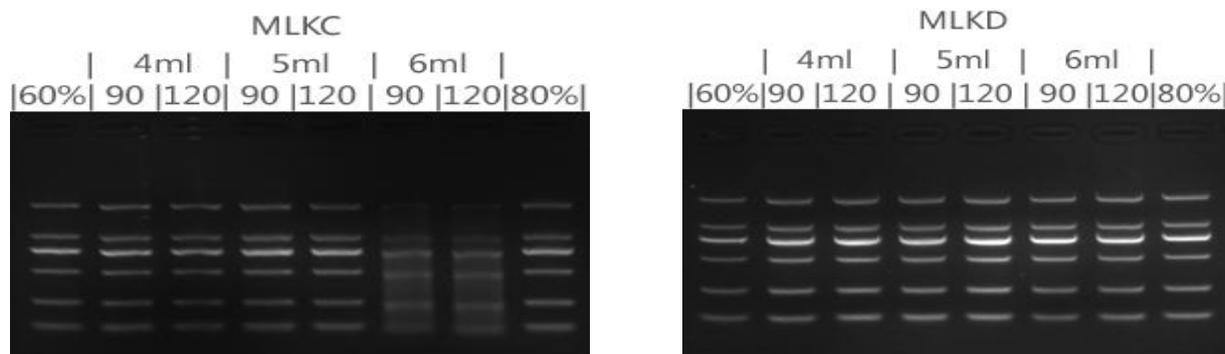


IVD5435-R48 24 孔板 (4 通道) 游离 DNA 性能验证报告

实验 1: 宏观 DNA Marker 回收效率

样品准备: 取 15ml 离心管中, 加入 35ul DL2000 DNA Marker, 然后加入 4ml、5ml 和 6ml 猪血浆混匀, 然后按 IVD5435-R48 预分装试剂盒进行提取和回收, 用 70ul 进行洗脱, 最后测 OD 值和电泳检测 DNA 的回收率。本次实验分别验证 MLKC 和 MLKD 两种结合体系的对不同体积血浆的外加 DNA Marker 的回收率和片段回收能力。

实验方案	MLKC 方案 (直接上样)	MLKD 方案 (机外消化充分释放 DNA)
样品前处理	不需要前处理, 只需要把猪血浆 (DNA Marker) 和 Proteinase K 加到第 1~3 孔样品中。	猪血浆 (DNA Marker), 加入 0.05 倍体积的 Buffer SDS 和 Proteinase K 混匀, 55 度温育 60 分钟, 然后把样品再转移第 1~3 孔中。
第 1 个孔	2.2 ml Buffer MLKC	2.2 ml Buffer MLKD
第 2 个孔	2.2 ml Buffer MLKC	2.2 ml Buffer MLKD
第 3 个孔	2.2 ml Buffer MLKC	2.2 ml Buffer MLKD
第 4 个孔	4.4 ml Buffer MAW1	
第 5 个孔	4.4 ml Buffer MW2&90~120ul MPG2	
第 6 个孔	2.8 ml Buffer MW2&75ul MPG2	



实验方案	样品量	运作时间	24 孔板类型	磁珠量	核酸 ng/ul	260/280	260/230	结果分析
MLKC(样品直接上机)	4ml	130 分钟	24 孔矮板 10ml	90ul	42.37	1.67	0.10	为了更直接分析核酸的回收率和纯度, 我们在 4~6ml 猪血浆添加 35ul DL2000 DNA Marker(约 3.0ug DNA), 然后用 MLKC 和 MLKD 两种方法提取总 DNA。 1: 从电泳来看, MLKC 和 MLKD 可以回收 100bp DNA 片段, 且回收率明显超过 60%, 并接近或超过 80% 对照回收率。 2: 从 OD 值来看, 不同体积的血浆用量和两种方法, 其 DNA 浓度相当, 表明三孔结合是可行的。 3: A260/280 比值能达到 1.65-1.78 表明核酸纯度高, 但由于核酸含量低且样品体积大, 磁珠用量多, 造成 A260/230 比较低。
				120ul	45.04	1.74	0.09	
	5ml			90ul	40.34	1.69	0.11	
				120ul	45.46	1.61	0.09	
	6ml			90ul	46.41	1.65	0.08	
				120ul	48.72	1.65	0.06	
MLKD(机外消化后上机)	4ml	56 分钟	24 孔矮板 10ml	90ul	51.03	1.73	0.13	
				120ul	56.80	1.68	0.10	
	5ml			90ul	52.13	1.72	0.13	
				120ul	64.88	1.69	0.10	
	6ml			90ul	41.26	1.71	0.11	
				120ul	47.05	1.71	0.08	

实验 2：微量 DNA 回收效率

样品准备：取 10ml 离心管中，加入 0.5ul 和 2ul DL2000 DNA Marker，然后加入 4ml 和 6ml 纯水混匀，然后按 IVD5435-R48 预分装试剂盒进行提取和回收，用 70ul 进行洗脱，最后测 qubit，计算 DNA 的回收率。本次实验分别验证 MLKC 和 MLKD 两种结合体系的对不同体积血浆的外加 DNA Marker 的回收率和片段回收能力。

实验方案	MLKC 方案 (直接上样)	MLKD 方案 (机外消化充分释放 DNA)
样品前处理	超低含量核酸：在 4ml 和 6ml 纯水中添加 31ng DNA。 中低含量核酸：在 4ml 和 6ml 纯水中添加 119 ng DNA。	
第 1 个孔	2.2 ml Buffer MLKC	2.2 ml Buffer MLKD
第 2 个孔	2.2 ml Buffer MLKC	2.2 ml Buffer MLKD
第 3 个孔	2.2 ml Buffer MLKC	2.2 ml Buffer MLKD
第 4 个孔	加入 1.33~2ml 样品 67-100ul Proteinase K	
第 5 个孔	加入 1.46~2.2ml 经 SDS 消化后样品	
第 7 个孔	4.4 ml Buffer MAW1	
第 5 个孔	4.4 ml Buffer MW2&90~120ul MPG2	
第 7 个孔	70ul Elution Buffer	

实验方案	核酸总添加	样品量	洗脱体积	磁珠量	Carrier RNA 添加量	实得洗脱液	Qubit(ng /ul)	产量 (ng)	实际回收率
MLKD 机外消化	119ng	4ml 纯水	70UL	90ul	0	55	1.77	95.58	80%
					150ng		1.88	103.40	87%
				120ul	0	52	1.81	94.12	79%
		150ng			1.92		99.84	84%	
		6ml 纯水		90ul	0	54	1.85	98.05	82%
					150ng		1.96	105.84	89%
120ul	0		52	1.87	97.24	82%			
	150ng	2.12		110.24	93%				
MLKD	119ng	4ml 纯水	70UL	90ul	0	55	1.70	93.60	79%
					150ng		1.89	103.74	87%
				120ul	0	52	1.87	97.20	82%
		150ng			1.93		100.40	84%	
		6ml 纯水		90ul	0	54	1.89	104.16	88%
					150ng		1.85	101.60	85%
120ul	0		52	1.89	98.40	83%			
	150ng	1.98		103.20	87%				

结果分析：

实验 3：洗脱体积损失原因。

手工操作：取 50ul/75/100/150ul MPG2 磁珠至 2.0ml 离心管中，加入 1.5ml Buffer MW2，混匀，吸磁后吸弃残液，短暂离心吸尽残液，55 度干燥 10 分钟，加入 70ul 洗脱液混匀，短暂离心后上磁力架，转移出洗脱液，并计算实得洗脱体积。

机器操作（不吸磁）：取 50ul/75/100/150ul MPG2 磁珠至第 6 孔，加入 2.5ml Buffer MW2，再洗脱孔加入 70ul 洗脱液，设定程序为：第 6 孔混匀后，吸磁，干燥 10 分钟，在第 7 孔中混匀，但不吸磁。手工转移含磁珠洗脱液至 1.5ml 离心管中，离心 1 分钟让磁珠形成紧密的沉淀，上磁力架，并计算出实得洗脱体积。

机器操作（吸磁）：取 50ul/75/100/150ul MPG2 磁珠至第 6 孔，加入 2.5ml Buffer MW2，再洗脱孔加入 70ul 洗脱液，设定程序为：第 6 孔混匀后，吸磁，干燥 10 分钟，在第 7 孔中混匀后吸磁，转移洗脱液并计算出实得洗脱体积。

磁珠用量	洗脱体积	离心管操作	48 孔板(8 通道提取仪)		24 孔板 (4 通道提取仪)	
		手工洗脱	机器吸磁 实得洗脱液	机器不吸磁 手工吸磁实得洗脱液	机器吸磁 实得洗脱液	机器不吸磁 手工吸磁实得洗脱液
50ul	70ul	66ul	58ul	63ul	59ul	63ul
75ul		63ul	55ul	61ul	55ul	59ul
100ul		62ul	52ul	60ul	51ul	55ul
150ul		60ul	50ul	55ul	47ul	53ul

洗脱液蒸发量：在洗脱条或 24 孔高板或矮板中，添加 70ul/90ul 洗脱液至洗脱孔中，运作程序，在洗脱前停止（不洗脱），然后测量洗脱液的体积，计算出放置 1 小时和 2 小时后，洗脱液的蒸发量，得到磁珠洗脱前实际的洗脱液。

洗脱液蒸发情况	试剂装量	仪器运作时间		试剂装量	仪器运作时间	
		1 小时蒸发量	2 小时蒸发量		1 小时蒸发量	2 小时蒸发量
洗脱条	70ul	8ul	18ul	90ul	8ul	17ul
24 孔矮板	70ul	8ul	17ul	90ul	9ul	18ul
24 孔高板	70ul	8ul	18ul	90ul	8ul	17ul

使用 MLKC 方案时，采用机内消化，仪器运行时间要 2 小时，48 通道提取时，上机时就加入洗脱液时，建议加入 90ul，处理 7-9ml 样品时，建议加入 100ul。

使用 MLKC 方案时，采用机外消化，仪器运行时间要 1 小时，48 通道提取时，上机时就加入洗脱液时，建议加入 80ul，处理 7-9ml 样品时，建议加入 90ul。

结果分析：

1. 采用手工洗脱时，由于离心步骤收集管壁液滴，以及离心后磁珠堆积更紧密，采用手工洗脱时，可以回收更多的洗脱液，每 10ul 磁珠会损失~1ul 洗脱液。
2. 用核酸提取仪操作时，由于深孔板孔壁和磁套的粘附，以及磁力吸磁时，磁珠堆积不紧密，溶液的表面张力造成大量洗脱液在洗脱吸磁时产生大量损耗，每 10ul 高达 2ul 洗脱液损耗。采用机器洗脱，但不吸磁，最后用人工把洗脱液连同磁珠一起转移至 1.5ml 离心管后，离心后再上磁力架，每 10ul 磁珠会损失~1.2ul。在实现自动化提取时，最后一步采用手工吸磁，可得到更多的 DNA。

实验 4：血浆样品提取效果

样品准备：取 6ml 猪血浆和牛血浆，然后按 IVD5435-R48 预分装试剂盒进行提取和回收，用 70ul 进行洗脱，最后测 qubit。

实验方案	MLKC 方案（直接上样）		MLKD 方案（机外消化充分释放 DNA）	
第 1 个孔	2.2 ml Buffer MLKC	加入 2ml 样品 100ul Proteinase K	2.2 ml Buffer MLKD	加入 2.2ml 经 SDS 消化后样品
第 2 个孔	2.2 ml Buffer MLKC		2.2 ml Buffer MLKD	
第 3 个孔	2.2 ml Buffer MLKC		2.2 ml Buffer MLKD	
第 4 个孔	4.4 ml Buffer MAW1			
第 5 个孔	4.4 ml Buffer MW2&90ul MPG2			
第 7 个孔	70ul Elution Buffer			

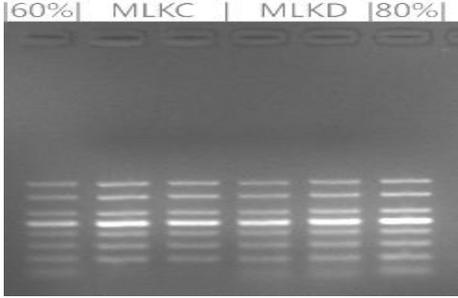
样品	结合液	Qubit(ng/ul)	洗脱体积	磁珠用量	实得洗脱体积 (ul)	实得产量 (ng)
6ml 纯水+2ul DNA Marker	MLKC	1.75	70ul	90ul	55	96.25
		1.76			55	96.8
	MLKD	1.79			56	100.24
		1.99			55	109.45
6ml 牛血浆	MLKC	2.66			55	146.3
		2.72			56	152.32
	MLKD	2.62			55	144.1
		2.52			55	138.6
6ml 猪血浆	MLKC	0.416	56	23.296		
		0.372	55	20.46		
	MLKD	0.242	56	13.552		
		0.266	56	14.896		

实验 5: 9ml 24 孔高板提取效果

样品准备: 取 9ml 猪血浆和牛血浆, 然后按 IVD5435-R48 预分装试剂盒进行提取和回收, 用 90ul 进行洗脱, 最后测 qubit。

实验方案	MLKC 方案 (直接上样)		MLKD 方案 (机外消化充分释放 DNA)	
第 1 个孔	3.3 ml Buffer MLKC	加入 3ml 样品 150ul Proteinase K	3.3 ml Buffer MLKD	加入 3.3ml 经 SDS/PK 消化后样品
第 2 个孔	3.3 ml Buffer MLKC		3.3 ml Buffer MLKD	
第 3 个孔	3.3 ml Buffer MLKC		3.3 ml Buffer MLKD	
第 4 个孔	6.6 ml Buffer MAW1			
第 5 个孔	6.6 ml Buffer MW2&130ul MPG2			
第 7 个孔	90ul Elution Buffer			

宏观 DNA Marker 回收效果

样品	结合液	核酸 ng/ul	A260/ A280	A260/ A230	
9ml 血浆加入 40ul 50bp DNA Marker	MLKC	26.454	1.682	0.085	
		24.682	1.655	0.082	
	MLKD	27.594	1.669	0.043	
		29.357	1.643	0.094	

微观回收率

样品	结合液	Carrier RNA	洗脱体积	Qubit(ng/ul)	实得洗脱体积 (ul)	实得产量 (ng)	回收率
9ml 灭菌水加 入 30ng DNA	MLKC	0	80ul 上机前加 入	0.354	53	28.32	89%
		150ng		0.382	52	30.56	96%
	MLKD	0		0.38	52	30.4	95%
		150ng		0.428	52	34.24	107%
9ml 灭菌水加 入 30ng DNA	MLKC	0	100ul* (洗脱时 再加入)	0.248	80	24.8	83%
		0		0.252	80	25.2	84%
	MLKD	0		0.31	80	31	103%
		0		0.276	80	27.6	92%
9ml 灭菌水加 入 120ng DNA	MLKC	0	80ul 上机前加 入	1.84	50	147.2	115%
		150ng		2.84	50	227.2	178%
	MLKD	0		1.97	52	157.6	123%
		150ng		2.6	52	208	163%

注: 由于 MLKC 方案仪器运作需要 130-140 分钟, 上机时加入 80~100ul Elution Buffer 至洗脱孔, 启动程序运作, 当程序运作到干燥步骤, 测量洗脱孔中的洗脱液体积时, 发现约有 15-18ul 洗脱液已经蒸发。

在上机前, 加入 80ul Elution Buffer 至洗脱孔中, 运作 100 分钟时, 约有 10~15ul Elution Buffer 蒸发, 折算出洗脱前实际只有 65ul。

在上机前, 不加入洗脱液, 等到程序运作到干燥时, 再加入 100ul Elution Buffer, 然后立即进行洗脱, 可以得到 80~83ul 洗脱液。

实验 6: 不同提取仪不同体积的 DNA 回收率差别

实验流程 (8 通道): 在 5ml 纯化水中添加 100ng DNA, 然后用 MLKD (机外 SDS 消化方案) 或 MLKC (机内消化) 进行纯化回收, 纯化时采用 MagMix 8 核酸提取仪进行提取, 为减少洗脱液的蒸发影响, 本次实验在程序运行完干燥时, 再添加 100ul Elution Buffer 至洗脱孔中再进行洗脱, 然后用 Qubit 定量, 计算出 DNA 回收率。

实验流程 (4 通道): 在 9ml 纯化水中添加 100ng DNA, 然后用 MLKD (机外 SDS 消化方案) 或 MLKC (机内消化) 进行纯化回收, 纯化时采用 MagMix 4 核酸提取仪进行提取, 为减少洗脱液的蒸发影响, 本次实验在程序运行完干燥时, 再添加 100ul Elution Buffer 至洗脱孔中进行洗脱, 然后用 Qubit 定量, 计算出 DNA 回收率。

样品	仪器	结合方式	结合液	洗脱体积	Qubit (ng/ul)	理论产量 ng	实得洗脱体积	理论回收率	实得回收率	仪器运行时间
5ml 纯水 添加 100ng DNA	MagMix 8 8 道提取仪 8 孔板	4 孔结合	MLKD 机外消化	100ul	0.942	94.2	85ul	93%	80%	1 小时
					0.986	98.6	85ul	98%	84%	
					0.956	95.6	85ul	95%	81%	
			MLKC 机内消化		0.99	99	85ul	98%	84%	2 小时
					0.796	79.6	85ul	79%	68%	
					0.816	81.6	85ul	81%	69%	
					0.82	82	85ul	81%	70%	
0.792	79.2	85ul	78%	67%						
	MLKD 机外消化	0.862	86.2	83ul	85%	72%	1 小时			
		0.828	82.8	83ul	82%	69%				
	MLKC 机内消化	0.708	70.8	83ul	70%	59%	2 小时			
0.69		69	83ul	68%	57%					

实验 7: 不同提取仪不同体积的血清血浆 DNA 提取对比

实验流程 (32 通道): 在 1.2ml 猪血浆或牛血浆, 然后用 MLKD (机外 SDS 消化方案) 或 MLKC (机内消化) 进行纯化回收, 纯化时采用 MagMix 32 核酸提取仪进行提取, 为减少洗脱液的蒸发影响, 本次实验在程序运行完干燥时, 再添加 100ul Elution Buffer 至洗脱孔中再进行洗脱, 然后用 Qubit 定量。

实验流程 (8 通道): 在 5ml 猪血浆或牛血浆, 然后用 MLKD (机外 SDS 消化方案) 或 MLKC (机内消化) 进行纯化回收, 纯化时采用 MagMix 8 核酸提取仪进行提取, 为减少洗脱液的蒸发影响, 本次实验在程序运行完干燥时, 再添加 100ul Elution Buffer 至洗脱孔中再进行洗脱, 然后用 Qubit 定量。

实验流程 (4 通道): 在 9ml 猪血浆或牛血浆, 然后用 MLKD (机外 SDS 消化方案) 或 MLKC (机内消化) 进行纯化回收, 纯化时采用 MagMix 4 核酸提取仪进行提取, 为减少洗脱液的蒸发影响, 本次实验在程序运行完干燥时, 再添加 100ul Elution Buffer 至洗脱孔中进行洗脱, 然后用 Qubit 定量。

样品	样品体积	仪器	结合方式	结合液	洗脱体积	Qubit ng/ul	理论产量 ng	实得洗脱液	每毫升产量	运行时间
猪血浆	1.2ml	32 通道 96 孔板	3 孔结合	MLKD 机外消化	干燥再 加入 100ul 洗脱液	0.131	13.10	90ul	10.92	50 分钟
						0.119	11.90	90ul	9.92	
				MLKC 机内消化		0.149	14.90	90ul	12.42	2 小时
						0.141	14.10	90ul	11.75	
	5ml	8 通道 48 孔板	4 孔结合	MLKD 机外消化		0.423	42.3	85ul	8.46	70 分钟
						0.406	40.6	85ul	8.12	
				MLKC 机内消化		0.452	45.2	85ul	9.04	2 小时
						0.408	40.8	85ul	8.16	
9ml	4 通道 24 孔高板	3 孔结合	MLKD/机外消化	0.786	78.60	83ul	8.73	70 分钟		
			MLKC/机内消化	0.776	77.60	83ul	8.62	2 小时		
牛血浆	1.2ml	32 通道 96 孔板	3 孔结合	MLKD 机外消化	干燥再 加入 100ul 洗脱液	0.690	69.00	90ul	57.50	50 分钟
						0.730	73.00	90ul	60.83	
				MLKC 机内消化		0.870	87.00	90ul	72.50	2 小时
						0.820	82.00	90ul	68.33	
	5ml	8 通道 48 孔板	4 孔结合	MLKD/机外消化		3.340	334.00	85ul	66.80	70 分钟
						3.260	326.00	85ul	65.20	
				MLKC/机内消化		3.770	377.00	85ul	75.40	2 小时
						3.590	359.00	85ul	71.80	
9ml	4 通道 24 孔高板	3 孔结合	MLKD/机外消化	6.052	605.2	83ul	67.2	70 分钟		
			MLKC/机内消化	5.985	598.5	83ul	66.5	2 小时		

实验 8：不同提取仪不同体积的血清血浆 DNA 提取对比 2 (含 Carrier RNA)

猪血浆：每 1ml 猪血浆，加入 30ng 纯化的 Low Marker (100~250bp)

实验流程 (8 通道)：取 3~5ml 猪血浆，然后用 MLKD (机外 SDS 消化方案) 或 MLKC (机内消化) 进行纯化回收，纯化时采用 MagMix 8 核酸提取仪进行提取，为减少洗脱液的蒸发影响，本次实验在程序运行完干燥时，再添加 90ul Elution Buffer 至洗脱孔中再进行洗脱，然后用 Qubit 定量。

实验流程 (4 通道矮板)：在 4~6ml 猪血浆，然后用 MLKD (机外 SDS 消化方案) 或 MLKC (机内消化) 进行纯化回收，纯化时采用 MagMix 4 核酸提取仪进行提取，为减少洗脱液的蒸发影响，本次实验在程序运行完干燥时，再添加 90ul Elution Buffer 至洗脱孔中进行洗脱，然后用 Qubit 定量。

实验流程 (4 通道高板)：在 7~9ml 猪血浆，然后用 MLKD (机外 SDS 消化方案) 或 MLKC (机内消化) 进行纯化回收，纯化时采用 MagMix 4 核酸提取仪进行提取，为减少洗脱液的蒸发影响，本次实验在程序运行完干燥时，再添加 90ul Elution Buffer 至洗脱孔中进行洗脱，然后用 Qubit 定量。

样品	仪器	结合方式	磁珠量	结合液	补添核酸	洗脱体积	Qubit ng/ul	理论产量 ng	实得洗脱液	每毫升产量	仪器运作时间				
3ml	8 通道	3 孔结合 48 孔板	75ul	MLKD 机外消化	每孔 加 150n g Carri er RNA	洗脱 前加 入 90ul 洗脱 液	1.54	138.6	75ul	46.20	70 分钟				
							1.47	132.3	75ul	44.10					
				MLKC 机内消化			1.58	142.2	75ul	47.40	2 小时				
							1.56	140.4	75ul	46.80					
5ml		4 通道矮板		4 孔结合 48 孔板			75ul	MLKD 机外消化	每孔 加 150n g Carri er RNA	洗脱 前加 入 90ul 洗脱 液	2.46	221.4	75ul	44.28	70 分钟
											2.48	223.2	75ul	44.64	
								MLKC 机内消化			2.62	235.8	75ul	47.16	2 小时
											2.58	232.2	75ul	46.44	
4ml	4 通道		3 孔结合 24 孔矮板	90ul	MLKD/机外消化	每孔 加 150n g Carri er RNA		洗脱 前加 入 90ul 洗脱 液			1.94	174.6	73ul	43.65	70 分钟
MLKC/机内消化											1.98	178.2	73ul	44.55	2 小时
6ml					MLKD/机外消化						2.87	258.3	73ul	43.05	70 分钟
											MLKC/机内消化	2.95	265.5	73ul	44.25
7ml		3 孔结合 24 孔高板	3 孔结合 24 孔高板		130ul		MLKD/机外消化		每孔 加 150n g Carri er RNA	洗脱 前加 入 90ul 洗脱 液	3.04	273.6	73ul	39.09	70 分钟
MLKC/机内消化											3.26	293.4	73ul	41.91	2 小时
9ml							MLKD/机外消化				3.6	324	73ul	36.00	70 分钟
											MLKC/机内消化	4.02	361.8	73ul	40.20