

# QIAamp<sup>®</sup> DNA Investigator 操作手册

适合从以下样本中纯化总 DNA ( 基因组 DNA 和  
线粒体 DNA )

表面和口腔拭子

FTA<sup>®</sup> 和 Guthrie 卡

体液斑

口香糖

烟蒂

指甲和毛发

纸质材料

小体积血液或唾液

组织

激光显微切割标本

骨头和牙齿

性侵犯样本



# QIAGEN 的样本制备和分析技术

QIAGEN 是创新的样本制备和分析技术的领先供应商，实现了任何生物样本中内容物的分离和检测。我们先进、高品质的产品及服务保证了从样本到结果的成功。

## QIAGEN 在下列领域设立标准：

- DNA、RNA 和蛋白的纯化
- 核酸及蛋白分析
- microRNA 研究和 RNAi
- 样本制备和分析技术的自动化

我们的使命是让您实现卓越的成功和突破。关于更多信息，请访问 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)。

# 目录

试剂盒组成 .....	4
储存 .....	4
质量控制 .....	4
产品使用限制 .....	5
产品质量保证和满意保证 .....	5
技术支持 .....	5
安全信息 .....	6
简介 .....	7
原理及操作步骤 .....	7
QIAcube <sup>®</sup> 上的自动化 DNA 纯化 .....	7
须由用户提供的仪器和试剂 .....	10
重要提示 .....	11
载体 RNA .....	11
QIAamp MinElute 柱的操作 .....	11
缓冲液的配制 .....	12
实验方案	
■ 从表面和口腔拭子中分离总 DNA .....	14
■ 从 FTA 和 Guthrie 卡中分离总 DNA .....	18
■ 从体液斑中分离总 DNA .....	21
■ 从口香糖中分离总 DNA .....	24
■ 从烟蒂中分离总 DNA .....	27
■ 从指甲和毛发中分离总 DNA .....	30
■ 从纸质材料中分离总 DNA .....	33
■ 从小体积血液或唾液中分离总 DNA .....	36
■ 从组织中分离总 DNA .....	39
■ 从激光显微切割标本中分离总 DNA .....	42
■ 从骨头和牙齿中分离总 DNA .....	45
■ 从性侵犯样本中分离总 DNA .....	48
常见问题指南 .....	52
附录 A: 处理 DNA .....	54
附录 B: DNA 的纯化 .....	54
订购信息 .....	56

## 试剂盒组成

<b>QIAamp DNA Investigator Kit</b>	<b>( 50 )</b>
<b>目录号</b>	<b>56504</b>
<b>使用次数</b>	<b>50</b>
QIAamp MinElute® 柱	50
收集管 (2 ml)	200
Buffer ATL	50 ml
Buffer AL*	33 ml
Buffer AW1* ( 浓缩液 )	19 ml
Buffer AW2† ( 浓缩液 )	13 ml
Buffer ATE	12 ml
载体 RNA ( 红盖 )	310 µg
蛋白酶 K	1.25 ml
操作手册	1

\* 含有胍盐。不能与含有漂白剂的消毒剂共同使用。详见第 6 页的安全信息。

† 含有叠氮化钠，作为防腐剂。

## 储存

QIAamp MinElute 柱在到货后应储存在 2–8°C，在这条件下至少稳定 1 年。不过，短时间（最多 4 周）的室温（15–25°C）储存不影响它们的性能。所有缓冲液应储存在室温（15–25°C），并在到货后至少稳定 1 年。QIAamp DNA Investigator Kit 内含一种新颖的即用型蛋白酶 K 溶液，它处于特殊配方的储存缓冲液中。蛋白酶 K 储存在室温（15–25°C），在到货后至少稳定 1 年。如果储存超过 1 年或环境温度常高于 25°C，我们建议将蛋白酶 K 储存在 2–8°C。

## 质量控制

按照 QIAGEN 的 ISO 认证的质量管理体系，每一批的 QIAamp DNA Investigator Kit 都经过预定参数的检测，以确保始终如一的产品质量。功能上的质量控制测试确保 QIAamp DNA Investigator Kit 可满足法医科学家所需的高标准。

## 产品使用限制

QIAamp DNA Investigator Kit 仅供一般的实验室使用。无任何声明或陈述表示它能为疾病的诊断、预防或治疗提供信息。

在操作产品时，应尽可能地小心和谨慎。我们建议所有的 QIAGEN 产品用户都遵守 NIH 为重组 DNA 实验而制定的准则，或其它适用的准则。

## 产品质量保证和满意保证

QIAGEN 保证所有产品在产品资料所描述的方式下的性能。购买者必须确定产品在特定使用中是否合适。如果任何产品基于任何理由（使用不当除外）未能令人满意地工作，QIAGEN 将负责免费更换产品或退还购买费用。我们保留更换、更改、或修改任何产品的权利，以提高其性能和设计。如果 QIAGEN 的产品未能满足您的预期，您只需致电当地的技术服务部门或经销商。我们将遵照您的意愿退还购买费用或更换产品。QIAGEN 科学仪器、服务产品和用于冰运输的产品有着不同的适用条件。更多信息，请咨询我们。

我们承诺将按照您的要求提供 QIAGEN 条款和条件的副本，这些内容可同时在销售过程中提供。如果您对产品参数或性能有疑问，请致电 QIAGEN 的技术服务或当地的经销商（详见封底或访问 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)）。

## 技术支持

在 QIAGEN，我们为技术支持的质量和有效性自豪。我们的技术服务部门由经验丰富的科学家组成，他们在样本制备和分析技术以及 QIAGEN 的产品使用方面均有着大量理论知识和实际经验。如果您有关于 QIAamp DNA Investigator Kit 或 QIAGEN 整体产品的任何疑问或经历任何困难，请勿吝垂询。

对于我们产品的改进或特殊用途，QIAGEN 的客户一直是我们的主要信息来源。这类信息对其他科学家以及 QIAGEN 的研究者很有帮助。因此，如果您有产品性能的任何建议，或有新的应用及技术，我们欢迎您与我们联系。

关于技术协助及更多信息，请登陆 [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)，查看我们的技术支持中心，或者致电 QIAGEN 技术服务部门（详见封底或访问 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)）。

## 安全信息

在处理化学品时,请始终穿戴适当的实验工作服,一次性手套和护目镜。关于更多信息,请参阅适当的材料安全数据表(MSDS)。这些文件可在 [www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx](http://www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx) 上下载方便、紧凑的 PDF 格式,在此页面上您能查找、浏览并打印每个 QIAGEN 试剂盒及试剂盒成分的 MSDS。



**切勿直接向样本制备废液中加入漂白剂或酸性溶液。**

Buffer AL 和 Buffer AW1 含有盐酸胍,在与漂白剂混合之后会形成高反应性的化合物。如果含有这些缓冲液的液体溅出,用适当的实验室去污剂和水清洗。如果泼洒出的液体含有潜在的传染原,先用实验室去污剂和水清洗,再用 1% (体积比) 的次氯酸钠清洗影响到的区域。

以下危险和安全短语适用于 QIAamp DNA Investigator Kit 的成分:

### Buffer AL 和 Buffer AW1

含有盐酸胍: 有害, 有刺激性。危险和安全短语: \* R22-36/38, S13-26-36-46

### 蛋白酶 K

含有蛋白酶 K: 致敏剂, 有刺激性。危险和安全短语: \* R36/37/38-42/43, S23-24-26-36/37

### 24 小时紧急信息

英文、法文和德文的紧急医疗信息可在全天 24 小时通过以下方式获得:

德国美因茨有毒物质信息中心

电话: +49-6131-19240

\* R22 : 吞食后有害; R36/38 : 刺激眼睛和皮肤; R36/37/38 : 刺激眼睛、呼吸系统和皮肤; R42/43 : 吸入和皮肤接触后可能致敏; S13 : 远离食品、饮料和动物饲料; S23 : 切勿吸入喷雾; S24 : 避免接触皮肤; S26 : 万一接触眼睛, 立即用大量的水冲洗, 并征求医生的建议; S36 : 穿着适当的防护服; S36/37 : 穿戴适当的防护服和手套; S46 : 如果吞食, 请立即征求医生的建议, 并给医生看容器或标签。

## 简介

QIAamp DNA Investigator Kit 采用成熟的技术，从小体积样本中纯化基因组 DNA 和线粒体 DNA。试剂盒融合了硅胶膜选择性结合 DNA 的特性，以及从 20 到 100  $\mu\text{l}$  的灵活洗脱体积。操作步骤适合多种法医和人类身份鉴定样本。

操作步骤的设计可确保无样本之间的交叉污染。样本裂解后，通过简单的 QIAamp DNA Investigator 操作步骤，可同时处理多个样本，在 40 分钟之内得到纯的 DNA。

纯化的 DNA 用 Buffer ATE 或水洗脱，可即用于扩增反应或储存于  $-20^{\circ}\text{C}$ 。纯化后的 DNA 不含有蛋白、核酸酶及其它抑制剂。

## 原理及操作步骤

QIAamp DNA Investigator 的操作步骤包括 4 步（详见第 9 页的流程图）：

- 裂解：在变性条件下用蛋白酶 K 裂解样本
- 结合：DNA 结合到膜上，而杂质流出
- 清洗：将残留的杂质洗掉
- 洗脱：将高纯度、浓缩的 DNA 从硅胶膜上洗脱

## QIAcube<sup>®</sup> 上的自动化 DNA 纯化

利用 QIAamp DNA Investigator Kit 从法医和人类身份鉴定样本中纯化 DNA 的过程能在 QIAcube 上自动化。创新的 QIAcube 利用先进的技术来处理 QIAGEN 离心柱，让低通量的自动化样本制备能与您的实验室流程无缝整合。QIAcube 上的样本制备采用与手工操作相同的步骤（即裂解、结合、清洗和洗脱）。关于自动化操作的更多信息，详见 [www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube) 上相关的操作步骤。

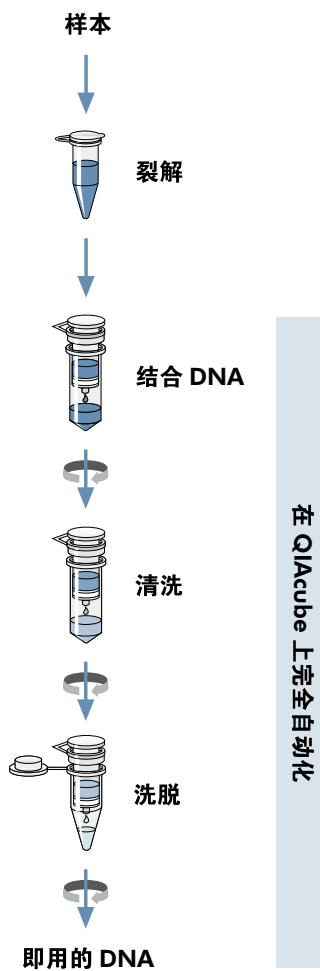
QIAcube 中预先安装了纯化质粒 DNA、基因组 DNA、RNA、病毒核酸和蛋白，以及 DNA 和 RNA 回收的操作程序。操作程序的范围仍在不断扩大，更多的 QIAGEN 操作程序可在 [www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube) 上免费下载。



**图 1. 自动化的 DNA 纯化。** 利用 QIAamp DNA Investigator Kit 的 DNA 纯化可在 QIAcube 上自动进行。



## QIAamp DNA Investigator 的操作步骤



## 须由用户提供的仪器和试剂

在操作化学品时，请始终要穿戴适当的实验服，一次性手套和护目镜。关于更多信息，请参阅适当的材料安全数据表（MSDS），此文件可向产品供应商索取。

- 乙醇（96–100%）\*
- 0.2 ml、1.5 ml 或 2 ml 离心管（用于裂解步骤）
- 1.5 ml 离心管（用于清洗和洗脱步骤）（Brinkmann [Safe-Lock，目录号 022363204]，Eppendorf [Safe-Lock，目录号 0030 120.086]，或 Sarstedt [Safety Cap，目录号 72.690] 有售）<sup>†</sup>
- 移液器吸头（为避免交叉污染，我们推荐使用带气溶胶防护的移液器吸头）
- 恒温混匀器、可加热的回转式摇床、加热模块或水浴
- 微型离心机，带有 2 ml 管的转子

### 对于拭子、FTA 和 Guthrie 卡、口香糖、烟蒂、指甲和毛发、纸质材料

- 剪刀或适当的切割装置

### 对于拭子和带有斑点的织物

- 可选：QIAshredder 离心柱（以获得最大产量），详见第 56 页的订购信息

### 对于指甲和毛发、精液斑和性侵犯样本

- DTT，1 M 水溶液

### 对于激光显微切割的标本

- 0.2 ml 离心管（用于裂解步骤）

### 对于骨头和牙齿

- 金属研磨器（如 Waring）<sup>†</sup> 或带有 Grinding Jar Set, S. Steel 的 TissueLyser，详见第 56 页的订购信息
- 液氮

### 对于性侵犯样本

- 额外的 Buffer ATL，详见第 56 页的订购信息

\* 请勿使用工业酒精，它还含有其它物质，如甲醇或甲基乙酮。

<sup>†</sup> 这并非供应商的完整列表，不包括很多重要的生物用品供应商。

## 重要提示

### 载体 RNA

试剂盒提供了载体 RNA，如果需要，它可添加到 Buffer AL 中。载体 RNA 增强了 DNA 与 QIAamp MinElute 柱上硅胶膜的结合，特别是如果样本中目标分子极少。所提供的冻干载体 RNA 的量足够用于试剂盒中提供的 Buffer AL。QIAamp DNA Investigator 步骤中使用的载体 RNA 的浓度令此步骤能作为通用的纯化系统，与多个不同的扩增系统兼容。

根据反应中存在的核酸总量，不同的扩增系统在效率上有所差异。如果使用载体 RNA，从 QIAamp MinElute 柱上的洗脱物就同时含有样本 DNA 和载体 RNA，其中载体 RNA 的量大大超过 DNA 的量。因此，应当根据 Buffer AL 中添加的载体 RNA 的量，来计算取多少洗脱物加入下游的扩增。为了在扩增反应中获得最高水平的灵敏度，有必要调整 Buffer AL 中添加的载体 RNA 的量。

### QIAamp MinElute 柱的操作

由于核酸扩增技术的灵敏度，在操作 QIAamp MinElute 柱时，有必要采取下列预防措施，以避免样本制备间的交叉污染：

- 小心将样本或溶液上样到 QIAamp MinElute 柱中。吸取样本，置于 QIAamp MinElute 柱中，不要弄湿纯化柱的边缘。
- 在不同的液体转移之间，始终及时更换移液器的吸头。我们推荐使用带气溶胶防护的移液器吸头。
- 移液器吸头避免接触 QIAamp MinElute 柱上的硅胶膜。
- 在所有涡旋振荡步骤完成之后，短暂离心离心管，将沾在内管盖的液滴收集入管内。
- 每次只打开一个 QIAamp MinElute 柱，小心不要产生气泡 / 气溶胶。
- 在整个过程中佩戴手套。假如手套和样本有接触，立即更换手套。

### 离心

QIAamp MinElute 柱适合大部分标准的 1.5–2 ml 离心管。额外的 2 ml 收集管可单独购买。QIAamp MinElute 柱的离心在  $6000 \times g$  ( 8000 rpm ) 下进行，以减少离心的噪音。全速离心并不能提高 DNA 的产量。不过，在操作过程的 2 个步骤中，QIAamp MinElute 柱需要在全速下离心：膜清洗后的干燥离心步骤和洗脱步骤。所有

的离心步骤应当在室温下（15–25°C）开展。

### 在微型离心机中处理 QIAamp MinElute 柱

- 在将 QIAamp MinElute 柱置于微型离心机中之前，保持关闭柱子。依照相关步骤的描述进行离心
- 流出组分可能含有有害的废液，应适当处理
- 对于高效地平行处理多个样本，我们推荐在架子上装有收集管，以便 QIAamp MinElute 柱离心后转移至其中。用过的含有流出液的收集管应弃去，将含有 QIAamp MinElute 柱的新收集管直接放置在微型离心机中。

## 缓冲液的配制

### 配制 Buffer ATL

在操作开始之前，检查 Buffer ATL 中是否形成了沉淀。如果必要，加热至 70°C，并轻柔搅动，以溶解沉淀。

### 配制 Buffer AL

在操作开始之前，检查 Buffer AL 中是否形成了沉淀。如果必要，加热至 70°C，并轻柔搅动，以溶解沉淀。

### 配制 Buffer AW1

在含有 19 ml Buffer AW1 浓缩液的瓶子中加入 25 ml 乙醇（96–100%）。在瓶子标签上的检查框中打勾，表示乙醇已添加。已重配的 Buffer AW1 可储存在室温（15–25°C）下长达一年。

**注意：**在操作开始之前，摇晃混匀已重配的 Buffer AW1。

### 配制 Buffer AW2

在含有 13 ml Buffer AW2 浓缩液的瓶子中加入 30 ml 乙醇（96–100%）。已重配的 Buffer AW2 可储存在室温（15–25°C）下长达一年。

**注意：**在操作开始之前，摇晃混匀已重配的 Buffer AW2。

## 在 Buffer AL 中加入载体 RNA

对于极少量样本中的 DNA 纯化，比如小体积的血液 (<10 µl) 或法医样本，我们推荐在 Buffer AL 中加入载体 RNA。对于含有更大量 DNA 的样本，载体 RNA 的加入是可选的。

在含有 310 µg 冻干的载体 RNA 的管中加入 310 µl Buffer ATE，以获得 1 µg/µl 的溶液。充分溶解载体 RNA，将它分装成小份，储存在 -20°C。切勿将小份载体 RNA 反复冻融 3 次以上。

计算 Buffer AL 的体积和每批样本所需的溶解载体 RNA，将需同时处理的样本体积乘以表 1 中给出的体积，考虑到移液误差，始终配制足够处理两个额外样本的缓冲液。

颠倒管子 10 次，轻柔混匀 Buffer AL 和溶解的载体 RNA。为了避免泡沫，切勿涡旋振荡。注意载体 RNA 不溶于 Buffer AL。它必须先溶于 Buffer ATE，再加入到 Buffer AL 中。含有载体 RNA 的 Buffer AL 在室温 (15–25°C) 下稳定最多 48 小时。

**表 1. 利用 QIAamp DNA Investigator Kit 进行一次 DNA 制备所需的 Buffer AL 及溶解的载体 RNA 的量**

实验方案	样本中加入的 Buffer AL 的体积 (µl)	溶解的载体 RNA (µl)
表面和口腔拭子	600* 或 400 <sup>†</sup>	1
FTA 和 Guthrie 卡	300	1
体液斑	300	1
口香糖	300	1
烟蒂	300	1
指甲和毛发	300	1
纸质材料	300	1
小体积血液或唾液	100	1
组织	200	1
激光显微切割标本	50	1
骨头和牙齿	300	1
性侵犯样本	300	1

\* 如果使用可弹出的拭子 (例如 Whatman® Omni 拭子)。

<sup>†</sup> 如果使用不可弹出的拭子 (例如棉花或 Dacron® 拭子)。

## 实验方案：从表面和口腔拭子中分离总 DNA

本实验方案适合从表面拭子、精液拭子、血液拭子和唾液拭子中分离总 DNA (基因组和线粒体 DNA)。

### 开始前的要点

- 在室温 (15–25°C) 下进行所有离心步骤。
- 确认是否需要载体 RNA (详见第 11 和 13 页)。

### 开始前要做的事

- 平衡 Buffer ATE 或用于洗脱的蒸馏水到室温 (15–25°C)。
- 将恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 56°C, 用于第 3 步及 (可选的) 第 15 步, 将第二个恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 70°C, 用于第 6 步。如果没有恒温混匀器或可加热的回转式摇床, 可使用加热模块或水浴作为替代。
- 如果处理精液拭子, 配制 1 M DTT (二硫苏糖醇) 储备液。分装后储存在 -20°C。融后即使用。
- 如果 Buffer AL 或 Buffer ATL 含有沉淀, 加热至 70°C 并轻柔搅动, 溶解沉淀。
- 确保 Buffer AW1 和 AW2 已根据第 12 页的操作指南配制。
- 可选: 为了收集残留在拭子上的裂解液, 可能需要 QIAshredder 离心柱。

### 操作步骤

- 1. 将拭子放置在 2 ml 离心管 (未提供) 中。**

如果使用 Omni 拭子, 按压杆的末端, 弹出拭子。  
如果使用棉花或 Dacron 拭子, 用手或剪刀从杆上分离拭子。
- 2. 加入 20  $\mu$ l 蛋白酶 K 及 600  $\mu$ l Buffer ATL (如果使用 Omni 拭子) 或 400  $\mu$ l Buffer ATL (如果使用棉花或 Dacron 拭子), 盖上盖子, 涡旋振荡混合 10 秒。**
- 3. 将 2 ml 管放置在恒温混匀器或可加热的回转式摇床中, 在 56°C 以 900 rpm 振荡至少 1 小时。**

如果使用加热模块或水浴, 每 10 分钟振荡离心管 10 秒, 以加速裂解。
- 4. 短暂离心 2 ml 管, 将沾在内管盖上的液滴收集入管内。**

5. 加入 600  $\mu$ l Buffer AL (如果使用 Omni 拭子) 或 400  $\mu$ l Buffer AL (如果使用棉花或 Dacron 拭子), 盖上盖子, 涡旋振荡混合 15 秒。

为确保有效的裂解, 将样本和 Buffer AL 充分混合以产生均质的溶液, 这一步非常关键。

当 Buffer AL 加入到 Buffer ATL 中, 可能会形成白色沉淀。此沉淀不影响 QIAamp 的操作, 在第 6 步的孵育过程中会溶解。

**注意:** 如果需要载体 RNA (详见第 11 页), 在 600  $\mu$ l Buffer AL (如果使用 Omni 拭子) 或 400  $\mu$ l Buffer AL (如果使用棉花或 Dacron 拭子) 中加入 1  $\mu$ g 溶解的载体 RNA。注意载体 RNA 在 Buffer AL 中不溶解。它必须先溶解在 Buffer ATE 中, 然后再加入到 Buffer AL。

6. 将 2 ml 管放置在恒温混匀器或可加热的回转式摇床中, 在 70°C 以 900 rpm 振摇 10 分钟。

如果使用加热模块或水浴, 每 3 分钟振摇离心管 10 秒, 以加速裂解。

7. 短暂离心 2 ml 管, 将沾在内管盖上的液滴收集入管内。

8. 加入 300  $\mu$ l 乙醇(96–100%) (如果使用 Omni 拭子) 或 200  $\mu$ l 乙醇(96–100%) (如果使用棉花或 Dacron 拭子), 盖上盖子, 涡旋振荡混合 15 秒。

为了确保第 10 步的高效结合, 将样本和乙醇充分混合以产生均质的溶液, 这一步非常重要。

9. 短暂离心 2 ml 管, 将沾在内管盖上的液滴收集入管内。

10. 如果使用 Omni 拭子, 遵照第 10a 步。如果使用棉花或 Dacron 拭子, 遵照第 10b 步。

- 10a. 将第 9 步的 700  $\mu$ l 裂解液小心转移至 QIAamp MinElute 柱 (放置在 2 ml 收集管中), 不要弄湿边缘, 盖上盖子, 以 6000  $\times$  g (8000 rpm) 离心 1 分钟。小心弃去收集管中的流出液, 然后将 QIAamp MinElute 柱放回收集管中。小心将第 9 步的剩余裂解液上样到 QIAamp MinElute 柱, 不要弄湿边缘, 盖上盖子, 以 6000  $\times$  g (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中, 并弃去含有流出液的收集管。

如果离心后裂解液并未完全穿过膜, 可提高离心速度再次离心, 直至 QIAamp MinElute 柱内液体排空。

**注意：**拭子中最多残留 250  $\mu\text{l}$  裂解液。为了收集剩余的裂解液，将拭子放置在 QIAshredder 离心柱（未提供）中，并全速（ $20000 \times g$ ；14000 rpm）离心 2 分钟。将流出液转移至 QIAamp MinElute 柱中，不要弄湿边缘，盖上盖子，以  $6000 \times g$ （8000 rpm）离心 1 分钟。

**10b. 将第 9 步的全部裂解液小心转移至 QIAamp MinElute 柱（放置在 2 ml 收集管中），不要弄湿边缘，盖上盖子，以  $6000 \times g$ （8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。如果离心后裂解液并未完全穿过膜，可提高离心速度再次离心，直至 QIAamp MinElute 柱内液体排空。**

**注意：**拭子中最多残留 200  $\mu\text{l}$  裂解液。为了收集剩余的裂解液，将拭子放置在 QIAshredder 离心柱（未提供）中，并全速（ $20000 \times g$ ；14000 rpm）离心 2 分钟。将流出液转移至 QIAamp MinElute 柱中，不要弄湿边缘，盖上盖子，以  $6000 \times g$ （8000 rpm）离心 1 分钟。

**11. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 500  $\mu\text{l}$  Buffer AW1，不要弄湿边缘。盖上盖子，以  $6000 \times g$ （8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。**

**12. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700  $\mu\text{l}$  Buffer AW2，不要弄湿边缘。盖上盖子，以  $6000 \times g$ （8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。**

QIAamp MinElute 柱与流出液之间的接触应当避免。一些离心机转子在减速时会振动，导致流出液（含有乙醇）与 QIAamp MinElute 柱接触。在从转子中取出 QIAamp MinElute 柱和收集管时，应小心，这样流出液就不会接触到 QIAamp MinElute 柱。

**13. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700  $\mu\text{l}$  乙醇（96–100%），不要弄湿边缘。盖上盖子，以  $6000 \times g$ （8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。**

**14. 全速（ $20000 \times g$ ；14000 rpm）离心 3 分钟，让膜彻底变干。**  
此步骤很必要，因为乙醇残留在洗脱液中会干扰一些下游应用。



**15. 将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 1.5 ml 离心管（未提供）中，并弃去含有流出液的收集管。小心打开 QIAamp MinElute 柱的盖子，在室温（15–25°C）下孵育 10 分钟或 56°C 下孵育 3 分钟。**

**16. 将 20–100  $\mu$ l Buffer ATE 或蒸馏水加样到膜的中央。**

**重要：**确保 Buffer ATE 或蒸馏水平衡到室温（15–25°C）。将 Buffer ATE 或蒸馏水滴到膜的中央，以确保完全洗脱结合的 DNA。

QIAamp MinElute 柱提供了选择洗脱体积的灵活性。根据下游应用的需要选择体积。小体积洗脱显著增加了洗脱液中的 DNA 终浓度，但降低了总体的 DNA 产量。记住洗脱液的体积将比加样到柱中的洗脱溶液的体积最多减少 5  $\mu$ l。

**17. 盖上盖子，在室温（15–25°C）下孵育 1 分钟。全速（20000  $\times$  g；14000 rpm）离心 1 分钟。**

离心之前，在室温下将带有 Buffer ATE 或水的 QIAamp MinElute 柱孵育 5 分钟，通常能增加 DNA 产量。

# 实验方案：从 FTA 和 Guthrie 卡中分离总 DNA

本实验方案适合从 FTA 卡、Guthrie 卡或类似的收集装置上干燥及固定的全血、唾液或口腔细胞中分离总 DNA（基因组和线粒体 DNA）。

## 开始前的要点

- 在室温（15–25°C）下进行所有离心步骤。

## 开始前要做的事

- 平衡 Buffer ATE 或用于洗脱的蒸馏水到室温（15–25°C）。
- 如果 Buffer AL 或 Buffer ATL 含有沉淀，加热至 70°C 并轻柔搅动，溶解沉淀。
- 将恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 56°C，用于第 4 步及（可选的）第 16 步，将第二个恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 70°C，用于第 7 步。如果没有恒温混匀器或可加热的回转式摇床，可使用加热模块或水浴作为替代。
- 确保 Buffer AW1 和 AW2 已根据第 12 页的操作指南配制。
- 可选：如果处理极少量的起始材料，根据第 13 页的操作指南，将溶于 Buffer ATE 的载体 RNA 加入到 Buffer AL 中。

## 操作步骤

1. 用单孔打孔机从干燥的斑点上切下直径 3 mm（1/8 英寸）的孔。将 3 个卡片孔放置在 1.5 ml 离心管（未提供）中。
2. 加入 280 µl Buffer ATL。
3. 加入 20 µl 蛋白酶 K，涡旋振荡彻底混匀。
4. 将 1.5 ml 管放置在恒温混匀器或可加热的回转式摇床中，在 56°C 以 900 rpm 振摇 1 小时。  
如果使用加热模块或水浴，每 10 分钟振摇离心管 10 秒，以加速裂解。
5. 短暂离心 1.5 ml 管，将沾在内管盖上的液滴收集入管内。
6. 加入 300 µl Buffer AL，盖上盖子，涡旋振荡混合 10 秒。  
为确保有效的裂解，将样本和 Buffer AL 充分混合以产生均质的溶液，这一步非常关键。

当 Buffer AL 加入到 Buffer ATL 中，可能会形成白色沉淀。此沉淀不影响 QIAamp 的操作，在第 7 步的孵育过程中会溶解。

**注意：**如果只处理 1 个直径在 3 mm 或更小的血液卡孔，我们推荐在 Buffer AL 中加入载体 RNA（详见第 13 页）。注意载体 RNA 在 Buffer AL 中不溶解。它必须先溶解在 Buffer ATE 中，然后再加入到 Buffer AL。

**7. 将 1.5 ml 管放置在恒温混匀器或可加热的回转式摇床中，在 70°C 以 900 rpm 振摇 10 分钟。**

如果使用加热模块或水浴，每 3 分钟振摇离心管 10 秒。

**8. 短暂离心 1.5 ml 管，将沾在内管盖上的液滴收集入管内。**

**9. 加入 150 µl 乙醇（96–100%），盖上盖子，涡旋振荡混合 15 秒。**

为了确保第 11 步的高效结合，将样本和乙醇充分混合以产生均质的溶液，这一步非常重要。

**10. 短暂离心 1.5 ml 管，将沾在内管盖上的液滴收集入管内。**

**11. 将第 10 步的全部裂解液小心转移至 QIAamp MinElute 柱（放置在 2 ml 收集管中），不要弄湿边缘，盖上盖子，以 6000 × g（8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。如果离心后裂解液并未完全穿过膜，可提高离心速度再次离心，直至 QIAamp MinElute 柱内液体排空。**

**12. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 500 µl Buffer AW1，不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000 × g（8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。**

**13. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700 µl Buffer AW2，不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000 × g（8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。**

QIAamp MinElute 柱与流出液之间的接触应当避免。一些离心机转子在减速时会振动，导致流出液（含有乙醇）与 QIAamp MinElute 柱接触。在从转子中取出 QIAamp MinElute 柱和收集管时，应小心，这样流出液就不会接触到 QIAamp MinElute 柱。

14. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700  $\mu\text{l}$  乙醇（96–100%），不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000  $\times g$ （8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。
15. 全速（20000  $\times g$ ；14000 rpm）离心 3 分钟，让膜彻底变干。  
此步骤很必要，因为乙醇残留在洗脱液中会干扰一些下游应用。
16. 将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 1.5 ml 离心管（未提供）中，并弃去含有流出液的收集管。小心打开 QIAamp MinElute 柱的盖子，在室温（15–25°C）下孵育 10 分钟或 56°C 下孵育 3 分钟。
17. 将 20–100  $\mu\text{l}$  Buffer ATE 或蒸馏水加样到膜的中央。  
**重要：**确保 Buffer ATE 或蒸馏水平衡到室温（15–25°C）。如果使用小的洗脱体积（ $<50 \mu\text{l}$ ），将 Buffer ATE 或蒸馏水滴到膜的中央，以确保完全洗脱结合的 DNA。QIAamp MinElute 柱提供了选择洗脱体积的灵活性。根据下游应用的需要选择体积。小体积洗脱显著增加了洗脱液中的 DNA 终浓度，但降低了总体的 DNA 产量。记住洗脱液的体积将比加样到柱中的洗脱溶液的体积最多减少 5  $\mu\text{l}$ 。
18. 盖上盖子，在室温（15–25°C）下孵育 1 分钟。全速（20000  $\times g$ ；14000 rpm）离心 1 分钟。  
离心之前，在室温下将带有 Buffer ATE 或水的 QIAamp MinElute 柱孵育 5 分钟，通常能增加 DNA 产量。

## 实验方案：从体液斑中分离总 DNA

此实验方案适合从沾有血液、唾液或精液的材料中分离总 DNA（基因组和线粒体 DNA）。

### 开始前的要点

- 在室温（15–25°C）下进行所有离心步骤。
- 确认是否需要载体 RNA（详见第 11 和 13 页）。

### 开始前要做的事

- 平衡 Buffer ATE 或用于洗脱的蒸馏水到室温（15–25°C）。
- 将恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 56°C，用于第 3 步及（可选的）第 15 步，将第二个恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 70°C，用于第 6 步。如果没有恒温混匀器或可加热的回转式摇床，可使用加热模块或水浴作为替代。
- 如果 Buffer AL 或 Buffer ATL 含有沉淀，加热至 70°C 并轻柔搅动，溶解沉淀。
- 如果处理精液斑，须配制 1 M DTT（二硫苏糖醇）储备液。分装后储存在 -20°C。融后即用。
- 确保 Buffer AW1 和 AW2 已根据第 12 页的操作指南配制。
- 可选：如果处理带斑的织物，可能需要 QIAshredder 离心柱。

### 操作步骤

1. 切下 0.5 cm<sup>2</sup> 斑点材料，随后切成更小的小块。将这些小块转移到 2 ml 离心管（未提供）中。
2. 加入 300  $\mu$ l Buffer ATL 和 20  $\mu$ l 蛋白酶 K。如果处理精液斑，还要加入 20  $\mu$ l 1M DTT。盖上盖子，涡旋振荡混合 10 秒。
3. 将管放置在恒温混匀器或可加热的回转式摇床中，在 56°C 以 900 rpm 振摇至少 1 小时。  
如果使用加热模块或水浴，每 10 分钟振摇离心管 10 秒，以加速裂解。
4. 短暂离心 2 ml 管，将沾在内管盖上的液滴收集入管内。

**5. 加入 300  $\mu$ l Buffer AL，盖上盖子，涡旋振荡混合 10 秒。**

为确保有效的裂解，将样本和 Buffer AL 充分混合以产生均质的溶液，这一步非常关键。

当 Buffer AL 加入到 Buffer ATL 中，可能会形成白色沉淀。此沉淀不影响 QIAamp 的操作，在第 6 步的孵育过程中会溶解。

**注意：**如果需要载体 RNA（详见第 11 页），在 300  $\mu$ l Buffer AL 中加入 1  $\mu$ g 溶解的载体 RNA。注意载体 RNA 在 Buffer AL 中不溶解。它必须先溶解在 Buffer ATE 中，然后再加入到 Buffer AL。

**6. 将管放置在恒温混匀器或可加热的回转式摇床中，在 70°C 以 900 rpm 振摇 10 分钟。**

如果使用加热模块或水浴，每 3 分钟振摇离心管 10 秒，以加速裂解。

**7. 短暂离心 2 ml 管，将沾在内管盖上的液滴收集入管内。**

如果固体颗粒仍然可见，以 6000  $\times$  g (8000 rpm) 离心 1 分钟，小心转移上清到新的 1.5 ml 离心管（未提供）中。

残留在固体样本材料（例如牛仔织物）中的裂解液也可收集，将材料转移至 QIAshredder 离心柱（未提供）中，并全速离心 2 分钟。将流出液转移至新的 1.5 ml 离心管（未提供）中。

**8. 加入 150  $\mu$ l 乙醇（96–100%），盖上盖子，涡旋振荡混合 15 秒。**

为了确保第 10 步的高效结合，将样本和乙醇充分混合以产生均质的溶液，这一步非常重要。

**9. 短暂离心管子，将沾在内管盖上的液滴收集入管内。**

**10. 将第 9 步的上清小心转移至 QIAamp MinElute 柱（放置在 2 ml 收集管中），不要弄湿边缘。**

**11. 盖上盖子，以 6000  $\times$  g（8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。**

如果离心后裂解液并未完全穿过膜，可提高离心速度再次离心，直至 QIAamp MinElute 柱内液体排空。

**12. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 500  $\mu$ l Buffer AW1，不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000  $\times$  g（8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。**

- 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700  $\mu\text{l}$  Buffer AW2，不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000  $\times$  g (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。

QIAamp MinElute 柱与流出液之间的接触应当避免。一些离心机转子在减速时会振动，导致流出液（含有乙醇）与 QIAamp MinElute 柱接触。在从转子中取出 QIAamp MinElute 柱和收集管时，应小心，这样流出液就不会接触到 QIAamp MinElute 柱。

- 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700  $\mu\text{l}$  乙醇（96–100%），不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000  $\times$  g (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。

- 全速（20000  $\times$  g; 14000 rpm）离心 3 分钟，让膜彻底变干。

此步骤很必要，因为乙醇残留在洗脱液中会干扰一些下游应用。

- 将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 1.5 ml 离心管（未提供）中，并弃去含有流出液的收集管。小心打开 QIAamp MinElute 柱的盖子，在室温（15–25°C）下孵育 10 分钟或 56°C 下孵育 3 分钟。

- 将 20–50  $\mu\text{l}$  Buffer ATE 或蒸馏水加样到膜的中央。

**重要：**确保 Buffer ATE 或蒸馏水平衡到室温（15–25°C）。将 Buffer ATE 或蒸馏水滴到膜的中央，以确保完全洗脱结合的 DNA。QIAamp MinElute 柱提供了选择洗脱体积的灵活性。根据下游应用的需要选择体积。小体积洗脱显著增加了洗脱液中的 DNA 终浓度，但降低了总体的 DNA 产量。记住洗脱液的体积将比加样到柱中的洗脱溶液的体积最多减少 5  $\mu\text{l}$ 。

- 盖上盖子，在室温（15–25°C）下孵育 1 分钟。全速（20000  $\times$  g; 14000 rpm）离心 1 分钟。

离心之前，在室温下将带有 Buffer ATE 或水的 QIAamp MinElute 柱孵育 5 分钟，通常能增加 DNA 产量。

# 实验方案：从口香糖中分离总 DNA

本实验方案适合从口香糖中分离总 DNA ( 基因组和线粒体 DNA )。

## 开始前的要点

- 在室温 ( 15–25°C ) 下进行所有离心步骤。
- 确认是否需要载体 RNA ( 详见第 11 和 13 页 )。

## 开始前要做的事

- 平衡 Buffer ATE 或用于洗脱的蒸馏水到室温 ( 15–25°C )。
- 将恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 56°C，用于第 3 步及 ( 可选的 ) 第 15 步，将第二个恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 70°C，用于第 6 步。如果没有恒温混匀器或可加热的回转式摇床，可使用加热模块或水浴作为替代。
- 如果 Buffer AL 或 Buffer ATL 含有沉淀，加热至 70°C 并轻柔搅动，溶解沉淀。
- 确保 Buffer AW1 和 AW2 已根据第 12 页的操作指南配制。

## 操作步骤

1. 切下最多 30 mg 口香糖，切成小块，将它们转移到 1.5 ml 离心管 ( 未提供 ) 中。
2. 加入 300 µl Buffer ATL 和 20 µl 蛋白酶 K，涡旋振荡混合 10 秒。
3. 将 1.5 ml 管放置在恒温混匀器或可加热的回转式摇床中，在 56°C 以 900 rpm 振摇至少 3 小时。

如果使用加热模块或水浴，每 30 分钟振摇离心管 10 秒，以加速裂解。

4. 短暂离心 1.5 ml 管，将沾在内管盖上的液滴收集入管内。
5. 加入 300 µl Buffer AL，盖上盖子，涡旋振荡混合 10 秒。

为确保有效的裂解，将样本和 Buffer AL 充分混合以产生均质的溶液，这一步非常关键。

当 Buffer AL 加入到 Buffer ATL 中，可能会形成白色沉淀。此沉淀不影响 QIAamp 的操作，在第 6 步的孵育过程中会溶解。



**注意：**如果需要载体 RNA（详见第 11 页），在 300  $\mu\text{l}$  Buffer AL 中加入 1  $\mu\text{g}$  溶解的载体 RNA。注意载体 RNA 在 Buffer AL 中不溶解。它必须先溶解在 Buffer ATE 中，然后再加入到 Buffer AL。

**6. 将 1.5 ml 管放置在恒温混匀器或可加热的回转式摇床中，在 70°C 以 900 rpm 振摇 1 小时。**

如果使用加热模块或水浴，每 10 分钟振摇离心管 10 秒，以加速裂解。

**7. 短暂离心 1.5 ml 管，将沾在内管盖上的液滴收集入管内。**

如果固体颗粒仍然可见，以 6000  $\times g$ （8000 rpm）离心 1 分钟，小心转移上清到新的 1.5 ml 离心管（未提供）中。

**8. 加入 150  $\mu\text{l}$  乙醇（96–100%），盖上盖子，涡旋振荡混合 10 秒。**

为了确保第 10 步的高效结合，将样本和乙醇充分混合以产生均质的溶液，这一步非常重要。

**9. 全速（20000  $\times g$ ；14000 rpm）离心 1 分钟。**

**10. 将第 9 步的上清小心转移至 QIAamp MinElute 柱（放置在 2 ml 收集管中），不要弄湿边缘，盖上盖子，以 6000  $\times g$ （8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。**

如果离心后裂解液并未完全穿过膜，可提高离心速度再次离心，直至 QIAamp MinElute 柱内液体排空。

**11. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 500  $\mu\text{l}$  Buffer AW1，不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000  $\times g$ （8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。**

**12. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700  $\mu\text{l}$  Buffer AW2，不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000  $\times g$ （8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。**

QIAamp MinElute 柱与流出液之间的接触应当避免。一些离心机转子在减速时会振动，导致流出液（含有乙醇）与 QIAamp MinElute 柱接触。在从转子中取出 QIAamp MinElute 柱和收集管时，应小心，这样流出液就不会接触到 QIAamp MinElute 柱。

**13. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700  $\mu\text{l}$  乙醇（96–100%），不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000  $\times g$ （8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。**

14. **全速 ( 20000 × g ; 14000 rpm ) 离心 3 分钟, 让膜彻底变干。**

此步骤很必要, 因为乙醇残留在洗脱液中会干扰一些下游应用。
15. **将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 1.5 ml 离心管 ( 未提供 ) 中, 并弃去含有流出液的收集管。小心打开 QIAamp MinElute 柱的盖子, 在室温 ( 15–25°C ) 下孵育 10 分钟或 56°C 下孵育 3 分钟。**
16. **将 20–50 µl Buffer ATE 或蒸馏水加样到膜的中央。**

**重要:** 确保 Buffer ATE 或蒸馏水平衡到室温 ( 15–25°C )。将 Buffer ATE 或蒸馏水滴到膜的中央, 以确保完全洗脱结合的 DNA。

QIAamp MinElute 柱提供了选择洗脱体积的灵活性。根据下游应用的需要选择体积。小体积洗脱显著增加了洗脱液中的 DNA 终浓度, 但降低了总体的 DNA 产量。记住洗脱液的体积将比加样到柱中的洗脱溶液的体积最多减少 5 µl。
17. **盖上盖子, 在室温 ( 15–25°C ) 下孵育 1 分钟。全速 ( 20000 × g ; 14000 rpm ) 离心 1 分钟。**

离心之前, 在室温下将带有 Buffer ATE 或水的 QIAamp MinElute 柱孵育 5 分钟, 通常能增加 DNA 产量。

# 实验方案：从烟蒂中分离总 DNA

本实验方案适合从烟蒂中分离总 DNA（基因组和线粒体 DNA）。

## 开始前的要点

- 在室温（15–25°C）下进行所有离心步骤。
- 确认是否需要载体 RNA（详见第 11 和 13 页）。

## 开始前要做的事

- 平衡 Buffer ATE 或用于洗脱的蒸馏水到室温（15–25°C）。
- 将恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 56°C，用于第 3 步及（可选的）第 16 步，将第二个恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 70°C，用于第 6 步。如果没有恒温混匀器或可加热的回转式摇床，可使用加热模块或水浴作为替代。
- 如果 Buffer AL 或 Buffer ATL 含有沉淀，加热至 70°C 并轻柔搅动，溶解沉淀。
- 确保 Buffer AW1 和 AW2 已根据第 12 页的操作指南配制。

## 操作步骤

1. **从香烟或过滤嘴的末端切下 1 cm<sup>2</sup> 外层纸。将这张纸切成 6 小块。将它们转移到 1.5 ml 离心管（未提供）中。**
2. **加入 300 µl Buffer ATL 和 20 µl 蛋白酶 K，盖上盖子，涡旋振荡混合 10 秒。**
3. **将管放置在恒温混匀器或可加热的回转式摇床中，在 56°C 以 900 rpm 振摇至少 1 小时。**  
如果使用加热模块或水浴，每 10 分钟振摇离心管 10 秒，以加速裂解。
4. **短暂离心管子，将沾在内管盖上的液滴收集入管内。**
5. **加入 300 µl Buffer AL，盖上盖子，涡旋振荡混合 10 秒。**  
为确保有效的裂解，将样本和 Buffer AL 充分混合以产生均质的溶液，这一步非常关键。  
当 Buffer AL 加入到 Buffer ATL 中，可能会形成白色沉淀。此沉淀不影响 QIAamp 的操作，在第 6 步的孵育过程中会溶解。

**注意：**如果需要载体 RNA（详见第 11 页），在 300  $\mu\text{l}$  Buffer AL 中加入 1  $\mu\text{g}$  溶解的载体 RNA。注意载体 RNA 在 Buffer AL 中不溶解。它必须先溶解在 Buffer ATE 中，然后再加入到 Buffer AL。

- 6. 将管放置在恒温混匀器或可加热的回转式摇床中，在 70°C 以 900 rpm 振摇 10 分钟。**

如果使用加热模块或水浴，每 3 分钟振摇离心管 10 秒，以加速裂解。

- 7. 短暂离心 1.5 ml 管，将沾在内管盖上的液滴收集入管内。**

如果固体颗粒仍然可见，以  $6000 \times g$ （8000 rpm）离心 1 分钟，小心转移上清到新的 1.5 ml 离心管（未提供）中。

- 8. 加入 150  $\mu\text{l}$  乙醇（96–100%），盖上盖子，涡旋振荡混合 10 秒。**

为了确保第 10 步的高效结合，将样本和乙醇充分混合以产生均质的溶液，这一步非常重要。

- 9. 短暂离心 1.5 ml 管，将沾在内管盖上的液滴收集入管内。**

- 10. 将第 9 步的上清小心转移至 QIAamp MinElute 柱（放置在 2 ml 收集管中），不要弄湿边缘。**

- 11. 盖上盖子，以  $6000 \times g$ （8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。**

如果离心后裂解液并未完全穿过膜，可提高离心速度再次离心，直至 QIAamp MinElute 柱内液体排空。

- 12. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 500  $\mu\text{l}$  Buffer AW1，不要弄湿边缘。盖上盖子，以  $6000 \times g$ （8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。**

- 13. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700  $\mu\text{l}$  Buffer AW2，不要弄湿边缘。盖上盖子，以  $6000 \times g$ （8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。**

QIAamp MinElute 柱与流出液之间的接触应当避免。一些离心机转子在减速时会振动，导致流出液（含有乙醇）与 QIAamp MinElute 柱接触。在从转子中取出 QIAamp MinElute 柱和收集管时，应小心，这样流出液就不会接触到 QIAamp MinElute 柱。

14. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700  $\mu$ l 乙醇（96–100%），不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000  $\times$  g（8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。
15. 全速（20000  $\times$  g；14000 rpm）离心 3 分钟，让膜彻底变干。  
此步骤很必要，因为乙醇残留在洗脱液中会干扰一些下游应用。
16. 将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 1.5 ml 离心管（未提供）中，并弃去含有流出液的收集管。小心打开 QIAamp MinElute 柱的盖子，在室温（15–25°C）下孵育 10 分钟或 56°C 下孵育 3 分钟。
17. 将 20–50  $\mu$ l Buffer ATE 或蒸馏水加样到膜的中央。  
**重要：**确保 Buffer ATE 或蒸馏水平衡到室温（15–25°C）。将 Buffer ATE 或蒸馏水滴到膜的中央，以确保完全洗脱结合的 DNA。  
QIAamp MinElute 柱提供了选择洗脱体积的灵活性。根据下游应用的需要选择体积。小体积洗脱显著增加了洗脱液中的 DNA 终浓度，但降低了总体的 DNA 产量。记住洗脱液的体积将比加样到柱中的洗脱溶液的体积最多减少 5  $\mu$ l。
18. 盖上盖子，在室温（15–25°C）下孵育 1 分钟。全速（20000  $\times$  g；14000 rpm）离心 1 分钟。  
离心之前，在室温下将带有 Buffer ATE 或水的 QIAamp MinElute 柱孵育 5 分钟，通常能增加 DNA 产量。

# 实验方案：从指甲和毛发中分离总 DNA

本实验方案适合从指甲和毛根或毛柄中分离总 DNA ( 基因组和线粒体 DNA )。

## 开始前的要点

- 在室温 ( 15–25°C ) 下进行所有离心步骤。
- 确认是否需要载体 RNA ( 详见第 11 和 13 页 )。

## 开始前要做的事

- 平衡 Buffer ATE 或用于洗脱的蒸馏水到室温 ( 15–25°C )。
- 将恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 56°C，用于第 3 步及 ( 可选的 ) 第 15 步，将第二个恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 70°C，用于第 5 步。如果没有恒温混匀器或可加热的回转式摇床，可使用加热模块或水浴作为替代。
- 如果 Buffer AL 或 Buffer ATL 含有沉淀，加热至 70°C 并轻柔搅动，溶解沉淀。
- 配制 1 M DTT ( 二硫苏糖醇 ) 储备液。分装后储存在 –20°C。融后即用。
- 确保 Buffer AW1 和 AW2 已根据第 12 页的操作指南配制。

## 操作步骤

1. 裂解样本，步骤 1a 适合指甲，步骤 1b 适合毛根，步骤 1c 适合毛柄 ( 没有根 )。
  - 1a. 将指甲转移到 1.5 ml 离心管 ( 未提供 ) 中。加入 300  $\mu$ l Buffer ATL、20  $\mu$ l 蛋白酶 K 和 20  $\mu$ l 1M DTT。盖上盖子，涡旋振荡混合 10 秒。继续第 2 步。
  - 1b. 在 1.5 ml 离心管 ( 未提供 ) 中加入 300  $\mu$ l Buffer ATL、20  $\mu$ l 蛋白酶 K 和 20  $\mu$ l 1M DTT。从毛球开始剪下 0.5–1 cm 的一段，转移至 1.5 ml 离心管中。盖上盖子，涡旋振荡混合 10 秒。继续第 2 步。
  - 1c. 在 1.5 ml 离心管 ( 未提供 ) 中加入 300  $\mu$ l Buffer ATL、20  $\mu$ l 蛋白酶 K 和 20  $\mu$ l 1M DTT。将毛发剪成 0.5–1 cm 的小段，转移至 1.5 ml 离心管中。盖上盖子，涡旋振荡混合 10 秒。继续第 2 步。

**2. 将离心管放置在恒温混匀器或可加热的回转式摇床中，在 56°C 以 900 rpm 振摇至少 1 小时。**

一般来说，毛发在 1 小时之内裂解。如果需要，可增加孵育时间，以确保样本完全裂解。

如果使用加热模块或水浴，每 10 分钟振荡离心管 10 秒，以加速裂解。

对于较大块的指甲样本，我们推荐在 56°C 过夜孵育。

在此孵育步骤或第 5 步的孵育中未裂解的所有物质将会在第 6 步的离心中沉淀。

**3. 将离心管短暂离心，将沾在内管盖的液滴收集入管内。**

**4. 加入 300 µl Buffer AL，盖上盖子，涡旋振荡混合 10 秒。**

为确保有效的裂解，将样本和 Buffer AL 充分混合以产生均质的溶液，这一步非常关键。

当 Buffer AL 加入到 Buffer ATL 中，可能会形成白色沉淀。此沉淀不影响 QIAamp 的操作，在第 5 步的孵育过程中会溶解。

**注意：**如果需要载体 RNA（详见第 11 页），在 300 µl Buffer AL 中加入 1 µg 溶解的载体 RNA。注意载体 RNA 在 Buffer AL 中不溶解。它必须先溶解在 Buffer ATE 中，然后再加入到 Buffer AL。

**5. 将离心管放置在恒温混匀器或可加热回转式摇床中，在 70°C 以 900 rpm 振摇 10 分钟。**

如果使用加热模块或水浴，每 3 分钟震荡离心管 10 秒，以加速裂解。

**6. 将 1.5 ml 离心管短暂离心，将沾在内管盖的液滴收集入管内。**

**7. 加入 150 µl 乙醇（96–100%），盖上盖子，涡旋振荡 15 秒，充分混合。**

为了确保第 9 步的高效结合，将样本和乙醇充分混合以产生均质的溶液，这一步非常重要。

**8. 将 1.5 ml 离心管短暂离心，沾在内管盖的液滴收集入管内。**

**9. 将第 8 步的上清小心转移至 QIAamp MinElute 柱（放置在 2 ml 收集管中），不要弄湿边缘。**

**10. 盖上盖子，以 6000 × g（8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，弃去含有流出液的收集管。**

如果在离心后裂解液并未完全穿过膜，可提高离心速度再次离心，直至 QIAamp MinElute 柱内液体排空。

11. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 500  $\mu\text{l}$  Buffer AW1，不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000  $\times$  g (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。
12. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700  $\mu\text{l}$  Buffer AW2，不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000  $\times$  g (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。

QIAamp MinElute 柱与流出液之间的接触应当避免。一些离心机转子在减速时会振动，导致流出液（含有乙醇）与 QIAamp MinElute 柱接触。在从转子中取出 QIAamp MinElute 柱和收集管时，应小心，这样流出液就不会接触到 QIAamp MinElute 柱。
13. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700  $\mu\text{l}$  乙醇（96–100%），不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000  $\times$  g (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。
14. 全速（20000  $\times$  g; 14000 rpm）离心 3 分钟，让膜彻底变干。

此步骤很必要，因为乙醇残留在洗脱液中会干扰一些下游应用。
15. 将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 1.5 ml 离心管（未提供）中，并弃去含有流出液的收集管。小心打开 QIAamp MinElute 柱的盖子，在室温（15–25 $^{\circ}\text{C}$ ）下孵育 10 分钟或 56 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 3 分钟。
16. 将 20–50  $\mu\text{l}$  Buffer ATE 或蒸馏水加样到膜的中央。

**重要：**确保 Buffer ATE 或蒸馏水平衡到室温（15–25 $^{\circ}\text{C}$ ）。将 Buffer ATE 或蒸馏水滴到膜的中央，以确保完全洗脱结合的 DNA。

QIAamp MinElute 柱提供了选择洗脱体积的灵活性。根据下游应用的需要选择体积。小体积洗脱显著增加了洗脱液中的 DNA 终浓度，但降低了总体的 DNA 产量。记住洗脱液的体积将比加样到柱中的洗脱溶液的体积最多减少 5  $\mu\text{l}$ 。
17. 盖上盖子，在室温（15–25 $^{\circ}\text{C}$ ）下孵育 1 分钟。全速（20000  $\times$  g; 14000 rpm）离心 1 分钟。

离心之前，将带有 Buffer ATE 或水的 QIAamp MinElute 柱在室温下孵育 5 分钟，通常能增加 DNA 产量。



## 实验方案：从纸质材料中分离总 DNA

此实验方案适合从纸质证物样本，如信封盖和邮票上的唾液或文件上的指纹中分离总 DNA（包括基因组和线粒体 DNA）。

### 开始前的要点

- 在室温（15–25°C）下进行所有离心步骤。
- 确认是否需要载体 RNA（详见第 11 和 13 页）。

### 开始前要做的事

- 平衡 Buffer ATE 或用于洗脱的蒸馏水到室温（15–25°C）。
- 将恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 56°C，用于第 3 步及（可选的）第 16 步，将第二个恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 70°C，用于第 6 步。如果没有恒温混匀器或可加热的回转式摇床，可使用加热模块或水浴作为替代。
- 如果 Buffer AL 或 Buffer ATL 含有沉淀，加热至 70°C 并轻柔搅动，溶解沉淀。
- 确保 Buffer AW1 和 AW2 已根据第 12 页的操作指南配制。

### 操作步骤

1. 从纸质材料上切下 0.5–2.5 cm<sup>2</sup> 的样本，然后切成小块。将它们转移到 1.5 ml 离心管（未提供）中。  
注意：在切样本之前，使用蒸馏水润湿的拭子能减少表面污染。
2. 加入 300 µl Buffer ATL 和 20 µl 蛋白酶 K，盖上盖子，涡旋振荡混合 10 秒。
3. 将管放置在恒温混匀器或可加热的回转式摇床中，在 56°C 以 900 rpm 振摇至少 1 小时。  
如果使用加热模块或水浴，每 10 分钟振摇离心管 10 秒，以加速裂解。
4. 短暂离心管子，将沾在内管盖上的液滴收集入管内。

**5. 加入 300  $\mu$ l Buffer AL, 盖上盖子, 涡旋振荡混合 10 秒。**

为确保有效的裂解, 将样本和 Buffer AL 充分混合以产生均质的溶液, 这一步非常关键。

当 Buffer AL 加入到 Buffer ATL 中, 可能会形成白色沉淀。此沉淀不影响 QIAamp 的操作, 在第 6 步的孵育过程中会溶解。

**注意:** 如果需要载体 RNA ( 详见第 11 页 ), 在 300  $\mu$ l Buffer AL 中加入 1  $\mu$ g 溶解的载体 RNA。注意载体 RNA 在 Buffer AL 中不溶解。它必须先溶解在 Buffer ATE 中, 然后再加入到 Buffer AL。

**6. 将管放置在恒温混匀器或可加热的回转式摇床中, 在 70°C 以 900 rpm 振摇 10 分钟。**

如果使用加热模块或水浴, 每 3 分钟振摇离心管 10 秒, 以加速裂解。

**7. 短暂离心 1.5 ml 管, 将沾在内管盖上的液滴收集入管内。**

如果固体颗粒仍然可见, 以 6000  $\times$  g ( 8000 rpm ) 离心 1 分钟, 小心转移上清到新的 1.5 ml 离心管 ( 未提供 ) 中。

**8. 加入 150  $\mu$ l 乙醇 ( 96–100% ), 盖上盖子, 涡旋振荡混合 15 秒。**

为了确保第 10 步的高效结合, 将样本和乙醇充分混合以产生均质的溶液, 这一步非常重要。

**9. 短暂离心 1.5 ml 管, 将沾在内管盖上的液滴收集入管内。****10. 将第 9 步的上清小心转移至 QIAamp MinElute 柱 ( 放置在 2 ml 收集管中 ), 不要弄湿边缘。****11. 盖上盖子, 以 6000  $\times$  g ( 8000 rpm ) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中, 并弃去含有流出液的收集管。**

如果离心后裂解液并未完全穿过膜, 可提高离心速度再次离心, 直至 QIAamp MinElute 柱内液体排空。

**12. 小心打开 QIAamp MinElute 柱, 加入 500  $\mu$ l Buffer AW1, 不要弄湿边缘。盖上盖子, 以 6000  $\times$  g ( 8000 rpm ) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中, 并弃去含有流出液的收集管。**

- 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700  $\mu\text{l}$  Buffer AW2，不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000  $\times g$  (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。

QIAamp MinElute 柱与流出液之间的接触应当避免。一些离心机转子在减速时会振动，导致流出液（含有乙醇）与 QIAamp MinElute 柱接触。在从转子中取出 QIAamp MinElute 柱和收集管时，应小心，这样流出液就不会接触到 QIAamp MinElute 柱。

- 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700  $\mu\text{l}$  乙醇（96–100%），不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000  $\times g$  (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。

- 全速（20000  $\times g$ ; 14000 rpm）离心 3 分钟，让膜彻底变干。

此步骤很必要，因为乙醇残留在洗脱液中会干扰一些下游应用。

- 将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 1.5 ml 离心管（未提供）中，并弃去含有流出液的收集管。小心打开 QIAamp MinElute 柱的盖子，在室温（15–25°C）下孵育 10 分钟或 56°C 下孵育 3 分钟。

- 将 20–50  $\mu\text{l}$  Buffer ATE 或蒸馏水加样到膜的中央。

**重要：**确保 Buffer ATE 或蒸馏水平衡到室温（15–25°C）。将 Buffer ATE 或蒸馏水滴到膜的中央，以确保完全洗脱结合的 DNA。

QIAamp MinElute 柱提供了选择洗脱体积的灵活性。根据下游应用的需要选择体积。小体积洗脱显著增加了洗脱液中的 DNA 终浓度，但降低了总体的 DNA 产量。记住洗脱液的体积将比加样到柱中的洗脱溶液的体积最多减少 5  $\mu\text{l}$ 。

- 盖上盖子，在室温（15–25°C）下孵育 1 分钟。全速（20000  $\times g$ ; 14000 rpm）离心 1 分钟。

离心之前，在室温下将带有 Buffer ATE 或水的 QIAamp MinElute 柱孵育 5 分钟，通常能增加 DNA 产量。

## 实验方案：从小体积血液或唾液中分离总 DNA

此实验方案适合从 1–100  $\mu\text{l}$  用 EDTA、柠檬酸或肝素类抗凝剂处理过的全血或 1–100  $\mu\text{l}$  唾液中分离总 DNA (基因组和线粒体 DNA)。

### 开始前的要点

- 在室温 (15–25°C) 下进行所有离心步骤。

### 开始前要做的事

- 平衡样本到室温 (15–25°C)。
- 平衡 Buffer ATE 或用于洗脱的蒸馏水到室温。
- 将恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 56°C, 用于第 5 步及 (可选的) 第 14 步。
- 确保 Buffer AW1 和 AW2 已根据第 12 页的操作指南配制。
- 如果 Buffer AL 或 Buffer ATL 含有沉淀, 加热至 70°C 并轻柔搅动, 溶解沉淀。
- 可选: 如果处理小体积样本 (<10  $\mu\text{l}$ ), 可根据第 13 页的操作指南, 将溶于 Buffer ATE 的载体 RNA 加入到 Buffer AL 中。

### 操作步骤

1. 将 1–100  $\mu\text{l}$  全血或唾液移液至 1.5 ml 离心管 (未提供) 中。
2. 加入 Buffer ATL 至终体积 100  $\mu\text{l}$ 。
3. 加入 10  $\mu\text{l}$  蛋白酶 K。
4. 加入 100  $\mu\text{l}$  Buffer AL, 盖上盖子, 涡旋振荡混合 15 秒。

为确保有效的裂解, 将样本、Buffer ATL、蛋白酶 K 和 Buffer AL 充分混合以产生均质的溶液, 这一步非常关键。

**注意:** 如果血液体积小于 10  $\mu\text{l}$ , 我们推荐在 Buffer AL 中加入载体 RNA (详见第 11 页)。注意载体 RNA 不溶于 Buffer AL。它必须先溶于 Buffer ATE, 再加入到 Buffer AL。

当 Buffer AL 加入到 Buffer ATL 中, 可能会形成白色沉淀。此沉淀不影响 QIAamp 的操作, 在第 5 步的孵育过程中会溶解。

**5. 在 56°C 孵育 10 分钟。**

**注意：**如果在孵育过程中振摇样本，DNA 产量会增加。

**6. 短暂离心 1.5 ml 管，将沾在内管盖上的液滴收集入管内。**

**7. 加入 50  $\mu$ l 乙醇 (96–100%)，盖上盖子，涡旋振荡混合 15 秒。在室温下孵育 3 分钟。**

**注意：**如果室温超过 25°C，在冰上冷却乙醇，再加入到管中。

**8. 短暂离心 1.5 ml 管，将沾在内管盖上的液滴收集入管内。**

**9. 将第 8 步的全部裂解液小心转移至 QIAamp MinElute 柱 (放置在 2 ml 收集管中)，不要弄湿边缘，盖上盖子，以 6000  $\times$  g (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。如果离心后裂解液并未完全穿过膜，可提高离心速度再次离心，直至 QIAamp MinElute 柱内液体排空。**

**10. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 500  $\mu$ l Buffer AW1，不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000  $\times$  g (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。**

**11. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700  $\mu$ l Buffer AW2，不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000  $\times$  g (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。**

QIAamp MinElute 柱与流出液之间的接触应当避免。一些离心机转子在减速时会振动，导致流出液 (含有乙醇) 与 QIAamp MinElute 柱接触。在从转子中取出 QIAamp MinElute 柱和收集管时，应小心，这样流出液就不会接触到 QIAamp MinElute 柱。

**12. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700  $\mu$ l 乙醇 (96–100%)，不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000  $\times$  g (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。**

**13. 全速 (20000  $\times$  g; 14000 rpm) 离心 3 分钟，让膜彻底变干。**

此步骤很必要，因为乙醇残留在洗脱液中会干扰一些下游应用。

14. 将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 1.5 ml 离心管（未提供）中，并弃去含有流出液的收集管。小心打开 QIAamp MinElute 柱的盖子，在室温（15–25°C）下孵育 10 分钟或 56°C 下孵育 3 分钟。

15. 将 20–100  $\mu$ l Buffer ATE 或蒸馏水加样到膜的中央。

**重要：**确保 Buffer ATE 或蒸馏水平衡到室温（15–25°C）。如果使用小的洗脱体积（ $<50 \mu$ l），将 Buffer ATE 或蒸馏水滴到膜的中央，以确保完全洗脱结合的 DNA。QIAamp MinElute 柱提供了选择洗脱体积的灵活性。根据下游应用的需要选择体积。小体积洗脱显著增加了洗脱液中的 DNA 终浓度，但降低了总体的 DNA 产量。记住洗脱液的体积将比加样到柱中的洗脱溶液的体积最多减少 5  $\mu$ l。

16. 盖上盖子，在室温（15–25°C）下孵育 1 分钟。全速（20000  $\times$  g；14000 rpm）离心 1 分钟。

离心之前，在室温下将带有 Buffer ATE 或水的 QIAamp MinElute 柱孵育 5 分钟，通常能增加 DNA 产量。

## 实验方案：从组织中分离总 DNA

本实验方案适合从少于 10 mg 的组织中分离总 DNA（基因组和线粒体 DNA）。

### 开始前的要点

- 在室温（15–25°C）下进行所有离心步骤。
- 如果从极少量的组织中分离 DNA，需要载体 RNA（详见第 11 和 13 页）。
- 在冷的表面（例如置于干冰块上方的玻璃板、钢板或铝板）制备组织样本。
- 如果使用冷冻的组织，确保在第 2 步的加入 Buffer ATL 之前，冰冻样本未溶化。

### 开始前要做的事

- 平衡 Buffer ATE 或用于洗脱的蒸馏水到室温。
- 将恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 56°C，用于第 4 步及（可选的）第 13 步。如果没有恒温混匀器或可加热的回转式摇床，可使用加热模块或水浴作为替代。
- 如果 Buffer AL 或 Buffer ATL 含有沉淀，加热至 70°C 并轻柔搅动，溶解沉淀。
- 确保 Buffer AW1 和 AW2 已根据第 12 页的操作指南配制。

### 操作步骤

1. 将重量低于 10 mg 的组织样本转移到 1.5 ml 离心管（未提供）中。
2. 立即加入 180  $\mu$ l Buffer ATL，平衡至室温（15–25°C）。
3. 加入 20  $\mu$ l 蛋白酶 K，涡旋振荡混合 15 秒。
4. 将 1.5 ml 管放置在恒温混匀器或可加热的回转式摇床中，在 56°C 过夜孵育，或直至样本已完全裂解。  
少量的组织可在 4–6 小时内完全裂解，但过夜裂解能获得最佳的结果。

**5. 加入 200  $\mu$ l Buffer AL, 盖上盖子, 涡旋振荡混合 15 秒。**

为确保有效的裂解, 将样本和 Buffer AL 充分混合以产生均质的溶液, 这一步非常关键。

**注意:** 如果需要载体 RNA ( 详见第 11 页 ), 在 300  $\mu$ l Buffer AL 中加入 1  $\mu$ g 溶解的载体 RNA。注意载体 RNA 在 Buffer AL 中不溶解。它必须先溶解在 Buffer ATE 中, 然后再加入到 Buffer AL。

**6. 加入 200  $\mu$ l 乙醇 ( 96–100% ), 盖上盖子, 涡旋振荡混合 15 秒。在室温 ( 15–25°C ) 下孵育 5 分钟。**

**注意:** 如果室温超过 25°C, 在冰上冷却乙醇, 再加入到管中。

**7. 短暂离心 1.5 ml 管, 将沾在内管盖上的液滴收集入管内。**

**8. 将第 7 步的上清小心转移至 QIAamp MinElute 柱 ( 放置在 2 ml 收集管中 ), 不要弄湿边缘, 盖上盖子, 以 6000  $\times$  g ( 8000 rpm ) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中, 并弃去含有流出液的收集管。**

如果离心后裂解液并未完全穿过膜, 可提高离心速度再次离心, 直至 QIAamp MinElute 柱内液体排空。

**9. 小心打开 QIAamp MinElute 柱, 加入 500  $\mu$ l Buffer AW1, 不要弄湿边缘。盖上盖子, 以 6000  $\times$  g ( 8000 rpm ) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中, 并弃去含有流出液的收集管。**

**10. 小心打开 QIAamp MinElute 柱, 加入 700  $\mu$ l Buffer AW2, 不要弄湿边缘。盖上盖子, 以 6000  $\times$  g ( 8000 rpm ) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中, 并弃去含有流出液的收集管。**

QIAamp MinElute 柱与流出液之间的接触应当避免。一些离心机转子在减速时会振动, 导致流出液 ( 含有乙醇 ) 与 QIAamp MinElute 柱接触。在从转子中取出 QIAamp MinElute 柱和收集管时, 应小心, 这样流出液就不会接触到 QIAamp MinElute 柱。

**11. 小心打开 QIAamp MinElute 柱, 加入 700  $\mu$ l 乙醇 ( 96–100% ), 不要弄湿边缘。盖上盖子, 以 6000  $\times$  g ( 8000 rpm ) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中, 并弃去含有流出液的收集管。**

**12. 全速 ( 20000  $\times$  g; 14000 rpm ) 离心 3 分钟, 让膜彻底变干。**

此步骤很必要, 因为乙醇残留在洗脱液中会干扰一些下游应用。



**13. 将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 1.5 ml 离心管（未提供）中，并弃去含有流出液的收集管。小心打开 QIAamp MinElute 柱的盖子，在室温（15–25°C）下孵育 10 分钟或 56°C 下孵育 3 分钟。**

**14. 将 20–100  $\mu$ l Buffer ATE 或蒸馏水加样到膜的中央。**

**重要：**确保 Buffer ATE 或蒸馏水平衡到室温（15–25°C）。如果使用小的洗脱体积（ $<50 \mu$ l），将 Buffer ATE 或蒸馏水滴到膜的中央，以确保完全洗脱结合的 DNA。QIAamp MinElute 柱提供了选择洗脱体积的灵活性。根据下游应用的需要选择体积。小体积洗脱显著增加了洗脱液中的 DNA 终浓度，但降低了总体的 DNA 产量。记住洗脱液的体积将比加样到柱中的洗脱溶液的体积最多减少 5  $\mu$ l。

**15. 盖上盖子，在室温（15–25°C）下孵育 1 分钟。全速（20000  $\times$  g；14000 rpm）离心 1 分钟。**

离心之前，在室温下将带有 Buffer ATE 或水的 QIAamp MinElute 柱孵育 5 分钟，通常能增加 DNA 产量。

## 实验方案：从激光显微切割标本中分离总 DNA

本实验方案适合从激光显微切割组织中分离总 DNA ( 基因组和线粒体 DNA )。激光显微切割组织标本代表了分子分析的特殊挑战，因为必须从极少量的起始材料中纯化核酸。此外，固定和染色步骤可能损害 DNA 的完整性，有必要修改固定方案或使用瞬间冷冻标本的冰冻切片，将问题最小化。

Leica 莱卡公司提供了一系列切片、染色和显微切割标本的设备和耗材 ( [www.leicamicrosystems.com](http://www.leicamicrosystems.com) )。

### 开始前的要点

- 在室温 ( 15–25°C ) 下进行所有离心步骤。
- 如果从极少量的细胞中分离 DNA，需要载体 RNA ( 详见第 11 和 13 页 )。

### 开始前要做的事

- 平衡样本到室温 ( 15–25°C )。
- 平衡 Buffer ATE 或用于洗脱的蒸馏水到室温。
- 将恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 56°C，用于第 3 步及 ( 可选的 ) 第 13 步。如果没有恒温混匀器或可加热的回转式摇床，可使用加热模块或水浴作为替代。
- 如果 Buffer AL 或 Buffer ATL 含有沉淀，加热至 70°C 并轻柔搅动，溶解沉淀。
- 确保 Buffer AW1 和 AW2 已根据第 12 页的操作指南配制。

### 操作步骤

1. 向 0.2 ml 离心管 ( 未提供 ) 中收集的激光显微切割样本中加入 15  $\mu$ l Buffer ATL。
2. 加入 10  $\mu$ l 蛋白酶 K，涡旋振荡混合 15 秒。
3. 将 0.2 ml 管放置在恒温混匀器或可加热的回转式摇床中，在 56°C 孵育 3 小时 ( 福尔马林固定组织为 16 小时 )，期间不时摇动。  
孵育时间可随收集的组织量而改变。
4. 加入 25  $\mu$ l Buffer ATL。

**5. 加入 50  $\mu$ l Buffer AL, 盖上盖子, 涡旋振荡混合 15 秒。**

为确保有效的裂解, 将样本和 Buffer AL 充分混合以产生均质的溶液, 这一步非常关键。

**注意:** 如果需要载体 RNA ( 详见第 11 页 ), 在 200  $\mu$ l Buffer AL 中加入 1  $\mu$ g 溶解的载体 RNA。注意载体 RNA 在 Buffer AL 中不溶解。它必须先溶解在 Buffer ATE 中, 然后再加入到 Buffer AL。

**6. 加入 50  $\mu$ l 乙醇 ( 96–100% ), 盖上盖子, 涡旋振荡混合 15 秒。在室温 ( 15–25°C ) 下孵育 5 分钟。**

**注意:** 如果室温超过 25°C, 在冰上冷却乙醇, 再加入到管中。

**7. 短暂离心 0.2 ml 管, 将沾在内管盖上的液滴收集入管内。****8. 将第 7 步的上清小心转移至 QIAamp MinElute 柱 ( 放置在 2 ml 收集管中 ), 不要弄湿边缘, 盖上盖子, 以 6000  $\times$  g ( 8000 rpm ) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中, 并弃去含有流出液的收集管。**

如果离心后裂解液并未完全穿过膜, 可提高离心速度再次离心, 直至 QIAamp MinElute 柱内液体排空。

**9. 小心打开 QIAamp MinElute 柱, 加入 500  $\mu$ l Buffer AW1, 不要弄湿边缘。盖上盖子, 以 6000  $\times$  g ( 8000 rpm ) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中, 并弃去含有流出液的收集管。****10. 小心打开 QIAamp MinElute 柱, 加入 700  $\mu$ l Buffer AW2, 不要弄湿边缘。盖上盖子, 以 6000  $\times$  g ( 8000 rpm ) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中, 并弃去含有流出液的收集管。**

QIAamp MinElute 柱与流出液之间的接触应当避免。一些离心机转子在减速时会振动, 导致流出液 ( 含有乙醇 ) 与 QIAamp MinElute 柱接触。在从转子中取出 QIAamp MinElute 柱和收集管时, 应小心, 这样流出液就不会接触到 QIAamp MinElute 柱。

**11. 小心打开 QIAamp MinElute 柱, 加入 700  $\mu$ l 乙醇 ( 96–100% ), 不要弄湿边缘。盖上盖子, 以 6000  $\times$  g ( 8000 rpm ) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中, 并弃去含有流出液的收集管。****12. 全速 ( 20000  $\times$  g; 14000 rpm ) 离心 3 分钟, 让膜彻底变干。**

此步骤很必要, 因为乙醇残留在洗脱液中会干扰一些下游应用。

13. 将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 1.5 ml 离心管（未提供）中，并弃去含有流出液的收集管。小心打开 QIAamp MinElute 柱的盖子，在室温（15–25°C）下孵育 10 分钟或 56°C 下孵育 3 分钟。

14. 将 20–30  $\mu$ l Buffer ATE 或蒸馏水加样到膜的中央。

**重要：**确保 Buffer ATE 或蒸馏水平衡到室温（15–25°C）。将 Buffer ATE 或蒸馏水滴到膜的中央，以确保完全洗脱结合的 DNA。

QIAamp MinElute 柱提供了选择洗脱体积的灵活性。根据下游应用的需要选择体积。小体积洗脱显著增加了洗脱液中的 DNA 终浓度，但降低了总体的 DNA 产量。记住洗脱液的体积将比加样到柱中的洗脱溶液的体积最多减少 5  $\mu$ l。

15. 盖上盖子，在室温（15–25°C）下孵育 1 分钟。全速（20000  $\times$  g；14000 rpm）离心 1 分钟。

离心之前，在室温下将带有 Buffer ATE 或水的 QIAamp MinElute 柱孵育 5 分钟，通常能增加 DNA 产量。

# 实验方案：从骨头和牙齿中分离总 DNA

本实验方案适合从骨头和牙齿碎片中分离总 DNA（基因组和线粒体 DNA）。

## 开始前的要点

- 裂解时间随来源材料的大小和密度而改变。此处给出的裂解条件旨在作为参考条件。
- 在室温（15–25°C）下进行所有离心步骤。

## 开始前要做的事

- 平衡 Buffer ATE 或用于洗脱的蒸馏水到室温（15–25°C）。
- 将恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 56°C，用于第 2 步及（可选的）第 15 步，将第二个恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 70°C，用于第 5 步。如果没有恒温混匀器或可加热的回转式摇床，可使用加热模块或水浴作为替代。
- 如果 Buffer AL 或 Buffer ATL 含有沉淀，加热至 70°C 并轻柔搅动，溶解沉淀。
- 确保 Buffer AW1 和 AW2 已根据第 12 页的操作指南配制。
- 可选：如果处理极少量的起始材料，根据第 13 页的操作指南，将溶于 Buffer ATE 的载体 RNA 加入到 Buffer AL 中。

## 操作步骤

1. **将骨头碾成小碎片。利用装有一半液氮的金属搅拌机磨成细小的粉末。或者，利用 TissueLyser 和不锈钢球磨罐 Grinding Jar Set, S. Steel 将骨头研磨成细小的粉末。**

在使用 TissueLyser 时，将骨头样本和研磨球转移至研磨罐中。在研磨罐中倒入液氮，覆盖球和骨头碎片。让温度平衡（即液氮停止汽化时刻）。倒入过量的液氮，盖上研磨罐的盖子，转移至 TissueLyser 中。在 30 Hz 研磨骨头 1 分钟，或直到骨头已粉碎（研磨时间取决于骨头的类型、条件和大小）。

2. **将 <100 mg 的骨头粉末置于 1.5 ml 离心管中。加入 360  $\mu$ l Buffer ATL 和 20  $\mu$ l 蛋白酶 K。在 56°C 过夜孵育。**

孵育之后，将温度设为 70°C，为第 5 步操作备用。

3. **将离心管短暂离心，将沾在内管盖的液滴收集入管内。**

**4. 加入 300  $\mu$ l Buffer AL，盖上盖子，涡旋振荡混合 10 秒。**

为确保有效的裂解，将样本和 Buffer AL 充分混合以产生均质的溶液，这一步非常关键。

当 Buffer AL 加入到 Buffer ATL 中，可能会形成白色沉淀。此沉淀不影响 QIAamp 的操作，在第 5 步的孵育过程中会溶解。

**注意：**如果需要载体 RNA (carrier RNA，详见第 11 页)，在 300  $\mu$ l Buffer AL 中加入 1  $\mu$ g 溶解的载体 RNA。注意载体 RNA 在 Buffer AL 中不溶解。它必须先溶解在 Buffer ATE 中，然后再加入到 Buffer AL。

**5. 将离心管放置在恒温混匀器或可加热回转式摇床中，在 70°C 以 900 rpm 振荡 10 分钟。**

如果使用加热模块或水浴，每 3 分钟震荡离心管 10 秒，以加速裂解。

**6. 全速 (20000  $\times$  g; 14000 rpm) 离心 1 分钟，将上清小心转移至新的 1.5 ml 离心管 (未提供) 中。****7. 加入 150  $\mu$ l 乙醇 (96–100%)，盖上盖子，涡旋振荡 15 秒，充分混合。**

为了确保第 9 步的高效结合，将样本和乙醇充分混合以产生均质的溶液，这一步非常重要。

**8. 将 1.5 ml 离心管短暂离心，沾在内管盖的液滴收集入管内。****9. 将第 8 步的上清小心转移至 QIAamp MinElute 柱 (放置在 2 ml 收集管中)，不要弄湿边缘。****10. 盖上盖子，以 6000  $\times$  g (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，弃去含有流出液的收集管。**

如果在离心后裂解液并未完全穿过膜，可提高离心速度再次离心，直至 QIAamp MinElute 柱内液体排空。

**11. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 600  $\mu$ l Buffer AW1，不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000  $\times$  g (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。**

- 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700  $\mu\text{l}$  Buffer AW2，不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000  $\times g$  (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。

QIAamp MinElute 柱与流出液之间的接触应当避免。一些离心机转子在减速时会振动，导致流出液（含有乙醇）与 QIAamp MinElute 柱接触。在从转子中取出 QIAamp MinElute 柱和收集管时，应小心，这样流出液就不会接触到 QIAamp MinElute 柱。

- 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700  $\mu\text{l}$  乙醇（96–100%），不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000  $\times g$  (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。

- 全速（20000  $\times g$ ; 14000 rpm）离心 3 分钟，让膜彻底变干。

此步骤很必要，因为乙醇残留在洗脱液中会干扰一些下游应用。

- 将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 1.5 ml 离心管（未提供）中，并弃去含有流出液的收集管。小心打开 QIAamp MinElute 柱的盖子，在室温（15–25°C）下孵育 10 分钟或 56°C 下孵育 3 分钟。

- 将 20–50  $\mu\text{l}$  Buffer ATE 或蒸馏水加样到膜的中央。

**重要：**确保 Buffer ATE 或蒸馏水平衡到室温（15–25°C）。将 Buffer ATE 或蒸馏水滴到膜的中央，以确保完全洗脱结合的 DNA。

QIAamp MinElute 柱洗脱体积灵活，可以根据下游应用的需要选择体积。小体积洗脱显著增加了洗脱液中的 DNA 终浓度，但降低了总体的 DNA 产量。记住洗脱液的体积将比加样到柱中的洗脱溶液的体积最多减少 5  $\mu\text{l}$ 。

- 盖上盖子，在室温（15–25°C）下孵育 1 分钟。全速（20000  $\times g$ ; 14000 rpm）离心 1 分钟。

离心之前，在室温下将带有 Buffer ATE 或水的 QIAamp MinElute 柱孵育 5 分钟，通常能增加 DNA 产量。

## 实验方案：从性侵犯样本中分离总 DNA

本实验方案适合从混合上皮细胞及精子细胞的织物或拭子中分离总 DNA（基因组和线粒体 DNA）。

### 开始前的要点

- 在室温（15–25°C）下进行所有离心步骤。
- 需要额外的 Buffer ATL（详见第 56 页的订购信息）。

### 开始前要做的事

- 平衡 Buffer ATE 或用于洗脱的蒸馏水到室温（15–25°C）。
- 将恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 56°C，用于第 3、10 步及（可选的）第 23 步，将第二个恒温混匀器或可加热的回转式摇床设定到 70°C，用于第 13 步。如果没有恒温混匀器或可加热的回转式摇床，可使用加热模块或水浴作为替代。
- 如果 Buffer AL 或 Buffer ATL 含有沉淀，加热至 70°C 并轻柔搅动，溶解沉淀。
- 确保 Buffer AW1 和 AW2 已根据第 12 页的操作指南配制。
- 制备 1 M DTT（二硫苏糖醇）的储备液。分装后储存在 -20°C。融后即用。
- 可选：如果处理极少量的起始材料，根据第 13 页的操作指南，在 Buffer AL 中加入用 Buffer ATE 溶解的载体 RNA。

### 操作步骤

1. 将拭子或一块织物（ $< 0.5 \text{ cm}^2$ ）放入 2 ml 离心管（未提供）中。  
用手或剪刀将棉花或 DACRON 拭子从杆上分离出来。
2. 加入 20  $\mu\text{l}$  蛋白酶 K 和 500  $\mu\text{l}$  Buffer ATL。盖上盖子，涡旋振荡混合 10 秒。
3. 将 2 ml 管放置在恒温混匀器或可加热的回转式摇床中，在 56°C 以 900 rpm 振摇至少 1 小时。  
如果使用加热模块或水浴，每 10 分钟振摇离心管 10 秒，以加速裂解。
4. 短暂离心 2 ml 管，将沾在内管盖上的液滴收集入管内。



**5. 去除管内的固体材料。**

**注意：**拭子或织物上最多残留 200  $\mu\text{l}$  裂解液。为了收集剩余的裂解液，将拭子或织物放置在 QIAshredder 离心柱（未提供）中，将含有固体材料的 QIAshredder 离心柱放在含有裂解液的 2 ml 管中，并全速（20000  $\times$  g；14000 rpm）离心 2 分钟。取出并弃去含有固体材料的 QIAshredder 离心柱。

**6. 全速离心 5 分钟。小心去除上清（尽量去除干净），不要接触或搅动沉淀。**

**注释：**如果希望获得上皮细胞（女性成份）的 DNA，则移取上层的 300  $\mu\text{l}$  上清至新的 2 ml 离心管中，并且继续步骤 12。

**7. 用 500  $\mu\text{l}$  Buffer ATL 重悬沉淀。盖上盖子，涡旋振荡混合 10 秒。全速离心 5 分钟。小心去除上清（尽量去除干净），不要接触或搅动沉淀。****8. 重复第 7 步，至少 3 次。**

**注意：**上皮细胞与精子细胞的比例影响了纯化精子核酸所需的重复次数。

**9. 在沉淀中加入 280  $\mu\text{l}$  Buffer ATL、10  $\mu\text{l}$  蛋白酶 K 和 10  $\mu\text{l}$  1M DTT。盖上盖子，涡旋振荡混合 10 秒。****10. 将 2 ml 管放置在恒温混匀器或可加热的回转式摇床中，在 56°C 以 900 rpm 振荡至少 1 小时。**

如果使用加热模块或水浴，每 10 分钟振荡离心管 10 秒，以加速裂解。

**11. 短暂离心管子，将沾在内管盖上的液滴收集入管内。****12. 加入 300  $\mu\text{l}$  Buffer AL，盖上盖子，涡旋振荡混合 10 秒。**

为确保有效的裂解，将样本和 Buffer AL 充分混合以产生均质的溶液，这一步非常关键。

当 Buffer AL 加入到 Buffer ATL 中，可能会形成白色沉淀。此沉淀不影响 QIAamp 的操作，在第 13 步的孵育过程中会溶解。

**注意：**如果需要载体 RNA（详见第 11 页），在 300  $\mu\text{l}$  Buffer AL 中加入 1  $\mu\text{g}$  溶解的载体 RNA。注意载体 RNA 在 Buffer AL 中不溶解。它必须先溶解在 Buffer ATE 中，然后再加入到 Buffer AL。

13. 将管子放置在恒温混匀器或可加热的回转式摇床中，在 70°C 以 900 rpm 振摇 10 分钟。

如果使用加热模块或水浴，每 3 分钟振摇离心管 10 秒，以加速裂解。

14. 全速 (20000 × g; 14000 rpm) 离心 1 分钟，小心转移上清至新的 1.5 ml 离心管 (未提供) 中。

15. 加入 150 μl 乙醇 (96–100%)。盖上盖子，涡旋振荡混合 15 秒。

为了确保第 17 步的高效结合，将样本和乙醇充分混合以产生均质的溶液，这一步非常重要。

16. 短暂离心 1.5 ml 管，将沾在内管盖上的液滴收集入管内。

17. 将第 16 步的上清小心转移至 QIAamp MinElute 柱 (放置在 2 ml 收集管中)，不要弄湿边缘。

18. 盖上盖子，以 6000 × g (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。

如果离心后裂解液并未完全穿过膜，可提高离心速度再次离心，直至 QIAamp MinElute 柱内液体排空。

19. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 500 μl Buffer AW1，不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000 × g (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。

20. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700 μl Buffer AW2，不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000 × g (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。

QIAamp MinElute 柱与流出液之间的接触应当避免。一些离心机转子在减速时会振动，导致流出液 (含有乙醇) 与 QIAamp MinElute 柱接触。在从转子中取出 QIAamp MinElute 柱和收集管时，应小心，这样流出液就不会接触到 QIAamp MinElute 柱。

21. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 700 μl 乙醇 (96–100%)，不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000 × g (8000 rpm) 离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute

柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。

**22. 全速 ( 20000 × g ; 14000 rpm ) 离心 3 分钟，让膜彻底变干。**

此步骤很必要，因为乙醇残留在洗脱液中会干扰一些下游应用。

**23. 将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 1.5 ml 离心管 ( 未提供 ) 中，并弃去含有流出液的收集管。小心打开 QIAamp MinElute 柱的盖子，在室温 ( 15–25°C ) 下孵育 10 分钟或 56°C 下孵育 3 分钟。**

**24. 将 20–50 μl Buffer ATE 或蒸馏水加样到膜的中央。**

**重要：**确保 Buffer ATE 或蒸馏水平衡到室温 ( 15–25°C )。将 Buffer ATE 或蒸馏水滴到膜的中央，以确保完全洗脱结合的 DNA。

QIAamp MinElute 柱提供了选择洗脱体积的灵活性。根据下游应用的需要选择体积。小体积洗脱显著增加了洗脱液中的 DNA 终浓度，但降低了总体的 DNA 产量。记住洗脱液的体积将比加样到柱中的洗脱溶液的体积最多减少 5 μl。

**25. 盖上盖子，在室温 ( 15–25°C ) 下孵育 1 分钟。全速 ( 20000 × g ; 14000 rpm ) 离心 1 分钟。**

离心之前，在室温下将带有 Buffer ATE 或水的 QIAamp MinElute 柱孵育 5 分钟，通常能增加 DNA 产量。

## 常见问题指南

本常见问题指南有助于解决可能发生的任何问题。关于更多信息，请参看我们技术支持中心的常见问答页面：[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx)。QIAGEN 技术服务部门的科学家乐于为您解答任何问题，无论是关于本操作手册中的信息和方案，还是关于样本制备和分析技术（关于联系信息，详见封底或访问 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)）。

---

### 评论和建议

---

#### 洗脱液中 DNA 极少或没有

- |                               |   |
|-------------------------------|---|
| a) Buffer AL 中未加入载体 RNA       | 如第 13 页所描述的，将载体 RNA 溶于 Buffer ATE，并与 Buffer AL 混合。用新的样本重复纯化步骤。  |
| b) 样本经过多次冻融                   | 避免样本的反复冻融。如果可能，始终使用新鲜的样本，或只融过一次的样本。   |
| c) 样本在室温放置太久                  | 在室温下长期储存，样本中的 DNA 可能降解。如果可能，始终使用新鲜的样本，或将样本储存在 2–8°C（不干的血液）或 –20°C（组织样本）。干燥的血斑、斑点或拭子能储存在室温下，而 DNA 无显著降解。 |
| d) 样本在 Buffer AL 中裂解不充分       | 蛋白酶 K 在高温下放置时间过长。使用新样本和新鲜的蛋白酶 K 重复此步骤。  |
| e) Buffer AL- 载体 RNA 混合物未充分混合 | 将管子轻柔颠倒至少 10 次，混合 Buffer AL 和载体 RNA。  |
| f) 使用低百分比的乙醇代替了 96–100%       | 用新样本和 96–100% 分析纯乙醇重复纯化步骤。请勿使用工业酒精，其中含有其它物质如甲醇或甲基乙酮。  |
| g) Buffer AW1 或 AW2 配制得不正确    | 确认 Buffer AW1 和 Buffer AW2 浓缩液是否用正确体积的 96–100% 乙醇稀释。如果可行，用新样本重复纯化步骤。                                    |
| h) 用于洗脱的水的 pH 值太低             | DNA 不易溶于酸性溶液。确保用于洗脱的水的 pH > 7.0。  |

### DNA 在下游酶反应（例如 PCR 反应）中表现不佳

- |                                 |  |
|---------------------------------|--|
| a) 洗脱液中 DNA 极少或没有               | 详见“洗脱液中 DNA 极少或没有”（第 52 页），找出可能的原因。如果可能，增加反应中洗脱液的量。  |
| b) 洗脱液中载体 RNA 过多或过少             | 确定适合扩增反应的载体 RNA 最大量。相应调整 Buffer AL 中加入的载体 RNA 的浓度。   |
| c) 灵敏度降低                        | 确定适合扩增反应的洗脱液最大量。相应调整扩增反应中加入的洗脱液的量。洗脱体积可按比例调整。        |
| d) 纯化的 DNA 在下游分析中的表现随复原清洗液的时间而异 | 清洗液 AW1 和 AW2 中的盐和乙醇成分可能在长时间未使用后析出。在每次纯化步骤之前充分混合缓冲液。 |

### 一般操作

- |                        |                             |
|------------------------|-----------------------------|
| a) QIAamp MinElute 柱堵塞 | 不充分的裂解导致膜的堵塞。增加裂解时间，充分裂解样本。 |
| b) 变化的洗脱体积             | 处理不同的样本类型时可以根据需要调解洗脱体积。     |

## 附录 A：处理 DNA

### 一般操作

在处理小体积样本时，应始终使用适当的微生物无菌技术。手和尘埃会携带细菌和霉菌，是最常见的污染源。在处理试剂和样本时，始终佩戴乳胶或乙烯基手套，以避免皮肤表面或积满灰尘的实验室设备的污染。时常更换手套，保持管子紧闭。

### 一次性的塑料制品

在整个纯化过程中推荐使用无菌的一次性聚丙烯管。这些管通常是无 DNase 的。

## 附录 B：DNA 的纯化

本实验方案适合 DNA 的纯化。使用本实验方案让 DNA 还原成适合作为 PCR 的模板，或增加 DNA 的浓度。

### 开始前的要点

- 在室温（15–25°C）下进行所有离心步骤。

### 开始前要做的事

- 平衡样本到室温（15–25°C）。
- 平衡 Buffer ATE 或用于洗脱的蒸馏水到室温（15–25°C）。
- 确保 Buffer AW1 和 AW2 已根据第 12 页的操作指南配制。

### 操作步骤

1. 将最多 100  $\mu\text{l}$  DNA( 最多含有 10  $\mu\text{g}$  DNA )加入到 1.5 ml 离心管( 未提供 )中。  
如果 DNA 体积小于 100  $\mu\text{l}$ ，加入去离子水，让终体积达到 100  $\mu\text{l}$ 。
2. 加入 10  $\mu\text{l}$  Buffer AW1。
3. 加入 250  $\mu\text{l}$  Buffer AW2，涡旋振荡混合 10 秒。

4. 将第 3 步的全部样本转移至 QIAamp MinElute 柱（放置在 2 ml 收集管中），不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000 × g（8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。

5. 小心打开 QIAamp MinElute 柱，加入 500 μl Buffer AW2，不要弄湿边缘。盖上盖子，以 6000 × g（8000 rpm）离心 1 分钟。将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 2 ml 收集管中，并弃去含有流出液的收集管。

QIAamp MinElute 柱与流出液之间的接触应当避免。一些离心机转子在减速时会振动，导致流出液（含有乙醇）与 QIAamp MinElute 柱接触。在从转子中取出 QIAamp MinElute 柱和收集管时，应小心，这样流出液就不会接触到 QIAamp MinElute 柱。

6. 全速（20000 × g；14000 rpm）离心 3 分钟，让膜彻底变干。

此步骤很必要，因为乙醇残留在洗脱液中会干扰一些下游应用。

7. 将 QIAamp MinElute 柱放置在干净的 1.5 ml 离心管（未提供）中，并弃去含有流出液的收集管。小心打开 QIAamp MinElute 柱的盖子，将 20–100 μl Buffer ATE 或蒸馏水滴到膜的中央。

**重要：**确保 Buffer ATE 或蒸馏水平衡到室温（15–25°C）。如果使用小的洗脱体积（<50 μl），将 Buffer ATE 或蒸馏水滴到膜的中央，以确保完全洗脱结合的 DNA。QIAamp MinElute 柱提供了选择洗脱体积的灵活性。根据下游应用的需要选择体积。小体积洗脱显著增加了洗脱液中的 DNA 终浓度，但降低了总体的 DNA 产量。记住洗脱液的体积将比加样到柱中的洗脱溶液的体积最多减少 5 μl。

8. 盖上盖子，在室温（15–25°C）下孵育 1 分钟。全速（20000 × g；14000 rpm）离心 1 分钟。

离心之前，在室温下将带有 Buffer ATE 或水的 QIAamp MinElute 柱孵育 5 分钟，通常能增加 DNA 产量。

## 订购信息

产品	规格	货号
QIAamp DNA Investigator Kit (50)	For 50 DNA preps: 50 个 QIAamp MinElute 离心柱, 蛋白酶 K, Carrier RNA, 试剂, 收集管 (2ml)	56504
<b>QIAcube —— 利用 QIAGEN 离心柱试剂盒进行全自动的样本制备附件</b>		
Buffer ATL (200ml)	200 ml 组织裂解液	19076
Buffer AL (216ml)	216 ml 裂解液	19075
Buffer AW1 (concentrate, 242 ml)	242 ml 洗涤液 1, 浓缩液	19081
Buffer AW2 (concentrate, 324 ml)	324 ml 洗涤液 2, 浓缩液	19072
QIAGEN Proteinase K (2ml) <sup>†</sup>	2 ml (>600mAU/ml, 溶液)	19131
QIAshredder	50 个纯化核酸时候一次性使用的细胞裂解物均匀化离心柱, 带盖的。	79654
Collection Tubes (2ml)	1000 个 Collection Tubest 2 ml	19201
Tissuelyser (220-240V, 50/60 Hz)	实验室手持式混均器	85220
Grinding Jar Set, S. Steel (2x10ml)	2 个研磨罐 (10 ml), 2 个不锈钢研磨球	69985



# 订购信息

产品	规格	货号
<b>相关产品</b>		
<b>EZ1<sup>®</sup> DNA Investigator Kit —— 从多种法医和人类身份鉴定样本中轻松、自动化地纯化 DNA</b>		
EZ1 <sup>®</sup> DNA Investigator Kit (48)	在 EZ1 仪器上进行纯化制备的试剂条。48 份样品。Reagent Cartridges, Disposable Tip Holders, Disposable Filter-Tips, Sample Tubes, Elution Tubes, Buffers and Reagents; includes carrier RNA	952034
EZ1 DNA Investigator Card	EZ1 Investigator 实验程序卡	9016387
<b>MagAttract<sup>®</sup> M48 DNA Manual Kit —— 从多种人类样本中磁珠方法纯化 DNA, 适合法医应用。(原 M48 试剂盒)</b>		
MagAttract M48 DNA Manual Kit (200)	For approx.. 200 DNA preps MagAttract Suspension B, Buffers, Proteinase K	1064605
<b>QIAamp 96 DNA Swab BioRobot Kit —— 利用 BioRobot Universal System, 从拭子中高通量地自动纯化 DNA</b>		
QIAamp 96 DNA Swab BioRobot Kit (12)	For 12 x 96 DNA preps: 12 QIAamp 96 Plates, Buffers, QIAGEN Proteinase K, AirPore Tape Sheets, Tape Pad, S-Blocks, Racks with Collection Microtubes (1.2 ml), Caps	965842
<b>QIAamp DNA Stool Mini Kit —— 从粪便中纯化最多 30 µg 基因组、细菌、病毒和寄生虫 DNA</b>		
QIAamp DNA Stool Mini Kit	For 50 DNA preps: Mini Spin Columns, QIAGEN Proteinase K, InhibitEX <sup>®</sup> tablets, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	51504

## 订购信息

产品	规格	货号
<b>QIAamp DNA Blood Mini Kit —— 从血液和相关的体液中分离 DNA</b>		
QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	For 50 DNA preps: Mini Spin Columns, QIAGEN Proteinase , Reagents,Buffers, Collection Tubes (2 ml)	51104
<b>QIAamp DNA Mini Kit —— 用于 DNA 的分离</b>		
QIAamp DNA Mini Kit (50)	For 50 DNA preps: Mini Spin Columns, QIAGEN Proteinase K, Reagents,Buffers, Collection Tubes (2 ml)	51304
<b>QIAamp DNA Micro Kit —— 从少量样本中纯化基因组和线粒体 DNA</b>		
QIAamp DNA Micro Kit (50)	For 50 DNA preps: QIAamp MinElute Columns, QIAGEN Proteinase K, Reagents,Buffers, Collection Tubes (2 ml)	56304
<b>QIAamp DNA FFPE Tissue Kit —— 从福尔马林固定和石蜡包埋的组织中纯化 DNA</b>		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	For 50 DNA preps: QIAamp MinElute Columns, QIAGEN Proteinase K, Reagents,Buffers, Collection Tubes (2 ml)	56404

\* QIAcube 上可完全自动化。详见 [www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube)，了解实验方案。

† 还提供更大的试剂盒规格；敬请垂询。

QIAcube、BioRobot EZ1 workstation、BioRobot M48 workstation、BioRobot Universal System、EZ1 DNA Investigator Card 以及 App. Package, M48, Forensics 都仅供科研使用。无任何声明或陈述表示它们能为疾病的诊断, 预防或治疗提供信息。EZ1 DNA Investigator Kit、MagAttract DNA Mini M48 Kit、QIAamp 96 DNA Swab BioRobot Kit、QIAamp DNA Stool Mini Kit、QIAamp DNA Blood Mini Kit、QIAamp DNA Mini Kit、QIAamp DNA Micro Kit 以及 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit 都仅供一般实验室使用。无任何声明或陈述表示它们能为疾病的诊断, 预防或治疗提供信息。

Trademarks: QIAGEN<sup>®</sup>, QIAamp<sup>®</sup>, QIAcube<sup>®</sup>, BioRobot<sup>®</sup>, EZ1<sup>®</sup>, InhibitEX<sup>®</sup>, MagAttract<sup>®</sup>, MinElute<sup>®</sup> (QIAGEN Group); DACRON<sup>®</sup> (E.I. du Pont de Nemours and Company); FTA<sup>®</sup>, Whatman<sup>®</sup> (Whatman Group).

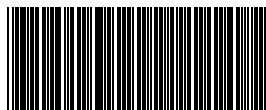
### Limited License Agreement

Use of this product signifies the agreement of any purchaser or user of the QIAamp DNA Investigator Kit to the following terms:

1. The QIAamp DNA Investigator Kit may be used solely in accordance with the QIAamp DNA Investigator Handbook and for use with components contained in the Kit only. QIAGEN grants no license under any of its intellectual property to use or incorporate the enclosed components of this Kit with any components not included within this Kit except as described in the QIAamp DNA Investigator Handbook and additional protocols available at [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Other than expressly stated licenses, QIAGEN makes no warranty that this Kit and/or its use(s) do not infringe the rights of third-parties.
3. This Kit and its components are licensed for one-time use and may not be reused, refurbished, or resold.
4. QIAGEN specifically disclaims any other licenses, expressed or implied other than those expressly stated.
5. The purchaser and user of the Kit agree not to take or permit anyone else to take any steps that could lead to or facilitate any acts prohibited above. QIAGEN may enforce the prohibitions of this Limited License Agreement in any Court, and shall recover all its investigative and Court costs, including attorney fees, in any action to enforce this Limited License Agreement or any of its intellectual property rights relating to the Kit and/or its components

For updated license terms, see [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2007 QIAGEN, all rights reserved.



LS201109006

凯杰企业管理（上海）有限公司

电话：+86-21-3865 3865

技术支持热线：800-988-0325 400-880-0325

TechService-CN@qiagen.com

www.qiagen.com

