

1: 核酸抽提原理

简单地讲，核酸抽提包含样品的裂解和纯化两大步骤。裂解是使样品中的核酸游离在裂解体系中的过程，纯化则是使核酸与裂解体系中的其它成分，如蛋白质、盐及其它杂质彻底分离的过程。

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。

最常用的纯化方法，一是 PC 抽提 + 醇沉淀，二是介质纯化。第一种方法是利用 PC 对裂解体系进行反复抽提以去除蛋白质，实现核酸与蛋白质的分离；再用醇将核酸沉淀下来，实现核酸与盐的分离。第二种方法则是利用某些固相介质，在某些特定的条件下，选择性地吸附核酸，而不吸附蛋白质及盐的特点，实现核酸与蛋白质及盐的分离。高盐沉淀去除蛋白质是第一种纯化方法的一个变体，省略了 PC 操作的麻烦。当然，也有不纯化的抽提方法，但是用途多局限于简单的 PCR。其它杂质 - 如多糖、多酚等 - 的去除，基本上都是在这两种方法的基础上，通过增加一些特别的试剂，或者增加一些额外的步骤来实现的。

2: 了解你的实验样品

如果你研究某个实验样品，并且要抽提它的核酸，以下的信息一定要先行收集：该样品的核酸含量、酶含量、特殊杂质含量。如果你对样品的特点一无所知，当样品稍微有一点复杂时，抽提核酸的实验就会碰到许多问题。以血液为例，如果你不知道鸟的血液中有核细胞的含量是人血的千倍左右，而使用人血一样的起始量去抽提鸟血的基因组 DNA，怎么可能成功？失败了又怎么知道原因所在？同时，只有对实验样品有所了解，才能正确选择裂解方法。

绝大部分情况下，使用新鲜样品可以获得最好的结果。对一些杂质含量高的样品，如果使用新鲜样品抽提基因组 DNA 是碰到杂质残留过大的问题，可以试一下 -20℃ 保存一天后再抽提的对策，可能会有意想不到

的效果。样品如果因为某些原因必须先行保存，也要先简化一下样品：血液最好只保存有核细胞；将样品分割后保存，避免反复冻融。如果实验室不具备合适的保存条件，将样品先裂解后再保存，是一个不错的选择。

3: 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。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。

不使用蛋白酶的去污剂裂解方法，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。该方法也可用于基因组 DNA 抽提，非常快速简单，但纯度不是很高。

CTAB（十六烷基三甲基溴化铵）是一种阳离子去污剂，可以从低离子强度的溶液中沉淀核酸和酸性多聚糖的特性，在这种条件下，蛋白质和中性多聚糖仍留在溶液里，在高离子强度的溶液里，CTAB 与蛋白质和大多数酸性多聚糖以外的多聚糖形成复合物，只是不能沉淀核酸。因此，CTAB 可以用于从大量产生粘多糖的有机体如植物以及某些革兰氏阴性菌（包括 E.coli 的某些株）中制备纯化 DNA。

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 65C；但如果发现降解严重或者得率太低，可以试一下 37C – 45C 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 4C 会更好一些，所以，加入溶液 III 后在 4C 静置一段时间以及采用 4C 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。

选择了合适的裂解液，下一步就是要控制好样品与裂解液的比例。这个问题非常重要，但却没有获得足够的重视。严肃的参考资料，都应该会提供一个简单的比例，如 1ml 裂解液可以用于 T mg 组织或者 C 个细胞；我的建议是，你的样品量绝对要小于资料所提供的。起始样品用多大，并没有具体的说法。如果不是样品量有限，则以能抽提出满足数次成功实验所需的核酸量，作为决定样品起始量的基础，会比较合理的。不要因为 1ml 裂解液可以抽提 100mg 样品，就一定使用 100mg 样品。裂解液的用量，表面上与抽提的结果（纯度及得率）没有关系，然而，在实际操作中，对结果是有比较大的影响的。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。

4: 纯化方法评价

PC 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。

5: 醇的沉淀

醇的沉淀，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。实际操作中，许多杂质也会与核酸一起被醇沉淀下来，尤其是当其它杂质的浓度也比较高的时候。醇的沉淀并不是非常特异性的，任何有机大分子及一些盐，当浓度达到一定水平后，都可能同步被沉淀下来。

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 **TRIzol** 提供的一个沉淀方案：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。

如果核酸抽提的起始样品是比较“脏”的，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。

醇沉淀使用异丙醇还是乙醇，我没有发现这二者对质量有大的影响，虽然许多人“发现”乙醇沉淀的核酸纯度更高。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，提示结论：异丙醇沉淀的核酸不容易丢掉，但比较难洗涤。结合丢失和洗涤两个方面综合考虑，则建议：少量核酸用异丙醇沉淀（量少，洗涤不是问题，不丢失为先），大量核酸用乙醇沉淀（量大，丢失不是问题，洗涤方便为先）。至于异丙醇沉淀更容易沉淀下盐的说法，我没有碰到过（我几乎不使用低温沉淀，难道低温沉淀比较容易出现盐沉淀？）；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。

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。

6: 洗涤

洗涤首先一定要将沉淀悬浮起来；第二就是要有一定的时间，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。教科书中的操作基本上都是“倒掉上清后倒置在吸水纸上片刻”，这一描述本身没有问题，且十分方便，但因为来自国外，自然就有了“水土不服”的问题。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。唯一不受管子质量影响的操作，就是倒掉液体后再短暂离心，将残液用移液器吸出。一定要牢记的是，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。

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。最关键的，洗涤一定要用室温的 75% 乙醇。

7: 核酸的溶解和保存

纯化后的核酸，最后多使用水或者低浓度缓冲液溶解；其中 RNA 以水为主，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，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。

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。虽然也有部分实验人员发现，-20℃ 保存的 DNA 比 -70℃ 保存的稳定，我却宁可认为这是个例。

如果温度合适，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。

8: 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。) 其次，一定要经常调较仪器；调较可以使用非常纯的自备核酸，也可以使用苯酚 (后者是我目前每次都使用的方法，非常简单；具体道理可以见我以前的帖。) 最后，要记住读数 $A_{230} : A_{260} : A_{280} = 1 : 2 \text{ (DNA 为 1.8)} : 1$ 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 $A_{260}/A_{230} > 2$ 就是纯的，如果 $A_{260}/A_{280} > 2.3$ 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， $A_{260}/A_{280} > 2.3$ 决不提示核酸降解，原因是：那些能导致 $A_{260}/A_{280} > 2.3$ 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

A280 受仪器准确性的影响比较大。

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）。

9: 问题解答

非常基础的问题就不再罗嗦，目的是想对一些选项众多的问题解答进行简化：如果某一因素占了 70% 以上的可能性，我就只提该因素了。还有一些解答与部分人的知识可能相冲突，也请不要放在心上，因为它们也与我当年从书本上学习的知识相冲突。我记性差，什么都是看完就忘；但这也有好处，做实验从来没有框框。看一看，想一想，做一做 – 管用就好。

A 抽提过程中的现象及可能的原因

I: 核酸不溶解或者难溶解 – 蛋白质残留（虽然目前更多的资料强调的是过分干燥所致。）。75% 乙醇洗涤后，如果是空气干燥，几乎不可能过分干燥的，尤其是在南方潮湿的地方。佐证实验：撕取少量 Merck 的丝状 CT DNA 到一个离心管中，加入无水乙醇；10 分钟后彻底去除乙醇；待乙醇完全挥发后，加入 TE，10 分钟后溶液就非常均匀而粘稠了。

II: 使用异丙醇沉淀核酸，沉淀为白色 – 多糖残留。

III: 核酸溶解后为乳白色 – 多糖残留。

IV: 75% 乙醇洗涤异丙醇沉淀的核酸时，沉淀变大了 – 见 10-III。

B 紫外检测

I: A260/A280 比值低 – 蛋白质残留。但如果操作过程中使用了苯酚，则更可能是苯酚残留。

II: A260 值提示的含量与电泳检测时提示的含量有可见的误差 – 苯酚残留。

C 电泳中的现象及可能的原因

I: 加样孔有荧光 – 首先一定有 DNA 的滞留；其次多含蛋白质残留；如果是比较特殊的样品，其杂质也可能导致荧光。蛋白质几乎不会被 EB 染色，能出现荧光，则一定含有核酸。非常巨大的基因组 DNA (>

50kb)，如果使用普通的琼脂糖电泳，往往不能电泳出孔，单独就可能滞留在加样孔中产生荧光。更多的时候，是比较大的 DNA 与残留的蛋白质结合后，电泳不能出孔而在孔中产生荧光。酶反应产物，如果没有经过纯化去除酶，也非常容易在孔中出现荧光，其原因是酶与核酸几乎都有比较强的结合能力（基因组 DNA 的 PCR 产物电泳往往在孔中都有荧光，而且荧光强度与体系的特异性成反比。）。如果是植物样品，还可能由其它杂质残留引起。我的经验是：蛋白残留的荧光有点发闷，其它杂质残留亮得很刺眼，且薄得锐利。

II：总 RNA 非变性电泳显示过多的条带 – 根本就不是问题。

III：总 RNA 非变性电泳显示 28S 不如 18S 亮，但条带清晰无弥散 – 多提示 28S 没有被 EB 饱和。RNA 残留多时，基因组 DNA 的电泳也会有相似现象。简单的补染可以解决此问题。再次电泳时，或者降低上样量，或者增加胶中 EB 的量。

D 降解的现象、原因及对策

降解的现象，如果抛开问题电泳所致，可以简单总结如下：主带不再突出，向小片段方向发生弥散，亮度比较均衡地衰减。如果同时还伴随下列的一个或者多个现象，则需要更进一步的检测：加样孔非常的亮、弥散发生在主条带位置的上下两个方向、从加样孔即开始发生弥散。

以现在的裂解液的裂解能力而言，降解的发生主要是在彻底匀浆之前，只有极少量由不干净的溶解液导致。以总 RNA 抽提为例，本站就有帖总结为：总 RNA 的质量由高到低依次为悬浮细胞、贴壁细胞、组织（此处的质量不仅指纯度，也指完整性才对）。彻底裂解悬浮细胞的时间最短，彻底裂解组织的时间最长，这就是降解多发生在彻底匀浆之前的一个佐证。再看一看新鲜样品和冷冻保存样品，非常严格的冷冻保存和匀浆操作的确可以确保冷冻样品的核酸的质量；但是，有许多实验室并不具备严格的保存手段，实验人员的操作也并非完美，其结果就是核酸的降解。RNA 抽提受的影响因素太多，就以基因组 DNA 的抽提为例看一看吧。假定消化使用的是含蛋白酶 K 的溶液，无论你使用的是新鲜样品还是冷冻保存样品，如果混匀彻底，可以预期的降解为：细胞 – 不应该降解，碾碎的组织 – 不应该降解，大块组织（包括鼠尾）– 部分降解。如果电泳发现新鲜的细胞和碾碎的新鲜组织发生了降解现象，该现象是假象；如果电泳发现冷冻的细胞和碾碎的冷冻组织发生了降解现象，该现象不是假象，就是样品在保存中已经降解了。说得更极端一点，即使蛋白酶 K 失活了，消化试剂的裂解能力也足以保证细胞的基因组 DNA 在抽提过程中间不被降解。

减少或者杜绝核酸降解，一定要将重点放在样品被彻底匀浆之前。样品的保存在前面已经说过了，不重复。其次就是要缩短样品从脱离原来的生存环境或者低温到被彻底匀浆之间的时间。

E 后续酶反应失败

资料书中连篇累牍的原因我就不说了，因为都对。我相信因为大家首先相信的就是它们，所以碰到问题首先一定会从那些方面着手。如果三次实验后，问题还没有解决，那么 90% 的可能在于洗涤方式的不严格导致的小分子物的残留。小分子物像刀，可以陆续“杀”死很多酶；大分子物如蛋白质，像绳子，只能“捆住”一个目的核酸或者酶。更严格的洗涤可以解决该问题。

F 蛋白质是如何残留的

PC 纯化：a-取上清时取到中间层及下层；b- PC 用量不足；c-混匀不彻底；d-溶解于上清中的少量 PC 中含有的蛋白质。

高盐沉淀：a-取上清时取到了蛋白沉淀；b-裂解不彻底；c-裂解液用量不足，使裂解体系太粘稠；d-溶解度问题（可以使用低温沉淀加以改善）。

介质：a-裂解不彻底；b-裂解体系太粘稠。

G 小分子物质（苯酚、盐）是如何残留的

醇沉淀：洗涤不彻底。其原因与管子、操作手法等有关。

介质：颗粒状介质的原因与醇沉淀相同。柱式的几乎都是柱子设计上的缺陷所致，极少数由操作者未严格按照要求操作所致。

10: 某些我使用的操作手法

实验做多了，的确希望能偷点懒；偷懒也有讲究，否则就是偷鸡不成失把米。下面就是一些在确保抽提成功前提下的通用操作方法；有些看起来很麻烦，但请想一想抽提失败后的再次抽提，应该是可以算偷懒的方法了：

I: 混匀操作（1.5ml 离心管内）– 如果液体体积在 100ul 以内，用指头弹击尖底混匀；在 100-400ul 之间，用振荡器混匀；大于 400ul，用手晃动混匀：晃动时使离心管底永远处于斜上位置，频率要快。

II: PC 抽提时上清的移取 – 离心管倾斜, 根据上清的量选择不超过 200ul 的移液器, 在外面先压下移液器, 再将 tip 移入上清。Tip 要尽可能靠近液面, tip 的尖嘴接触内壁, 缓缓松手吸取上清。可多次移取, 但决不要使用 1ml 移液器。

III: 核酸的洗涤 – 核酸沉淀后离心, 将上清倒掉。如果核酸是来源于杂质比较多的样品 (如植物、动物肝脏、细菌等), 则在加入 75% 乙醇之前, 再将离心管短暂离心后, 用移液器将残留液体彻底吸出, 否则, 75% 的乙醇非常容易将残留液体中的多糖等杂质给沉淀下来。移取 75% 乙醇使用一次性的塑料吸管, 加入后将核酸彻底悬浮起来, 置于室温一段时间 (时间长短取决于沉淀大小), 期间多混匀几次。如果去除 75% 乙醇的操作是“离心后倒掉再短暂离心后吸出残留液体”, 则洗涤 2 次; 如果去除 75% 乙醇的操作是“离心后倒掉”, 则洗涤 3 次, 但最后一次仍然采用“离心后倒掉再短暂离心后吸出残留液体”。这样洗涤的目的, 是确保小分子物的残留低于 10 万分之一 (最大残留不高于 10uM 级)。

11: 一些特别的问题

a: EP 管的问题

几乎没有人会认为 EP 管的质量会与核酸抽提的操作有关, 与某些现象 (如核酸在 -20C 保存一天后发生了降解) 有关系, 但事实是, EP 管的质量的确与核酸抽提的质量以及核酸保存时的稳定性有关。

硅化可以提供最高质量的 EP 管, 使某些奇怪的现象消失或者大大减轻。最糟糕的 EP 管对液体有较强的吸附力, 在倾倒液体时残留多, 核酸在管中保存的过程中会发生变性。这样的管子是很有市场的, 因为便宜; 而正因为便宜, 其材料总是不令人放心的。

我个人认为, 只有硅化过的 EP 管, 才可能按照标准操作获得满意的结果。否则, 某些操作步骤必须调整, 才可以获得稳定的质量。

b: 核酸抽提中的温度问题

核酸抽提中的温度问题, 也是一个值得关注的问题。首先要明确的一点是, 任何一个温度条件, 对某些方面有利, 同时也一定会有不利的一面。如沉淀, 低温操作会提高得率, 但也会增加杂质的残留。任何一步操作该用什么温度为好, 应该是利弊权衡的结果。基本上, 除了一些特殊的步骤, 如消化等外, 用室温是最好的选择。那些认为“低温操作可以防止或者减少降解”之类的理由, 并没有多少可操作性的。低温的确可以减低酶的活性, 但低温同时也降低了这些酶被裂解液中的试剂灭活或者抑制的速度, 此消彼长, 没有办法给出结

论的。就 RNA 抽提而言，彻底匀浆前在冰上操作可以降低 RNA 被降低的风险，彻底匀浆后的温度对 RNA 的完整性影响已经不会大的；如果发现影响很大，说明 RNase 没有被裂解液有效抑制，提示裂解液的用量不足。更没有道理的是认为低温沉淀和低温洗涤可以防止降解了。事实上，核酸一旦被沉淀下来，对酶的耐受力是很强的，这就是核酸保存在醇溶液中最稳定的理论基础。如果说沉淀使用低温还可以提高得率，洗涤使用低温又是为什么？彻底的错误而已。

c: 如何阅读操作手册

拿到操作手册后，要倒着阅读：先阅读问题解答，再看操作步骤下面的说明，再看操作步骤。问题解答是别人在使用过程中曾经碰到过的问题集锦，操作步骤下面的说明是商家的警告。没有一个商家会将他的操作步骤写得非常复杂，因为这是满足使用人员习惯的结果。一句话，PS 和 By the Way 之类的话中含有真正的有用素材。

12: 延伸的思考

a: 标准化的概念

所谓的标准化，指的是一套程序，确保不同的人能获得质量接近的产物的程序。标准化并不是以获得最高质量为目标，而是以稳定为目标。标准化的核心是质控。

事实上，核酸抽提的每一步操作，都有一个核心；重要的是找到可观察的指标或者现象作为参考，从而确保实验的成功。如悬浮的核心是没有块状物的存在，彻底消化的核心是没有块状物的存在，PC 抽提的核心是混匀-两相成为乳状，取上清的核心是用小一点的移液器移取液体，吸取时 Tip 的尖头尽可能接近液面，吸取速度要慢，并且要留下 1mm 以上的液体不要再吸。去上清的核心是先倒空，再短暂离心将残留液体离到管底，用移液器彻底移出。洗涤的核心是彻底悬浮沉淀，并且要放置一段时间（时间长短与沉淀大小有关）使沉淀内部也能被洗涤到。按这样的方法抽提的核酸，其质量是非常稳定的。

柱离心式实际上就是非常标准化的核酸沉淀与洗涤的操作。一般而言，如果严格按照操作步骤去做了，柱式操作出问题，系统性的与试剂盒有关，偶然性的与操作有关。这一点，应该是可以理解的。

一个方法，其标准化程度越高，其稳定性就越好。步骤越少，标准化就越容易。产品的开发也要以高标准化程度为目标。

b: QC 的概念

QC (质控) 概念远没有 QT (质检) 概念深入人心。最高境界的产品追求的是免检，或者是 Trouble-free。另外，现在的许多产品也是不允许 QT 的 (因为是一次性的)，因此就只能靠 QC 来保证质量了。QC 是将精力集中在过程中：原料、操作等。只要严格按照标准去做，最终的结果就有保证。事实上，很多实验人员是不做检测而直接将抽提好的核酸用于后续实验的；他们之所以可以这么做，是因为他们有意无意之中非常的注意 QC。也有不少人，尤其是新手，Pay no attention to QC，只知道最后的 QT。一旦发现问题，就去逆推原因；但因为过程中所出现的现象根本就没有注意，几乎不可能准确找出真正的原因的。如果 QC 做得好，最后的 QT 是否全部做/部分做/完全不做，取决于时间、经验、后续实验的成本等因素。

c: 其它

核酸抽提的每一步操作，都是利弊权衡的结果。消化要彻底，时间就会长；PC 抽提时多取上清，得率会提高，但增加了蛋白质污染的风险；沉淀使用低温且延长时间，得率会提高，但增加了杂质污染的风险 ... 不足详列。总之，核酸抽提是艺术，可以根据自己的样品及当时的情况，对操作步骤进行适当的优化。

d: 实验的思维

核酸抽提的成功，就是每一步都没有失败。这不是玩文字游戏，而是告诉你做实验的良好思维。就如同小学基础没有打好，早晚会发现大问题一样，做实验决不要以成功为喜悦，以失败为痛苦。要保证实验成功，绝对不能有“这个操作应该没有问题”，“用这个可能不会有问题”之类的侥幸心理。去掉任何一个可能使实验失败的因素，这才是实验该有的出发点。用这样的出发点，实验几乎没有不成功的，所以说，实验成功没有什么快乐；实验的快乐来自于：发现自认为不会导致失败的某因素实际会导致实验的失败。学到了这样的知识，才有快乐的理由。

e: EB 在 NA 抽提中的运用

EB 在 NA 抽提中的应用，用于电泳，人皆尽知；用于 gDNA 抽提时提高蛋白质与 gDNA 的分离效率，却似乎没有人再考虑了，因为大家都怕使用 EB。在 NA 抽提中涉及到 EB 的另外一大类，就是胶回收操作了；EB 在胶回收中扮演的角色，就不完全是正面的。

如果 NA 与 EB 充分接触，EB 就会以每隔数个碱基的频率均匀地插入 NA 之中。EB 的这种插入，无疑更可能破坏核酸双链的稳定性，使核酸由双链变成单链的压力增加。如果核酸比较短，而错配又多（错配的后果之一也是核酸容易由双链变成单链），EB 的插入将更容易导致变性的出现。这个观点有如下的实验报告佐证：有相当部分的 PCR 产物胶回收实验，都报告说回收后的电泳结果是：目的条带变淡或者消失，同时出现了一条小的原来不存在的条带。

坛中曾有文描述他做胶回收的程序：两边加 Marker，中间加产物；电泳过程不含 EB。电泳结束后，纵向割下 Marker 条带用 EB 染色后，放回胶原来的位置。开紫外，根据 Marker 的位置割下目的条带，再回收。这是个笨办法，但这样使用的人一定是聪明人。如果这个办法仍然不能消除变性，则只能使用高保真的酶了。

f: 蛋白质残留的影响问题（探讨，没有证据）

一直对蛋白质残留不抱好感，却也没有将它看成威力无比。本节考虑的是蛋白质对酶反应的影响问题，为方便表述，我将残留的蛋白质分成同源的（与核酸或者酶有同一或者相似的来源，如细菌）和异源的（与核酸或者酶没有同一或者相似的来源）两种。

先看异源蛋白质的影响：内切酶几乎都在保存液中添加有 500ug/ml 的 BSA，BSA 是改善 PCR 结果的一个选项，BSA 是稳定低浓度核酸的一个选项。几乎都是正面的。可以看到，异源蛋白质对酶反应没有抑制作用，甚至还有促进作用（虽然都是以 BSA 为例）。

再看同源蛋白质的影响：AMBION 公司有一个非常有特点的产品“Cells-to-cDNA Kit”。细胞裂解后不去除蛋白质就直接用于 RT-PCR。该例子应该可以说明，与核酸同源的蛋白质的残留对 RT-PCR 不一定有影响。另外一个例子是质粒的酶切。质粒酶切是比较容易出现一些靠 PC 纯化一次就可以解决的问题的；因为 PC 纯化基本上就是去除蛋白质，所以可以认为质粒抽提中残留的蛋白质对酶切是有巨大影响的。各位看官是否注意到这两个例子的最大区别在什么地方？区别在于残留的蛋白质究竟是与核酸同源还是与蛋白质同源。事实是，质粒抽提中残留的蛋白质是宿主菌的（Ecoli 或者其它），与质粒并不同源；而内切酶却是来自于 Ecoli 或者其表弟表妹的，与宿主菌的蛋白质同源性是非常高才对。还有一个现象：EcoR I 的 Star Activity 是最明显的，其它来源于 Ecoli 的酶的该活性也不差，这是为什么？

写到这，我头有点痛了，因为我没有办法证明；就是有人提供了证明，我暂时也看不到用途。毕竟，酶反应不是受单一因素影响的。如果说该思考有什么现实意义，那就是：残留蛋白质的危害可能被夸大；许多实验

在重复失败，只是因为你抓住的嫌疑犯不是真凶。更大胆的假设是：**BSA** 可以用于某些核酸抽提，以更彻底去除与酶同源的蛋白质残留。

g: 无介质的核酸抽提裂解液 (不含苯酚) 的展望 (供核酸抽提产品生产商及潜在的生产商参考)

经典的醇沉淀和洗涤，在无介质核酸抽提技术中，几乎是不可或缺的，尽管微调可以带来一些意想不到的效果。能展望的，也只有裂解液了。现在的裂解液，都没有同步去除蛋白质的功能；蛋白质的去除，或者靠裂解后再加入苯酚抽提去除蛋白质，或者靠加入高盐溶液去除蛋白质，效果也不错。能做的改进，看起来也就只有配制出这样一种裂解液：裂解效率高 (得率的保证)，同时蛋白质可以靠离心去除 (操作简化了)。简单地讲，下面提供的是目前可以想象的结合有高等率、高纯度、操作最简单诸多特点的操作步骤 (以细胞为例。组织捣碎后也适用)：

在样品中加入裂解液，混匀后，静置使裂解彻底。高速离心后，蛋白质沉淀在离心管的底部，上清则为核酸。将上清转移到预先已经加入了醇的离心管中，轻轻混匀后，用一个小钩捞出大的絮状沉淀 (以 **DNA** 为主) 到另外一个离心管中；捞不起来的 (主要是 **RNA**) 用离心沉底。分别洗涤蛋白质沉淀，**DNA** 絮状沉淀和 **RNA** 离心的沉淀，再分别溶解，就可以同步获得 **DNA/RNA/蛋白质**了。

半年前我开始考虑这样的裂解液时，只是抱作玩的态度。失败后思考，思考后再失败；半年下来，试剂的配制进展有一点，但“发现”的用途却越来越多：所有原来采用苯酚抽提去除蛋白质的纯化操作，如酶切后的纯化、**DNase** 降解 **DNA** 后的纯化 ... 都可以用这样的裂解液来替代。其前景越来越美好，内心却越来越不平和，患得患失起来；开放这个思路，我就会不那么在意了。这个裂解液应该是有比较好的经济价值的 – 即使是技术的卖价应该也不会低于 6 位数；任何人都可以用玩的心态试一试，不过不要赌博就是。

h: 醇沉淀的语言 **Flash** – 从低浓度核酸沉淀条件的改变看核酸是如何形成沉淀的

核酸醇沉淀的原理，按照分子克隆中的描述，是用阳离子中和了磷酸根的负电荷后，核酸“无性”结合才能沉淀下来。低浓度核酸沉淀的条件一般要做如下改变：使用长时间的低温、使用更高比例的醇、使用 **tRNA** 之类的东西。下面就用 **Flash** 语言的特点，描述一下“无性”的核酸是如何结合的。

溶液中的单个核酸，虽然是“无性”的，对其它的核酸，仍然是有引力的 (大小与距离相关)；同时，核酸分子受到的另外一个力，来自分子运动。在一般情况下，核酸之间的引力比分子运动产生的力小许多；只有当核酸之间的距离足够近时，引力才能克服分子运动产生的力，使两个核酸结合到一起。结合在一起的两个核酸又共同对其它的核酸产生引力 (该引力比单个核酸的要大)，结合上更多的核酸 ... 最终沉淀下来了。低

温和和更高浓度的醇都有利于降低分子运动产生的力，tRNA 能提高总核酸浓度进而通过与目的核酸的结合提高了目的核酸之间的引力，所以低浓度核酸的沉淀条件如上。至于 2 价镁离子有利于低浓度核酸的沉淀原因，可能是镁离子要被同一核酸分子的两个磷酸根结合，这种结合的结果是核酸分子变得更立体了（团状）：引力越集中，对外就越大。

i: 从柱离心式产品的流行看经典方法的缺点（或者操作重点）

柱式方法的风行是无法否定的现实。下面通过柱式方法与经典方法的比较，看一看如何注意经典方法的操作重点。

裂解，二者几乎没有任何区别。去蛋白质，柱式靠的是柱材料对蛋白质吸附力低这一特点，将蛋白质残留控制在比较低的水平（并不是/也不能彻底去除）；经典方法最常用的是 PC 抽提，可以将蛋白质去除得更彻底一些。其它大分子杂质 - 如多糖等 - 的去除，柱式的与蛋白质的去除相似，但经典方法中却没有如此方便的对应方法。小分子物（盐等）的去除，在我的眼里，是柱式方法最可爱的地方。如果柱子设计没有问题，离心后柱子中残留的液体稳定而少；柱式的洗涤具有“流水洗涤”的效果；柱式中的核酸是不成团块的 - 这三个特点决定了柱式的洗涤效率比经典的洗涤效率高，所以，柱式纯化的核酸纯度比较高。

结论是：裂解和去蛋白质的能力，经典方法不次于柱式方法；去除其它大分子杂质，经典方法不如柱式；洗涤能力，按目前各种参考书中的介绍去做，几乎没有办法超过柱式方法。你看一看上面柱式方法洗涤的特点，经典洗涤方法哪一条强调了。再想一想你是如何手工洗衣服的，象不象柱式洗涤的特点，就应该不会有疑问的吧。难道过去的核酸沉淀洗涤方法有错误？那倒不是。真正的原因是，过去核酸抽提使用的小分子物（盐等），多是后续酶反应中会使用到的或者起码少量的残留不会抑制后续酶反应的；现在抽提中使用的东西就不一样了，都是一些对蛋白质有强烈作用的东西，而且浓度还非常高。过去有资料强调测 A230 值吗？自打 Guanidine Thiocyanate 开始广泛用于核酸抽提后，A260/A230 比值的测定成为检测质量标准的一个非常重要的指标了。

如果将洗涤操作更强化及严格一点，对于一般比较干净的样品，你会发现经典方法抽提的核酸完全可以达到非常好的质量的。柱式就还留下一个“快”的特点，当然应该说是“更快”。