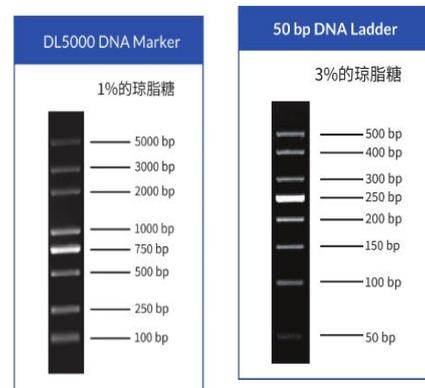
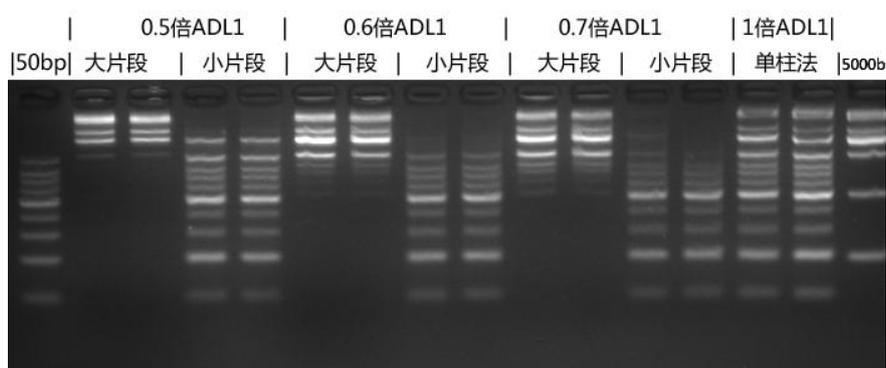


D3183 游离 DNA 富集试剂盒性能验证报告

实验 1：血浆中 DNA 片段分选效果。

- 分选：在 5ml 猪血浆中，加入 30ul 50bp DNA Marker 和 20ul 5000bp DNA Marker，然后按 D3183 试剂盒进行操作。操作简化为：含 5ml 不同 DNA 片段的猪血浆，加入 0.5ml PK 和 2.5ml (0.5 倍)，3ml (0.6 倍)和 3.5ml (0.7 倍)的 Buffer ADL1 混匀，55 度温育 1 小时后，转移至 DNA 纯化柱中吸附大片段，得到的滤液加入等倍体积的结合液 ADL2 混匀，转移至 DNA 纯化柱吸附小片段，吸附了大片段的大纯化柱和吸附了小片段的纯化柱经用清洗液清洗，最后用 40ul 洗脱液洗脱出 DNA，并用 2.0%琼脂糖凝胶电泳分析。
- 不分选（对照组）：在 5ml 猪血浆中，加入 30ul 50bp DNA Marker 和 20ul 5000bp DNA Marker，按 D3183 试剂盒操作，但样品直接过短片段的吸附柱，操作简化为：含 5ml 不同 DNA 片段的猪血浆，加入 0.5ml PK 和 5ml (1 倍)的 Buffer ADL1 混匀，55 度温育 1 小时后，加入等倍体积的结合液 ADL2 混匀，转移至 DNA 纯化柱吸附小片段，经用清洗液清洗后，最后用 40ul 洗脱液洗脱出 DNA，并用 2.0%琼脂糖凝胶电泳分析。



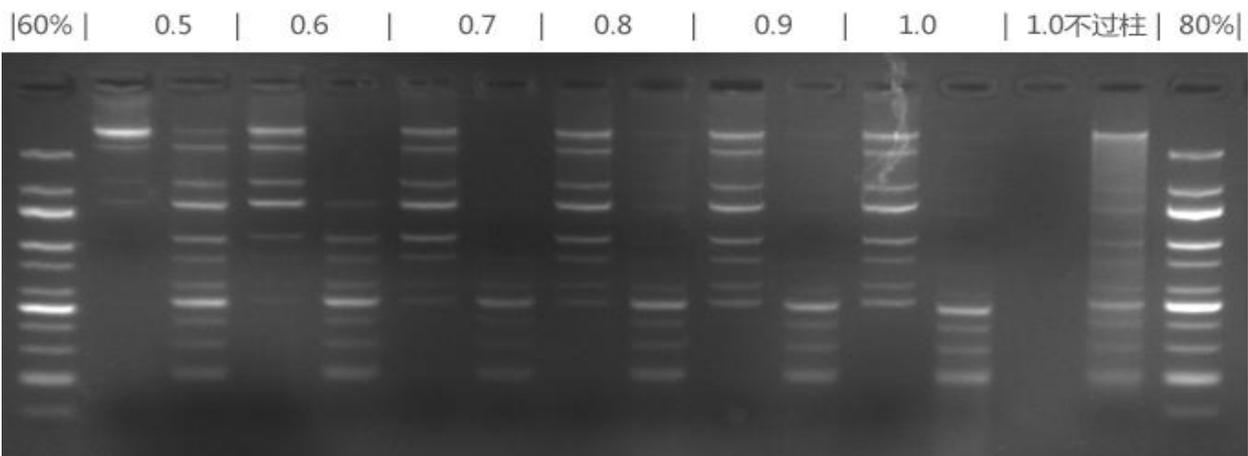
结果分析：

- 单柱法（不分选，对照组）把 50bp 和 5000bp DNA Marker 的全部 DNA 都可以回收，从 50bp 至 5000bp 都可以回收。
- 双柱分选中，在样品中添加 0.5~0.7 倍的 Buffer ADL1，大片段 DNA 纯化柱都可以高效吸附大于 1KB 以上 DNA 片段，随着 ADL1 的添加量增加，400~1000bp 的 DNA 可以不同程度的吸附。由于本次实验添加了大量的 5000 和 50bp DNA Marker，造成小片段吸附柱中，仍有少量的 1000~500bp 残留。

实验 2：血浆中 DNA 片段分选效果。

- 分选：在 2ml 猪血浆中，加入 30ul 50bp DNA Marker 和 20ul 5000bp DNA Marker，然后按 D3183 试剂盒进行操作。操作简化为：含 2ml 不同 DNA 片段的猪血浆，加入 0.2ml PK 和不同体积的 Buffer ADL 混匀，55 度温育 1 小时后，转移至 DNA 纯化柱中吸附大片段，得到的滤液补加入 ADL 和 0.5 倍异丙醇混匀，转移至 DNA 纯化柱吸附小片段，吸附了大片段的大纯化柱和吸附了小片段的纯化柱经用清洗液清洗，最后用 60ul 洗脱液洗脱出 DNA，并用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分析和测量 OD 值和 Qubit。
- 备注：本次洗脱时，离心速度为 8000rpm，洗脱体积为 60ul，实得 56-47ul。

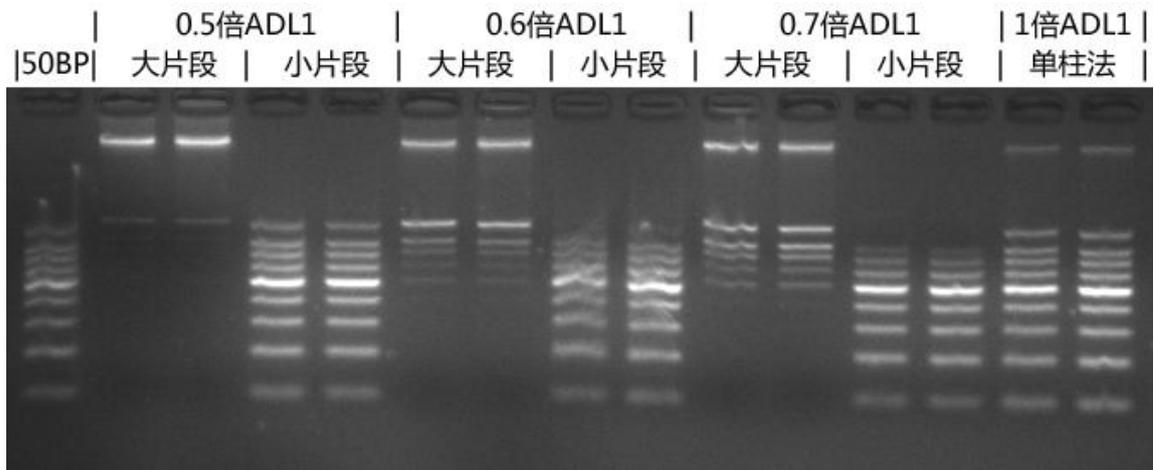
大片段	分选体积	片段	洗脱体 积	实得洗 脱体积	260/2 80	260/23 0	OD 浓度	QUBIT Ng	总量 ng	
条件 1 0.4 x	0.4x, 0.8ml ADL	大片段	60ul	45	1.333	0.304	5.095	11.22	112.6 2	
	1.2ml ADL, 1.0ml 异丙醇	小片段		46.5	1.683	0.5	23.415	101.4		
条件 2 0.5x	0.5x, 1.0ml ADL	大片段		46	1.497	0.44	13.171	46.5	149.1	
	1.0ml ADL, 1.0ml 异丙醇	小片段		47	1.62	0.587	24.836	102.6		
条件 3 0.6 x	0.6x, 1.2ml ADL	大片段		46	1.539	0.085	25.022	92.4	153	
	0.8ml ADL, 1.0ml 异丙醇	小片段		47	1.653	0.491	23.991	60.6		
条件 4 0.7 x	0.7x, 1.4ml ADL	大片段		46	1.464	0.061	24.82	114	151.8	
	0.6ml ADL, 1.0ml 异丙醇	小片段		46.5	1.55	0.545	18.82	37.8		
条件 5 0.8 x	0.8 x, 1.6ml ADL	大片段		46	1.598	0.385	28.702	140.4	186.6	
	0.4ml ADL, 1.0ml 异丙醇	小片段		46.5	1.67	0.645	28.368	46.2		
条件 6 0.9 x	0.9 x, 1.8ml ADL	大片段		46	1.57	0.474	19.346	123.6	166.8	
	0.2ml ADL, 1.0ml 异丙醇	小片段		46.5	1.764	0.765	37.665	43.2		
条件 7 1.0 x	1.0x, 2.0ml ADL	大片段		46	1.601	0.809	26.671	121.8	165	
	1.0ml 异丙醇	小片段		46.5	1.9	0.491	60.027	43.2		
条件 8 总核酸	1.0x ADL, 2.0ml 1.0ml 异丙醇	总片段		60ul	46.5	1.67	0.107	33.945	144	144



分析：从结果可以，D3183 在 0.5-0.8 倍的 ADL 中有良好的分选效果。

实验 3：含全血的血浆中 DNA 片段分选效果。

- 分选：在 5ml 猪血浆中，加入 0.1ml 全血和 30ul 50bp DNA Marker，然后按 D3183 试剂盒进行操作。操作简化为：5ml 含 DNA 片段和含全血的猪血浆，加入 0.5ml PK 和 2.5ml (0.5 倍)，3ml (0.6 倍)和 3.5ml (0.7 倍)的 Buffer ADL1 混匀，55 度温育 1 小时后，转移至 DNA 纯化柱中吸附大片段，得到的滤液加入等倍体积的结合液 ADL2 混匀，转移至 DNA 纯化柱吸附小片段，吸附了大片段的大纯化柱和吸附了小片段的纯化柱经用清洗液清洗，最后用 40ul 洗脱液洗脱出 DNA，并用 2.0%琼脂糖凝胶电泳分析。
- 不分选（对照组）：在 5ml 猪血浆中，加入 0.1ml 全血和 30ul 50bp DNA Marker，按 D3183 试剂盒操作，但样品直接过短片段的吸附柱，操作简化为：含 5ml 不同 DNA 片段的猪血浆，加入 0.5ml PK 和 5ml (1 倍)的 Buffer ADL1 混匀，55 度温育 1 小时后，加入等倍体积的结合液 ADL2 混匀，转移至 DNA 纯化柱吸附小片段，经用清洗液清洗后，最后用 40ul 洗脱液洗脱出 DNA，并用 2.0%琼脂糖凝胶电泳分析。



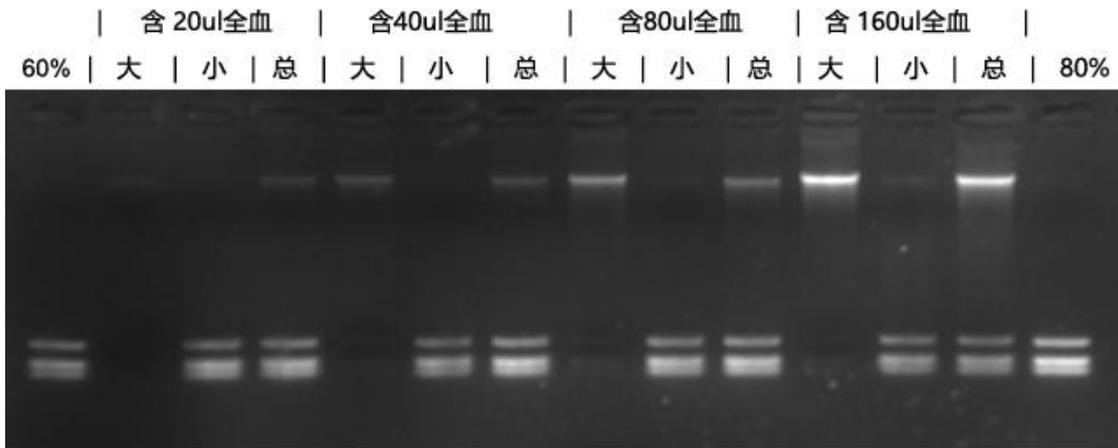
结果分析：

- 单柱法（不分选，对照组）：50bp DNA Marker 和 0.1ml 全血（基因组 DNA）添加猪血浆中，然后提取总 DNA。从数据来看，添加的 50bp DNA Marker 可以全部回收，而离电泳孔最近的大片段为基因组 DNA，是来自于 0.1ml 全血 DNA。
- 双柱分选中，在样品中添加 0.5~0.7 倍的 Buffer ADL1，大片段 DNA 纯化柱都可以高效吸附污染的全血的基因组 DNA，随着 ADL1 的添加量增加，大片段吸附柱可以吸附不同程序的 500bp (0.5 倍)，300-500(0.6 倍) 和 250-500bp(0.7 倍) 片段。从小片段吸附柱来看，0.6-0.7 倍 ADL1 还可以高效去除 500bp 的片段。

实验 4：含不同全血的血浆中 DNA 片段分选效果。

- 分选：取 30ul Low DNA Marker 至 5ml 离心管中，加入 20ul/40ul/80ul/160ul 猪血，然后补加入猪血浆至总体积为 2ml，加入 1.2ml (0.6x) Buffer ADL 和 0.1ml Proteinase K，混匀。55 度温育 30 分钟，转移至第一个柱子吸附大片段（提取总核酸时这一步不过柱），然后得滤液再加入 0.8ml Buffer ADL 和 1ml 异丙醇混匀，转移至第二个柱子，最后大片段柱子和小片段柱子，或总片段柱子都经过清洗液清洗，最后用 60ul Elution Buffer 洗脱出 DNA，测量 OD 值、qubit 浓度和电泳分析。

实验条件	血液比例	洗脱体积	片段	洗脱体积	实得洗脱体积	260/280	260/230	OD 浓度	QUBIT 总量
条件 1	20ul	60ul	大片段 DNA	60ul	51ul	1.632	0.174	6.813	7.32
			小片段 DNA		51ul	1.949	1.84	18.119	82.2
			总片段 DNA		54ul	1.848	0.942	25.66	89.4
条件 2	40ul		大片段 DNA		54ul	1.882	0.467	7.885	27.84
			小片段 DNA		54ul	1.859	0.417	21.384	78
			总片段 DNA		52ul	1.943	1.687	21.649	102.6
条件 3	80ul		大片段 DNA		54ul	2.214	2.289	10.805	68.4
			小片段 DNA		54ul	1.953	1.078	17.741	77.4
			总片段 DNA		54ul	1.939	0.646	24.96	129
条件 4	160ul		大片段 DNA		51ul	2.087	1.356	20.886	31.8
			小片段 DNA		51ul	1.969	0.943	16.552	84.6
			总片段 DNA		54ul	1.966	1.37	35.335	159.6



实验 5：猪血浆游离 DNA 提取效果。

- 分选：在 5ml 猪血浆中，然后按 D3183 试剂盒进行操作。操作简化为：5ml 猪血浆，加入 0.5ml PK 和 2.5ml (0.5 倍)，3ml (0.6 倍)和 3.5ml (0.7 倍)的 Buffer ADL1 混匀，55 度温育 1 小时后，转移至 DNA 纯化柱中吸附大片段，得到的滤液加入等倍体积的结合液 ADL2 混匀，转移至 DNA 纯化柱吸附小片段，吸附了大片段的大纯化柱和吸附了小片段的纯化柱经用清洗液清洗，最后用 40ul 洗脱液洗脱出 DNA，然后测 qubit 进行定量。
- 不分选（对照组）：在 5ml 猪血浆中，按 D3183 试剂盒操作，但样品直接过短片段的吸附柱，操作简化为：含 5ml 不同 DNA 片段的猪血浆，加入 0.5ml PK 和 5ml (1 倍)的 Buffer ADL1 混匀，55 度温育 1 小时后，加入等倍体积的结合液 ADL2 混匀，转移至 DNA 纯化柱吸附小片段，经用清洗液清洗后，最后用 40ul 洗脱液洗脱出 DNA，，然后测 qubit 进行定量。

实验方案	实验条件	样品名称	qubit 值 (ng/ul)	产量 (ng)
分选	0.5 倍 ADL1	大片段	0.0410	2.05
			0.0332	1.66
		小片段	0.3840	19.20
			0.4640	23.20
	0.6 倍 ADL1	大片段	0.0500	2.50
			0.0560	2.80
		小片段	0.3980	19.90
			0.3880	19.40
	0.7 倍 ADL1	大片段	0.0772	3.86
			0.0860	4.30
		小片段	0.3840	19.20
			0.3640	18.20
不分选	1 倍 ADL1	单柱	0.4100	20.50
			0.3680	18.40

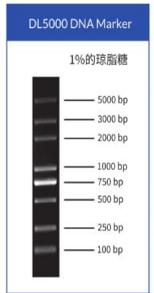
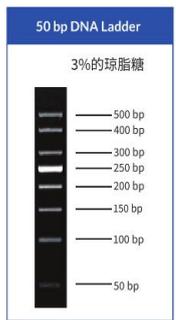
结果分选：

- 不分选：猪血浆样品经 D3183 试剂盒进行提取，不分选的条件下，5ml 猪血浆含有 18-20ng。
- 分选：猪血浆样品经 D3183 试剂盒进行分选提取，小片段的游离 DNA 含量为 19-20ng，与不分选的总量是一样的，这表明当样品中不含有大片段 DNA 时，大片段吸附柱不会影响小片段 DNA 的吸附，这说明 D3183 进行分选时，不会影响到短片段游离 DNA 的吸附。

实验 6：微量 DNA 的分选效果

- 分选：在 5ml 纯水中，分别加入 200ng 50bp DNA Marker 或 200ng 5000bp DNA Marker，然后按 D3183 试剂盒进行操作。操作简化为：5ml 含不同 DNA 片段的纯水，加入 0.5ml PK 和 2.5ml (0.5 倍)，3ml (0.6 倍) 和 3.5ml (0.7 倍) 的 Buffer ADL1 混匀，55 度温育 1 小时后，转移至 DNA 纯化柱中吸附大片段，得到的滤液加入等倍体积的结合液 ADL2 混匀，转移至 DNA 纯化柱吸附小片段，吸附了大片段的大纯化柱和吸附了小片段的纯化柱经用清洗液清洗，最后用 40ul 洗脱液洗脱出 DNA，然后测 qubit 进行定量，计算出大片段纯化柱和小片段纯化柱的回收率，以及总回收率。

3.12 微量回收率				
Buffer ADL1 加入的倍数	0.5 倍	0.6 倍	0.7 倍	1 倍
短片段核酸分选回收率：5ml 纯化中，添加 200ng 50bp DNA Marker，然后进行回收				
大片段吸附柱产量	5.2	10.4	10.700	12
大片段吸附柱回收率	2.6%	5.2%	5.4%	6.0%
小片段吸附柱产量	167	164	167	177
小片段吸附柱回收率	83.5%	82.0%	83.5%	88.5%
总回收率	86.1%	87.2%	88.85%	94.5%
大片段核酸分选回收率：5ml 纯化中，添加 200ng 5000bp DNA Marker，然后进行回收				
微量柱（大）	64.4	81.1	99.4	129
回收率（大）	32.2%	40.6%	49.7%	64.5%
微量柱（小）	110	91.8	74.6	45.3
回收率（小）	55.0%	45.9%	37.3%	22.65%
回收率（总）	87.2%	86.5%	87.0%	87.15%



通过短片段和长片段的微量回收来看，该产品高效去除长片段核酸，随着 ADL1 加入量至 1 倍时，可以高效去除大片段核酸，而对短片段核酸基本没有影响，说明分选效果充分。

实验 7：分选与不分选 DNA 的对比效果

- 宏观样品，分选和不分选对比：在 5ml 纯水和 5ml 猪血浆中，加入 30ul 或 3ul Low DNA Marker，然后加入 2.5ml (0.5x)或 3ml (0.6x) Buffer ADL，以及 0.5ml Proteinase K，55 度温育 30 分钟，然后转移至第一个柱子吸附大片段（不分选时，不过柱子），得到的滤液或混合液（不分选），补加入 ADL 至总体积为 5ml，加入 2.5ml 异丙醇，混匀，转移至柱子中，最后两个柱子都经过清洗液清洗，并用 60ul Elution Buffer 洗脱出 DNA，测量 OD 值和 Qubit。

小片段	核酸添加量	ADL		洗脱体积	片段	实得洗脱体积	260/280	260/230	OD 浓度	QUBIT 总量
条件 1	微量 3ul Low Marker	2.5ml 0.5x	纯水	60ul	大片段 DNA	52ul	1.343	0.109	1.648	0
			猪血浆		小片段 DNA	55ul	1.906	0.008	5.958	10.128
		3.0ml 0.6 x	纯水		大片段 DNA	52ul	1.355	0.155	5.32	0
			猪血浆		小片段 DNA	55ul	1.468	0.035	8.735	6.9
条件 2		3.0ml 0.6 x	纯水		大片段 DNA	56ul	1.5	0.082	5.041	0.096
			猪血浆		小片段 DNA	55ul	1.868	0.009	4.218	10.8
		2.5ml 0.5 x	纯水		大片段 DNA	56ul	1.536	0.024	7.537	0.3
			猪血浆		小片段 DNA	55ul	1.51	0.026	8.504	8.76
条件 3	宏观 30ul Low Marker	2.5ml 0.5 x	纯水	60ul	大片段 DNA	51ul	0.825	0.018	8.558	0.48
			猪血浆		小片段 DNA	54ul	1.446	0.048	26.839	75
		3.0ml 0.6 x	纯水		大片段 DNA	51ul	1.117	0.033	2.963	0
			猪血浆		小片段 DNA	54ul	1.458	0.045	24.217	82.8
条件 4		3.0ml 0.6 x	纯水		大片段 DNA	54ul	0.897	0.02	6.004	0.3
			猪血浆		小片段 DNA	54ul	1.489	0.044	22.947	81
		2.5ml 0.5 x	纯水		大片段 DNA	54ul	1.074	0.026	7.862	0.24
			猪血浆		小片段 DNA	54ul	1.529	0.038	19.996	81.9