

QIAquick Gel Extraction Kit Protocol

using a microcentrifuge

This protocol is designed to extract and purify DNA of 70 bp to 10 kb from standard or low-melt agarose gels in TAE or TBE buffer. Up to 400 mg agarose can be processed per spin column. This kit can also be used for DNA cleanup from enzymatic reactions (see page 8). For DNA cleanup from enzymatic reactions using this protocol, add 3 volumes of Buffer QG and 1 volume of isopropanol to the reaction, mix, and proceed with step 6 of the protocol. Alternatively, use the new MinElute Reaction Cleanup Kit.

- Notes:**
- The yellow color of Buffer QG indicates a pH ≤ 7.5 .
 - Add ethanol (96–100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).
 - Isopropanol (100%) and a heating block or water bath at 50°C are required.
 - All centrifugation steps are carried out at 13,000 rpm ($\sim 17,900 \times g$) in a conventional table-top microcentrifuge.
 - 3 M sodium acetate, pH 5.0, may be necessary.

1. Excise the DNA fragment from the agarose gel with a clean, sharp scalpel.

Minimize the size of the gel slice by removing extra agarose.

2. Weigh the gel slice in a colorless tube. Add 3 volumes of Buffer QG to 1 volume of gel (100 mg ~ 100 μ l).

For example, add 300 μ l of Buffer QG to each 100 mg of gel. For >2% agarose gels, add 6 volumes of Buffer QG. The maximum amount of gel slice per QIAquick column is 400 mg; for gel slices >400 mg use more than one QIAquick column.

3. Incubate at 50°C for 10 min (or until the gel slice has completely dissolved). To help dissolve gel, mix by vortexing the tube every 2–3 min during the incubation.

IMPORTANT: Solubilize agarose completely. For >2% gels, increase incubation time.

4. After the gel slice has dissolved completely, check that the color of the mixture is yellow (similar to Buffer QG without dissolved agarose).

If the color of the mixture is orange or violet, add 10 μ l of 3 M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The color of the mixture will turn to yellow.

The adsorption of DNA to the QIAquick membrane is efficient only at pH ≤ 7.5 . Buffer QG contains a pH indicator which is yellow at pH ≤ 7.5 and orange or violet at higher pH, allowing easy determination of the optimal pH for DNA binding.

5. Add 1 gel volume of isopropanol to the sample and mix.

For example, if the agarose gel slice is 100 mg, add 100 μ l isopropanol. This step increases the yield of DNA fragments <500 bp and >4 kb. For DNA fragments between 500 bp and 4 kb, addition of isopropanol has no effect on yield. Do not centrifuge the sample at this stage.

6. **Place a QIAquick spin column in a provided 2 ml collection tube.**
7. **To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column, and centrifuge for 1 min.**

The maximum volume of the column reservoir is 800 μ l. For sample volumes of more than 800 μ l, simply load and spin again.
8. **Discard flow-through and place QIAquick column back in the same collection tube.**

Collection tubes are re-used to reduce plastic waste.
9. **(Optional): Add 0.5 ml of Buffer QG to QIAquick column and centrifuge for 1 min.**

This step will remove all traces of agarose. It is only required when the DNA will subsequently be used for direct sequencing, in vitro transcription or microinjection.

10. **To wash, add 0.75 ml of Buffer PE to QIAquick column and centrifuge for 1 min.**

Note: If the DNA will be used for salt sensitive applications, such as blunt-end ligation and direct sequencing, let the column stand 2–5 min after addition of Buffer PE, before centrifuging.

11. **Discard the flow-through and centrifuge the QIAquick column for an additional 1 min at 13,000 rpm (~17,900 \times g).**

IMPORTANT: Residual ethanol from Buffer PE will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation.

12. **Place QIAquick column into a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.**

13. **To elute DNA, add 50 μ l of Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) or H₂O to the center of the QIAquick membrane and centrifuge the column for 1 min. Alternatively, for increased DNA concentration, add 30 μ l elution buffer to the center of the QIAquick membrane, let the column stand for 1 min, and then centrifuge for 1 min.**

IMPORTANT: Ensure that the elution buffer is dispensed directly onto the QIAquick membrane for complete elution of bound DNA. The average eluate volume is 48 μ l from 50 μ l elution buffer volume, and 28 μ l from 30 μ l.

Elution efficiency is dependent on pH. The maximum elution efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water, make sure that the pH value is within this range, and store DNA at -20°C as DNA may degrade in the absence of a buffering agent. The purified DNA can also be eluted in TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0), but the EDTA may inhibit subsequent enzymatic reactions.

Fyzikální mapování genomů

- přístup volen podle velikosti a komplexity genomu

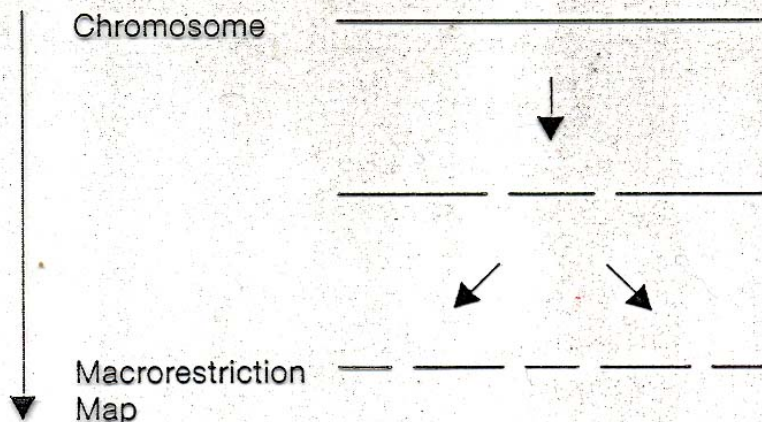
Základní strategie

- * restriční (makrorestriční) mapování
- * kontigové mapování (seřazení souvislých sekvencí genomu)
- * přímé sekvencování DNA

Základní strategie pro mapování a sekvencování velkých genomů

Top-Down

Shora dolů



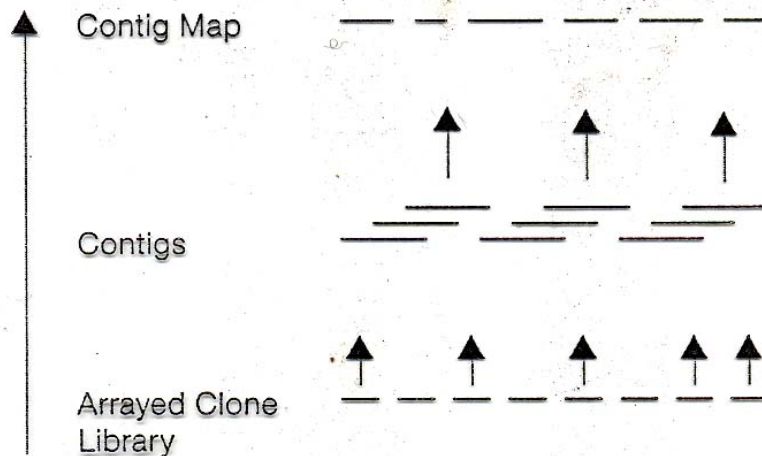
Štěpení RE

elektroforéza

hybridizace

Bottom-Up

Zdola nahoru

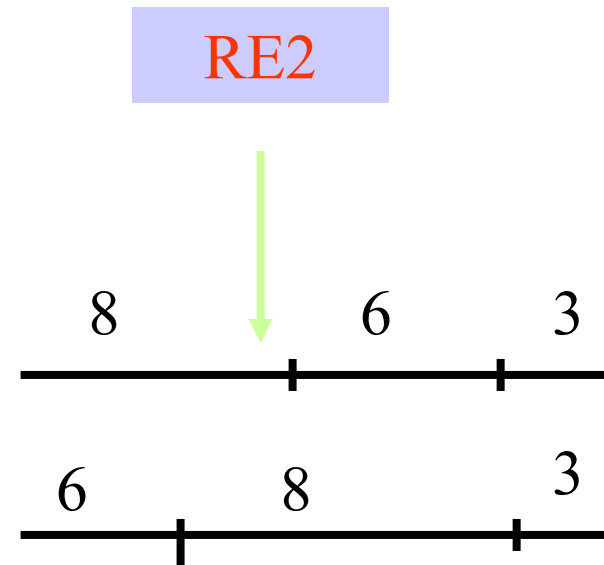
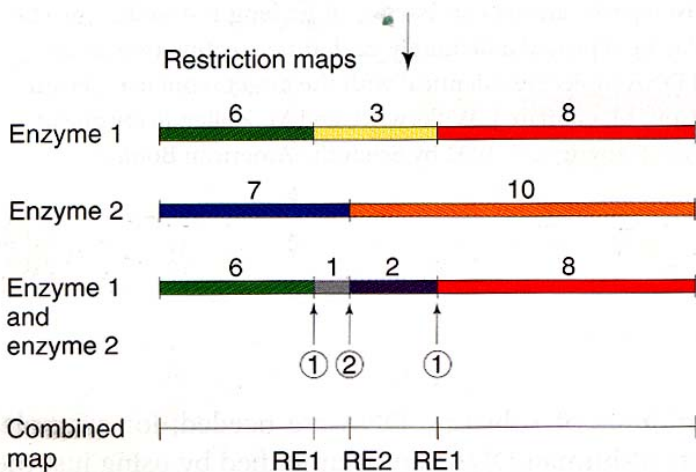
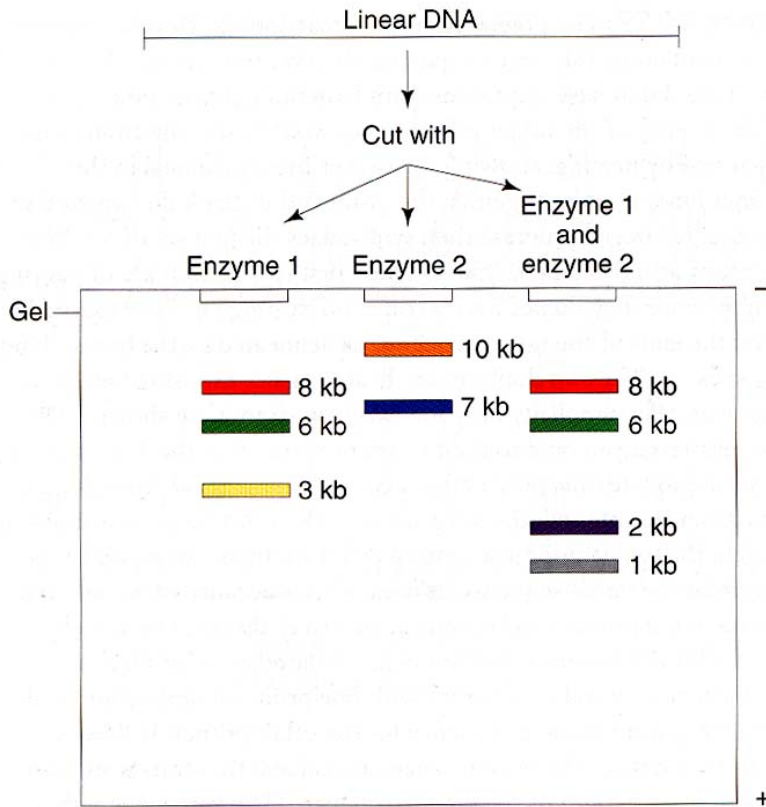


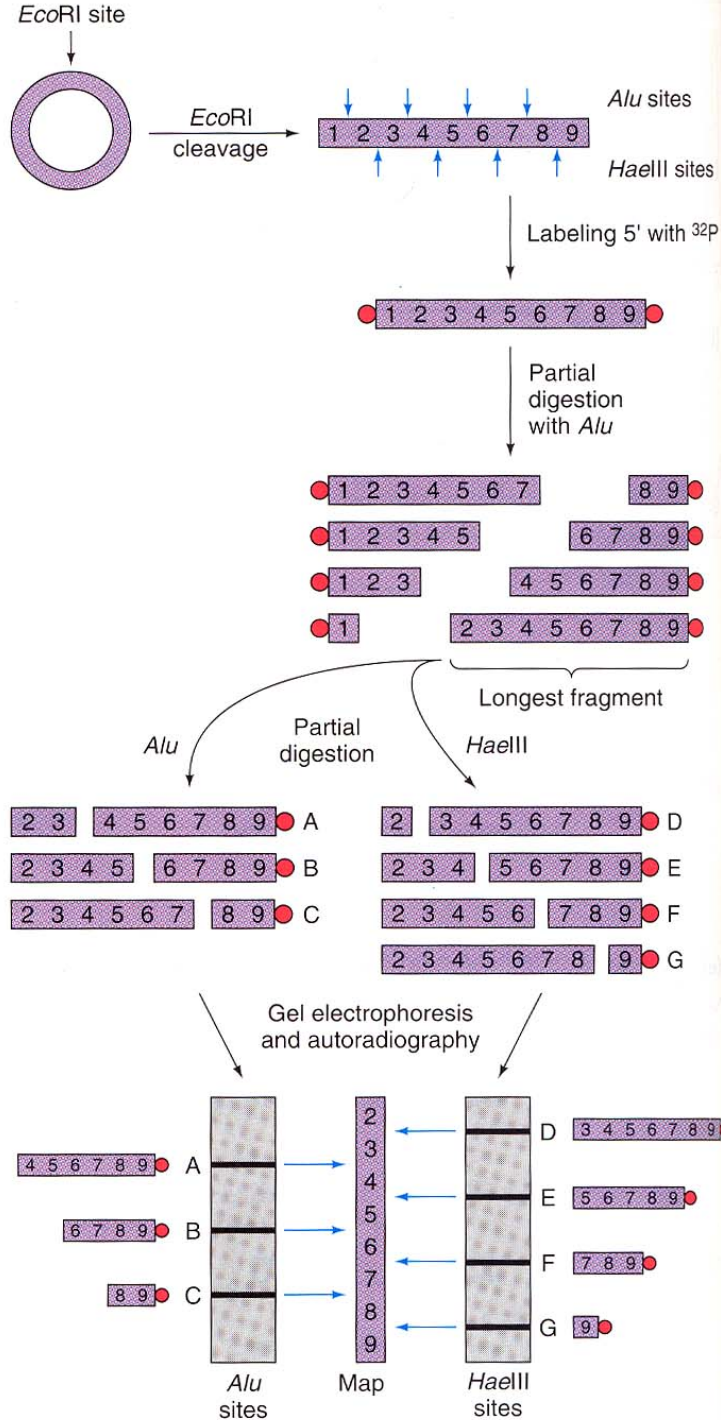
Uspořádání klonů

Srovnání klonů

Genomová knihovna

Restriční mapování srovnáním jednoduchého a dvojitého štěpení RE



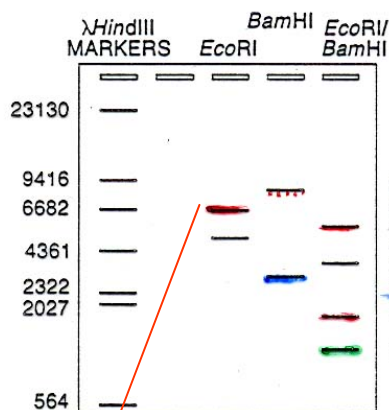
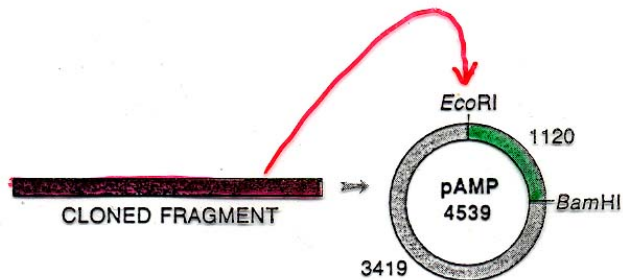


Restrikční mapování kružnicových molekul

1. Linearizace molekuly
2. Značení na koncích
3. Izolace nejdelšího fragmentu a jeho částečné štěpení RE1 a RE2
4. Elektroforéza, stanovení velikosti fragmentů a sestavení mapy

Restrikční mapování klonovaného fragmentu

(1)

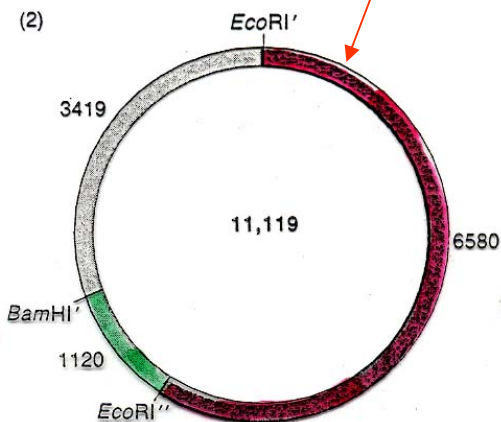


Poloha BamHI''

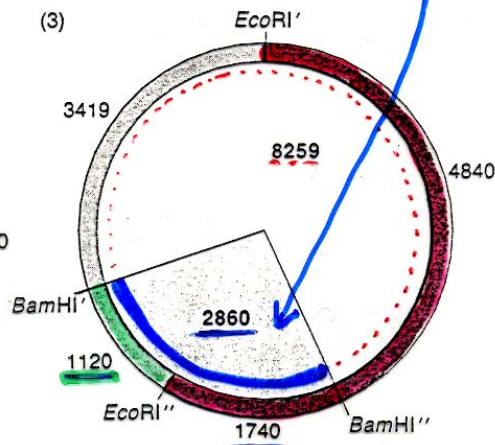
1120 + x = 2860 (nový fragment vzniklý štěpením BamHI)

$$x = 1740$$

(2)



(3)



Konstrukce restrikční mapy DNA genomu metodou dvojitého štěpení

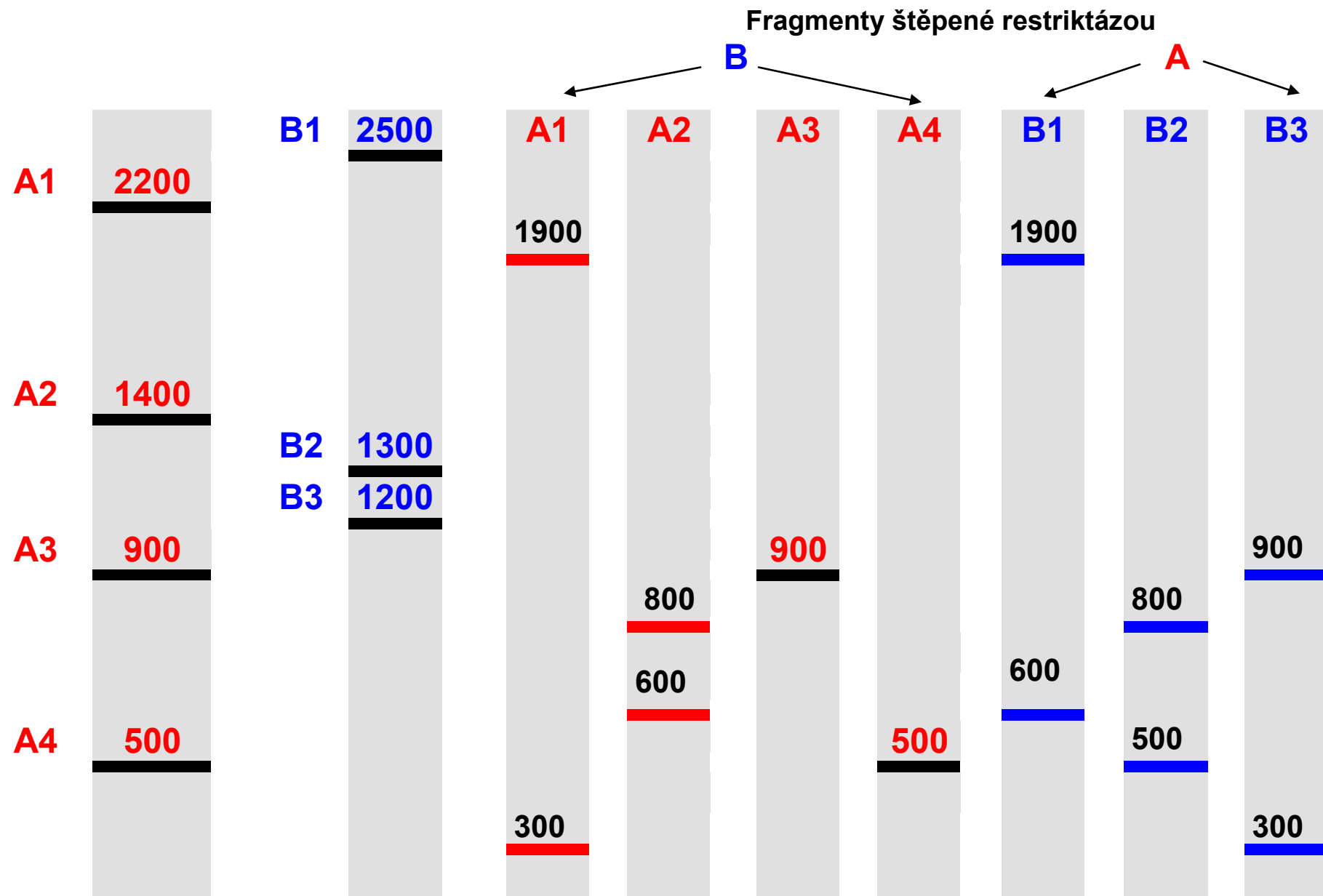
Restrikční místo = místo štěpení DNA restrikční endonukleázou

Restrikční mapa = fyzikální forma mapy vyjadřující vzdálenost RE míst, která je dána velikostí fragmentu DNA mezi dvěma sousedními RE-místy

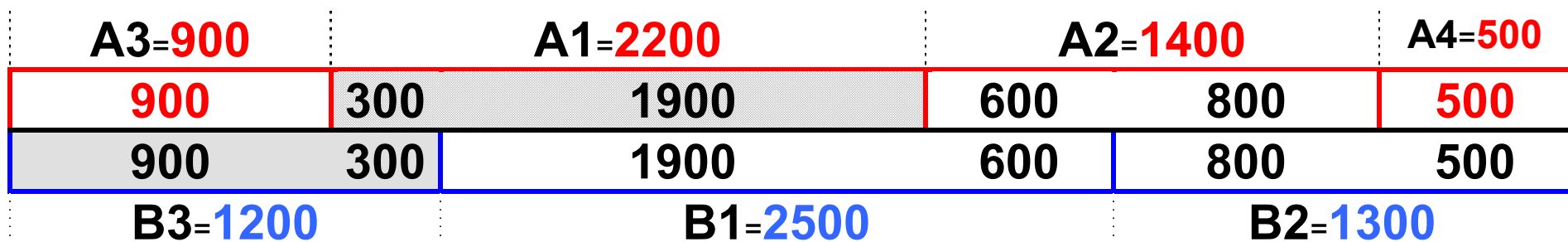
Metoda:

1. elektroforéza v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu
2. stanovení pozice fragmentů v gelu a jejich velikosti
3. izolace (eluce) fragmentů z gelu
4. štěpení izolovaných fragmentů další restriktázou
5. hledání překryvů mezi fragmenty, vzniklých působením dvou nebo více restriktáz.

Příklad: Vzorek DNA o velikosti **5 000 bp** je štěpený dvěma restriktázami (**A** a **B**)



Mapa DNA genomu štěpeného restriktázami A a B



Příklady z mapování DNA pomocí restriktáz

1.

a) restriktáza *SfiI* (S)

Označení primárního fragmentu	S1	S2	S3	S4	S5
Velikost primárního fragmentu (bp)	4 100	2 300	1 900	1 200	300
Velikost sekundárního fragmentu (bp)	3 300 800	2 100 200	1 800 100	700 500	300

b) restriktáza *RsaI* (R)

Označení primárního fragmentu	R1	R2	R3	R4
Velikost primárního fragmentu (bp)	3 500	3 100	2 300	900
Velikost sekundárního fragmentu (bp)	3 300 200	2 100 700 300	1 800 500	800 100

2.

a) restriktáza *ClaI* (C)

Označení primárního fragmentu	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Velikost primárního fragmentu (bp)	3 500	2 500	2 100	1 400	1 000	400	100
Velikost sekundárního fragmentu (bp)	3 500	2 200 300	1 900 200	800 600	1 000	400	100

b) restriktáza *Bam* HI (B)

Označení primárního fragmentu	B1	B2		B3	B4
		úplné štěpení	částečné štěpení		
Velikost primárního fragmentu (bp)	3 800	3 500		2 500	1 200
Velikost sekundárního fragmentu (bp)	3 500 300	2 200 800 400 100	2 300 2 200 1 300 1 200 800 500 400 100	1 900 600	1 000 200