

实验 1.1 DNA 提取

一、实验背景

参考课程 ppt

二、教学目标

- 1、采集个人唾液样本
- 2、磁珠法提取唾液 DNA
- 3、完成 DNA 定量检测

三、实验原理

第一部分、磁珠法提取 DNA 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（ Fe_3O_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。

在磁珠法的反应体系中，核酸分子（此实验中富集核酸为 DNA）会由线性压缩成球状，暴露出核酸骨架上大量的负电基团与反应体系中的阳离子连接，在磁珠最外层负电基团的作用下，形成“阴离子-阳离子-阴离子”的盐桥结构，使核酸分子被特异性地吸附到磁珠表面。

将磁珠反应体系放置到磁力架之后，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。



第二部分、Qubit 定量原理

Qubit 荧光计采用荧光染料法对核酸进行定量。首先为不同类型的核酸准备不同的、可与之特异性结合的染料，这些染料在不同波长的光源激发下，会发出荧光。其中结合了核酸的荧光染料相比于那些游离的染料，荧光信号强度可能高出数十倍至数百倍，其光强与被检测物分子数正相关，由此检测出反应体系中的核酸浓度。

【教学重点】在本实验环节中，学生需在理解磁珠纯化原理的基础上，在磁珠投放前的混匀、吸附后洗脱及晾干等操作环节严格按照操作注意事项进行，确保得到足量的 DNA，用于下一步建库实验。在此过程中，学生需养成书写实验记录的习惯，以便于在实验完成后根据记录数据和信息进行实验回顾、分析和总结。

四、实验材料

◇ 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 μL 、0.5-10 μL 、2-20 μL 、10-100 μL 、20-200 μL 、100-1000 μL ）、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 μ L、200 μ L、1000 μ L)、Qubit 专用薄壁 EP 管、医疗垃圾袋、口罩、无粉乳胶手套。

五、实验步骤

第一部分 唾液采集

按以下步骤完成个人唾液样本采集：



注意事项：

1. 此次采样仅供学生课堂实验教学用，不得用于其他用途
2. 使用前需仔细阅读采集流程，熟悉注意事项；
3. 在采集唾液样本前的 30 分钟内，请勿进食、饮水、吸烟或嚼口香糖；
4. 所有样本及试剂切勿吞咽，并避免直接接触皮肤和眼睛，若发生此类情况请立即用大量清水冲洗并及时到医院就诊；
5. 所有样本和各种废弃物均应视为潜在感染性的污染物，按相关法规规定处理。

第二部分 DNA提取实验

1. 华大智造唾液 DNA 采集套装保存的唾液/口腔拭子样本：取 400 μ L 已保存的唾液/口腔拭子保存液样本加入到 1.5 mL 离心管中。

1) 注意：取样前需充分混匀样本，确保 DNA 的产量。

2) 注意：若新鲜唾液不急于提取，可以先取 200 μ L 新鲜唾液样本加入 300 μ L 的 Buffer LB，充分混匀后可以在室温条件保存 24 小时，请在 24 小时内从步骤 2 进行操作。

2. 加 Proteinase K 溶液：加入 20 μ L Proteinase K (20 mg/mL) 溶液，振荡混匀；

3. 添加裂解液 Buffer LB，不同类型样本，操作如下：

新鲜唾液：加入 300 μ L Buffer LB，充分振荡混匀，将离心管放置于恒温混匀仪上，温度控制在 65 $^{\circ}$ C，转速控制在 800 rpm~1000 rpm，孵育 15 min。

4. 加入 350 μ 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。

5. 涡旋重悬 Magnetic Beads H 后再加入 20 μL Magnetic Beads H, 充分振荡混匀, 室温静置 2 min, 中间混匀 1-2 次。

6. 瞬时离心, 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。

7. 将离心管从磁力架上取下, 加入 500 μL 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 μL 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, 尽可能吸弃离心管中残留的液体。

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。

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

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

15. 注意: 洗脱体积不宜过少, 推荐采用 50 μL 以上 Buffer EB 洗脱。如果提取样本量偏多时, 在转移 DNA 溶液时候会有磁珠粘附透明粘液现象, 主要是由 DNA 溶解不充分导致, 可补加一定量的 Buffer EB 重新充分溶解, 如果粘液现象依旧存在, 转移 DNA 溶液时应避免吸入粘液磁珠, 不影响提取的核酸质量。如果对核酸纯度有较高要求, 可以将离心管置于离心机上, 转速设定为 8000 rpm, 离心 1 min, 然后转移上层 DNA 溶液, 做好标记并于-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

注意事项:

1. 若 Buffer LB、Buffer W1 溶液有沉淀析出, 使用前请将溶液放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热 10 min, 待沉淀溶解, 摇匀后使用。沉淀析出为正常现象, 不影响试剂性能。

2. 所有的试剂和样本在使用前请平衡到室温 (15~25 $^{\circ}\text{C}$)。

3. 使用前确保 Buffer W1 和 Buffer W2 已按照试剂瓶标签的提示量添加无水乙醇, 其中 Buffer W1 需添加 18mL 无水乙醇, Buffer W2 需添加 52 mL

无水乙醇（此处注意是毫升不是微升，添加无水乙醇后充分混匀）。

4. 实验结束后，确保试剂瓶瓶盖拧紧，尤其是添加过无水乙醇的 Buffer W1 和 Buffer W2。

5. Buffer EB 的组分为 10 mM Tris-HCl (pH8.0) 和 0.5 mM EDTA (pH8.0)，若有特殊需求可自备洗脱缓冲液。

6. 所有试剂从规定的存储环境中取出时，按照要求使用，使用前试剂应摇匀，混匀后使用。

7. 所有样本及试剂应避免直接接触皮肤和眼睛，切勿吞咽，一旦发生这种情况立即用大量清水冲洗并及时到医院就诊。

8. 所有样本和各种废弃物均应按相关法规规定污染物处理。

第三部分 定量实验

1. 取配液试管，按 1: 199 将 Qubit™ reagent 染料与 Qubit™ buffer 缓冲液配成总体积为 $[200 * (N + 3)] \mu\text{L}$ 的 Qubit 定量反应体系（总体积 $200\mu\text{L} * (N+3)$ ，N 为待测样本数），上下颠倒混匀；
2. 取 N 支 Qubit 专用薄壁 EP 管（N 为待测样本数），每管按 1: 199 将 1 μL 待测样本与 199 μL 步骤 1 所得 Qubit 定量反应液混合，充分震荡混匀；
3. 取 2 支 Qubit 专用薄壁 EP 管，按 10: 190 将分别加入 10 μL 标准品 1 (0 ng/ μL) 和标准品 2 (10 ng/ μL) 与 190 μL 步骤一所得 Qubit 定量反应液混合，充分震荡混匀；
4. 先打开 Qubit 荧光定量仪，选择 dsDNA 选项采用按顺序放入步骤三中用标准品 1 和标准品 2 配置的溶液薄壁 EP 管，对荧光定量仪进行校准；
5. 选择 1 μL 样本量，逐个检测并记录被试待测样本 DNA 浓度，并记录。

注意事项：

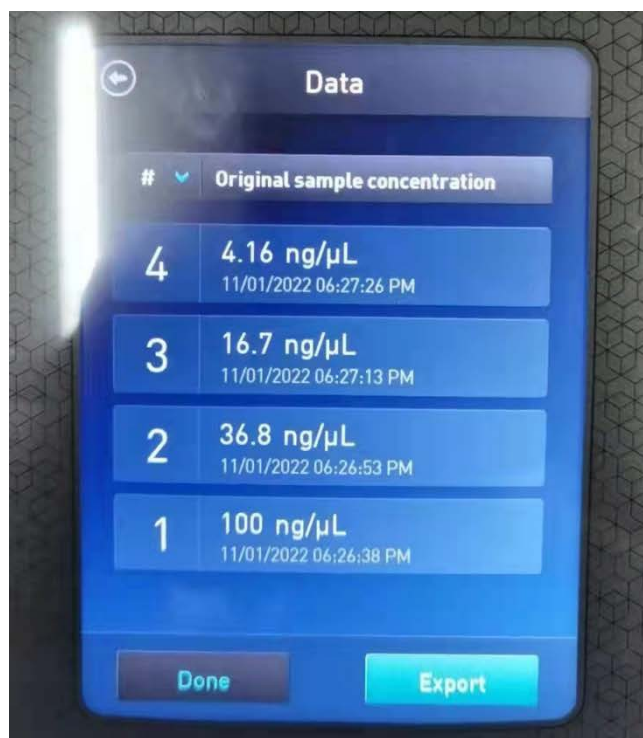
6. 为保证定量准确，实验操作过程中须保持 Qubit 专用薄壁 EP 管底部及外壁尽量洁净，不被磨损（混匀时禁止管底直接接触涡旋混匀仪）；
7. Qubit 荧光染料见光易分解，应避免在强光环境下操作，并在非使用时间置于避光处。

【教学重点】本实验要求学生务必细心和做好操作，如因自己操作原因失败，原则上不安排补课。一方面给予学生严格的要求，另一方面在教学中给予详细的指导和帮助，两方协同提升学生的动手能力和科研素养。

六、实验后处理和预期结果

为保证下一步骤实验顺利，所得样本 DNA 浓度最适范围为 10~20ng/ μ L，若样本浓度位于 5-10ng/ μ L 之间，下一步骤建库实验有风险；若样本浓度低于 5ng/ μ L，则下一步骤建库实验有极大的失败风险，建议重新提取。若样本浓度高于 20 ng/ μ L，须用 TE Buffer 稀释后重新定量；

预实验结果举例：（Qubit 定量结果图片）



The image shows a screenshot of a software interface titled "Data". It displays a table with the following information:

#	Original sample concentration
4	4.16 ng/ μ L 11/01/2022 06:27:26 PM
3	16.7 ng/ μ L 11/01/2022 06:27:13 PM
2	36.8 ng/ μ L 11/01/2022 06:26:53 PM
1	100 ng/ μ L 11/01/2022 06:26:38 PM

At the bottom of the interface, there are two buttons: "Done" and "Export".

提取后所得样本须保存在-20 $^{\circ}$ C条件下，可长期保存。