

## 一、口腔粘膜脱落细胞采集

### 【使用方式】



**注意：**为了保证样本不被食物或者饮料污染，取样前 30min 内请勿进食和饮水。

- 1、洗净双手；
- 2、取出棉签；
- 3、手持棉签，伸入口腔，从口腔内侧颊粘膜处（腮帮子内侧）反复擦拭 **40 次**以上（不时旋转棉棒），取出棉签；
- 4、从试管盒中取出试管，打开管盖，将棉签头部伸入管中，用力掰断，将棉签头部留在管内，并扣紧管盖。

## 二、口腔拭子基因组 DNA 提取（天根 Kit，DP322）

使用前，请先在缓冲液 GD 和漂洗液 PW 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

### 1. 处理材料：

将在面颊内擦拭过的棉签转置于 2ml 离心管中，用剪刀将棉签部分从其杆上剪下，加入 **600ul** 缓冲液 GA。

**注意:**如果需要去除RNA, 可加入4  $\mu$ l RNase A(100 mg/ml)溶液(客户自备, 目录号:RT405-12), 振荡15 sec, 室温放置5 min。

2. 加入**40uI** Proteinase K溶液, 涡旋10 sec混匀, 56°C放置20 min, 其间每7 min涡旋混匀数次。

3. 加入**600uI**缓冲液GB, 充分颠倒混匀, 70°C放置10 min。此时溶液应变清亮, 简短离心以去除管盖内壁的液滴, 然后挤压去除拭子, 将尽可能多的裂解液转移至新的离心管中。

**注意1:** 加入缓冲液GB时可能会产生白色沉淀, 一般70°C放置时会消失, 不会影响后续实验。如溶液未变清亮, 说明细胞裂解不彻底, 可能导致提取DNA量少和提取出的DNA不纯。

**注意2:** 如果由于拭子上细胞数少导致提取的基因组DNA少于1  $\mu$ g, 可以在添加缓冲液GB的同时添加Carrier RNA(客户自备, 目录号:RT416)。

4. 加**300uI**无水乙醇, 充分颠倒混匀, 简短离心以去除管盖内壁的液滴。

**注意:**加入无水乙醇后可能会出现絮状沉淀, 但不影响DNA提取。

5. 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱CR2中(吸附柱CR2放入收集管中), 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心30 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CR2放回收集管中。

**注意:** 第4步液体总体积超过800uI, 分两次转移。

6.向吸附柱CR2中加入500  $\mu$ l缓冲液GD(使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心30 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CR2放回收集管中。

7. 向吸附柱CR2中加入600  $\mu$ l 漂洗液PW(使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心30 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CR2放回收集管。

8. 重复操作步骤7。

9. 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心2 min, 倒掉废液。将吸附柱CR2室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

**注意:** 这一步的目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除, 漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应(酶切、PCR等)实验。

10. 将吸附柱CR2转入一个干净的离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加20-50  $\mu$ l 洗脱缓冲液TB, 室温放置2-5 min, 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心2 min。

**注意:**洗脱缓冲液体积不应少于20  $\mu$ l, 体积过小影响回收效率。为增加基因组DNA的得率, 可将离心得到的溶液再加入吸附柱CR2中, 室温放置2 min, 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心2 min。洗脱液的pH对于洗脱效率有很大影响。若用ddH<sub>2</sub>O做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5范围内, pH值低于7.0会降低洗脱效率;且DNA产物应保存在-20 $^{\circ}$ C, 以防DNA降解。

## DNA浓度及纯度检测

得到的基因组DNA片段的大小与样品保存时间、操作过程中的剪切力等因素有关。回收得到的DNA片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。

DNA应在OD260处有显著吸收峰，OD260值为1相当于大约50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 双链DNA、40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 单链DNA。

OD260/OD280比值应为1.7-1.9，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用ddH<sub>2</sub>O，比值会偏低，因为pH值和离子存在会影响光吸收值，但并不表示纯度低。

## 琼脂糖凝胶电泳

### 1、配置琼脂糖凝胶（1%）（以配置 100ml 琼脂糖凝胶为例）

- 1) 称取 1g 琼脂糖，倒入锥形瓶中；
- 2) 加 100ml 1\*TAE，摇晃均匀，放入微波炉中加热至琼脂糖完全溶解（其间可取出锥形瓶摇几次，以促进琼脂糖溶解）；
- 3) 取出锥形瓶，待瓶身温度降至 50 度左右时（不烫手），加入 1-2ul 荧光染料，摇匀；
- 4) 倒入制胶板中，插上梳子，待其凝固。

### 2、电泳

- 1) 从胶板上取下凝胶，在 1\*TAE 中浸泡使胶孔中充满 1\*TAE（可直接在

电泳槽中加样，也可把凝胶取出加样)；

- 2) 将 PCR 产物与 6\*Loading Buffer 充分混匀；
- 3) 将混合液加至凝胶孔中 (注意留出加 marker 的孔)；
- 4) 加 marker (根据片段大小选择合适大小的 marker)；
- 5) 选择合适的电压开始电泳 (一般选择 160V, 10-15min)；
- 6) 停止电泳，在凝胶成像仪上观察并拍照。