

文章编号:1009-038X(2003)02-0071-04

从海鱼鱼白中提取核酸

王建

(淮海工学院 化工系 江苏 连云港 222005)

摘要:对地产海鱼加工下脚料鱼白中核酸含量测定、提取方法、产品纯度测定和组分鉴定方法进行了研究.结果显示在样品预处理过程中,低温抽提法比索氏抽提器法造成核酸损失要小,核酸粗产品收率为6.72%时,核酸总质量分数为2.30%.

关键词:核酸;核糖核酸;脱氧核糖核酸;鱼白;测定;提取

中图分类号:Q 52

文献标识码:A

Extraction of Nucleic Acid from Protamine in Sea Fish Processing

WANG Jian

(Department of Chemical Engineering, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005)

Abstract: The methods of detecting the nucleic acid content, extracting the nucleic acid from protamine in sea fish processing, determining product purity, and identifying constituent have been studied in this paper. In the course of samples pro-processing, the low temperature extracting method has less nucleic acid loss than the Soxhlet's methods. The yield of raw nucleic acid product from protamine is 6.72%, and the total nucleic acid content in the raw product is 2.30%.

Key words: nucleic acid; RNA; DNA; fish protamine; extraction; determination

核酸类物质广泛用于医药、畜牧业及食品工业,核酸(Nucleic acid)由脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)组成,具有多种生理和保健功能.最新研究表明,核糖核酸在基因抑制和酶的活性中所起的作用就大大出乎科学家的意料^[1].医学实验发现,在正常的新陈代谢中,人体每天需要一定量的核酸.除了肝脏制造,补充核酸最简便的方式是从饮食中摄取,但一般食品中核酸含量很少,而在鱼类的精子和卵子中间富含核酸,但一般人不可能天天大量地吃到富含核酸的食品.这样多数人在不同程度上存在核酸摄取不足.动物核酸(DNA)结构中

所含的碱基比例较接近于人体自身核酸中的碱基比例,更有利于合成人体所需的核酸.从动物甚至微生物中提取到较纯的DNA和RNA就成了研究和开发食品添加剂的首选方法.我国海域广阔,海洋渔业资源丰富.以连云港市为例,该市地处沿海,水产资源丰富.2000年海洋水产产量为25万t,预计2005年为35万t,2010年为55万t.一般鱼体中精巢组织约占体重质量分数的2%~3%,按质量分数2%计,2000年产出的精巢组织为5000t左右.据了解,这些精巢组织大多被废弃或廉价处理.因此综合开发利用鱼类精巢组织具有很好的社会和

收稿日期:2002-09-27; 修回日期:2002-10-27.

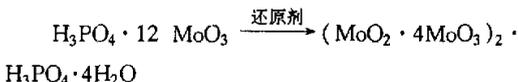
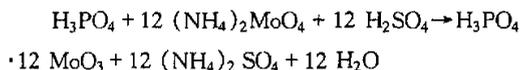
作者简介:王建(1962-),男,江苏淮安人,工学硕士,讲师.

经济效益。目前国内文献对利用水产品加工下脚料提取核酸的报道较少^[2-4],作者对地产海鱼鱼白中核酸含量的测定、提取方法及产品纯度和组分鉴定进行了一些探索。

1 原理

1.1 核酸含量测定

测定核酸的化学方法均以测定核酸中磷含量,戊糖含量或碱基含量为基础。核酸含量的测定方法很多,根据所用仪器试剂的不同可分为比色法、高效液相色谱法、薄层层析法、紫外吸收法、荧光法、离子交换色谱法^[5]、近红外分光光度法^[6]、探针技术法、显微光度法、免疫分析法等。近年来,还新兴一种共振瑞利散射法^[7]。目前以分光光度法和荧光光度法使用较多。核酸中所含的磷及戊糖的性质,可用定磷法、二苯胺法和地衣酚法等进行测定^[8-10]。采用定磷法其准确度高、操作简便,最低可测得 5 μg/mL 的核酸。核酸中所含的磷用 H₂SO₄ 消化^[11],变为无机磷,在酸性条件下与钼酸铵反应生成磷钼酸。在还原剂的作用下,生成蓝色化合物——钼蓝。



钼蓝的最大吸收峰在 650~660 nm 波长处,可通过测定吸光度、测定磷的含量。不同来源的核酸其含磷量有所差别,一般 DNA 含磷量为质量分数 9.5%,RNA 含磷量为质量分数 9.2%,根据磷测定的结果,可推算核酸质量分数

$$w_p(\text{RNA}) = (\text{总磷量} - \text{无机磷量}) / 9.2$$

$$w_p(\text{DNA}) = (\text{总磷量} - \text{无机磷量}) / 9.5$$

其中总磷量指样品中无机磷与核酸中有机磷经消化后转变为无机磷的总和。

1.2 核酸提取

在细胞内 DNA 和 RNA 均以核蛋白形式存在,要提取较纯的核酸,须除去蛋白质等杂质。提取核酸的一般原则是:首先用机械方法使细胞破碎,再用蛋白质变性剂如 SDS、苯酚等处理,使蛋白质沉淀,离心分离。将获得的上层清液(核酸溶液)用乙醇沉淀法提取核酸。提取过程须在低温下进行。DNA 核蛋白和 RNA 核蛋白分离的依据是:DNA 核蛋白能溶于水及高浓度(1~2 mol/L)的 NaCl 溶液,而 RNA 核蛋白则易溶于 0.14 mol/L NaCl 溶

液。

2 试 验

2.1 主要仪器和试剂

2.1.1 仪器 724 型分光光度计;上海光学仪器厂生产;高速组织捣碎机;江阴科研仪器厂产品;JJ1-精密增力电动搅拌机;常州国华电器有限公司产品;SHB-B 循环水多用真空泵;郑州长城科工贸有限公司生产;YJ501 超级恒温水浴槽;上海跃进医疗器械厂产品;离心机;上海手术器械厂生产;冰箱;分析天平。

2.1.2 试剂(分析纯) NaOH、NH₃·H₂O、H₂SO₄、HCl、KH₂PO₄、(NH₄)₂MoO₄、NaCl、AgNO₃、FeCl₃、冰醋酸、三氯醋酸、抗坏血酸、无水酒精、95%酒精、二苯胺、苯酚、苔黑酚、柠檬酸钠、十二烷基硫酸钠(SDS),定磷试剂:3 mol/L H₂SO₄:2.5 g/dL (NH₄)₂MoO₄:2 g/dL 的抗坏血酸:水=1:1:1:2(均为体积比),苔黑酚—氯化铁试剂:100 mg FeCl₃·6H₂O 溶于 100 mL 浓 HCl 中,储存备用,使用前加入 476 mg 苔黑酚。

2.2 试验步骤

2.2.1 样品鱼白中核酸含量分析

1) 分析样品的预处理:方法 1:①取一定量(45 g)海鱼鱼白鲜组织在低温下(用冰块)打成匀浆,再用冰冷的稀三氯醋酸在低温下抽提几次,离心去掉上层清液。②用乙醇在低温下抽提数小时,去除磷脂等脂溶性物质。③经预处理后的核酸,加热(37℃)的 0.3 mol/L NaOH 溶液 70 mL 保温近 20 h,用 0.3 mol/L HCl 中和,再用 7 mL 酸化三氯醋酸,离心分离后得上清液(含 RNA)和沉淀(含 DNA),并使沉淀干燥。方法 2:采用索氏提取器,以乙醇为溶剂加热抽提数小时,其余步骤同方法 1。

2) 磷标准曲线。准确移取 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 mL 磷标准液(质量浓度为 5.115 μg/mL),分别加入 2.5 g/dL 钼酸铵溶液 5 mL, 2 g/dL 抗坏血酸 2 mL,用水稀释至约 30 mL,加热至沸,迅速在流水中冷却至室温,在 50 mL 容量瓶中定容。尽快于 650 nm 波长,2 cm 比色皿中测其吸光度。以标液体积为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,线性范围 0.5~11 mL,求得回归方程 $A = 0.0785 V + 0.0233$, $r = 0.9986$

3) RNA 的含量测定:①移取上层清液 2.5 mL,加入浓 H₂SO₄ 3~4 滴,高温消化。再加质量浓度 2.5 g/dL 的 (NH₄)₂MoO₄ 溶液 5 mL,再加质量浓度 2 g/dL 的抗坏血酸 2 mL 和 30 mL H₂O,加热至沸,

迅速冷却至室温,在 50 mL 容量瓶中定容.在 2 cm 比色皿于波长 650 nm 中的分光光度计中测定吸光度 A .②移取上清液 2.5 mL,不加 H_2SO_4 ,其余步骤同①.③根据所测吸光度由标准曲线的回归方程算出含磷量,求出 RNA 的质量分数.

4)DNA 的质量分数测定:①准确称取一定量的干燥沉淀(0.8 g),加入 1~2 mL 浓 H_2SO_4 ,于凯氏烧瓶中在 140~160 °C 进行消化约 2 h.待固体溶解后,取出冷却,加 5 mL 去离子水,在沸水中加热 10 min,再移至 50 mL 容量瓶中,定容至刻度.准确移取该液 5.00 mL,加质量浓度 2.5 g/dL $(NH_4)_2MoO_4$ 溶液 5 mL,质量浓度 2 g/dL 的抗坏血酸 2 mL,30 mL H_2O ,加热至沸,迅速冷却至室温,在 50 mL 容量瓶中定容.在 2 cm 比色皿于波长 650 nm 中的分光光度计中测定吸光度 A .②准确称取干燥沉淀 0.8 g,不加浓 H_2SO_4 ,其余步骤同.③根据所测吸光度求出含磷量和 DNA 质量分数.

2.2.2 鱼白中核酸的分离和提取

1)DNA 的提取.①原料样品取自 4~6 月地产海水鱼类(如当地俗称的狗腿鱼、马鲛鱼、白姑鱼等)的鱼白.称取一定量去除杂质的新鲜鱼白浸入冰浴中含 0.14 mol/L 食盐和 0.01 mol/L 柠檬酸钠的混合液中,反复洗涤至无血色为止.再放入捣碎机中磨成匀浆,离心分去上清液(A),沉淀再加适量混合液继续磨碎,再离心,直到沉淀物发白为止,保留清液(A).②将洗净的沉淀物溶于生理盐水中,搅拌下加入去污剂 SDS 溶液,使溶液由稀变稠(约 2~3 h),冷藏过夜.然后溶液在搅拌下加入固体 NaCl,使其浓度达到 1 mol/L,离心去除蛋白质沉淀,得乳白色清液(B).过滤后加入等体积的体积分数为 9% 的冰酒精,有白色纤维状 DNA 沉淀析出,干燥,称重.

2)RNA 的提取:将上述清液合并,加入适量 0.14 mol/L 食盐溶液,充分搅匀,静置 10 min,加入 8% 苯酚溶液,使其达到饱和.离心沉降,吸出上层清液,加入体积的体积分数为 95% 冰酒精,有白色絮状沉淀析出,干燥称重,得 RNA 粗产品.

2.2.3 核酸粗产品的纯度分析和组分鉴定

1)DNA 的纯度分析.准确称取一定量(0.1 g)上述干燥 DNA 粗产品,加入 1~2 mL 6 mol/L H_2SO_4 ,以下步骤同鱼白中 DNA 含量的测定.

2)DNA 的组分鉴定.①DNA 水解:取 0.1~0.2 g 干燥 DNA 粗产品,加 5 mL 体积分数 10% H_2SO_4 ,煮沸 2 min,过滤,得水解液.②嘌呤碱鉴定:取 1 mL 水解液,再加 1 mL 体积分数 15% 氨水,1

mL 体积分数 2% $AgNO_3$ 溶液,摇匀,放置片刻,观察溶液变化.③脱氧核糖鉴定:取 0.5 mL 水解液,加 3 滴浓 H_2SO_4 和 4 滴冰醋酸,再加二苯胺溶液 1 mL,置沸水浴中加热 5 min,观察颜色变化.④磷酸鉴定:取 0.5 mL 水解液,加 0.5 mL 质量浓度 2.5 g/dL $(NH_4)_2MoO_4$ 溶液,2 mL 质量浓度 2 g/dL 的抗坏血酸,置沸水浴中观察溶液变化.

3)RNA 的纯度分析.准确称取一定量(0.1 g)干燥粗 RNA 产品,以下步骤同 DNA 纯度分析.

4)RNA 的组分鉴定.①RNA 的水解和嘌呤碱鉴定,同 DNA 的组分鉴定.②核糖鉴定:取 0.5 mL 水解液,加苔黑酚—氯化铁试剂 1 mL,置沸水浴中加热,观察溶液变化.③磷酸鉴定:取 0.5 mL 水解液,加定磷试剂 1 mL,置沸水浴中观察溶液变化.

3 结果与讨论

3.1 样品中核酸含量分析

两种预处理方法,测得鱼白样品中核酸含量见表 1 和表 2.可见,样品预处理方法 1(低温提取法)比方法 2(索氏提取器法)造成核酸损失要小.故提取试验均按预处理方法 1 进行.

表 1 按预处理方法 1 测得样品中核酸质量分数

Tab.1 The nucleic acid content in samples determined by pro-processing method 1

批次	RNA 质量 分数/%	DNA 质量 分数/%	核酸 质量分数/%
1	0.0111	0.0134	0.0245
2	0.0118	0.0125	0.0243
3	0.0107	0.0139	0.0246
平均值	0.0112	0.0133	0.0245

表 2 按预处理方法 2 测得样品中核酸质量分数

Tab.2 The nucleic acid content in samples determined by pro-processing method 2

批次	RNA 质量 分数/%	DNA 质量 分数/%	核酸 质量分数/%
1	0.0121	0.00815	0.0203
2	0.0128	0.00761	0.0204
3	0.0136	0.00755	0.0212
平均值	0.0128	0.00777	0.0206

3.2 DNA、RNA 的提取得率

表 3 中列出核酸一次提取粗产品的收率.核酸粗品平均收率 6.72%.

表 3 核酸一次提取粗产品的收率

Tab.3 The extraction yield of raw nucleic acid product (single step)

批次	RNA 质量 分数/%	DNA 质量 分数/%	核酸 总收率/%
1	4.62	1.98	6.60
2	4.80	2.58	7.38
3	4.30	1.89	6.19
平均值	4.57	2.15	6.72

3.3 产物中 DNA、RNA 纯度分析

表 4 列出一次提取粗产品中核酸的纯度. 核酸平均质量分数 2.30%.

3.4 DNA、RNA 组分鉴定

1) DNA 组分鉴定. ①嘌呤碱, 有白色絮状嘌呤银产生. ②脱氧核糖, 溶液由无色变为蓝色. ③磷酸, 溶液颜色变蓝.

2) RNA 组分鉴定. 嘌呤碱和磷酸鉴定情况同

DNA 组分鉴定; 核糖, 溶液由黄色变为深绿色.

表 4 一次提取粗产品中核酸的纯度

Tab.4 The purity of extracted raw nucleic acid product (single step)

批次	RNA 质量 分数/%	DNA 质量 分数/%	核酸 质量分数/%
1	1.09	0.93	2.02
2	1.41	1.27	2.68
3	1.28	0.94	2.22
平均值	1.26	1.05	2.30

4 结 论

鱼白中核酸含量高低明显受预处理方法的影响. 试验中的提取方法及所得粗产品的 DNA 和 RNA 的收率、纯度较好. 在对粗产品进行精制后, 可提高核酸含量.

参考文献:

- [1] The news and editorial staffs. The runners-up: RNA ascending[J]. Science, 2001, 21, 2443 - 2447.
- [2] 唐孝礼, 周永红. 鱼精 DNA 的快速无污染提取工艺[J]. 广州化工, 1996, 24(4): 21 - 23.
- [3] 王晓霞, 解军, 王惠珍. 改良稀碱法从鲑鱼肝脏中提取核酸[J]. 山西医科大学学报, 2001, 32(5): 385 - 386.
- [4] 玄国东, 佟晓水, 赵鑫. 饮食核酸提取技术[J]. 中国卫生检验杂志, 2000, 10(3): 337 - 338.
- [5] 郭健, 刘宁等. 保健食品中总核酸的测定[J]. 中国公共卫生, 2001, 17(8): 697.
- [6] 郑洪, 吴敏, 李东辉. 近红外分光光度法测定核酸[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2000, 39(2): 191 - 194.
- [7] 刘绍璞, 龙秀芬. 某些分子光谱分析法测定核酸的进展[J]. 理化检验—化学分册, 2002, 38(2): 101 - 107.
- [8] 郭勇. 现代生化技术[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 1996.
- [9] 赵亚华. 生物化学实验技术教程[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2000.
- [10] 陈鸿琪. DNA 分子构成及其分析测定[J]. 理化检验, 1999, 35(12): 568 - 570.
- [11] 景挂兰, 刘祖昌, 李冬伟. 核酸含量的测定[J]. 广东微量元素科学, 1999, 6(11): 48 - 49.

(责任编辑: 杨 萌)