

MicroGEM 快速入门指南
使用 **prepGEM Universal**
的DNA提取



更多详细信息，请访问
www.microgembio.com

或邮件
info@microgembio.com

MicroGEM International PLC: 仅供研究使用。所有产品均受限制使用许可。请参阅我们网站上的产品文档。

prepGEM

prepGEM 可从一系列的样本类型中提取DNA。有关更多信息，请访问 www.microgembio.com。

一般说明

- 所有操作需在洁净室或PCR工作台中进行。
- 应始终穿戴洁净服、手套和发网。
- 仅使用经过认证的无核酸试管和试剂。
- 使用0.05%漂白剂清洗会与样本接触的设备。用蒸馏水彻底冲洗。

当您的套件抵达时

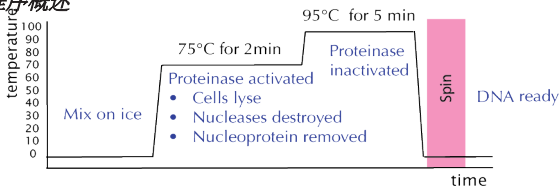
所述*Histosolv*是作为冻干粉形式递送，加入如下提示的无DNA水。

套件尺寸 (Rxn)	编码	加入的水 的体积
50	PUN0050	0.55 ml
100	PUN0100	1.1 ml
500	PUN0500	5.5 ml
1000	PUN1000	11.0 ml

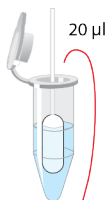
试剂储存

prepGEM试剂在室温下是稳定的，但收货后应储存在4°C。且试剂打开后应储存在-20°C下以防止意外污染。缓冲液可以储存在4°C以方便使用。

程序概述



口腔拭子



1. 用少量能覆盖拭子的无DNA水清洗口腔拭子。一个拭子一般需要400-500微升。将拭子压在管子侧面并转动以尽可能多地挤出液体。

另一种方法是剪下一部分拭子。



2. 在一个薄壁PCR管里加入：

20 µl	洗出液
10 µl	10x BLUE 缓冲液
69 µl	无DNA水
1 µl	<i>prep</i> GEM

确保在添加前搅拌悬浮液



3. 在以下温度进行温育

75°C—5分钟

95°C—2分钟

使用前混合

不要离心。

该DNA是高分子量，会在高速离心下沉淀。



样本现在可以进行分析。

该方法通常产生0.5 - 2 µl的DNA。这取决于取样的质量和拭子的大小。

7 组织培养

*prep*GEM DNA提取是低细胞数量的理想选择。由于用于*prep*GEM的缓冲液与大多数下游过程兼容，这意味着可以使用整个样本。此外，由于*prep*GEM不需要纯化步骤，因此可以**亚微升体积**下进行提取。

使用培养细胞，您可以获得5到约100,000个细胞的线性产量，是单细胞工作的理想选择。对于少量细胞，我们建议减少提取量。可用的最小体积取决于您使用的设备的蒸发量。

用于不同提取量的*prep*GEM推荐量如下。使用1/10体积的10X **BLUE**缓冲液。

提取体积	细胞数	<i>prep</i> GEM体积
50 - 100 微升	50,000 - 500,000	1 微升
20 - 50 微升	5000 - 50,000	1 微升
5 - 20 微升	100 - 5000	0.5 微升
1 - 15 微升	1 - 500	0.2 微升

样本处理因不同的样本类型而异。下面提供了一些建议步骤的概述。有关更多信息，请访问 www.microgembio.com。

处理不同的培养类型

在悬浮液里的细胞

1. 将悬浮液以 200 x g 离心5分钟。
2. 去除所有液体。
3. 将颗粒重悬于*prep*GEM提取试剂中。

7 细胞培养

处理不同的培养类型 (续)

贴壁细胞

若细胞在烧瓶中，通过优选方法（胰蛋白酶或细胞刮刀）移出细胞并以200 x g离心5分钟。否则，*prepGEM*试剂可以直接添加到粘附层。

1. 去除所有液体。
2. 加入*prepGEM*提取试剂。

储存在RNAlater™的细胞

1. 将悬浮液以3,000 x g离心5分钟。
2. 去除所有液体（在台式离心机上快速旋转有助于收集最后几滴）。
3. 将颗粒重悬于*prepGEM*提取试剂中。

细胞颗粒

使用推荐方法可以提取多达 5×10^5 个细胞。线性提取最好的效率可以在 <10个细胞至约 10^5 个细胞的范围内实现。细胞颗粒可以直接使用。又或，可将颗粒重悬于1X **BLUE**缓冲液里，并适量添加到提取中。

FACS和LCM

可以直接从提取试剂主混合物中收集细胞，或者将试剂直接添加到LCM的毛细管中。若细胞是从不同的缓冲液里收集，则有可能在收集后需要先添加1/10体积的*prepGEM*缓冲液。我们建议在制备后一小时内使用*prepGEM*试剂。对于长时间则应冷冻试剂。

*prepGEM*对EDTA和其他螯合剂敏感。如果细胞存在于含EDTA的溶液中，则应在200 x g下离心，并在使用前用1X **BLUE**缓冲液洗涤。

7 细胞培养

提取 (50微升反应 - 可以缩放到任何体积)

1. 加入:

细胞悬浮液或颗粒

5 μ l 10x **BLUE** 缓冲液

1 μ l *prep*GEM

加水至最终体积为50微升

2. 涡旋和温育:

75 °C —

- >50,000 个细胞 - 10分钟
- 1,000 - 50,000 个细胞 - 5分钟
- <1,000 个细胞 - 2分钟

95 °C —2分钟

保持在4 °C

此步骤可使用热循环仪。

3. 加入1/10体积的10x TE缓冲液并储存在-20°C或更低温度下。

7 组织

固体组织

将组织切成约1- 2 mm³的立方体。对于毛囊，使用1-3根头发。
将毛囊上方4毫米的毛干剪掉。



1. 在一个薄壁PCR管里混入：

79 μ l 无DNA水
10 μ l 10x ORANGE+缓冲液
1 μ l *prep*GEM
10 μ l *Histosolv*



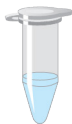
2. 加入样本。
3. 使用吸头尖端捣碎样本并通过涡旋分散。
4. 在热循环仪中进行温育：

52 °C —5分钟
75 °C —10分钟
95 °C —3分钟



5. 从残余物质中吸取提取物。

DNA就在溶液里。不要丢弃。



为了长期储存提取的DNA，加入1/10体积的10x TE缓冲液（100 mM Tris, pH 7.5, 10mM EDTA）。储存在-20 °C。

昆虫和老鼠尾巴

提取方法



1. 往材料添加 (对于更大/更小的起始样本, 可以按比例放大/缩小体) :

44 μ l PCR级水

5 μ l 10x **BLUE**缓冲液

1 μ l *prep*GEM

2. 在以下温度进行温育:

75 °C —15分钟

95 °C —2分钟

此步骤可使用热循环仪。

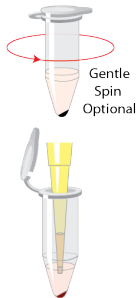
3. 将上清液转移到新管中。



DNA就在溶液里。不要丢弃。

此样本现可进行PCR。

储存时, 加入1x TE缓冲液, 储存在-20°C。



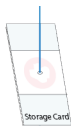
离心对于自动化是不合需求的, 一般也不需要。然而, 对于某些材料, 长达两分钟的5,000 x g 离心可能有助于澄清提取物。注意: 快速离心会造成基因组DNA沉淀。

根据组织的年龄和质量, 推荐使用0.1-5 μ l提取物进行25 μ l PCR。

采集卡上的唾液

根据不同的采集卡，卡中的防腐剂通常会抑制Taq DNA聚合酶。因此，在提取DNA前建议进行预清洗。

1. 从卡存放的样本中取出一个3毫米的圆盘放入薄壁PCR管或96孔板中。



拭子不均匀转移到卡片时会导致DNA产量变化。为获得最佳效果，请在卡上样本的中心打孔。

2. 通过在室温下温育15分钟，在100 μ l的无DNA水里对圆盘进行洗涤。从圆盘中吸取水并扔掉。



3. 在试管中加入：

5 μ l 10x **BLUE** 缓冲液
44 μ l 无DNA水
1 μ l *prepGEM*



4. 在热循环仪中进行温育：

75 $^{\circ}$ C —5分钟
95 $^{\circ}$ C —2分钟



5. 将溶液移液到新管中。

DNA在溶液里，不在圆盘里。



样本现可进行定量。

通常，在PCR中使用2-5 μ l。

血液方法

离心技巧

MicroGEM血液缓冲液是一种可以沉淀PCR抑制剂的专用配方。去除上清液时不应扰乱固体物质。

通常，在13,000 r.c.f.下长达5分钟足以得到包装良好的颗粒。对于较低r.c.f.的离心，应使用较长的旋转。例如，一个典型的96孔板，额定转速为3,000 r.c.f.的转子应旋转10分钟。提取后应立即进行离心。

笔记

- 产量将根据样本的WBC计数而变化。
- 有关如何优化提取血液DNA的信息，请访问我们的网站：

<http://www.microgembio.com/products/prepgem-universal/>

- 您应该知道血红素染色会携带到DNA上，使样本略呈粉红色。这不会抑制PCR、qPCR或人类谱分析。

液体血液



提取方法

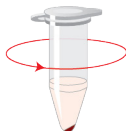
1. 在一个薄壁PCR管里加入：
2-5 μl 液体血液
10 μl 10x RED+ 缓冲液
1 μl *prepGEM*
加无DNA水至最终体积为100 μl



2. 在热循环仪中进行温育：
75°C — 5分钟
95°C — 5分钟

3. 在微量离心机中全速离心5分钟。

查看离心提示



4. 将上清液移液到新管中，不要扰乱颗粒。

此溶液含有DNA。
不要丢弃。



样本现在可以使用了。通常，5 μl 的1:5稀释度在PCR或HID分析中得到最佳结果。但根据您的应用，我们建议测试几种不同的稀释度。

新鲜血液的产量可达~0.5 ng/nl。

请访问www.microgembio.com 获取更多信息

采集卡上的血液

根据不同的采集卡，卡中的防腐剂通常会抑制Taq DNA聚合酶。因此，在提取DNA前建议进行预清洗。



1. 从卡存放的血液样本中取出一个3毫米的圆盘放入薄壁PCR管或96孔板中。为了获得最佳结果，请在血液样本中心区域打孔。
2. 通过在室温下温育15分钟，在100 μ l的无DNA水里对圆盘进行洗涤。从圆盘中吸取水并扔掉。
3. 在一个薄壁PCR管里加入：

5 μ l 10x **RED+**
44 μ l 无DNA水
1 μ l *prep*GEM



4. 在热循环仪中进行温育：
75 °C —5分钟
95 °C —5分钟



5. 以最高速离心2分钟并将上清液移液到新管中。

(查看离心提示)

DNA在溶液里 - 不在圆盘里。



样本现在可以进行定量。

通常，在PCR中使用2-5 μ l。

7 技术提示

- *prepGEM*是提取DNA的制备方法。该方法裂解细胞并从DNA中去除核蛋白。提取的DNA可用于多种类型的基因分型，包括SNP和STR分析以及定量、多重和终点PCR。
- 该方法没有浓缩步骤，因此提取物的浓度取决于：1) 样本的质量；2) 在拭子的情况下，拭子的类型和用于清洗拭子的水量；3) 提取量（在某些情况下可以缩放）。
- 使用*prepGEM*提取的DNA由于95°C加热步骤，因此主要是单链的。
- 为了准确评估产量，建议使用qPCR。如果要使用标准荧光螯合染料对样品进行标准化，我们建议在95°C步骤之前采集提取物样本。或者，您可以使用已量化的先前提取物生成标准曲线。
- 与任何用于提取核酸的制备方法一样，当样本在提取的前后均在4°C或冰上处理能获得最佳结果。
- 为了长期保存提取的DNA，将TE缓冲液加入1x（10 mM Tris, pH 7.5, 1mM EDTA）并储存在-20°C。

prepGEM 试剂在室温下稳定，但在打开试管后及为了长期储存，酶应该储存在-20°C，缓冲液应储存在4°C。

更多详细信息，请访问
www.microgembio.com

若您仍需要帮助，请发送邮件至：
info@microgembio.com

MicroGEM International PLC: 仅供研究使用。所有产品均受限制使用许可。请参阅我们网站上的产品文档。

QSG_001_190531_prepGEM Universal