

## 核酸分离纯化原理

核酸分离纯化技术是生物化学与分子生物学的一项基本技术。随着分子生物学技术广泛应用于生物学、医学及其相关等领域，核酸分离纯化技术也得到进一步发展。各种新方法、经完善后的传统经典方法以及商品试剂方法的不断出现，极大地推动了分子生物学的发展。现就核酸分离与纯化的原理及其方法学进展作一总结。

核酸分离纯化的原则核酸在细胞中总是与各种蛋白质结合在一起的。核酸的分离主要是指将核酸与蛋白质、多糖、脂肪等生物大分子物质分开。在分离核酸时应遵循以下原则：保证核酸分子一级结构的完整性；排除其他分子污染。核酸分离纯化的步骤大多数核酸分离纯化的方法一般都包括了细胞裂解、酶处理、核酸与其他生物大分子物质分离、核酸纯化等几个主要步骤。每一步骤又可由多种不同的方法单独或联合实现。

1、细胞裂解：核酸必须从细胞或其他生物物质中释放出来。细胞裂解可通过机械作用、化学作用、酶作用等方法实现。

a. 机械作用：包括低渗裂解、超声裂解、微波裂解、冻融裂解和颗粒破碎(Gd200 高通量组织研磨仪)等物理裂解方法。这些方法用机械力使细胞破碎，但机械力也可引起核酸链的断裂，因而不适用于高分子量长链核酸的分离。有报道超声裂解法提取的核酸片段长度从 $< 500\text{bp} \sim > 20\text{kb}$  之间，而颗粒匀浆法提取的核酸一般 $< 10\text{kb}$ 。

b. 化学作用：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。上述变性条件可通过加热、加入表面活性剂(SDS、Triton X-100、Tween 20、NP-40、CTAB、sar-cosyl、Chelex-100 等) 或强离子剂(异硫氰酸胍、盐酸胍、肌酸胍) 而获得。而 pH 环境则由加入的强碱(NaOH) 或缓冲液 (TE、STE 等) 提供。在一定的 pH 环境下，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  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ ，从而抑制核酸酶的活性，保护核酸不被降解。

c. 酶作用：主要是通过加入溶菌酶或蛋白酶(蛋白酶 K、植物蛋白酶或链霉蛋白酶) 以使细胞破裂，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(cell wall)的蛋白多糖 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸残基间的  $\beta$ -(1,4) 键水解。蛋白酶 K 能催化水解多种多肽键，其在  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  及有 EDTA、尿素( $1\sim 4\text{mol/L}$ ) 和去污剂( $0.5\% \text{SDS}$  或  $1\% \text{Triton X-100}$ ) 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。

2、酶处理：在核酸提取过程中，可通过加入适当的酶使不需要的物质降解，以利于核酸分离纯化。如在裂解液中加入蛋白酶(蛋白酶 K 或链酶蛋白酶) 可以降解蛋白质，灭活核酸酶(DNase 和 RNase)，DNase 和 RNase 也用于去除不需要的核酸。

3、核酸分离纯化：核酸的高电荷磷酸骨架使其比蛋白质、多糖、脂肪等其他生物大分子物质更具亲水性，根据它们理化性质的差异，用选择性沉淀、层析、密度梯度离心等方法可将核酸分离、纯化。

a. 酚提取/ 沉淀法：核酸分离的一个经典方法是酚：氯仿抽提法。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 8-羟基喹啉，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 NaOAc 或 KOAc 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。不同的离子对一些酶有抑制作用或可影响核酸的沉淀和溶解，在实际使用时应予以选择。经离心收集，核酸沉淀用 70 % 的乙醇漂洗以除去多余的盐分，即可获得纯化的核酸。

b. 层析法：层析法是利用不同物质某些理化性质的差异而建立的分离分析方法。包括吸附层析、亲和层析、离子交换层析等方法在内的层析法。因分离和纯化同步进行，并且有商品试剂盒供应，而被广泛应用于核酸的纯化。在一定的离子环境下，核酸可被选择性地吸附到硅土、硅胶或玻璃表面而与其他生物分子分离。另外一些选择性吸附方法以经修饰或包被的磁珠作为固相载体，磁珠可通过磁场分离而无需离心，结合至固相载体的核酸可用低盐缓冲液或水洗脱。该法分离纯化核酸，具有质量好、产量高、成本低、快速、简便、节省人力以及易于实现自动化等优点。玻璃粉或玻璃珠被证实为一种有效的核酸吸附剂。在高盐溶液中，核酸可被吸附至玻璃基质上，离液盐碘化钠或高氯酸钠可促进 DNA 与玻璃基质的结合。Dederich 等用酸洗玻璃珠分离纯

化核酸，获得高产量的质粒 DNA。在该方法中，细胞在碱性环境下裂解，裂解液用醋酸钾缓冲液中和后，直接加至含异丙醇的玻璃珠滤板，被异丙醇沉淀的质粒 DNA 结合至玻璃珠，用 80 % 乙醇真空抽洗除去细胞残片和蛋白质沉淀。后用含 RNase A 的 TE 缓冲液洗脱与玻璃珠结合的 DNA，获得的 DNA 可直接用于测序。