

一、核酸的发现、核酸的分类和功能、核酸的理化性质

二、细胞裂解

三、核酸纯化

四、核酸检测

五、核酸除杂质

一、核酸

核苷酸单体聚合而成的生物大分子，是生物细胞最基本和最重要的成分。一般认为，生物进化即始于核酸，因为在所有生命物质中只有核酸能够自我复制。今天已知核酸是生物遗传信息的贮藏所和传递者。一种生物的蓝图就编码在其核酸分子中。核酸是 1869 年米歇尔(F.Miescher)在脓液的白细胞中发现的。他当时称之为核素。阿尔特曼(R.Altmann)于 1889 年认识其酸性后，定名为核酸。

二、核酸的分类和功能

核酸分为核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)两大类。这两类核酸有某些共同的结构特点，但生物功能不同。DNA 贮存遗传信息，在细胞分裂过程中复制，使每个子细胞接受与母细胞结构和信息含量相同的 DNA；RNA 主要在蛋白质合成中起作用，负责将 DNA 的遗传信息转变成特定蛋白质的氨基酸序列。

核酸的基本结构单元是核苷酸，核苷酸含有含氮碱基、戊糖和磷酸 3 种组分。碱基与戊糖构成核苷，核苷的磷酸酯为核苷酸。DNA 和 RNA 中的戊糖不同，RNA 中的戊糖是 D-核糖；DNA 不含核糖而含 D-2-脱氧核糖(核糖中 2 位碳原子上的羟基为氢所取代)。核酸就是根据其中戊糖种类来分类的，DNA 和 RNA 的碱基也有所不同。

三、核酸的理化性质

RNA 和核苷酸的纯品都呈白色粉末或结晶，DNA 则为白色类似石棉样的纤维状物。除肌苷酸、鸟苷酸具有鲜味外，核酸和核苷酸大都呈酸味。DNA、RNA 和核苷酸都是极性化合物，一般都溶于水，不溶于乙醇、氯仿等有机溶剂，它们的钠盐比游离核酸易溶于水，RNA 钠盐在水中溶解度可达 40g/L，DNA 钠盐在水中为 10g/L，呈黏性胶体溶液。在酸性溶液中，DNA、RNA 易水解，在中性或弱碱性溶液中较稳定。天然状态的 DNA 是以脱氧核糖核蛋白(DNP)形式存在于细胞核中。要从细胞中提取 DNA 时，先把 DNP 抽提出来，再把 P 除去，再除去细胞中的糖，RNA 及无机离子等，从中分离 DNA。

四、细胞裂解：

(一) 裂解原理在核酸提取过程中，细胞裂解是非常重要的。经典的裂解液几乎都含有去污剂 (如 SDS、Triton X-100、NP-40、Tween 20 等) 和盐 (如 Tris、EDTA、NaCl 等)。盐的作用，除了提供一个合适的裂解环境 (如 Tris)，还包括抑制样品中的核酸酶在裂解过程中对核酸的破坏 (如 EDTA)、维持核酸结构的稳定 (如 NaCl) 等。

去污剂则是通过使蛋白质变性，破坏膜结构及解开与核酸相连接的蛋白质，从而实现核酸游离在裂解体系中。裂解体系中还可能加入蛋白酶，利用蛋白酶将蛋白质消化成小的片段，促进核酸与蛋白质的分开，同时，也便于后面的纯化操作以及获得更纯的核酸。也有直接使用高浓度的蛋白质变性剂（如 GIT、GuHCl 等）裂解的，该方法已经成为了 RNA 抽提的主流，却不是基因组 DNA 抽提的主流。

（二）细胞的裂解方法

细菌细胞破碎方法有以下几种：

- 1) 机械方法：超声波处理法、研磨法、匀浆法。关于超声波处理法，要设定好超声时间和间隙时间，一般超声时间不超过 5 秒，间隙时间最好大于超声时间。
- 2) 化学试剂法：用含 SDS 或 CTAB 的溶液处理细胞，在一定的 pH 环境和变性条件下，细胞破裂，蛋白质变性沉淀，核酸被释放到水相，pH 环境则由加入的强碱(NaOH) 或缓冲液（TE、STE 等）提供，表面活性剂或强离子剂可使细胞裂解、蛋白质和多糖沉淀，缓冲液中的一些金属离子螯合剂(EDTA 等) 可螯合对核酸酶活性所必须的金属离子 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} ，从而抑制核酸酶的活性，保护核酸不被降解。
- 3) 反复冻融法：将细胞在-20 度以下冰冻，室温融解，反复几次，由于细胞内冰粒形成和剩余细胞液的盐浓度增高引起溶胀，使细胞结构破碎。个人经验一般情况，37℃,3min，液氮 3min,反复三次即可以。
- 4) 酶解法：加入溶菌酶或蜗牛酶、蛋白酶 K 等，都可使细胞壁破碎，核酸释放。蛋白酶还能降解与核酸结合的蛋白质，促进核酸的分离。其中溶菌酶能催化细菌细胞壁的蛋白多糖 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸残基间的 β -(1,4) 键水解。蛋白酶 K 能催化水解多种多肽键，其在 65℃ 及有 EDTA、尿素(1~4mol/L) 和去污剂(0.5%SDS 或 1%Triton X-100) 存在时仍保留酶活性，这有利于提高对高分子量核酸的提取效率。在实际工作中，酶作用、机械作用、化学作用经常联合使用。具体选择哪种或哪几种方法可根据细胞类型、待分离的核酸类型及后续实验目的来确定。

（三）裂解方法的评价

含蛋白酶的裂解方法，可以认为是抽提基因组 DNA 的首选。裂解包括膜蛋白的游离和与基因组 DNA 相连接的蛋白质的游离。蛋白酶的作用是使蛋白质变小，故而对蛋白质的游离有巨大的促进作用；同时，巨大的基因组 DNA 是很容易“缠”住大分子的东西的，蛋白质被蛋白酶消化变小后，则不容易被基因组 DNA “缠”住，有利于蛋白质在纯化操作中的去除，使最终获得的基因组 DNA 的纯度更高。另外一个思路是，如果基因组 DNA 与蛋白质“缠”在一起，在纯化的过程中有两种可能：如果基因组 DNA 的特性占优势，则纯化时以 DNA 的形式被保留下来，导致蛋白质的残留；如果蛋白质的特性占优势，则纯化时以蛋白质的形式被去除，导致 DNA 的损失。当然去污剂裂解方法，仍然在细胞基因组 DNA 抽提方面有优势，尤其是当得率和纯度要求不是最高，而经济性及操作简单很重要时。控制好裂解液/样品的比例是该方法成功的关键。该方法结合高盐沉淀，可以实现最简单的操作，但纯度及得率的稳定性可能会比用 PC 抽提的差一些。

高浓度蛋白质变性剂（如 GIT、GuHCl 等）的裂解方法，是抽提 RNA 的首选。总 RNA 的抽提，最重要的是快速裂解细胞膜，至于与基因组 DNA 相连接的蛋白质的裂解以及基因组与蛋白质“缠”住的问题，因为都不会对以后的纯化产生大的影响，可以不考虑。高浓度蛋白质变性剂能快速破坏细胞膜，进而迅速抑制住细胞内的 RNA 酶，从而确保了 RNA 的完整性。除了极少量不适用该方法的样品——主要是植物，其它绝大部分样品的 RNA 的抽提，都可以以高浓度的蛋白质变性剂为基础的。当然有些样品，如肌肉，即使是 RNA 抽提，也强烈建议使用含蛋白酶的裂解液（或者在操作中的某个时候使用蛋白酶消化蛋白质），原因在于这些样品中的蛋白质，是非常难以去除的。该方法是获得最大得率和最高纯度的基础。

含 CTAB 的裂解液，几乎成为富含多糖的样品，如细菌、植物的基因组 DNA 抽提的首选裂解方法。该方法成功与否与两个因素有关：一是 CTAB 的质量，二是洗涤的彻底程度。CTAB 的质量对裂解效率有很大的影响，

而且，似乎还说不清楚原因，因为即使是同一公司生产的纯度一样的 CTAB，批号不同，效果就可能差别很大。洗涤去除 CTAB 要比其它的盐难一些，同时，CTAB 的少量残留也会对酶活性有巨大影响，所以洗涤是否彻底也是该方法成功与否的关键。裂解时的温度，多使用 65℃；但如果发现降解严重或者得率太低，可以试一下 37℃–45℃ 这个相对低温的区域。

SDS 碱裂解法是质粒抽提的首选裂解方法，具有快速、得率高、几乎无基因组 DNA 污染的特点。控制好裂解液/菌体的比例和操作的温和是该方法成功的关键。蛋白质的沉淀效率在 4℃ 会更好一些，所以，加入溶液 III 后在 4℃ 静置一段时间以及采用 4℃ 离心去蛋白质，都可以提高质量。该方法不一定要使用 PC 纯化，但结合 PC 纯化，可以获得纯度很高的质粒。RNA 的去除可以靠在溶液 I 中加入 RNase A (100ug/ml) 或者在最后的溶解液中加入 RNase A (25 ug/ml) 来实现。总的感觉是，在溶液 I 中使用 RNase A，RNA 的残留少一些。不过，经典沉淀几乎没有办法彻底去除 RNA 残留。另外，对大质粒 (50 kb 以上)，该方法可能会有问题。

PCR 模板的简易裂解方法，也是使用面很广的一类方法。该方法的特点是无须纯化，样品被裂解后即可直接取裂解液用于 PCR，非常快速。也正因为不纯化，所以，假阴性 (即没有扩增出来的阳性) 比例也比较高。该方法最简单的就是反复冻融法，简便快捷，不需任何化学试剂，冻融离心，PCR 检测就可以了。如果使用裂解法，那么最简单的裂解液就是水，复杂一点的就会含有一些不会抑制后续的 PCR 反应，而且能提高裂解效率，甚至还可能部分消除样品内抑制 PCR 反应杂质的东西，如 Triton X-100、甲酰胺等。再复杂一点的就会含有诸如 Chelex 100 之类的能吸附部分杂质的介质。操作也非常简单，多使用温度的变化来实现样品的裂解，如煮沸、或者高温-低温的多次循环等。该方法最适合从一大堆样品中找出阳性样品，但却不适合用于判断某一个样品是阳性还是阴性。降低样品使用量可以提高阳性率，因为样品量的降低，同时意味着 PCR 的抑制物量的降低。

裂解液的用量原则是：确保能彻底裂解样品，同时使裂解体系中核酸的浓度适中。浓度过低，将导致沉淀效率低，影响得率；浓度过高，去除杂质的过程复杂且不彻底，导致纯度下降。另外，裂解液的用量是以样品中蛋白质的含量为基准的，而不是以核酸含量为基准，这一点务必牢记。

五、核酸纯化

就个人所知，目前在科研领域广泛使用的核酸纯化技术主要可以分为两大类：使用介质的和不使用介质的，使用介质的，一次就将核酸与其它所有杂质分开；不使用介质的，一定是首先将核酸和盐与大分子杂质分开，再通过沉淀核酸使核酸与盐分开 (PEG 沉淀和 LiCl 沉淀除外)。

1) 经典的使用苯酚/氯仿抽提的纯化技术：细胞裂解后离心分离含核酸的水相，加入等体积的酚：氯仿：异戊醇 (25 : 24 : 1 体积) 混合液。依据应用目的，两相经漩涡振荡混匀 (适用于分离小分子量核酸) 或简单颠倒混匀 (适用于分离高分子量核酸) 后离心分离。疏水性的蛋白质被分配至有机相，核酸则被留于上层水相。酚是一种有机溶剂，预先要用 STE 缓冲液饱和，因未饱和的酚会吸收水相而带走一部分核酸。酚也易氧化发黄，而氧化的酚可引起核酸链中磷酸二酯键断裂或使核酸链交联；故在制备酚饱和液时要加入一特殊物质，以防止酚氧化。氯仿可去除脂肪，使更多蛋白质变性，从而提高提取效率。异戊醇则可减少操作过程中产生的气泡。核酸盐可被一些有机溶剂沉淀，通过沉淀可浓缩核酸，改变核酸溶解缓冲液的种类以及去除某些杂质分子。典型的例子是在酚、氯仿抽提后用乙醇沉淀，在含核酸的水相中加入 pH 5.0~5.5，终浓度为 0.3M

的 NaAc 或 KAc 后，钠离子会中和核酸磷酸骨架上的负电荷，在酸性环境中促进核酸的疏水复性。然后加入 2~2.5 倍体积的乙醇，经一定时间的孵育，可使核酸有效地沉淀。其他的一些有机溶剂 (异丙醇、聚乙二醇 (PEG) 等) 和盐类 (10.0mol/L 醋酸铵、8.0mol/L 的氯化锂、氯化镁和低浓度的氯化锌等) 也用于核酸的沉淀。

2) 使用离子交换介质的纯化技术：将裂解液过柱，核酸被联结在离子交换介质上；洗涤去除残留的杂质后，用

高盐缓冲液将核酸从介质上洗脱下来。再经过标准的乙醇/异丙醇沉淀、乙醇洗涤、干燥等操作，获得纯的核酸，溶解于合适的缓冲液中。

3) 使用吸附介质的纯化技术：将裂解液过柱，核酸被吸附介质选择性吸附；洗涤去除残留的杂质后，用水或者合适的低盐缓冲液将核酸从介质上洗脱下来，就可以直接用于后续实验。

4) 密度梯度离心法：密度梯度离心也用于核酸的分离和分析。双链 DNA、单链 DNA、RNA 和蛋白质具有不同的密度，因而可经密度梯度离心形式形成不同密度的纯样品区带，该法适用于大量核酸样本的制备，其中氯化铯 2 溴化乙锭梯度平衡离心法被认为是纯化大量质粒 DNA 的首选方法。氯化铯是核酸密度梯度离心的标准介质，梯度液中的溴化乙锭与核酸结合，离心后形成的核酸区带经紫外灯照射，产生荧光而被检测，用注射针头穿刺回收后，通过透析或乙醇沉淀除去氯化铯而获得纯化的核酸。

二) 纯化方法评价

PC(P 是英文酚的缩写，C 是英文氯仿的缩写)抽提/醇沉淀方法，是一个永不过时的方法。稳定、可靠、经济、方便。PC 抽提可以彻底去除蛋白质，醇沉淀可以去除盐，对于一般的干净的样品 (杂质为蛋白质)，该方法完全可以获得高质量的核酸。虽然每次 PC 抽提都会损失一部分核酸 (因为不可能将水相全部移取)，以及低浓度核酸的醇沉淀效率低，但这些问题都可以靠操作的调整而得以解决或者减少影响。该方法的最大的问题是不适合大规模抽提。PC 抽提是去除蛋白质的一个非常有效的手段。苯酚能使蛋白质变性，变性后的蛋白质从水相中被析出，处于苯酚中或者苯酚/水相之间。PC 抽提的关键是，一要混匀彻底，二要用量足够。彻底混匀，才能确保苯酚与蛋白质的充分接触，使蛋白质完全变性。许多人总是担心混匀的剧烈程度是否会对核酸，尤其是基因组 DNA 造成破坏，实际上大可不必如此小心。剧烈的混匀操作，是会部分打断大分子的基因组 DNA，但该破坏作用不会强烈到 DNA 变成 10kb 以内的小片段。手剧烈晃动混匀后，基因组 DNA 的片段，大部分会大于 20kb，这个大小，除了一些特别的要求外，对 PCR 和酶切，都是完全适用的。如果要求的片段非常大，如构建文库用，则不能使用剧烈的混匀方法，而只能来回温和颠倒混匀 – 此时的关键是：裂解液的比例要足够大，使体系不要太粘稠。用量要足够，是因为苯酚去除蛋白质是有一定的饱和度的。超过了该饱和度，裂解体系中的蛋白质不会被一次去除，必须靠多次抽提，方可彻底去除。另外，体系太粘稠的坏处是，蛋白质难以彻底去除，以及基因组 DNA 会断裂得更厉害，所以要注意裂解液与样品的比例。4C

离心操作有利于更彻底去除蛋白质。PC 抽提的另外一个用途是，利用酸性酚可以部分去除 DNA 的特点，在 RNA 抽提时获得 DNA 残留极少的 RNA。不过有一点要提醒的是，有些植物样品，在去除某些杂质之前，是不能使用 PC 抽提的，否则核酸必定降解。

高盐沉淀蛋白质/醇沉淀方法，同样也是一个非常不错的方法。与 PC 抽提方法相比，除了纯度的稳定性可能要低一点外，该方法几乎克服了 PC 抽提的所有缺点。更快、更轻松去除蛋白质所伴随的好处是，可以用于大规模抽提，不足是纯度 (蛋白质残留) 不够稳定。蛋白质的沉淀效率在 4C 会更好一些。

介质纯化方法，是一个越来越受到重视的方法。其最大特点是非常适合大规模核酸抽提，并且因为受人为操作因素影响小，纯度的稳定性很高 (虽然纯度不一定比 PC 纯化方法更高)。其致命弱点是样品过量。介质可以分为两大类，一类是柱式的，即介质被预先装填在下面通通的柱子里；另外一类则是颗粒状 (如 Glassmilk、磁性小珠等)。颗粒状的介质的纯化操作与经典的醇沉淀差别不大，都是通过数次的加液-倒液过程，干燥后，溶解即可获得纯化好的核酸。柱式纯化的操作虽然也是有加液-倒液过程，但因为加入的液体通过离心后会进入另外一个离心管中，与含有核酸的柱子完全是分开的，所以洗涤更彻底，操作更省力 (不用操心将核酸倒掉了，或者液体的残留)。不过，介质纯化方法的成本是最高的。

(三) 醇的沉淀 1) 沉淀的原理目的：目的是使核酸从裂解体系中沉淀下来，从而实现核酸与其它杂质—主要是盐的分离。就核酸而言，标准的醇沉淀要求有一定的盐及某一比例的醇用量，但这决不是说这些盐是必不可少的

或者醇的比例是不可更改的。实际操作中不难发现，当裂解体系中核酸的浓度达到一定水平后，即使体系中不含教科书中建议的盐，单独使用醇也可以使核酸沉淀下来；或者含有盐，使用低比例的醇也可以使核酸沉淀下来（当然，得率可能会降低）。知道这一点的意义在于：不要迷信标准方法的唯一性；相反，当使用标准方法碰到问题——主要是纯度问题时，完全可以通过调整沉淀条件来改善。最有参考价值的是的一个沉淀方案：一半异丙醇加一半高盐溶液替代纯粹的异丙醇，可以大大降低多糖残留。另外一个问题就是，要坚信核酸的醇沉淀过程同样也是其它杂质的沉淀过程；调整醇沉淀的条件，虽然会降低核酸的得率，但因为可以大大提高纯度。2) 沉淀剂的选择：醇沉淀使用异丙醇还是乙醇，我们并没有发现这二者对质量有大的影响。异丙醇沉淀的核酸比较紧凑，帖壁紧，颜色不是很白；乙醇沉淀的核酸比较蓬松，容易从壁上移动，颜色比较白。这是现象，少量核酸用异丙醇沉淀，大量核酸用乙醇沉淀。至于异丙醇沉淀更容易沉淀下盐的说法，我们没有碰到过，我更觉得出现该现象的原因就在洗涤的不彻底。当然，也不要忘记异丙醇沉淀的最大优点是体积小，可以使绝大部分的小量抽提操作在 1.5ml 离心管内完成。但由于其沉淀物很紧凑，洗涤时其中心部分不容易被洗涤到，所以，洗涤异丙醇沉淀的核酸的关键是：一定要使沉淀悬浮起来，一定要放置一段时间使沉淀最终变成蓬松的白色。如果再洗涤一次，质量决不会有问题的。当然，沉淀所用的试剂，不仅仅就乙醇和异丙醇，还有包括 PEG、LiCl、CTAB 都可以用于核酸沉淀，虽然它们远没有醇沉淀的高使用频率，但却各有特点。LiCl 可以沉淀 RNA 以去除 DNA，CTAB 可以从含多糖的裂解体系中将核酸沉淀下来。PEG 是沉淀病毒颗粒的方便手段。3) 沉淀温度的选择：如果核酸抽提的起始样品是杂质比较多时，原则上不要使用低温沉淀。低温沉淀能提高沉淀效率：当核酸浓度很低时，效果明显；当核酸浓度比较高时，效果不明显，但却会导致杂质的大大增加。

（四）核酸的洗涤

1) 洗涤原理与目的：洗涤对于整个提取过程来说，也是非常重要的。洗涤，首先一定要将沉淀悬浮起来；第二就是要控制一定的时间，尤其是当核酸沉淀比较大时（使核酸沉淀最终蓬松）；第三是少量多次；第四则是去上清要彻底。大部分资料中的操作基本上都是“倒掉上清后倒置在吸水纸上片刻”，这一说法，对于质量好的离心管，如果离心管是经过硅化的，因为液体几乎不挂壁，所以上清可以去除得非常彻底；好的管子，即使没有经过硅化，残留量也非常少，也没有什么问题；差的管子，液体的挂壁非常可观，其残留量多到会影响到后续的实验。避免液体残余的一个好方法，就是倒掉液体后再短暂离心，将残液用移液器吸出。还有需大家牢记的是，残液中都含有上一步操作中的杂质，其残留量与混匀程度、核酸沉淀的大小都有关。挥发时去掉的是乙醇，杂质是不会被挥发去除的。这步，切忌不要用手甩，这样容易将核酸甩掉。另外，核酸沉淀的大小及裂解液的裂解能力也决定了洗涤的强度。沉淀越大，裂解液的裂解能力越强，洗涤越要彻底：放置时间相对要长一点，洗涤次数也要考虑增加。当然，乙醇浓度的选择也非常重要，一般情况，洗涤一定要用室温的 75% 乙醇。

（五）核酸的溶解和保存 1) 核酸溶解：纯化后的核酸，其中 RNA 以水溶解为主，DNA 则多以弱碱性的 Tris 或者 TE 溶解。经典的 DNA 溶解方法多提倡使用 TE 溶解，其中原因是有人认为 EDTA 可以减少 DNA 被可能残留下来的 DNase 降解的风险；如果操作过程控制得当，DNase 的残留几乎是可以忽略的，完全可以直接使用 Tris 或者水（pH 接近 7）溶解 DNA。

2) 核酸保存：基本上，核酸在保存中的稳定性，与温度成反比，与浓度成正比。一般的我们选择，-20℃ 或 70℃ 保存的稳定。如果温度不合适，保存中核酸发生降解或者消失，首要原因是酶残留导致的酶解，第二个原因则是保存核酸溶液的 pH 值不合适导致的水解（RNA 在弱酸性更稳定，而 DNA 在弱碱性更合适）。还有一个不为人重视的，就是 EP 管对核酸的影响。首先一定要坚信一点，那就是核酸一定会与装它的容器的接触面发生反应，达到某种均衡。EP 管的材质，首先可能吸附核酸，其次还可以诱导核酸的结构发生某些变化，如变性。在核酸的浓度比较高时，这个现象可能观察不到；当核酸浓度很低时，则比较明显了。在低浓度的核酸中加入 Geletin, Glycogen, BSA 可以稳定核酸，虽然已经为实验所证明，但许多实验人员并没有将该建议当回事。现在制

造 EP 管的材料远多于过去。这些新出现的材料，在强度、透明度等物理特征方面可能比原来的纯 PP 材质要好许多，但其化学特征，尤其是对核酸稳定性的可能影响，远没有研究透彻。正如现在的质粒可以改造得越来越适用某些要求一样，其负面产物可能是，抽提的质粒电泳的构型越来越多：除了原来的三种带型外，还可能出现 denatured cc、multimeric forms of cc 等等带型。

（六）核酸的浓缩

应用最广的核酸浓缩法是乙醇沉淀法。在中等浓度单价阳离子存在下，加入一定量的乙醇后，所形成有核酸沉淀可经离心而回收，甚至对低至 pg 量的 DNA 或 RNA，也可定量回收。回收的核酸可按所需浓度，再溶于适当的缓冲液中。

核酸浓缩的具体操作时，可向含样品的小离心管中加入 V/10 单价阳离子盐贮存液 2V 无水乙醇，混匀，放冰水浴中 15~30min，取出目测平衡，0~4 度，12000g，离心 10min。吸弃上清，再另 70%乙醇 0.5~1ml，12000g，0~4 度洗涤离心 2min。吸弃上清，沉淀用油泵抽干或打开盖子晾干后，溶于适当体积的缓冲液中。单价阳离子盐的选择，主要基于下述

考虑：用醋酸铵可减少 dNTP 的共沉淀，但在以后要作核酸的磷酸化时应避免用醋酸铵，因铵离子是 T，多核苷酸激酶的强烈抑制剂。当用较高浓度的乙醇沉淀 RNA 时，常用 LiCl，因 LiCl 在乙醇中溶解度很高，不随核酸共沉淀。含有 SDS 的核酸样品，应使用 NaCl，这时该去垢剂要 70%乙醇中仍保持可溶。DNA 和 RNA 沉淀，大多使用醋酸钠 (pH5.2)。

六、核酸质量的检测问题

将抽提好的核酸直接用于后续的实验，是唯一可靠的检测方法；除此之外的检测方法，都是相对的，而且并不十分可信。目前用于正式实验前检测核酸质量的方法，一是电泳，二是紫外分光光度仪。电泳检测的主要是核酸的完整性和大小，只要核酸不是太小或者太大 (超出电泳分离范围)，该方法还是非常可信的；电泳还可以用于估计核酸的浓度，但其准确度与经验有关；另外，电泳也可能提供某些杂质污染的信息，但是同样与经验有关。紫外分光光度仪检测的是纯度和核酸含量，然而，由于紫外分光光度仪不能确保非常准确，而该仪器的灵敏度又非常高，所以，提供的结果并不十分可信。一般讲，同时进行紫外和电泳检测，综合二者的结果，可以做出一个更合理的判断。但由于这两个方法都有缺陷，所以，即使出现坏的结果能用于后续实验而好的结果却不能用于后续实验，也不用大惊小怪。

关于紫外分光光度仪的检测。首先，不要使用不能选择波长的仪器；使用那些已经固定了波长的仪器，大概可以算是你梦魇的开始 (没有信息是可怕的，更可怕的是将错误的信息当真，其中 280、320、230、260nm 下的吸光度分别代表了核酸、背景 (溶液浑浊度)、盐浓度和蛋白等有机物的值。)。其次，一定要经常调较仪器；最后，要记住读数 $A_{230} : A_{260} : A_{280} = 1 : 2$ (DNA 为 1.8) : 1 为理论上的数据，实际测定时会有一些差别；但如果差别太大，就有问题了，有两个值得商榷的观点：如果 $A_{260}/A_{280} > 2$ 就是纯的，如果 $A_{260}/A_{280} > 2$ 就是核酸降解。 A_{260}/A_{230} 如果比 2.0 大许多，一定是有杂质残留的 (具体是什么杂质我不知道)。如果核酸抽提好后立即就测定， $A_{260}/A_{280} > 2.0$ 决不提示核酸降解，原因是：那些能导致 $A_{260}/A_{280} > 2.0$ 的核酸片段非常小，常规的沉淀是不可能将它们沉淀下来的；更可能的原因是：你仪器提供的 A_{260}/A_{280} 实际是 A_{262}/A_{282} 甚至 A_{264}/A_{284} 的值。纯的核酸的吸光值，在 A_{230} 是谷底，在 A_{260} 是峰顶，在 A_{280} 则正好是半山坡。根据曲线在底和顶的斜率最小，在半山坡的斜率最大的特点，不难得出如下结论： A_{230} 和 A_{260} 的读数受仪器准确性的影响比较小，而 A_{280} 受仪器准确性的影响比较大。

关于电泳检测，观察琼脂凝胶中 DNA 的最简单方法是利用荧光染料溴化乙锭进行染色。该物质含有一个可以嵌入 DNA 的堆积碱基之间的一个平面基团，这个基团的固定位置及其与碱基的密切接近，导致染料与 DNA 结合

并呈现荧光，其荧光产率比游离染料溶液有所增加。DNA 吸收 254nm 处的紫外辐射并传递给染料，而被结合的染料本身则在 302nm 和 366nm 有光吸收。这两种情况下，被吸收的能量可在可见光谱红橙区的 590nm 处重新发射出来。因此，当凝胶中含有游离溴化乙锭时即可以检测到少量的 DNA。

建议先电泳检测，再用紫外分光光度仪检测。电泳后，可以看到哪些样品根本就不能用（如降解太厉害），以及核酸的大致浓度，这样就为紫外分光光度仪的检测提供了一个参考（降解的不必要测了，要测的该取多少量等）。

七、核酸中杂质的去除

对于一些对核酸纯度要求较高的实验，我们就需要对其进行特殊的处理，除去其中的多糖、蛋白质及非目的核酸，其方法如下：

（1）肝糖元、淀粉及粘多糖，由于其物理化学性质与核酸有许多相似之处，常在提取液中残存下来。除去的方法常有：①取材前尽量减少组织中多糖的含量，如先使动物饥饿数天然后杀死，可使细胞内肝糖元大大减少。②加入淀粉酶，将大分子多糖分解为小分子，在以后纯化步骤中逐渐被除去。③在浓磷酸盐存在下，以 2-甲氧基乙醇抽提核酸提取液，使多糖溶于下层水相，核酸在上面有机层中。④以钙盐沉淀 DNA，再以草酸钾处理，使之形成 DNA 钾盐回收，然后用离子交换法吸附 DNA，使之与多糖分离。

（2）蛋白质的除去：由于核酸在细胞内以核蛋白体形式存在，不论采用哪种方法提取核酸，蛋白质都不同程度地存在于体系中。因此，除去蛋白质是核酸分离纯化不可避免的步骤。常用方法有下列几种：①加入去污剂如硫酸十二脂钠，从提取到分离纯化各阶段均可反复使用此法。去污剂与氯仿法或苯酚法结合使用，效果更加理想。②氯仿-戊醇或辛醇对提取液摇荡抽提，蛋白质在氯仿-水界面形成凝胶，离心后除去，核酸留在水溶液中。此法在分离纯化中也常反复使用。③苯酚水溶液抽提，在对氨基水杨酸等阴离子化合物存在下，DNA 或 RNA 都可以进入水相，蛋白质则沉淀于酚层，然后取水相加入乙醇或 2-乙氧基乙醇沉淀 RNA 或 DNA，残余的酚可用葡聚糖凝胶 G-10 或 G-25 除去。

（3）不同类型核酸的分离：两种类型核酸的制备过程中，DNA 制品中混杂着少量 RNA 或 RNA 制品中混杂着少量 DNA 是经常发生的。由于 DNA 和 RNA 结构和性质都很相似，而且分子量都十分大，所以两类核酸的分离是核酸纯化工作中比较复杂和繁琐的一步。从 DNA 中除去 RNA 的方法常有：①核糖核酸酶选择地破坏 RNA，这是比较有效的方法，但使用的核糖核酸酶中常含有极微量的脱氧核糖核酸酶，必须事先加热处理除去，然后将纯净的核糖核酸酶与样品溶液一起在 37℃ 孵育数分钟，就可达到破坏 RNA 的目的。②钙盐分步沉淀：在核酸溶液中加入 1/10 体积 10% 的氯化钙溶液，使 DNA 与 RNA 均成为钙盐后，再利用 DNA 钙盐在 2/10 体积乙醇中能形成沉淀析出，RNA 钙盐不形成沉淀而彼此分离。③活性炭吸附：将处理好的活性炭按 1/15~1/20 体积加入每毫升含有 0.5~1mgDNA 溶液中，0~4℃ 下搅拌 1h，以 31000×g 离心 1h，除去 RNA 后的 DNA 回收率可达 94%。

在 RNA 制品中除去 DNA，苯酚水溶液抽提是较有效和常用的方法。在没有阴离子化合物存在下，以等体积 90% 苯酚水溶液反复抽提 RNA，可以除去绝大部分 DNA。此外，也可采用加入脱氧核糖核酸酶处理，破坏 DNA，或参考上述 DNA 与 RNA 分离方法将 DNA 除去。

（4）同类核酸的分离：①RNA 混合物的分离：经过提取的初步纯化的 RNA 制品中含有各类 RNA 和某些已降解的 RNA 混合物。进一步纯化时，多应用柱层析、梯度离心及逆流分溶等方法。例如 tRNA 与 rRNA 的分离用吸附于硅藻土表面的甲基化白蛋白柱吸附后，以不同梯度氯化钠溶液洗脱，或用蔗糖梯度（顶部 5% 浓度，底部 20% 浓度）离心法分开。mRNA 的代谢速度较快，在细菌中平均寿命为 90min，在哺乳动物中约为几小时至十几小时，常用密度梯度离心法和 DNA-琼脂柱进行分离。制备 rRNA 时，由于共沉作用，常混有 mRNA，一般可用蔡-1，5-二磺酸处理，使二者分开。各种 tRNA 的提纯，通常采用逆流分溶法在磷酸缓冲液-甲酰胺-异丙醇

系统下进行，分离效果较好。 ②DNA 混合物的分离：主要是变性或降解的 DNA 和天然的分离，常用磷酸钙、ECTEOLA-纤维素、DEAE-纤维素和甲基化白蛋白柱层析，逆流分溶，梯度离心等方法。一个具有生物活性高度提纯的 DNA 制品应具有如下标准：不含有蛋白质及多糖；不含有可透析的小分子杂物；在 pH7 时紫外吸收最大值在 257~261nm 之间，E (P) 在 6600 左右；不含有 RNA；固体为纤维状，水溶液具有高的粘度并有流动双折射作用；具有电泳均一性及超离心中单分散性；具有生物活性。