏酸，侧向混合液中逐滴加入1M的NaOH或KOH。加入2滴碱液，用玻棒搅匀，用试纸检测一次。至溶液pH值5.8。
- 6.分装：小试管（1/3体积处）或大试管（1/4体积处）。注意试管必须保持竖起状态。用牛皮纸兜底包扎，标明组号。
- 7.用锡铂纸封试管口；将试管插入铁笼内，将铁笼放入灭菌锅。
- 8.灭菌，121 °C，20min。下次课备用。

# 灭菌锅的使用

- 灭菌锅型号不一样，使用方法也不尽相同，使用前一定要根据说明书掌握其操作方法。
- 灭菌锅一般结构：



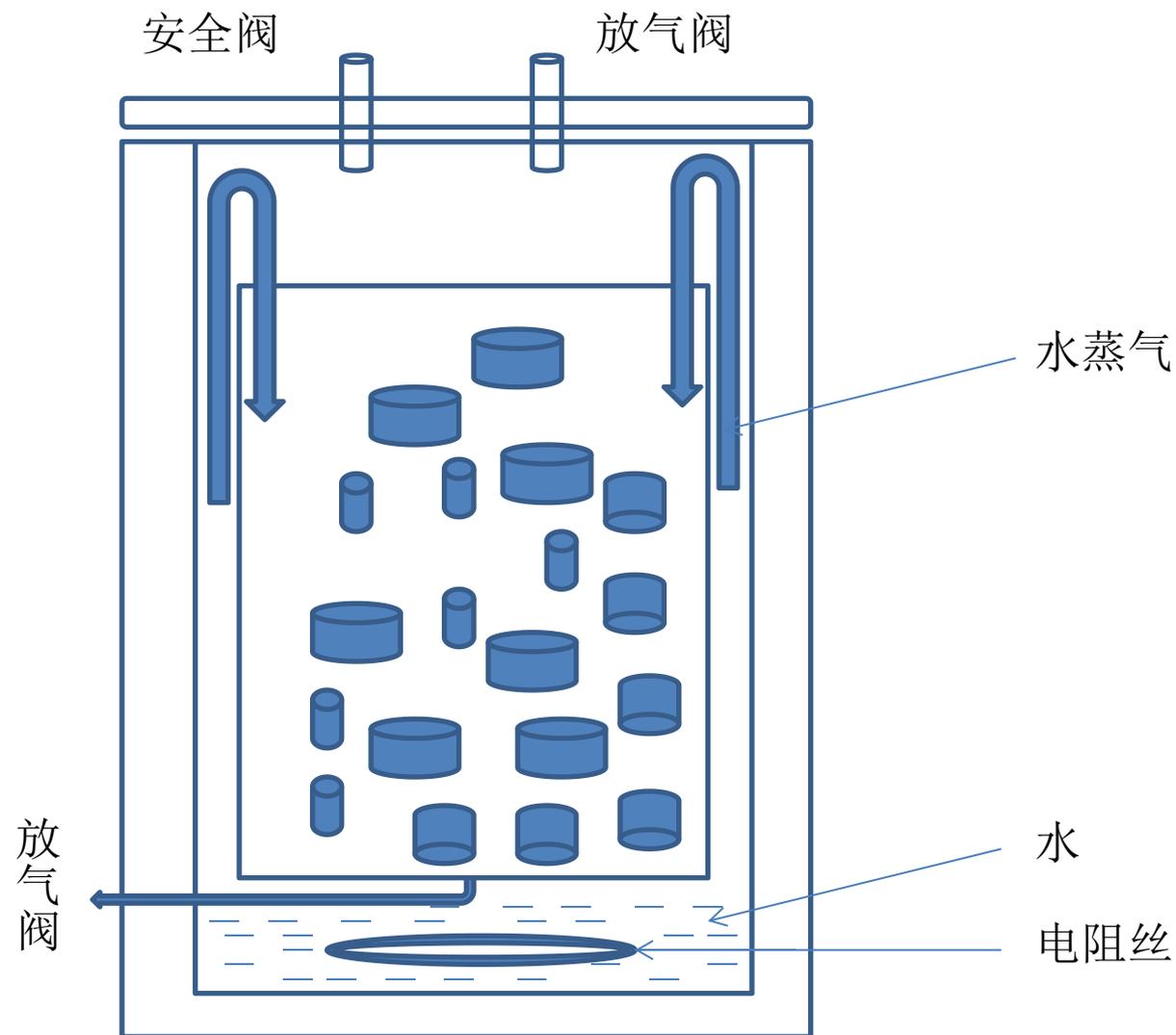
安全阀



放气阀

锅盖螺栓

# 灭菌锅工作原理图





# 灭菌锅的使用

---

- 程序设置：
  1. 检测水位：开电源，加热程序启动前检查水位，电子显示高水位或目测水位，如缺水，则添加蒸馏水。如无法电显，目测锅底有少量存水即可。
  2. 按循环键，绿色数字显示为温度。右边箭头为移位键。上下箭头为数字调节键。设置温度为 1 2 1 . 0 。
  3. 再按循环键，绿色数字显示为时间。设置时间为 0 0 : 2 0 。
  4. 再按循环键，上限（红数字）与下限（绿数字）间的工作指示灯即可亮起变绿，开始加热。

# 灭菌锅的使用

---

- 1. 将待灭菌的物品放入灭菌锅。盖下锅盖，左右手同时旋紧**对角**的螺栓；
- 2. 加热，开启放汽阀，边加热边排汽，排汽的目的是将锅内的空气全部排出，使锅内充满水蒸气，否则显示的温度达不到所需温度；
- 3. 当汽流连续较快喷出时，关闭上、下放汽阀；
- 4. 温度上升到121.0时，显示开启倒记时；
- 5. 倒记时20分钟后，提示灭菌结束；
- 6. 待温度下降到100.0时，开锅取出灭菌物品。

- 实验二 母液与培养基的配制
- 思考题：
  - 1. 配制MS大量元素的母液的过程，容易出现的问题有哪些，如何避免？
  - 2. 配制MS培养基的过程，容易出现的问题有哪些，如何避免？
  - 3. 灭菌锅的工作原理，使用方法和注意事项。