

# 个体基因解密实验 I

-- 样本DNA提取

# CONTENTS

01

**实验室安全注意事项**

---

02

**唾液DNA提取**

---

**/01**

**实验室安全注意事项**



## 实验室常规安全注意事项

- 1、实验前认真阅读实验材料和参考资料，明确实验目的和要求；
- 2、实验室内不穿凉鞋、拖鞋或高跟鞋，不穿裙子或短裤；长发需扎束整齐；不佩戴长的或下垂的饰品，避免实验过程中沾染实验试剂；
- 3、任何实验用品不得带离实验室，严禁在实验室内饮食或吸烟，实验室内仪器不可用于制备食物，实验室内冰箱不得用于储藏食物；
- 4、熟悉实验室周围环境，了解水阀、电闸、安全门的位置，了解消防器材的位置和使用方法，了解洗眼器和喷淋的位置，了解急救箱的位置；
- 5、实验时打开门窗或换气设备，保持室内空气流通；进行挥发或有异味、潜在有毒或有污染的实验，要在通风橱内进行。



- 6、实验中认真操作、仔细观察，不得随便离开实验室岗位，密切关心实验的进展情况；
- 7、节约水、电、药品、试剂，爱护实验器材和各种实验设备；
- 8、使用电器时谨防触电，不要在使用时用湿手或湿物接触电器或电插头插座。实验完毕，应按要求切断电源或电器；
- 9、靠近或使用加热装置时，注意防护，避免烫伤、灼伤（在本实验的水浴锅、恒温混匀仪、PCR仪等有加热功能的电器使用过程中需注意）；
- 10、严格执行国家环境保护相关规定，实验过程产生的废液、枪头、试管等投入医疗垃圾袋；
- 11、实验结束后认真清理实验台面，清洁实验用具，清洁整理完成后再离开。最后离开实验室的人员需帮助检查水阀、电器、门窗等，是否关闭。

# 化学品安全技术说明书

<https://www.chemsrc.com/MSDSIndex/>

chemsrc.com/cas/67-63-0\_766167.html

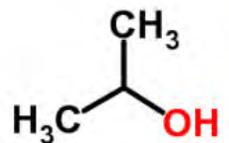
化源网 登录 注册 VIP 首页

请输入名称/CAS号/分子式/EINECS/MDL获得MSDS, 物化性质等信息。

CAS号查询 / 化工产品分类 / 有机原料 / 醇、酚、酚醇类化合物及衍生物 / 无环醇 / 异丙醇

## 异丙醇

更新时间: 2022-01-11 16:22:57



前往商城 一键下单  
— 前往化源商城 立即购买 —

常用名	异丙醇	英文名	Isopropanol
CAS号	67-63-0	分子量	60.095
密度	0.8±0.1 g/cm3	沸点	73.0±3.0 °C at 760 mmHg
分子式	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	熔点	-89.5 °C
MSDS	<a href="#">中文版</a> <a href="#">美版</a>	闪点	11.7±0.0 °C
符号	  GHS02, GHS07	信号词	Danger

## 专用试剂安全注意事项

在实验室常见试剂外，本课程涉及4套专用试剂，应用在样本采集、核酸提取、文库构建、测序4个步骤中。专用试剂安全情况如下：

试剂名称	安全情况	处理建议
唾液 DNA 样本采集套装	无毒害	下水直排
MGIEasy 基因组 DNA 提取试剂盒	无毒害	下水直排
MGIEasy 高通量测序教育培训试剂盒 (人趣味基因组检测)	无毒害	下水直排
DNBSEQ-E5RS 测序试剂套装 (SE100)	有毒害	按有毒有害废物处理

样本采集、提取、文库制备试剂均只包含常规实验室用无机盐、生物酶等成分，pH值适中，对身体无毒害，对环境友好。

DNBSEQ-E5RS测序仪配套的测序试剂包含低浓度的有毒有害废物，操作时建议如下：

1. 该环节为多人混样后加样至测序试剂盒中，所以在校内开展实验时，测序试剂盒准备和加样的过程可指定一位实验操作经验丰富的老师或学生来操作。
2. 完成上样后，试剂盒置于基因测序仪中运行结束后，全部废液均应完好地存放于测序试剂盒中，保证无外泄风险。
3. 实验结束后，将测序试剂盒放置于学校统一的有毒有害废物处理箱/袋中，并联系相关有毒有害废物处理机构上门回收，或由供货商带回原厂处理。

## 特定仪器使用过程中的安全注意事项

本实验涉及的大部分仪器均有较高的安全性，按常规安全要求规范使用即可。

少部分仪器使用过程中需要特别注意以下几点：

1. 微生物实验耗材和试剂的灭菌以及分子实验的枪头、离心管等的灭菌等均需使用灭菌锅。灭菌锅的使用具有一定风险，一定要在老师或有使用经验的学生指导下按照仪器使用说明严格操作，降低安全风险。
2. 离心机的使用尤其需要注意“配平”，切勿在非配平状态下启动离心机。
3. PCR仪使用时注意盖子、管子、管架的温度，防止烫伤。
4. 水浴锅、恒温箱等保温设备操作时，请注意将温度控制在实验所需的范围内，不要设置过高的温度导致仪器失灵或增加烫伤风险。

**/02**

**唾液DNA提取**



本次实验用到的主要仪器、试剂、耗材

◇ 试剂/套装:

异丙醇（用于沉淀DNA）

无水乙醇（用于稀释缓冲液）

唾液DNA样本采集套装（用于采集唾液）

MGIEasy基因组DNA提取试剂盒（磁珠法）（用于提取DNA）

Qubit® dsDNA HS Assay Kit（用于定量DNA）

◇ 设施设备:

移液器（0.1-2.5 $\mu$ L、0.5-10 $\mu$ L、2-20 $\mu$ L、10-100 $\mu$ L、20-200 $\mu$ L、100-1000 $\mu$ L）、恒温混匀仪（可以用水浴锅替代）、涡旋混匀仪、1.5mL管磁力架、Qubit® 4.0 荧光定量仪、试管架。

◇ 耗材（无菌级别）:

1.5mL离心管、枪头（10 $\mu$ L、200 $\mu$ L、1000 $\mu$ L）、Qubit专用薄壁EP管、医疗垃圾袋、口罩、无粉乳胶手套。

## 移液器试用步骤与注意事项

- 1、选：选合适的移液器，需要先看清量程；若要移液7.3/17.3/173 $\mu$ L，应当选用哪个量程的移液器？
- 2、调：调到目标量程，尝试从2个不同方向调节移液器量程，观察变化情况；注意，不可将移液器调至高于最大量程或低于最小量程使用；尝试感受移液器两个挡位的摁压手感
- 3、配：给移液器搭配合适的枪头，需要先看清3种不同枪头的口径
- 4、吸：吸液时，需要将移液器先按压至一档，保持在该档位不动，将枪头伸至目标试剂液面下，缓慢释放档位至空档。注意，避免吸液过快，产生气泡，导致取液体积达不到目标
- 5、打：将吸有液体的移液器枪头伸至目标加液试管中，贴壁或伸至液面下，快速按压至2档，保持按压在二档，离开管体后，再松手回位至空档
- 6、换：换枪头，取用不同试剂，或向不同反应液中加液时，一定要确保及时更换枪头，避免污染试剂或样本

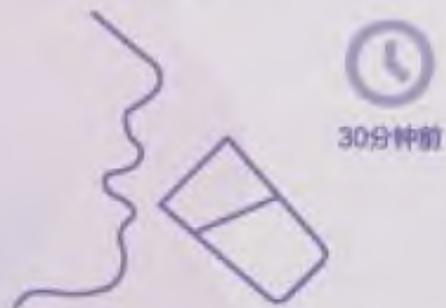
移液器试用小作业：

取1.5mL离心管中装水，使用移液器，分别向另一支相同规格的空管中按以下体积进行移液操作：

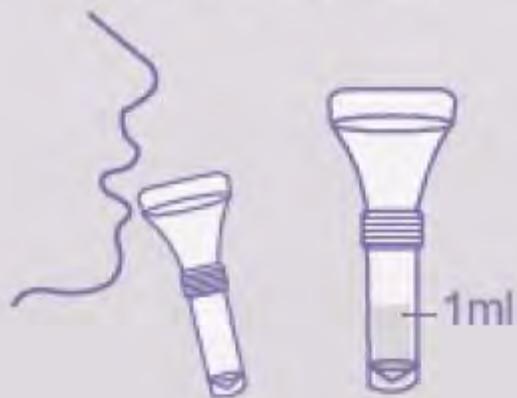
- 1、1.5 $\mu$ L
- 2、2.2 $\mu$ L
- 3、5.3 $\mu$ L
- 4、17.2 $\mu$ L
- 5、183 $\mu$ L
- 6、300 $\mu$ L

## 唾液样本采集

- 1 收集前30分钟，  
用清水漱口



- 2 向采集漏斗中吐1ml  
唾液（不含泡沫）



- 3 将保存液倒入唾液  
样本中，充分混匀



- 4 贴上标签，封装样本



## 唾液样本采集

使用1.5ml 离心管采集约1ml唾液  
建议提前30分钟漱口，不进食



# DNA提取试剂盒

## 【组成信息】

试剂名称	规格与数量 (48 Preps)
Buffer LS	针对组织和细胞样本
Buffer LB	Lysis Buffer: 双亲结构, 裂解细胞膜结构
Buffer W1	Washing Buffer: HEPES (维持稳定pH值)、
Buffer W2	巯基乙醇 (打开蛋白质结构)、PVP (溶剂)
Buffer EB	Extraction Buffer: 多种螯合剂, 溶解DNA
Proteinase K (20 mg/mL)	消化角蛋白Kerati
Magnetic Beads H	吸附DNA

## 【运输条件】

常温条件 (15°C~30°C) 下运输。

## 【存储条件】

本试剂盒中不同试剂组分存储条件不同, 请按如下条件分别储存:

Proteinase K (20 mg/mL): 2°C~8°C。

Magnetic Beads H: 2°C~8°C。

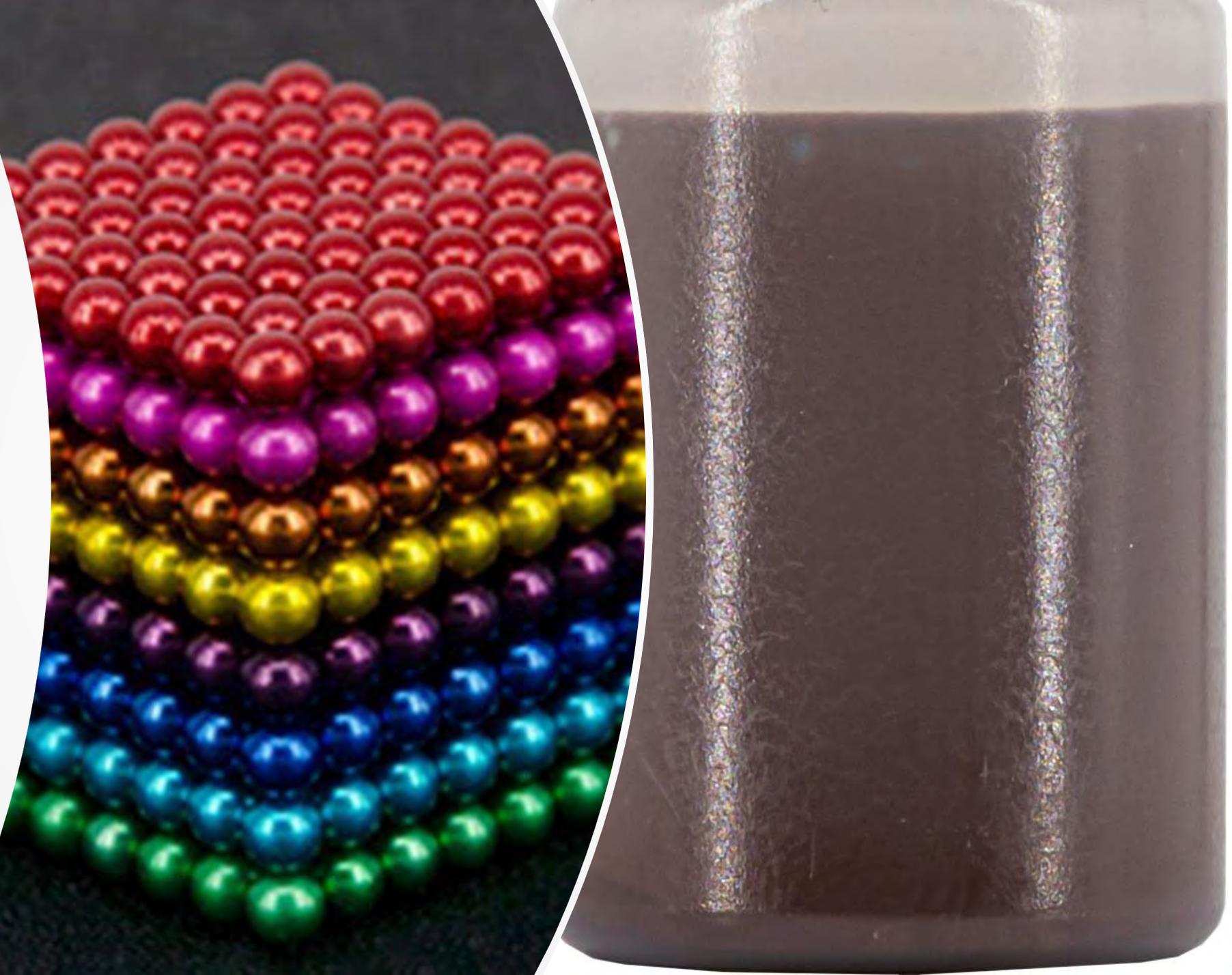
其他试剂: 室温 (15°C~25°C) 干燥条件下保存。若溶液有沉淀析出, 为正常现象, 不影响试剂性能。

## 磁珠纯化原理

磁珠由微小（20至30纳米）的铁氧化物颗粒组成，如磁铁矿（ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ），这使它们具有超顺磁性。

**超顺磁性**磁珠与常见的铁磁体不同，因为它们只在有外部磁场的情况下表现出磁性行为。这一特性取决于磁珠颗粒极小的尺寸，并使其能够在悬浮液中与它们结合的任何东西一起被分离。由于它们在磁场外不会相互吸引，所以在使用时不必担心会出现不必要的结块。

磁珠的类型很多。不同的表面涂层和化学成分使每种磁珠都有自己的结合特性，可用于核酸、蛋白质或其他**生物大分子的磁分离**（分离和纯化），方法简单、有效，且可扩展。



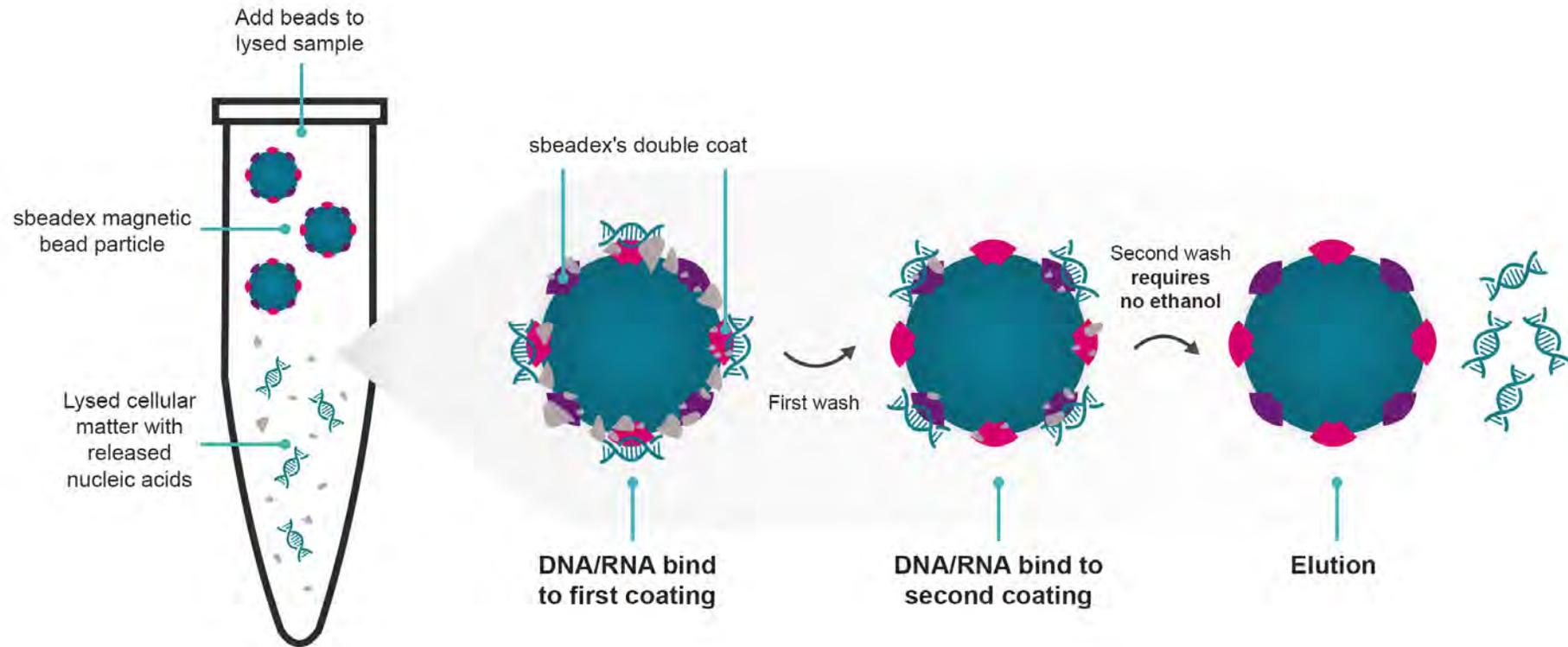
## 磁珠DNA洗脱

在结合DNA后，外部磁场将磁珠吸引到试管内壁外缘，使其固定下来。当磁珠被固定住时，磁珠结合的DNA在洗涤步骤中被保留下来。随后加入洗脱缓冲液，DNA从磁珠上脱落下来，作为纯化的样品释放出来，准备进行定量和分析。

这种方法不需要真空或离心，从而最大限度地减少了对目标分子的压力或剪切力，比其他DNA提取方案需要更少的步骤和试剂，并且适合在24、96和384孔板中实现自动化。



## sbeadex novel two-step binding mechanism



## DNA提取

1. 取200  $\mu\text{L}$ 新鲜唾液样本加入到1.5 mL的离心管中；
2. 加入 Proteinase K 溶液：加入**20  $\mu\text{L}$  Proteinase K** 溶液，振荡混匀；
3. 添加裂解液Buffer LB；
4. 加入**350  $\mu\text{L}$ 异丙醇**，充分振荡混匀，此时部分离心管溶液会出现絮状沉淀为正常现象；

针对华大智造唾液DNA采集套装保存唾液/口腔拭子样本：加入100  $\mu\text{L}$  Buffer LB。

针对新鲜唾液加入**300  $\mu\text{L}$  Buffer LB**。

随后充分振荡混匀后将离心管放置于恒温混匀仪上，温度控制在65°C，转速控制在800 rpm~1000 rpm,孵育15 min。如实验室没有恒温混匀仪器，可使用水浴锅代替，每五分钟手动混匀样本一次；

5. 取出Magnetic Beads H试剂涡旋重悬，在样本中加入**20  $\mu\text{L}$  Magnetic Beads H**，充分振荡混匀，室温静置2 min，中间颠倒混匀 1~2次；

6. 将离心管放置磁力架上静置2 min，磁珠完全吸附后，小心**吸弃上清液体**；

## DNA提取

7. 将离心管从磁力架上取下，加入**500  $\mu$ L Buffer W1**（确保已按照操作说明加入无水乙醇），充分振荡混匀 1 min~2 min;

注意：加入Buffer W1后振荡混匀一定要充分，否则会影响提取的核酸纯度；

8. 将离心管放置磁力架上静置1 min，磁珠完全吸附后，小心**吸弃上清液体**；

9. 将离心管从磁力架上取下，加入**600  $\mu$ L Buffer W2**（确保已按照操作说明加入无水乙醇），充分振荡混匀 1 min~2min;

注意：加入Buffer W2后振荡混匀一定要充分，否则会影响提取的核酸纯度；

10. 将离心管放置磁力架上静置1 min，磁珠完全吸附后，小心**吸弃上清液体**；

11. **重复步骤9~10一次**，尽可能地吸弃离心管中残留的液体。尽量吸干管内液体，若管内仍残留液体，可短暂离心后用10  $\mu$ L 枪头吸净底部残留液体；

## DNA提取

12. 将离心管放置磁力架上，开盖室温干燥5~10 min，确保乙醇挥发干净。根据室内湿度掌握干燥时间，最佳状态为磁珠表面**干燥（不反光）且不开裂**；

13. 将离心管从磁力架上取下，加入50~100  $\mu\text{L}$ 洗脱液Buffer EB，振荡混匀后置于恒温混匀仪上，温度控制在56°C，转速控制在800 rpm ~1000 rpm孵育5 min；

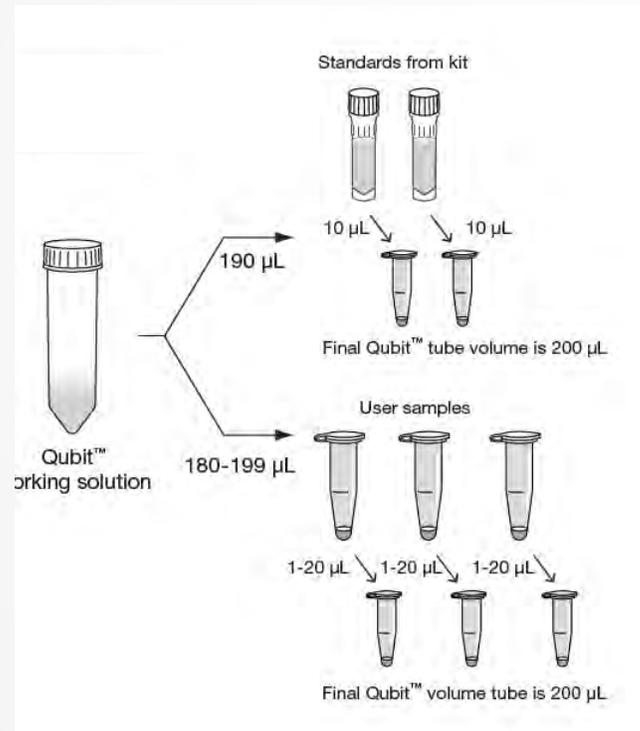
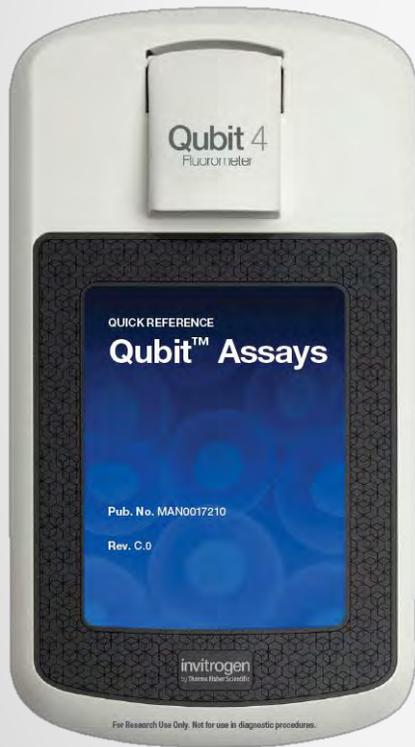
**此次实验加入50  $\mu\text{L}$ 洗脱液Buffer EB；**

14. 将离心管放置磁力架上，待磁珠完全吸附后，小心将45~90  $\mu\text{L}$  DNA溶液转移至一个新的1.5 mL离心管中，做好标记并于-20°C以下保存。；

**此次实验请保存与4°C冰箱中，供后续实验使用；**

# DNA定量

15. 提取后请利用Invitrogen Qubit (2.0/3.0/4.0均可, 请使用配套dsDNA试剂) 对DNA进行精确定量。第一次使用前请利用标准品对仪器进行校准。不推荐使用紫外分光光度法、Nanodrop等仪器定量。



- 准备Qubit定量分析专用管
- 2μL DNA + 198 μL dsDNA working solution
- 放入仪器, 使用dsDNA模式检测浓度

**注意:**

**2μL DNA与198μL定量混合液混匀后需遮光孵育2分钟, 再进行定量检测。**