



QIAamp DNA Mini Kit (CAT#51304) -细菌DNA提取Protocol

2011-11-17

Amy

应用:

- ❖ 这个protocol可以成功地运用于大肠杆菌、Subtilis 杆菌，来自于鼻炎拭子的结核杆菌，来源于脑脊液的螺旋菌，以及来源与灌洗支气管肺泡的军团杆菌。对于其它的G⁺，裂解步骤会比较难操作。

额外需要的试剂:

- ❖ 对于拭子样本：灭过菌的PBS
- ❖ 对于G⁺和难裂解的细菌： 20 mg/ml的溶菌酶或者 200 µg/ml的溶葡萄球菌酶（溶解于20 mM Tris·Cl），pH 8.0, 2 mM EDTA，以及1.2% Triton。

须知:

- ❖ 所有的离心步骤都在室温进行（15~25°C）。
- ❖ 如果样品量小于10,000拷贝，使用Carrier DNA (如 poly dA, poly dT, poly dA:dT)

Carrier DNA:

- ❖ 从尿液或者其它体液中制备游离病毒的DNA，使用血液和体液的protocol，我们建议加入1 µl 含有5–10 µg的 carrier DNA (如poly dA, poly dT, poly dA:dT) 到200 µl 的Buffer AL中。为了保证最优化的结合条件，在第六步的时候适当增加乙醇的量（200 µl 到 230 µl），洗脱液应该在60 µl Buffer AE中。
- ❖ 避免反复冻融样品，因为这样会造成DNA的降解。

实验开始之前:

- ❖ 样品平衡至室温（15~25°C）。
- ❖ 加热两个水浴槽或加热模块：分别到56°C和70°C。
- ❖ 平衡Buffer AE或者蒸馏水到室温用于洗脱。
- ❖ 保证Buffers AW1 和AW2已经准备好。

Buffer AW1:

（存放于室温15–25°C）

- ❖ Buffer AW1 是浓缩液，第一次使用之前，加入适量的96%–100%的乙醇（按照瓶子上的说明）。室温密封保存，1年有效。

Buffer AW2:

（存放于室温15–25°C）

- ❖ Buffer AW2 是浓缩液，第一次使用之前，加入适量的96%–100%的乙醇（按照瓶子上的说明）。室温密封保存，1年有效。
- ❖ 如果Buffer ATL 或者Buffer AL出现沉淀，56°C加热溶解。

从细菌培养板中分离gDNA步骤:

- ❖ 接种环把培养板中的细菌分离出来，重悬于180 μ l的Buffer ATL（强烈搅拌）。
- ❖ 加入20 μ l的蛋白酶K，涡旋混匀，56°C孵育至完全裂解。孵育过程中可以适当涡旋来分散样品，或者将样品置于震荡水浴槽或者摇床中。

注：必须使用蛋白酶K，QIAGEN蛋白酶在Buffer ATL中活性已经下降。

- ❖ 裂解时间决定于样品的类型，1~3h应该可以完成，而且可以考虑裂解过夜，并不影响样品的准备。为了保证裂解的有效性，震荡水浴或者摇床是必须的，如果没有相应的设备，在孵育的过程中每小时建议涡旋2~3次。
- ❖ 1.5ml离心管中短离，去除离心管盖上的液体。

如果需要除RNA的DNA，采用步骤A，如果不需要，采用步骤B：

A:

- ❖ 具有转录活性的组织（如肝和肾），含有高水平的RNA，这些RNA会和gDNA共同被纯化。RNA会抑制下游的酶反应，但不会抑制PCR。
- ❖ 加入4 µl RNase A (100 mg/ml)，涡旋15s，室温孵育2min，1.5ml离心管中短离，去除离心管盖上的液体。加入200 µl Buffer AL，涡旋15s，70°C孵育10min。1.5ml离心管中短离，去除离心管盖上的液体。
- ❖ 样品和Buffer AL需要充分混匀，加入Buffer AL后会有白色沉淀，通常情况下70°C孵育后就会溶解，沉淀不会干扰QIAamp过程或者任何后续的应用。

如果需要除RNA的DNA， 采用步骤A， 如果不需要， 采用步骤B:

B:

- ❖ 样品中加入200 µl Buffer AL， 涡旋15s， 70°C孵育10min。1.5ml离心管中短离， 去除离心管盖上的液体。
- ❖ 样品和Buffer AL需要充分混匀， 加入Buffer AL后会有白色沉淀， 通常情况下70°C孵育后就会溶解， 沉淀不会干扰QIAamp过程或者任何后续的应用。

- ❖ 加入200 μ l 的96–100%乙醇，涡旋15s。1.5ml离心管中短离，去除离心管盖上的液体。
- ❖ 样品、Buffer AL和乙醇需要充分混匀，加入乙醇后会产生白色沉淀，要保证将所有的沉淀都加入到QIAamp Mini spin column中。沉淀不会干扰QIAamp过程或者任何后续的应用。
- ❖ 小心地将上一步得到的混悬液（包括沉淀）加入到QIAamp Mini spin column（在2ml的收集管中）不要弄湿边缘。盖上管盖，6000 x g (8000 rpm) 离心1 min。将QIAamp Mini spin column置于新的收集管中，丢弃含有滤出液的管子。

注意:

- ❖ 应该扣上每一个spin column，避免离心过程中形成悬浮颗粒。需要注意的是，要将所有的沉淀都加入到QIAamp Mini spin column中。
- ❖ 6000 x g (8000 rpm)离心是为了降低噪音，这并不会影响DNA纯化的产量和纯度。如果混悬液没有完全通过膜，以更高的速度再离心一遍，直到所有的液体都通过。

建议:

- ❖ 小心地打开QIAamp Mini spin column，加入500 μ l Buffer AW1，不要打湿边缘。盖上管盖，6000 x g (8000 rpm) 离心1 min，将QIAamp Mini spin column 置于新的2ml收集管中，丢弃含有滤出液的管子。
- ❖ 小心地打开QIAamp Mini spin column，加入500 μ l Buffer AW2，不要打湿边缘。盖上管盖，全速 (20,000 x g/14,000 rpm)离心3 min 。
- ❖ 将QIAamp Mini spin column置于新的2ml收集管中（未包含在kit中），丢弃含有滤出液的管子。全速 (20,000 x g/14,000 rpm)离心1 min。

这一步的目的是帮助去除可能含有多余的Buffer AW2 。

- ❖ 将QIAamp Mini spin column置于1.5ml干净的离心管中（未包含在kit中），丢弃含有滤出液的收集管。小心地打开QIAamp Mini spin column，加入200 μ l Buffer AE或者蒸馏水。室温孵育1min，6000 x g (8000 rpm) 离心1 min。
- ❖ 重复上一个步骤。
- ❖ 用Buffer AE或者蒸馏水过QIAamp Mini spin column时，离心前孵育5min，可以增加DNA的产量。
- ❖ 进一步用200 μ l Buffer AE的第三次洗脱能够增加15%的产量。

- ❖ 如果洗脱液体积大于200 μ l，就不能用1.5ml的离心管，因为spin column会接触到洗脱液，导致在离心过程中很可能会形成悬浮颗粒。
- ❖ 如果洗脱液的体积小于200 μ l，会显著提高DNA的终浓度，但却会稍微降低总的DNA产量。用100 μ l洗4次并不会比200 μ l洗2次的效果好。
- ❖ 对于长期储存的DNA，建议用Buffer AE 洗脱，并且储存于 -20°C ，因为储存于水中的DNA会被酸水解。
- ❖ DNA的产量取决于所用的样本量和样本类型。

从细菌培养液中分离gDNA步骤:

- ❖ 接种环把培养板中的细菌分离出来，重悬于180 μ l的Buffer ATL（强烈搅拌）。
- ❖ 加入20 μ l的蛋白酶K，涡旋混匀，56°C孵育至完全裂解。孵育过程中可以适当涡旋来分散样品，或者将样品置于震荡水浴槽或者摇床中。

注：必须使用蛋白酶K，QIAGEN蛋白酶在Buffer ATL中活性已经下降。

- ❖ 裂解时间决定于样品的类型，1~3h应该可以完成，而且可以考虑裂解过夜，并不影响样品的准备。为了保证裂解的有效性，震荡水浴或者摇床是必须的，如果没有相应的设备，在孵育的过程中每小时建议涡旋2~3次。
- ❖ 1.5ml离心管中短离，去除离心管盖上的液体。

如果需要除RNA的DNA，采用步骤A，如果不需要，采用步骤B：

A:

- ❖ 具有转录活性的组织（如肝和肾），含有高水平的RNA，这些RNA会和gDNA共同被纯化。RNA会抑制下游的酶反应，但不会抑制PCR。
- ❖ 加入4 µl RNase A (100 mg/ml)，涡旋15s，室温孵育2min，1.5ml离心管中短离，去除离心管盖上的液体。加入200 µl Buffer AL，涡旋15s，70°C孵育10min。1.5ml离心管中短离，去除离心管盖上的液体。
- ❖ 样品和Buffer AL需要充分混匀，加入Buffer AL后会有白色沉淀，通常情况下70°C孵育后就会溶解，沉淀不会干扰QIAamp过程或者任何后续的应用。

如果需要除RNA的DNA，采用步骤A，如果不需要，采用步骤B:

B:

- ❖ 样品中加入200 µl Buffer AL，涡旋15s，70°C孵育10min。1.5ml离心管中短离，去除离心管盖上的液体。
- ❖ 样品和Buffer AL需要充分混匀，加入Buffer AL后会有白色沉淀，通常情况下70°C孵育后就会溶解，沉淀不会干扰QIAamp过程或者任何后续的应用。

- ❖ 加入200 μ l 的96–100%乙醇，涡旋15s。1.5ml离心管中短离，去除离心管盖上的液体。
- ❖ 样品、Buffer AL和乙醇需要充分混匀，加入乙醇后会产生白色沉淀，要保证将所有的沉淀都加入到QIAamp Mini spin column中。沉淀不会干扰QIAamp过程或者任何后续的应用。
- ❖ 小心地将上一步得到的混悬液（包括沉淀）加入到QIAamp Mini spin column（在2ml的收集管中）不要弄湿边缘。盖上管盖，6000 x g (8000 rpm) 离心1 min。将QIAamp Mini spin column置于新的收集管中，丢弃含有滤出液的管子。

- ❖ 应该扣上每一个spin column，避免离心过程中形成悬浮颗粒。
- ❖ 需要注意的是，要将所有的沉淀都加入到QIAamp Mini spin column中，6000 x g (8000 rpm)离心是为了降低噪音，这并不会影响DNA纯化的产量和纯度。如果混悬液没有完全通过膜，以更高的速度再离心一遍，直到所有的液体都通过。
- ❖ 小心地打开QIAamp Mini spin column，加入500 μ l Buffer AW1，不要打湿边缘。盖上管盖，6000 x g (8000 rpm) 离心1 min，将QIAamp Mini spin column置于新的2ml收集管中，丢弃含有滤出液的管子。

- ❖ 小心地打开QIAamp Mini spin column，加入500 μ l Buffer AW2，不要打湿边缘。盖上管盖，全速 (20,000 x g/14,000 rpm)离心3 min 。
- ❖ 建议：将QIAamp Mini spin column置于新的2ml收集管中（未包含在kit中），丢弃含有滤出液的管子。全速(20,000 x g/14,000 rpm)离心1 min。

这一步的目的是帮助去除可能含有多余的Buffer AW2 。

- ❖ 将QIAamp Mini spin column置于1.5ml干净的离心管中（未包含在kit中），丢弃含有滤出液的收集管。小心地打开QIAamp Mini spin column，加入200 μ l Buffer AE或者蒸馏水。室温孵育1min，6000 x g (8000 rpm) 离心1 min。

- ❖ 重复上一个步骤。
- ❖ 用Buffer AE或者蒸馏水过QIAamp Mini spin column时，离心前孵育5min，可以增加DNA的产量。
- ❖ 进一步用200 µl Buffer AE的第三次洗脱能够增加15%的产量。
- ❖ 如果洗脱液体积大于200 µl，就不能用1.5ml的离心管，因为spin column会接触到洗脱液，导致在离心过程中很可能会形成悬浮颗粒。
- ❖ 如果洗脱液的体积小于200 µl，会显著提高DNA的终浓度，但却会稍微降低总的DNA产量。用100 µl洗4次并不会比200 µl洗2次的效果好。
- ❖ 对于长期储存的DNA，建议用Buffer AE洗脱，并且储存于-20°C，因为储存于水中的DNA会被酸水解。
- ❖ DNA的产量取决于所用的样本量和样本类型。