

TECHNOTE 303

酚/氯仿法提取 DNA



Enriching Biotechnology

Telephone: +86 021 55809378

E-mail address: marketing@bio-enriching.com

酚/氯仿法提取 DNA 是 DNA 抽提的经典方法，也是基本方法。各种商品化 DNA 提取试剂盒，绝大部分在此基础上衍生、发展而成。掌握酚/氯仿法的基本原理，不但有助于理解 DNA 抽提的标准操作流程(SOP)，而且有助于故障排除，有助于优质地完成工作。所有从事分子生物学工作的同学，都有必要对这一方法有透彻的理解。

1. 用酚/氯仿法抽提 DNA 时，苯酚起什么作用？

用苯酚处理各种样本匀浆液时，由于组蛋白与 DNA 之间的联键已经断裂，蛋白质分子表面又含有很多极性基团，与苯酚相似相溶，所以蛋白质分子溶于酚相。DNA 分子溶于水相。在 DNA 提取过程中，苯酚的作用是：第一，使**蛋白质变性**；第二，**抑制细胞破裂时所释放出来的 DNase 的活性**，抑制 DNase 对 DNA 的降解。

苯酚的缺点有：第一，苯酚能溶解 10%-15%的水，从而溶解一部分 DNA，造成部分 DNA 被损失。2，苯酚不能完全抑制 DNase 的活性，导致部分 DNA 被降解。

2. 氯仿起什么作用？

第一，氯仿能够帮助克服上面提到的酚的两个缺点，帮助提取更多更好质量的 DNA；第二，氯仿能加速有机相与水相的分层，方便操作。由于酚易溶于氯仿，在酚/氯仿抽提后，再用氯仿抽提一次，可以去除核酸溶液中残留的痕量酚。

酚和氯仿都是非极性分子，水是极性分子。当蛋白质水溶液与酚/氯仿混合时，蛋白质分子之间的水分子被酚或氯仿挤去，使蛋白失去水合状态而变性。经过离心，变性蛋白质的密度比水的密度大，与水相分离，沉淀在水相下面，从而与溶解在水相中的 DNA 分离。而酚、氯仿等有机溶剂的比重更大，位于最下层。

作为蛋白质变性剂的酚与氯仿，在去除蛋白质的作用中，各有所长，各有所短。酚的变性作用更强烈，但是酚与水有一定程度的互溶，大约 10%~15%的水溶解在酚相中，因而损失了这部分水相中的 DNA。氯仿的变性作用比酚弱，但是氯仿与水不相溶，不会带走 DNA。所以在抽提 DNA 的过程中，酚与氯仿混合使用效果最好。

经第一次酚抽提后，水相中残留有酚。利用酚与氯仿互溶的性质，可以用氯仿进行

第二次抽提，一方面进一步变性蛋白质，一方面将残留的酚带走。第二次抽提时，也可以将酚与氯仿混合（1:1）使用。

3. 为什么要在酚/氯仿中加入少量异戊醇？

第一，异戊醇可以降低表面张力，减少气泡的产生。在 DNA 抽提过程中，为了使有机溶剂与样本裂解液尽可能地混合均匀，必须剧烈振荡数次。这时容易在混合液内产生气泡，气泡又会阻止有机溶剂与蛋白质之间的充分接触和相互作用。在酚/氯仿溶液中加入少许异戊醇，能够降低表面张力，减少抽提过程中泡沫的产生，使酚/氯仿能够更容易、更充分地与样本裂解液中的蛋白质接触，更好地发挥蛋白质变性和酶活性抑制作用。一般采用氯仿：异戊醇比例 24：1，也可以采用酚：氯仿：异戊醇比例 25：24：1（不必事先配制，临用前一份酚加一份 24：1 的氯仿：异戊醇）。

第二，异戊醇有助于分相，有助于维持离心后上层含 DNA 水相、中间层变性蛋白相、下层有机溶剂相的稳定分层。

4. 为什么要用无水乙醇沉淀 DNA？

无水乙醇是最常用的 DNA 沉淀剂。DNA 溶液中的 DNA 分子以水合物的状态稳定存在。加入乙醇后，乙醇夺取 DNA 周围的水分子，使 DNA 失水而易于相互聚合，形成沉淀。乙醇的优点是，1、可以以任意比例与水混溶；2、乙醇与核酸不起任何化学反应，对 DNA 很安全，所以乙醇是理想的 DNA 沉淀剂。

实验中，通常加入 2.5 倍体积的无水乙醇与 DNA 溶液相混合，乙醇的终含量为 71.4%。由于无水乙醇的价格比 95%乙醇贵很多，经常有实验室改用 95%乙醇，乙醇的终含量下降为 67.9%，沉淀效果稍差，DNA 的损失增大。在多次用乙醇反复沉淀以纯化 DNA 的时候，会影响 DNA 得率。可以考虑一种折中的做法：初次沉淀用 95%乙醇，第二次沉淀用无水乙醇。

5. 用乙醇沉淀 DNA 时，为什么要加入一价阳离子？

用乙醇沉淀 DNA 时，通常要在溶液中加入单价阳离子，如少量 3 M NaCl 或 NaAc。Na⁺能中和 DNA 分子上的负电荷，减少 DNA 分子之间由于同性电荷而形成的排斥力，使 DNA 分子更容易聚集形成沉淀。所加入的单价阳离子，浓度不可过高也不可过低。如果加入的盐溶液浓度太低，只有部分 DNA 生成 DNA 钠盐而聚合，则 DNA 沉淀不完全。如果加入的盐溶液浓度太高，导致最终获得的 DNA 产品中盐杂质过多，则影响后续的 PCR、DNA 酶切等生化反应。出现这种情况，可以通过对 DNA 进行洗涤或重沉淀来纯化。