第三章　样本的采集、处理和分离纯化

第一节　学习目标与要求

（1）掌握：常见临床样本的处理方法；核酸和蛋白质的分离、纯化技术；核酸和蛋白质的含量、纯度及完整性的检测。

（2）熟悉：样本采集和处理的一般性原则及注意事项；样本的运送、保存方法。

（3）了解：生物样本分离、纯化策略；蛋白质的性质。

第二节　基本内容

一、样本的采集与处理

1. 血液样本的采集与处理　血液样本是临床医学检测中不可或缺的重要材料，尤其在血液形态学、临床生物化学、免疫学、病原微生物学等多个领域扮演着关键角色。临床实践中静脉血采集因其便利性和代表性而被广泛应用。血液样本类型包括全血、血浆和血清样本。全血适用于细胞计数、分类和形态观察。在采集全血时，EDTA 作为一种抗凝剂得到广泛应用，因为它能有效防止血液凝固，确保样本的完整性和可靠性。然而，需要特别注意的是，肝素并不适用于此种采血方式，因为它对 Taq DNA 聚合酶具有强烈的抑制作用，可能影响后续的检测效果；血浆则是全血去除血细胞后剩余的部分，可用于血栓、止血检测；血清是全血自然凝固后析出的液体，可用于生物化学、免疫学检测等。常用血液样本的采集方法包括以下几种。

（1）静脉采血法：静脉血能较好地反映全身循环血液的真实情况，其采集部位主要是肘静脉。静脉采血法是临床上广泛应用的采血方法，按采血方式可分为普通采血法和真空采血法两种，样本常用于红细胞沉降率、免疫、生化等检测项目。具体步骤：①选择采血部位。通常选择患者上臂内侧的前臂静脉或手背静脉。采血前应让患

者坐下，让患者的手臂放平，可减少静脉收缩，有助于静脉血的采集。②消毒。采血前应先用 75% 乙醇或碘伏对采血部位进行仔细消毒，消毒的范围应大于采血点。③采血。用注射针插入患者的静脉，然后接上采血管进行采血。在采血的过程中应保持采血管的位置稳定，避免血流的不畅或溢出。④止血。采血完成后，拔出针头，用干净的棉球按压，必要时可用纱布进行包扎，并且让患者用力按压采血点，直到停止出血。

（2）毛细血管采血法：用于微量检测。成人采集部位推荐以左手中指或环指的指尖内侧为宜。婴幼儿手指太小可用拇指或足底部内外侧缘。严重烧伤患者，可选择皮肤完整处进行采血。采血步骤：用手指轻轻按摩患者的采血部位，使中指或环指的指尖自然充血，提高采血的顺利度；再用 75% 乙醇棉球消毒皮肤，待酒精挥发干燥后，用左手拇指和示指固定采血部位，右手持消毒刺针，自指尖腹侧迅速刺入 2 ~ 3 mm，立即出针，让血液自然流出，再用消毒棉球擦去第 1 滴血，随后按需依次采血；采血完成后，用消毒干棉球轻轻压迫伤口片刻，以促进止血并防止感染。

（3）动脉采血法：采血部位多选用患者的桡动脉、股动脉或肱动脉，样本常用于血气分析等检测。采血步骤：用 2 mL 注射器，连接 7 号针头，吸 1∶500 肝素生理盐水溶液 1 mL，将活塞来回进行抽动，使内壁沾匀肝素，再推掉全部肝素溶液，将活塞推至空筒顶端后不再回拉，以保持注射器内无空气。在操作桡动脉采血时，首先确保环境的清洁和操作者的充分准备，常规消毒患者的皮肤及操作者的左手示指和中指后，以左手绷紧皮肤，右手持注射器，用左手示指触摸动脉搏动处，以 45° 进针，当血液自动流入空筒内达到 2 mL 时，立即拔出针头。随后，提醒患者按压采血部位持续 5 min，以促进止血。紧接着，立即使用橡皮泥或橡皮塞封闭针头，确保针头斜面完全埋入橡皮，形成一道屏障，有效隔绝空气。最后，在手中搓动注射器，使血与肝素混合，然后立即送检。

2. 体液样本的采集与处理

（1）尿液样本：①收集尿液的时间。任何时间排出尿都可做常规化验。一般肾病患者为了比较前后结果的差异，常规定一律采用清晨起床第 1 次尿液送检。②送检尿量。一般 5 ~ 10 mL，若需检测尿比重则不能＜ 50 mL。③留尿样本应取中段尿。在排尿过程中，先排出部分尿液以冲洗尿道口的细菌，随后留取中间段的尿液进行送检。应注意不要把非尿成分带入尿内，如女性患者不要混入白带及月经血（因此女性月经期一般不主张验尿常规），男性患者不要混入前列腺液等。

（2）痰液样本：①雾化蒸气吸入法。对无痰或少痰患者，可给予化痰药物，再应用超声雾化吸入法，使痰液稀释，从而易于咳出。②自然咳痰法。留痰前应先用清

水漱口，然后用力咳出气管深部痰液。24 h 痰量测定和分层检查时，患者应将痰吐在无色广口瓶内，加少许防腐剂（苯酚）用于防腐。痰液细胞学检测时，每次咳痰 5 ~ 6 口，定量为 5 mL 左右，或收集上午 9—10 时的新鲜痰液送检。③棉拭刮取法。幼儿痰液收集困难时，可用消毒棉拭刺激喉部引起咳嗽反射，用棉拭刮取样本。④负压吸引法。昏迷患者可在清理口腔后，用负压吸引法吸取痰液。⑤经支气管镜采集法。若采用纤维支气管镜检查，可直接从病灶处采集样本，质量最佳。

（3）其他体液样本：体液细胞形态学检查涵盖除血液外的多种体液，如腹水、胸腔积液、脑脊液、关节液、心包液及支气管肺泡灌洗液等。这些样本的采集通常是由临床医生在严格的局部麻醉条件下进行，常见的采集方法包括胸膜腔穿刺和腰椎穿刺术。通过这些专业的技术操作，医生能精确地获取所需的体液样本，以供进一步的形态学检查和分析。

3. 组织样本的采集与处理

组织样本包括新鲜组织和经过石蜡处理的切片。对于新鲜组织，一般首先会将其置于液氮中，利用碾磨或捣碎的方式使其完全匀浆化。随后，通过蛋白酶 K 进行消化处理，以便进行后续的核酸提取工作。对于石蜡切片，则需要先用二甲苯脱蜡，然后将其浸泡在浓度逐级降低的乙醇溶液中复水。接着用蛋白酶 K 消化，再进行 DNA 的提取（图 3-1）。

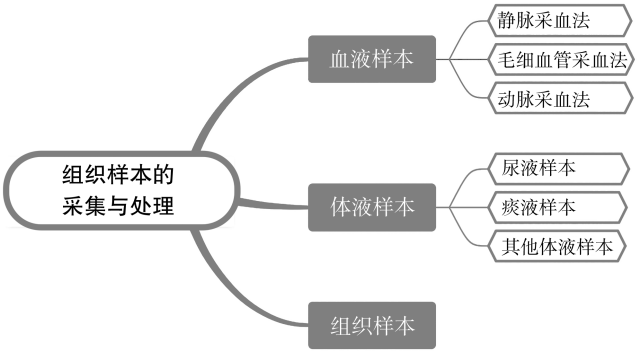

图 3-1　组织样本的采集与处理

4. 样本采集与处理的注意事项

（1）抗凝剂的选择：①乙二胺四乙酸盐（EDTA-K_2）。与血液中的钙离子形成络合物从而阻止血液凝固。常用于血常规检测（常用紫盖真空管），也可用于糖化血红蛋白等测定。②枸橼酸钠。能与血液中的钙离子形成络合物从而阻止血液凝固。3.2% 枸橼酸钠与血液比例为 1∶9，用于凝血功能检测（常用蓝盖真空管）；3.8% 枸橼酸

钠与血液比例为 1∶4，这种比例的枸橼酸钠溶液在红细胞沉降率测定（常用黑盖真空管）中发挥着关键作用，它有助于维持血液样本的稳定性，确保测定结果的准确性。③肝素。常用肝素锂（常用绿盖真空管），通过结合抗凝血酶Ⅲ因子（AT Ⅲ）灭活丝氨酸蛋白酶，阻止凝血酶的形成从而阻止血液凝固。主要用于微量元素等项目的检测。

（2）血液样本采集的注意事项：①除急诊和特殊病例外，一般血液检验项目均要求空腹采血，宜早晨空腹或禁食 12 h 后采血。②需抗凝的样本宜轻轻颠倒数次充分混匀，避免溶血，不能有凝块。③溶血可能影响很多成分的检测结果，因此为防止溶血的发生，样本采集时应特别小心。在采血过程中，应确保动作迅速以减少溶血的风险。此外，压脉带的压迫时间也是一个关键因素。压迫时间不宜＞ 1 min，因为过长的压迫时间可导致红细胞破裂，从而引起溶血。④患者在输液时不宜采集血液。若必须采集，不能在输液的一侧进行。⑤样本采集后应尽快送检，以免细胞代谢、酶失活等因素影响检验结果。⑥血气测定的血液以动脉血为宜，且不可漏气。⑦葡萄糖耐量测定：试验前 3 d 正常饮食。试验当日清晨空腹抽血 2 mL，并同时留尿。坐位取血，5 min 内口服 250 mL 含 75 g 无水葡萄糖的糖水后，分别于 0.5 h、1 h、2 h、3 h 各抽血 2 mL，立即记录时间，并每次同时留取尿液，注明管号和杯号，立即送检，分别测定血糖及尿糖。

（3）尿液样本采集的注意事项：①尿常规检验需收集晨尿或随机尿 5 ~ 10 mL，注意避免月经、白带或精液等非尿成分的污染。②尿液生化检测：24 h 尿蛋白定量需加入甲苯或二甲苯进行防腐。尿 17 - 酮类固醇、尿 17 - 羟皮质类固醇、儿茶酚胺等检测需加入盐酸进行防腐。量出 24 h 尿量，充分混匀后取 5 ~ 10 mL 送检。

（4）其他注意事项：①痰液样本。采集早晨第 1 口痰，多用于细胞学及微生物学检查。采样前应先反复漱口，经深呼吸数次后用力咳痰，痰液样本中不可吐入唾液。②精液和前列腺液。采集精液前禁欲 3 ~ 7 d，其中尤以 6 ~ 7 d 最好，并无遗精、手淫等排精史。采前排净尿液，在精液样本采集后，30 min 内保温送达检验科。采集精液时，最好使用广口小玻璃瓶作为容器，不宜使用避孕套或塑料瓶。在提供精液样本时，务必在化验单上注明具体的采集时间，以便检验科在收到样本后能及时进行检查。前列腺液由医师作前列腺按摩取样，收到样本后应立即检查。③阴道分泌物的样本采集。阴道分泌物通常由妇产科医师采集。为确保阴道样本的准确性，建议在采集前 24 h 内避免性交、盆浴、阴道检查、阴道灌洗及局部用药等活动。这些活动可影响阴道内的微生物平衡，从而影响检查结果的准确性。此外，也应避免在月经期采集样本。取材所用消毒的刮板、吸管或棉拭子必须清洁干燥，不沾有任何化学药品或

润滑剂，采集后立即送检，否则影响滴虫动力，造成漏检。④浆膜腔积液包括胸腔积液、腹水、心包液、关节液及鞘膜液等，为确保样本质量和避免污染，应由临床医师执行无菌穿刺术进行采集，最好留取中段液体于消毒容器内，立即送检。脑脊液由临床医师行腰椎穿刺术采集样本，样本必须立即送检，放置过久影响结果。

样本的采集与处理的注意事项见图 3-2。

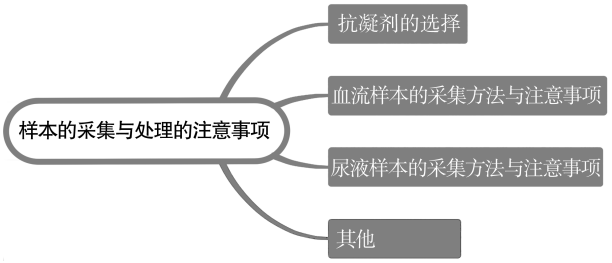

图 3-2　样本的采集与处理的注意事项

5. 样本的运送与保存

（1）样本运送的要点：①包装。为确保样本在运输过程中的完整性和稳定性，选用适当的包装材料和方法显得尤为重要。防震、防压和防渗漏的包装材料，如泡沫板和密封袋，能有效减少外部因素如振动和压力对样本的潜在影响。同时，采用适当的填充物能进一步保护样本。②温度控制。样本在运输中必须保持在适宜的温度范围内，以防止样本损坏或退化。对于冷藏样本，可使用冰袋或冷藏剂保持低温状态。对于冷冻样本，可使用干冰或液氮维持较低的温度。③时效控制。为确保样本得到及时分析，样本运输需考虑时效控制。必要时可使用快递服务或专业的送样服务，以缩短样本从采样点到实验室的时间。④送样过程记录。记录收到样本的日期和时间，同时应记录样本的送检人和接收人。

（2）样本保存的要点：①温度控制。根据不同类型的样本，选择适当的保存温度是保证样本稳定性的关键。常见的保存温度包括冷藏温度（2 ~ 8℃）和冷冻温度（–20℃ 或更低）。需要特别注意的是，一些特殊样本（如生物样本红细胞）可能需要极低的温度（如液氮温度）保存。②容器选择。为确保样本免受外界环境污染，应选择符合质量标准且密封性能优良的容器进行保存。对于液体样本，离心管、试管和封闭式血液管是常用的保存容器。这些容器不仅能有效防止样本泄漏，还能提供良好的密封环境。固体样本的保存则可考虑使用塑料袋或管等。另外，容器内应添加适当的保存液以保持样本的稳定性。③标签和记录。保存前样本必须经过准确的标识和记录，包括患者的信息、采样时间和种类等相关信息，从而有助于识别样本和追踪样本，

并确保样本的准确性和连续性。

样本的运送与保存见图 3-3。

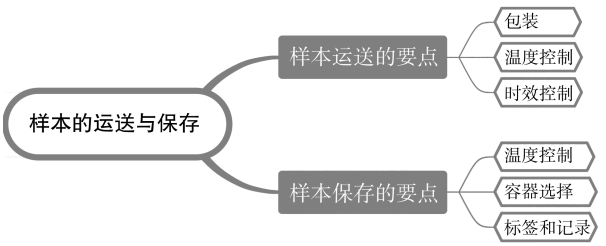

图 3-3　样本的运送与保存

二、核酸的分离与纯化

核酸分离的主要目标是将核酸与蛋白质、多糖、脂肪等其他生物大分子有效区分开来。分离核酸时，通常需要遵循两个原则：一是保证核酸一级结构的完整性；二是最大限度地避免其他分子的混入，从而保证核酸样本的纯度。核酸分为 DNA 和 RNA，从临床样品中提取核酸是进行分子生物学检验的前提，对后续实验尤为重要。尽管 DNA 和 RNA 的提取过程在思路上存在相似性，但由于它们之间的理化性质差异，使两者的最佳分离和纯化条件并不完全相同。

1. DNA 的分离与纯化

1）裂解过程

常规的裂解液都含有去污剂（如 SDS、Triton X-100、NP-40、Tween 20 等）和盐（如 Tris、EDTA、NaCl 等）。去污剂的作用：能使蛋白质变性；破坏膜结构；去除与核酸相互作用的蛋白质。盐的作用：提供合适的裂解环境，如 Tris；抑制核酸酶对核酸的降解，如 EDTA；维持核酸结构稳定，如 NaCl。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 DNA 与蛋白质的解离，从而便于后续的纯化操作。

（1）CTAB 法：CTAB（十六烷基三甲基溴化铵）属于阳离子去污剂的一种。它具有溶解细胞膜的能力，并能与核酸结合形成一种在高盐环境下可溶的复合物。CATB 裂解液主要组分及作用：① Tris-HCl（pH8.0）能提供一个缓冲环境，防止核酸被破坏。② EDTA 螯合 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 离子，能抑制 DNase 活性。③ NaCl 提供一个高盐环境，使 DNA 充分溶解于液相中。④ CTAB 裂解细胞，与核酸结合形成在高盐环境下可溶的复合物。

（2）SDS 法：SDS（十二烷基硫酸钠）是一种阴离子去垢剂，在高温（55 ~ 60℃）时裂解细胞，促进蛋白变性，染色体离析。当处于高盐环境或降低温度时，SDS 能促进蛋白质、多糖等生物大分子结合形成复合物，并使其沉淀下来。这一过程可有效释放细胞内的核酸。

2）纯化过程

（1）酚 – 氯仿抽提法：酚 – 氯仿抽提法作为一种经典的基因组 DNA 提取方法，其原理主要是利用酚和氯仿的混合物破坏细胞膜并溶解蛋白质，从而实现 DNA 与其他细胞成分的有效分离。然后通过离心和有机溶剂的萃取，将 DNA 从混合物中提取出来。具体步骤如下。

①细胞裂解：酚氯仿是一种有机溶剂，能破坏细胞膜和核膜，使细胞释放 DNA。将待提取 DNA 样本（细胞、组织等）加入含有酚氯仿的裂解缓冲液中，将溶液混合均匀。②蛋白质沉淀：样本中的蛋白质从混合溶液中的酚氯仿相互分离，这种相互作用形成一个物理屏障，有助于在离心过程中将 DNA 与蛋白质进行有效区分。由于 DNA 的密度小于蛋白质，在离心沉淀后，DNA 浮到上层，而蛋白质则沉降到下层。通过这样的分层现象，可轻松地实现 DNA 与蛋白质的分离。③ DNA 沉淀：将上层液体转移到新的离心管中，加入同等体积的冷乙醇或异丙醇，然后轻轻振荡，促使 DNA 沉淀下来。乙醇能与 DNA 相互作用，使 DNA 分子疏水性增加，从而有利于沉淀。④清洗：离心沉淀后，将上清液倒掉，加入 70% 乙醇洗涤沉淀。乙醇能去除残留的酚氯仿和其他杂质，从而纯化沉淀的 DNA。⑤溶解：将洗涤后的 DNA 沉淀用适量的缓冲液溶解，最常用的是 TE 缓冲液（含有 10 mmol/L Tris-HC1 和 1 mmol/L EDTA），以便后续的 DNA 浓度测定及实验操作。

总结：酚氯仿法利用酚氯仿破坏细胞膜和核膜，将 DNA 从细胞中释放出来。然后通过离心分离蛋白质和 DNA，再通过酒精沉淀和乙醇洗涤进而纯化提取的 DNA。该方法简单、快速，并且能获得较纯的 DNA 样品。然而，酚氯仿法在提取 DNA 时可能同时提取到 RNA 和一些蛋白质，因此在一些需要高纯度 DNA 的实验中可能不适用。在使用酚氯仿法提取 DNA 时，还需注意避免 DNA 的降解，避免污染和交叉污染。同时注意正确保存提取的 DNA 样品。

（2）吸附柱法：首先，利用含有蛋白酶 K 的裂解液迅速破坏细胞结构并灭活细胞内的核酸酶，确保 DNA 的稳定性和完整性。随后，在高盐环境下，DNA 会被选择性地吸附到离心柱内的硅基质膜上。通过一系列快速的漂洗和离心步骤，可有效去除细胞代谢物、蛋白质等杂质，最后利用低盐的洗脱缓冲液将纯净 DNA 从硅基

质膜上洗脱下来。吸附柱法主要包括以下步骤：①细胞或组织样本的收集和裂解；②加入蛋白酶和缓冲液，分解细胞或组织中的蛋白质；③加入乙醇或等体积的异丙醇，混匀后离心，使 DNA 沉淀到底部；④去除上清液，用 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀；⑤将 DNA 溶解在 TE 缓冲液中；⑥将含有 DNA 的溶液通过硅胶柱，使 DNA 被柱体吸附；⑦洗涤柱体，去除杂质和残余离子；⑧用纯水或低盐溶液洗脱 DNA，得到纯净的 DNA 分子。

（3）磁珠法：此方法利用纳米级磁珠表面包被的纯化介质来吸附 DNA。在外加磁场的作用下，DNA 被吸附并附着于磁珠上，随后磁珠在磁场中定向移动，从而实现 DNA 与其他物质的快速有效分离。磁珠法核酸提取一般分为四步：裂解、结合、洗涤和洗脱。

①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。在酶作用裂解中，溶菌酶或蛋白酶（如蛋白酶 K、植物蛋白酶、链霉蛋白酶）被加入以破裂细胞并释放核酸。蛋白酶还能降解与核酸结合的蛋白质，促进核酸的分离。②结合：磁珠表面带负电荷，磁珠缓冲液是高盐环境含有带正电荷的盐离子，样本受缓冲液影响，磷酸基团带负电荷。③洗涤：由于核酸具有高电荷的磷酸骨架，因此相较于蛋白质、多糖、脂肪等其他生物大分子物质，核酸展现更强的亲水性。根据它们理化性质的差异，利用选择性沉淀、层析、密度梯度离心等方法可将核酸分离、纯化。在实际操作中，无水乙醇是一种常用的 DNA 沉淀剂。无水乙醇与水可以任意比例混溶，与核酸不发生化学反应，因此对 DNA 安全无害，是理想的沉淀剂。当加入乙醇时，乙醇会夺去 DNA 周围的水分子，使 DNA 失水而易于聚合。④洗脱：加水或 EB 破坏高盐环境，形成低盐环境，使 DNA 从磁珠上脱落。

3）质粒 DNA

（1）碱裂解 -SDS 法：在氢氧化钠（pH 12 ~ 12.6 碱性环境）和去污剂 SDS 的作用下细胞破裂，细菌蛋白质和染色体 DNA 变性，双链 DNA 氢键断裂。通过加入酸性高盐缓冲液，使 pH 值恢复中性，此时共价闭合环状质粒 DNA 的复性速度超过线性的染色体 DNA。细菌蛋白质、破裂的细胞壁和变性的染色体 DNA 相互缠绕成大型复合物，并被 SDS 所包覆。最终，这些复合物沉淀下来，而质粒 DNA 则保留在上清液中，实现质粒 DNA 的有效分离。

（2）煮沸法：将细菌置于含有 Triton X-100 和溶菌酶的缓冲液中加热至 100℃使细菌裂解。通过加热破坏细菌外壁的同时有助于解开 DNA 链的碱基配对，并使蛋白质和染色体 DNA 变性。温度下降后，闭环 DNA 形成超螺旋分子，离心时留在上

清液中。

2. RNA 的分离与纯化

RNA 为单链分子，稳定性差，极易降解，降解的主要原因是内源性核酸酶（ribonuclease RNAase）的作用。在活体内，RNA 的存在时间相对较短，因为其面临持续内源性 RNA 酶的威胁。此外，外源性 RNA 酶也是一个不可忽视的因素，这些酶可存在于头发、灰尘、体液和塑料等多种环境中。因此，在提取 RNA 时，必须采取更为严格的条件和措施。

1）RNA 提取类型

①总 RNA 提取：总 RNA 中，75% ~ 85% 为 rRNA（主要是 28S ~ 26S/23S 和 18S/16S rRNA），其余的由分子量大小和核苷酸序列各不相同的 mRNA 和小分子 RNA 如 tRNA、5S rRNA、5.8S rRNA、miRNA、siRNA、小核 RNA（small nuclear RNA，snRNA）及核仁小分子 RNA（small nuceolar RNA，snoRNA）等组成。

② mRNA 提取：mRNA 的分离与纯化：与序列明确的 RNA、tRNA 及核内小分子 RNA 不同，真核生物的 mRNA 在细胞中含量少、种类多且分子量大小不一。mRNA 分子最显著的结构特征是 3′端的 Poly（A）尾。这种结构为真核生物 RNA 的提取提供方便的选择性标志。在提取真核生物 RNA 时，常用的方法包括寡聚（dT）-纤维素柱层析和 PolyU 琼脂糖柱的亲和层析法。这些方法都利用 mRNA 的 Poly（A）尾结构特点，通过特异性亲和作用将 mRNA 从复杂的 RNA 混合物中分离出来。

2）RNA 提取流程

①细胞或组织的收集：RNA 提取的第一步是从生物样品中收集细胞或组织。不同的样品类型需要采用不同的方法进行收集。如从培养细胞中提取 RNA 可直接收集细胞，而从动物组织中提取 RNA 则需要将组织切碎并加入一定量的缓冲液中。②裂解细胞：细胞或组织收集后，需使用化学试剂对细胞进行裂解，使 RNA 从细胞中释放出来。选择适当的裂解试剂对成功提取 RNA 至关重要。根据实验的具体需求和条件，可选择蛋白酶或盐酸等试剂裂解细胞并释放 RNA。重要的是，要确保所选试剂对 RNA 的稳定性和完整性影响最小，以获得高质量的 RNA 样本。③去除 DNA：RNA 提取过程中会出现 DNA 污染，因此需要使用 DNA 酶将 DNA 降解。此外，还可使用 DNA 特异性的硅胶柱对 RNA 进行纯化，避免 DNA 的污染。④去除蛋白质：RNA 提取后，还需去除蛋白质等杂质，可使用酚 / 氯仿等有机试剂将 RNA 和蛋白质分离开，从而去除蛋白质。⑤沉淀 RNA：RNA 经纯化后，需进行沉淀。可使用乙醇或异丙醇等有机试剂对 RNA 进行沉淀。⑥洗涤 RNA：沉淀后的 RNA 需进一步进行

洗涤，以去除杂质。可使用乙醇或异丙醇等有机试剂进行洗涤。⑦溶解 RNA：最后一步是将 RNA 溶解在缓冲液中。常用的 RNA 缓冲液是 TE 缓冲液、Tris-HCl 缓冲液等。

3）RNA 样本裂解方法

① TRIZol 法：TRIZol 法是 RNA 提取中最常用的方法之一。它利用酚的提取和氯仿的萃取原理，有效地将 RNA 与蛋白质分离开，从而提取高纯度的 RNA。尽管此方法步骤相对复杂，但其提取效果优越。TRIZol 试剂主要包含异硫氰酸肌和苯酚两种成分。异硫氰酸肌在细胞中发挥裂解作用，促进核蛋白体的解离，从而使 RNA 与蛋白质得以分离，并将 RNA 释放到溶液中。当加入氯仿时，它可抽提酸性的苯酚，而酸性苯酚可促使 RNA 进入水相，离心后可形成水相层和有机层，这样 RNA 与残留在有机相中的蛋白质和 DNA 分离开，水相层（无色）主要为 RNA，有机层（黄色）主要为 DNA 和蛋白质。

②硅胶柱法：硅胶柱法是一种高效的 RNA 提取方法。该方法利用硅胶柱对 RNA 进行纯化，可有效避免 DNA 的污染。该方法提取的 RNA 纯度高，但这一方法的成本较高。

③离心管法：离心管法是一种简单易行的 RNA 提取方法。其基本原理是在高速离心过程中 RNA 沉淀至离心管底部。这种方法无须使用昂贵的硅胶柱，而是通过简单的离心步骤和吸管操作，即可将 RNA 从溶液中分离出。尽管该方法操作简便，但提取的 RNA 纯度相对较低。

3. 核酸浓度、纯度与完整性的检测

（1）核酸浓度的测定：①紫外分光光度法。组成核酸分子的碱基，由于含有芳香环结构，具有紫外吸收的特性。吸收值波长在 250 ~ 270 nm，最大吸收波长是 260 nm。通常情况下，1 μg/mL RNA 溶液在 1 cm 光径比色皿中的光吸收峰值约为 0.022，1 μg/mL DNA 溶液的光吸收值约为 0.020。因此测定未知浓度 RNA 或 DNA 溶液在 260 nm 的光吸收值即可计算出其中核酸的含量。②定糖法。核糖中的戊糖在浓盐酸或浓硫酸的作用下，可发生脱水反应，生成醛类化合物。这些醛类化合物随后与特定的成色剂发生缩合反应，生成有色化合物。因此，可用比色法或分光光度法测定其溶液中的吸收值。在一定浓度范围内，溶液的吸收值与核酸的含量成正比。③定磷法。RNA 的含磷量约为 9.5%，DNA 的含磷量约为 9.2%。采用定磷法可准确测出磷含量，进而折算样品中核酸含量。

（2）核酸纯度的测定：①比色法。比色法是通过对核酸样品吸光度的测定来确定核酸纯度的方法。核酸的吸光度与波长和浓度有关。正常情况下，核酸在 260 nm

处有最大吸收峰，而蛋白质等杂质在 280 nm 处有吸收峰。因此，通过测定核酸在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度比值可确定核酸纯度。一般来说，纯度在 1.8 ~ 2.0 的标本可认为是比较纯的。②凝胶电泳法。凝胶电泳法是一种利用电场在凝胶中分离核酸样品的技术。在这种方法中，核酸分子在凝胶中的迁移速度与其大小和所带电荷密切相关。经电泳分离后，再通过染色或紫外线照射检测核酸纯度。凝胶电泳法可同时检测核酸纯度和分子量大小，因此可获得比色法无法获得的更加详细的信息。

核酸的分离与纯化见图 3-4。

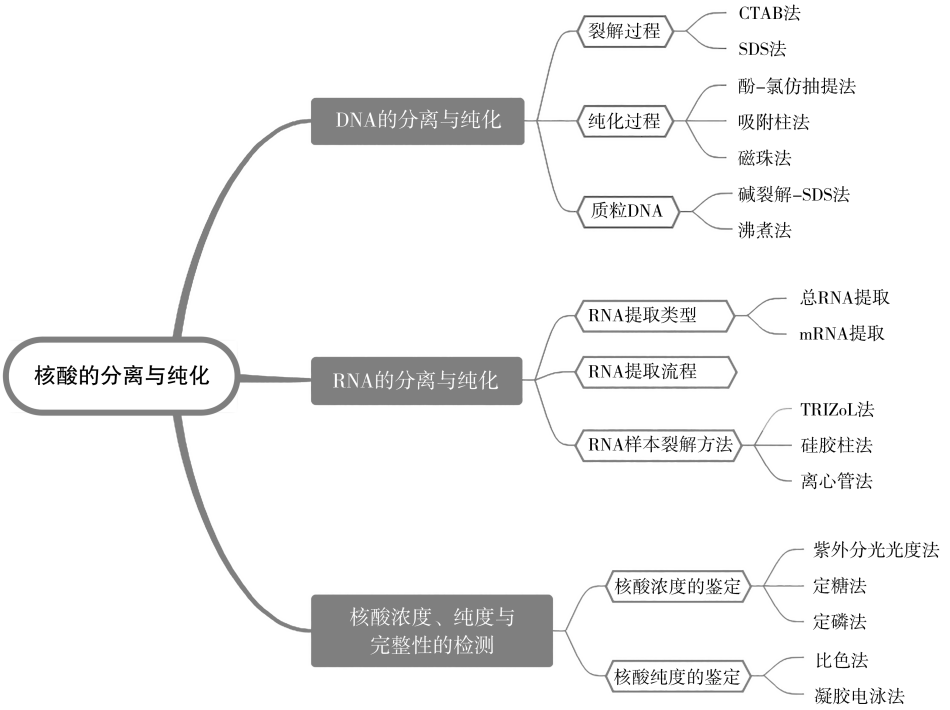

图 3-4　核酸的分离与纯化

三、蛋白质的分离与纯化

1. 蛋白质分离纯化原则

蛋白质的分离纯化是从样本材料中提取具有良好生物活性及化学结构完整性的特定蛋白质的过程。在蛋白纯化过程中，核心是利用不同蛋白质间的相似性与差异性。这些特性帮助去除非蛋白污染，同时确保目标蛋白得以提纯。这是一个非常复杂的过程，涵盖沉淀、溶解、离子交换和硅胶等多元化技术。分离的关键在于针对蛋白质的分子特性，如电荷、大小、疏水性和溶解度等，进行操作。随着溶剂环境的改变，蛋白质的分子结构、质量和电荷状态有所变化，利用这些变化可有效地将目标蛋白从混

合物中分离出。如当需要从大肠埃希菌裂解物中提取重组蛋白时，需要精准控制这些分离条件。

2. 蛋白质分离纯化的方法

（1）根据蛋白质溶解度差异的分离纯化：①等电点沉淀法。蛋白质在等电点附近溶解度最小，易沉淀析出。利用不同蛋白质等电点的不同，将蛋白质从混合溶液中分开。②盐析和盐溶。盐析指大量的中性盐溶液可降低蛋白质的溶解度，使蛋白质沉淀析出的现象；盐溶指低浓度的中性盐溶液促进某些蛋白质的溶解，从而与其他组分分开。③有机溶剂沉淀。亲水性有机溶剂如乙醇、丙酮等能使蛋白质在水中的溶解度降低，从而沉淀析出。④重金属盐沉淀。重金属盐带正电荷，可与蛋白质负离子结合而形成不溶性蛋白质沉淀。因此，可利用此性质通过大量清蛋白抢救重金属盐中毒的患者。

（2）根据蛋白质分子大小的不同分离：①透析。利用蛋白质分子不能通过半透膜的性质，使蛋白质和其他小分子物质如无机盐、单糖等分开。这种方法的核心在于利用浓度差作为驱动力，通过膜分离过程实现物质的分离。临床主要应用是血液（人工肾）的解毒。②超滤。通过加压、抽滤、离心等多种方式，使水和其他小分子溶质透过超滤膜，而蛋白质截留在膜上，以达到浓缩和脱盐的目的。这一方法的本质是以静压力差为推动力的膜分离过程。③密度梯度离心。蛋白质颗粒的沉降速度取决于它的大小和密度，在离心过程中，当蛋白质颗粒被置于具有密度梯度的介质中时，它们会根据自身的质量和密度差异进行分离。具体来说，质量和密度较大的蛋白质颗粒比质量和密度较小的颗粒沉降更快。当蛋白质颗粒沉降到与其自身密度相等的介质梯度位置时，它们停止进一步沉降，并在离心管中形成各自独立的区带。④凝胶过滤层析。当不同分子大小的蛋白质流经凝胶层析柱时，比凝胶珠孔径大的分子不能进入凝胶珠内部，只能随溶剂在凝胶珠之间的孔隙向下移动，并最先流出体外；比凝胶珠孔径小的分子能不同程度地自由进出凝胶珠的内外。因此，不同大小的分子所经路径长短不同而得到分离，大分子先洗脱出来，小分子后洗脱出来。⑤超速离心。蛋白质溶液在强大离心场中逐渐沉降，各种蛋白质沉降所需离心力场不同，可用超速离心法分离蛋白质并测定其分子量大小。

（3）根据电荷不同的纯化方法：①电泳。在外电场作用下，带电颗粒将向着与其电性相反的电极移动，这种现象称为电泳。利用带电颗粒净电荷的差异可分离混合物中的蛋白质。②离子交换层析。在某一特定的 pH 值，混合蛋白质溶液中各种蛋白质所带电荷数目及性质不同。事先在层析柱中装上离子交换剂，其所带电荷性质与

蛋白质电荷性质相反，当蛋白质混合溶液流经层析柱时，即可被吸附于柱上。随后，使用带有与蛋白质相同电荷性质的洗脱剂置换和洗脱吸附在离子交换剂上的蛋白质。由于不同蛋白质所带电荷的差异，它们与离子交换剂的结合紧密程度也不同。因此，在洗脱过程中，带电量较小的蛋白质先被洗脱下来。随着洗脱液中离子强度的增加，带电量较大的蛋白质也被逐渐洗脱下来。最终可逐步分离混合蛋白质溶液中的各个组分，实现蛋白质的纯化和分离。

（4）利用选择性吸附的纯化方法：吸附层析，利用待纯化的分子和杂质分子与吸附剂之间的吸附能力和解吸性质不同而达到分离目的。

（5）利用对配体的特异亲和力的纯化方法：亲和层析，为纯化某一特定蛋白质，可将其特异配体通过化学方法共价连接到载体分子上。当蛋白质混合物加到填有亲和介质的层析柱时，待纯化的蛋白质与配体特异性结合，其他蛋白质则不被结合从而可通过洗涤除去。被特异结合的蛋白质可用含游离的相应配体溶液把它从柱上洗脱下来。

（6）高效液相色谱（HPLC）：HPLC 以液体为流动相，采用高压输液系统，将具有不同极性的单一溶剂或不同比例的混合溶剂、缓冲液等流动相泵入装有固定相的色谱柱，在柱内各成分被分离后，进入检测器进行检测，从而实现对试样的分析。

3. 蛋白质浓度与纯度的检测

蛋白质纯度指在蛋白质混合物中所占比例大的蛋白质的含量。一般来说，蛋白质纯度越高，其特性和功能就越好。

（1）分光光度法：分光光度法是测定蛋白质浓度的常用手段之一，其原理是基于蛋白质在特定波长下展现的吸收特性。分光光度法需使用专用的分光光度计，这一仪器能测量特定波长下的吸光度。蛋白质的吸光度和波长有关，常用的波长为 280 nm。然而，这种方法仅适用于那些具有大量芳香族氨基酸（如色氨酸和酪氨酸）的蛋白质，对其他类型的蛋白质测定效果可能不够准确。

（2）SDS-PAGE：SDS-PAGE 是一种常用的蛋白质分离方法。在此过程中，蛋白质样品在电场作用下通过聚丙烯酰胺凝胶进行迁移分离，实现蛋白质的分离纯化。该方法依赖于聚丙烯酰胺凝胶的特性，可分离不同大小和电荷的蛋白质分子，从而获得高纯度的蛋白质。在分离过程中，可使用染色剂（如 Coomassie Blue）染色蛋白质，从而帮助确定蛋白质纯度。

（3）离子交换层析法：离子交换层析法是一种常用的蛋白质分离技术，其原理在于利用离子交换柱中的电荷特性，吸附并分离带有阴离子或阳离子电荷的蛋白质。根据不同的蛋白质类型，可选择相应的离子交换柱，以实现高效、精确的分离。通过

测量收集的梯度溶液中相对蛋白含量的变化，以确定蛋白质的纯度。

蛋白质的分离与纯化见图 3-5。

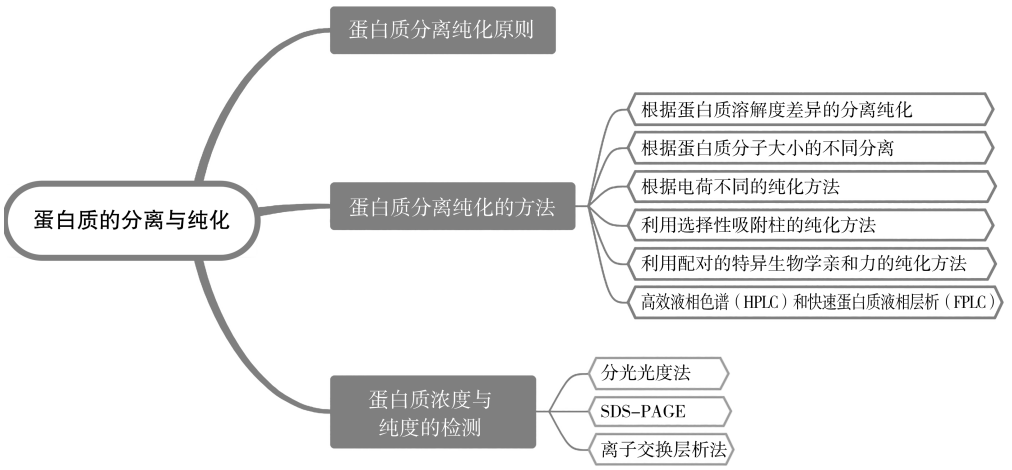

图 3-5　蛋白质的分离与纯化

第三节　自测题

一、名词解释

1. A_{260}/A_{280}
2. 离子交换层析
3. 总 RNA
4. SDS-PAGE
5. 酚 – 氯仿抽提法
6. 质粒 DNA
7. HPLC
8. 超滤
9. 肝素
10. 石蜡切片

二、单选题

1. 临床上婴幼儿毛细血管采血常用的部位是（　　）

A. 耳垂

B. 肘部

C. 足底

D. 手背

2. 下列不属于体液样本的是（　　）

A. 结肠

B. 脑脊液

C. 痰液

D. 血浆

3. 样本保存的要点不包括（　　）

A. 温度控制

B. 容器选择

C. 标签和记录

D. 包装

4. 提取 DNA 的原则不正确的是（　　）

A. 保留所有核酸分子

B. 核酸一级结构的完整性

C. 蛋白质、多糖和脂类分子的污染应降到最低程度

D. 尽可能排除 RNA 分子的污染与干扰

5. 组织 DNA 提取中，使用酚抽提法抽提后混合物经离心分为三层，DNA 位于（　　）

A. 上层

B. 中间层

C. 下层

D. 上层和下层均有

6. 某人提取 DNA 后，将 DNA 溶液稀释 20 倍，然后经紫外分光光度计检测结果为 A_{260}=0.26，A_{280}=0.14，比色皿光径 1 cm，该 DNA 样品的浓度为（　　）

A. 127 μg/mL

B. 140 μg/mL

C. 236 μg/mL

D. 260 μg/mL

7. 正常情况下，纯 DNA 在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度比值为 1.8 ~ 2.0，可使比值升高（＞ 2.0）的是（　　）

A. 乙醇

B. 酚

C. 蛋白质

D. RNA

8. DNA 的分离与纯化过程中纯化 DNA 的方法有（　　）

A. 酚 – 氯仿抽提法

B. 吸附柱法

C. 磁珠法

D. 以上所有

9. 分离与纯化 mRNA 可采用下列哪种方法（　　）

A. oligo（dT）– 纤维素柱层析法

B. oligo（dA）– 纤维素液相结合离心法

C. oligo（dT）– 纤维素液相结合离心法

D. oligo（dA）– 纤维素柱层析法

10. 关于 TRIZol 法提取 RNA，说法错误的是（　　）

A. 该方法提取出来的 RNA 纯度高

B. TRIZol 试剂中的主要成分为异硫氰酸肌和苯酚

C. RNA 位于水相层，颜色为淡黄色

D. 有机层主要为 DNA 和蛋白质

11. 在密度梯度离心法中，蛋白质和介质之间的密度差异如何影响蛋白质的沉降速度（　　）

A. 密度差异越大，沉降速度越快

B. 密度差异越小，沉降速度越快

C. 密度差异与沉降速度无关

D. 密度差异只影响沉降的最终位置，不影响速度

12. 紫外分光光度法对 DNA 进行测定中，下列正确的选项是（　　）

A. $A_{260}/A_{280} > 2.0$

B. A_{260} =1 的吸光度约为 50 μg/mL 双链 DNA

C. A_{260} =1 的吸光度约为 45 μg/mL 双链 DNA

D. A_{280} =1 的吸光度约为 50 μg/mL 双链 DNA

13. 酚 – 氯仿抽提法是目前基因组 DNA 提取的经典方法。所用试剂分别有不同的功能，下列正确的是（　　）

A. SDS 为阳离子去垢剂，在高温（55 ~ 60℃）时裂解细胞，促进蛋白变性，染色体离析

B. EDTA 为二价金属离子螯合剂，可促进 DNase 的活性

C. 蛋白酶 K 只可消化 DNA 酶、DNA 上的蛋白质

D. 酚氯仿可破坏细胞膜和核膜

14. 下列关于 RNA 的提取，说法正确的是（　　）

A. 提取 RNA 时应注意尽可能使用新鲜组织

B. 通过寡聚（dT）– 纤维素柱亲和层析或 PolyU 琼脂糖柱的亲和层析可较容易地从总 RNA 中分离纯化 mRNA

C. 离心管法是一种简单易行的 RNA 提取方法，且提取的 RNA 纯度较高

D. TRIZol 法提取 RNA 可室温提取

15. 下列哪种方法不是根据蛋白分子大小的不同进行蛋白分离纯化的（　　）

A. 透析

B. 超滤

C. 凝胶过滤层析

D. 离子交换层析

16. 利用对配体的特异性亲和力进行蛋白质分离纯化的方法是（　　）

A. 盐析和盐溶

B. 亲和层析

C. 凝胶过滤层析

D. 离子交换层析

17. 下列有关蛋白质提取和分离的说法，错误的是（　　）

A. 大量的中性盐溶液可降低蛋白质的溶解度，使蛋白质沉淀析出

B. 密度梯度离心法可使分子大小、密度不同的蛋白质分离

C. 蛋白质在电场中向与其自身所带电荷相同的电极方向移动

D. 透析法分离蛋白质的原理是利用蛋白质不能通过半透膜的特性

18. 离子交换层析有效分离蛋白质的依据是（　　）

A. 蛋白的分子大小

B. 蛋白的 pI

C. 蛋白所带电荷

D. 配体的特异性亲和力

19. 下列关于蛋白质浓度与纯度的检测说法错误的是（　　）

A. 分光光度法测定蛋白质浓度仅适用于那些具有大量芳香族氨基酸的蛋白质

B. SDS-PAGE 方法可分离不同大小和密度的蛋白质分子

C. 离子交换层析是根据不同蛋白质所带电荷不同而有效分离蛋白质的方法

D. 蛋白质纯度是指在蛋白质混合物中所占比例大的蛋白质的含量

20. 有关煮沸法提取质粒 DNA 的正确叙述是（　　）

A. 该法是一种条件比较温和的物理方法

B. 煮沸能在破坏细菌外壁的同时有助于解开 DNA 链的碱基配对

C. 温度下降后，闭环 DNA 形成线性分子

D. 该法需使用 TritonX-100 阴离子去垢剂

三、填空题

1. _____是目前基因组 DNA 提取的经典方法。

2. 血液标本采集按采集部位分为_____、_____和_____。

3. 核酸的最大紫外吸收波长在_____，蛋白质的最大吸收波长在_____。

4. 对蛋白质浓度与纯度的检测方法主要有_____、_____及_____。

5. 核糖核酸（RNA）的含磷量约为_____%，脱氧核糖核酸（DNA）的含磷量约为_____%。

四、简答题

1. 简述磁珠法分离 mRNA 的原理。

2. 简述血液样本采集的注意事项。

3. 蛋白质和核酸分离纯化原则分别是什么？两者有什么异同点？

4. 请简要设计 TRIZol 法提取新鲜组织样本中总 RNA 的实验步骤。

5. 试述 SDS-PAGE 分离纯化蛋白质的原理。

五、问答题

1. 请简述 DNA 分离纯化的主要步骤并详细阐述各个试剂的作用。

2. 请详细阐述核酸浓度、纯度与完整性的检测方法。

3. 请详细阐述蛋白质分离纯化的方法及其原理。

第三章
习题参考答案