

## 两种核酸提取方法在生物化学实验教学中的探求与研究

农嵩,李朝敢,李根亮,黄晓敏,孙科,李曙波,胡红柳

(右江民族医学院基础医学院,广西 百色 533000 E-mail: ns121@163.com)

**摘要:**目的 探索在生物化学实验教学中动物组织核酸的提取方法。方法 经过反复实践后,随机挑选两组学生(酚提取组 27 例,三氯醋酸提取组 28 例),分别以酚提取法和三氯醋酸提取法提取猪肝中的核酸,分别进行水解和鉴定核酸的各种成分(磷酸、嘌呤碱、核糖和脱氧核糖),对比分析各种成分鉴定的阳性率。结果 核酸四种成分定性鉴定,两组间磷酸、核糖和脱氧核糖对比差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),三氯醋酸提取组的嘌呤碱明显优于酚提取组( $P < 0.001$ )。结论 三氯醋酸提取法提取动物组织中核酸,实验试剂更加安全,步骤简单,对实验设备要求不高,实验效果明显。

**关键词:** 动物组织;核酸;酚提取法;三氯醋酸提取法

**中图分类号:** G642 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2018)03-0289-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.03.022

核酸是以核苷酸为基本单位的生物信息大分子,核苷酸由碱基(嘌呤和嘧啶)、戊糖(核糖和脱氧核糖)和磷酸三种成分连接而成,广泛分布于所有动物细胞内<sup>[1]</sup>。核酸既是生物大分子结构与功能的有机组成部分,也是基因信息传递与表达部分的学习基础,跟分子生物学联系密切<sup>[2]</sup>。动物组织中核酸的提取、水解与鉴定是生物化学课程中生物大分子结构与功能基础章节中的一个综合性实验,也是培养学生动手能力、可操作性很强的一个实验。实践课程着重培养学生发现问题、解决问题的能力,同时在实践中深化基础知识的理解并激发学生的创造力<sup>[3]</sup>。长期以来,我们都对各专业各层次的学生开设这个实验。由于用酚提取法进行操作存在一定的缺陷,自2014学年第二学期起,经过反复实践,我们认为三氯醋酸提取法所用实验试剂具有更加安全、费用更低、对实验设备和操作要求不高、实验阳性率较高等优点,更适合在课堂上开展。

### 1 对象与方法

1.1 对象 授课对象为右江民族医学院2014级55名医学影像专业本科四年制二年级学生,将其分为酚提取组( $n = 27$ )和三氯醋酸提取组( $n = 28$ );酚提取组学生采用酚提取法提取核酸,三氯醋酸提取组学生采用三氯醋酸提取法提取核酸。

### 1.2 方法

1.2.1 实验材料 取新鲜猪肝称重,剪成碎末,以肝:蒸馏水 = 1:2 的比例制肝匀浆。试剂:90%苯酚、乙醚、95%乙醇、2%三氯醋酸、10%氯化钠、5%硫酸、钼酸试剂(由钼酸铵、硫酸等配制)、氨基茶酚磺酸钠溶液(由1,2,4-氨基茶酚磺酸钠、亚硫酸氢钠和亚硫酸钠等配制)、饱和苦味酸溶液、Bial试剂(由3,5-二羟甲苯、盐酸和氯化铁等配制)、二苯胺试剂(由二苯胺、

冰乙酸和硫酸等配制),以上试剂均用国产分析纯。仪器:15 mm × 100 mm 试管(外径 15 mm,长度 100 mm)、滴管、玻棒、沸水浴锅、组织匀浆器、低速台式离心机。

### 1.2.2 实验过程

1.2.2.1 酚提取法 取试管 1 支,分别加入肝匀浆和 90%苯酚各 4 ml,用滴管抽吸充分混匀(2 min),离心(3000 r/min,下同)5 min。取上层液转移至另一试管中,加入 2 ml 乙醚,用塞子堵住管口振摇 1~2 min,离心 3 min,弃上层液。沉淀加 95%乙醇 2 ml,振摇 2 min,离心 3 min,沉淀物为核酸。水解方法:取沉淀物加入 5%硫酸 4 ml,摇匀,在沸水浴中加热 15 min,得核酸水解液,水浴冷却。

1.2.2.2 三氯醋酸提取法 取试管 1 支,分别加入肝匀浆和 2%三氯醋酸各 4 ml,用塞子堵住管口充分混匀(2 min),离心(3000 r/min,下同)5 min。将离心后的上层液倾去。于沉淀中再加入 10% NaCl 溶液 4 ml,搅匀后置沸水浴中 8 min,并用玻棒不断搅拌,取出;冷却后再离心 5 min,将上层液倾入另一试管中。取等量 95%的乙醇,逐滴加入到上层液中,即可见白色沉淀逐渐出现,静置 5 min 后,离心 5 min,将上层液倾去,所得白色沉淀即为核酸钠。水解方法同上。

### 1.2.3 核酸四种成分的鉴定方法<sup>[4]</sup>

1.2.3.1 试剂选择及其用量 在对照管和测定管中分别先加入相应剂量的 5%硫酸和核酸水解液。因为已证实 5%硫酸与饱和苦味酸不发生(包括颜色和性状)反应,所以嘌呤碱可不设对照管。根据文献<sup>[4]</sup>鉴定核酸四种成分的方法,在试管中加入相应量试剂,见表 1。

表1 鉴定核酸四种成分所用试剂及其用量

加入试剂	磷酸		核糖		脱氧核糖		嘌呤碱 测定管
	对照管	测定管	对照管	测定管	对照管	测定管	
核酸水解液(滴)	—	10	—	6	—	20	4~6
5%硫酸(滴)	10	—	6	—	20	—	—
钼酸试剂(滴)	5	5	—	—	—	—	—
氨基萘酚磺酸钠(滴)	4	4	—	—	—	—	—
Bial试剂(滴)	—	—	9	9	—	—	—
二苯胺试剂(滴)	—	—	—	—	40	40	—
饱和苦味酸(ml)	—	—	—	—	—	—	2

1.2.3.2 核酸四种成分阳性判定标准<sup>[4]</sup> 将各管按1.2.3.1方法加入的试剂混匀后,对磷酸和核糖的对照管和测定管分别置100℃水浴加热5~10 min,脱氧核糖加热15 min,嘌呤碱测定管室温静置5~10 min。磷酸与钼酸试剂和氨基萘酚磺酸钠加热反应生成蓝色的钼蓝,测定管可见蓝色为阳性(见图1a);嘌呤碱与苦味酸作用生成针状结晶,测定管有针状结晶出现为

阳性(见图1b);核糖与强酸共热生成糠醛,后者与苔黑酚(地衣酚,3,5-二羟甲苯)反应,缩合为绿色化合物,测定管可见绿色为阳性(见图1c);脱氧核糖与强酸共热脱水生成 $\omega$ -羟基- $\gamma$ -酮基戊醛,该化合物与二苯胺反应生成蓝色化合物,测定管可见蓝色为阳性(见图1d)。

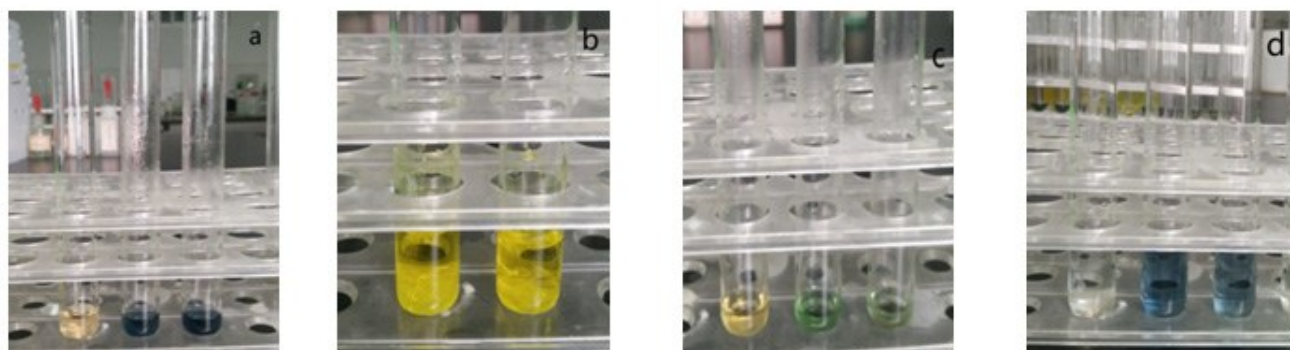


图1 核酸四种成分的鉴定标准

注:a为磷酸的鉴定;b为嘌呤碱的鉴定;c为核糖的鉴定;d为脱氧核糖的鉴定

1.2.4 统计学方法 使用SPSS 20.0统计软件进行两组计数资料 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

酚提取组和三氯醋酸提取组学生分别采用酚提取法和三氯醋酸提取法提取核酸后,对所得提取物均进行阳性鉴定,结果显示:磷酸、核糖和脱氧核糖的鉴定阳性率相对较高( $> 60\%$ ),两组差异无统计学意义。而嘌呤碱的鉴定,与酚提取组比较,三氯醋酸提取组阳性率明显升高,差异有统计学意义。见表2。

## 3 讨论

两种方法比较,酚提取法主要存在的缺点是:酚类物质具有高度腐蚀性,易引起严重的烧伤,故在涉及酚的所有实验操作中实验者往往须采取一定的防护措施;并且实验使用的酚为商品酚,易被氧化产生酚的氧

表2 两组学生提取的核酸四种成分鉴定的阳性结果对比 ( $n, \%$ )

组别	$n$	磷酸	嘌呤碱	核糖	脱氧核糖
酚提取法	27	24(88.89)	5(18.52)	22(81.48)	18(66.67)
三氯醋酸提取法	28	26(92.86)	24(85.71) <sup>a</sup>	22(78.57)	17(60.71)

注:与酚提取法比较,a: $P < 0.001$

化物如醌、二酸等,可破坏核酸的二酯键,并引起DNA链的交联<sup>[5]</sup>。乙醚是无色透明易燃液体,极易挥发出刺激性气味,长期接触乙醚有一定的危害,可以对中枢神经系统、肝脏等许多器官有危害作用。而三氯醋酸提取法是以三氯醋酸和氯化钠等替代,就不存在上述试剂危害作用,这对学生、实验课带教教师和实验准备人员都非常有益。

针对学生课堂教学实验,要取得良好的实验效果,

在提取过程中必须注意各环节的技巧。制备匀浆时务必使肝细胞充分粉碎均匀;离心后要保持离心管内液体的稳定,弃留上层液时都要尽量一次性完成;在使用95%乙醇沉淀核酸的操作时,要注意逐滴缓慢加入,同时轻缓摇动试管,等全部加入后,可倾斜试管沿同一方向旋转以增加两种液体的接触面,这样可使核酸析出效果更好;水解液(5%硫酸)的用量可适当减少,使核酸浓度相应增加,可提高鉴定阳性率;观察结果应取对照管和测定管一起在白色背景下进行对比观察;实验结束后,应尽快清洗实验器材,以保证下一个班组学生实验能够顺利完成。为进一步提高实验教学效果,我们积极开展实验形式改革,如安排学生参与实验准备,提高学生自主学习能力<sup>[6]</sup>。表2鉴定结果显示,对比两种方法提取到的磷酸、核糖和脱氧核糖差异无统计学意义,而对比嘌呤碱阳性率,三氯醋酸提取法明显高于酚提取法。图1鉴定结果显示,学生能够观察到黄色透明的饱和苦味酸溶液中亮晶晶的针状结晶,测定管核糖的鉴定阳性可呈现漂亮的绿色,磷酸和脱氧核糖鉴定阳性可呈现深浅不一的蓝色,三氯醋酸提取法增加实验的直观性和美感,可以激发学生的实验兴趣,让学生在实验课堂中享受快乐。

综上所述,在生物化学实验教学中,针对核酸提取实验,建议采用三氯醋酸提取法更利于提高嘌呤碱的阳性率,而且该实验方法所用试剂更为安全和实验现象更为直观。

#### 参考文献:

- [1] 黄忠仕,翟静. 生物化学[M]. 南京:江苏科技出版社, 2014:25.
- [2] 李曙波,农嵩,李朝敢. 以核酸的化学教学为例探讨医学生科研精神的培养[J]. 卫生职业教育, 2014, 32(10):30-31.
- [3] 肖娟,农嵩. 关于生物化学实验教学的几点体会[J]. 右江民族医学院学报, 2016, 38(2):231-232.
- [4] 李韬. 生物化学实验[M]. 南宁:广西科学技术出版社, 2007:81-83.
- [5] 鲍毅新,孙波,张龙龙,等. 对动物组织DNA提取方法的改进及PCR检测[J]. 浙江师范大学学报:自然科学版, 2009, 32(3):317-321.
- [6] 周江,唐植昭,王龙武. 临床生物化学检验实验教学改革探讨[J]. 右江民族医学院学报, 2014, 36(6):937-938.

收稿日期:2017-05-02;修回日期:2017-10-13

(上接第288页)

#### 参考文献:

- [1] 班雅洁. 从医患关系看当前医患沟通教育[J]. 右江民族医学院学报, 2015, 37(2):329-330.
- [2] 李彤. 导师对于硕士研究生教学的思考[J]. 中国病案, 2015, 16(1):84-86.
- [3] 朱家安,胡兵. 对超声医学研究生分型培养模式的探讨[J]. 西北医学教育, 2014, 22(3):484-486.

- [4] 农圣,农乐根,岑加尧. 角色扮演教学法在卫生事业管理学教学中的应用[J]. 右江民族医学院学报, 2014, 36(5):795-797.
- [5] 高妍,高云,郝晓亮. 信息化教学在研究生教育教学活动中的运用与思考[J]. 高教学刊, 2016(19):22-23, 25.
- [6] 倪才方,欧阳埔. 介入放射学研究生教学改革初探[J]. 介入放射学杂志, 2012, 21(5):425-427.

收稿日期:2017-05-24;修回日期:2017-09-04