

核酸的分离提取技术

1、真核细胞基因组 DNA 的制备

真核细胞的直径一般为 10-100 μm ，细胞膜由脂质双分子层组成，胞浆中含有不同功能的细胞器和细胞核。核内含有多条染色体，携带全部的细胞遗传信息，核膜是由带孔隙的脂质双分子层组成，它可以使中等大小的分子自由穿过。

真核细胞 DNA 分子是以核蛋白形式存在于细胞核中，制备 DNA 的原则是既要使 DNA 与蛋白质、脂类和糖类等分离，又要保持 DNA 分子的完整性。蛋白酶 K 在 SDS 和 EDTA 存在的条件下，可以将蛋白质降解成小肽或氨基酸，从而使 DNA 与蛋白质分开。然后采用酚/氯仿抽提法提取真核细胞基因组 DNA。

当用全血制备基因组 DNA 时，可以采用非离子去污剂 Triton X-100，它直接破裂红细胞和白细胞膜，使血红蛋白及细胞核释放出来，通过离心分离即可获得白细胞核，再用 SDS 破坏细胞的核膜，用 EDTA 抑制细胞中 DNase 活性，然后用酚/氯仿抽提除去蛋白质，再用氯仿抽提除去 DNA 溶液中微量的酚污染；最后用无水乙醇沉淀 DNA，即可获得白细胞 DNA。

2、细胞总 RNA 的提取

原核和真核细胞都含有 3 类基本的 RNA，其中 80%~85% 为 rRNA，1%~5% 为 mRNA。细胞内大部分的 RNA 均与蛋白质结合在一起，以核蛋白形式存在。因此在分离 RNA 时，可用盐酸胍等使 RNA 与蛋白质分离，酚/氯仿-异戊醇等使蛋白质变性，经离心后形成上层水相和下层酚相，核酸溶于水相，被酚变性的蛋白质或溶于酚相或在两相界面处，让核酸从核蛋白中释放出来，最后沉淀 RNA。

异硫氰酸胍法提取细胞总 RNA 是目前常用的提取方法，其基本原理是：异硫氰酸胍(GuSCN)是一种强的蛋白质变性剂，不仅能使细胞裂解，同时还能有效地抑制细胞内源性 RNA 酶的活性，通过有机溶剂的分步抽提，最终可获得纯度较高的细胞总 RNA。Trizol 试剂就是基于此原理制备的一步法提取细胞或组织总 RNA 的试剂，经它提取的 RNA 样品纯度高、完整性好，常用作逆转录实验中的模板。