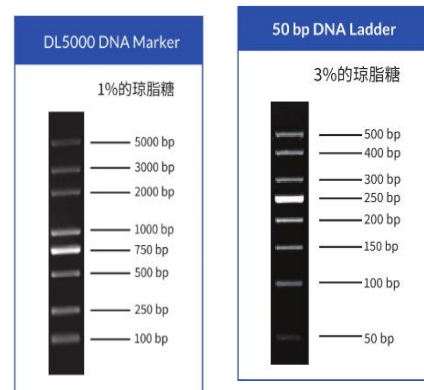
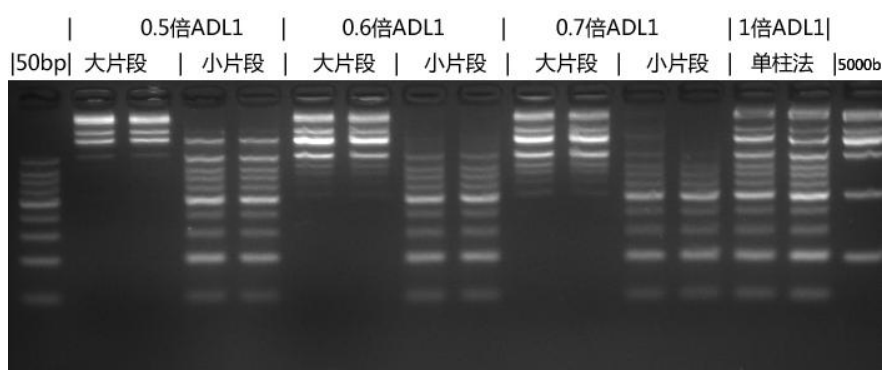


D3183 游离 DNA 富集试剂盒性能验证报告

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。



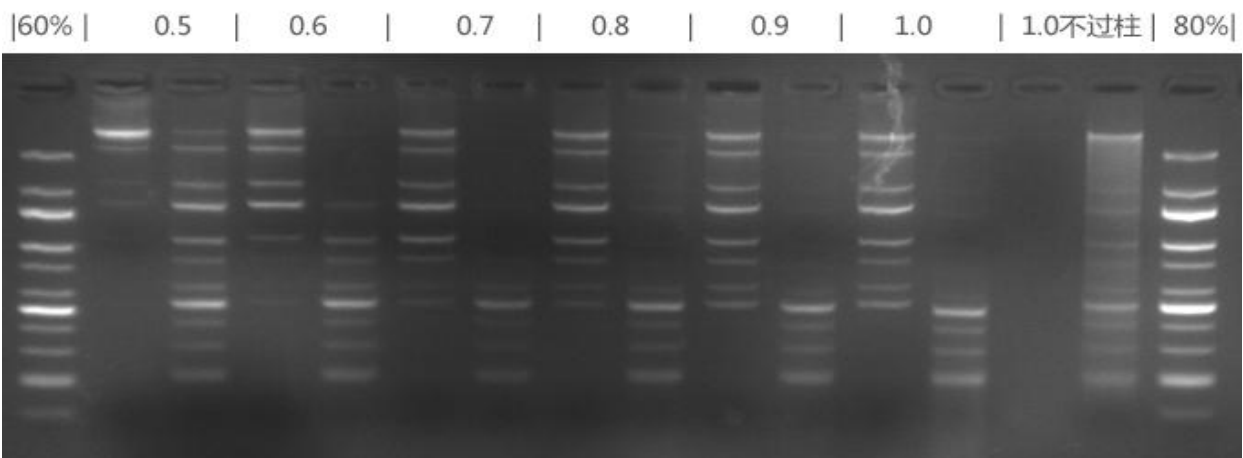
结果分析：

- 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。

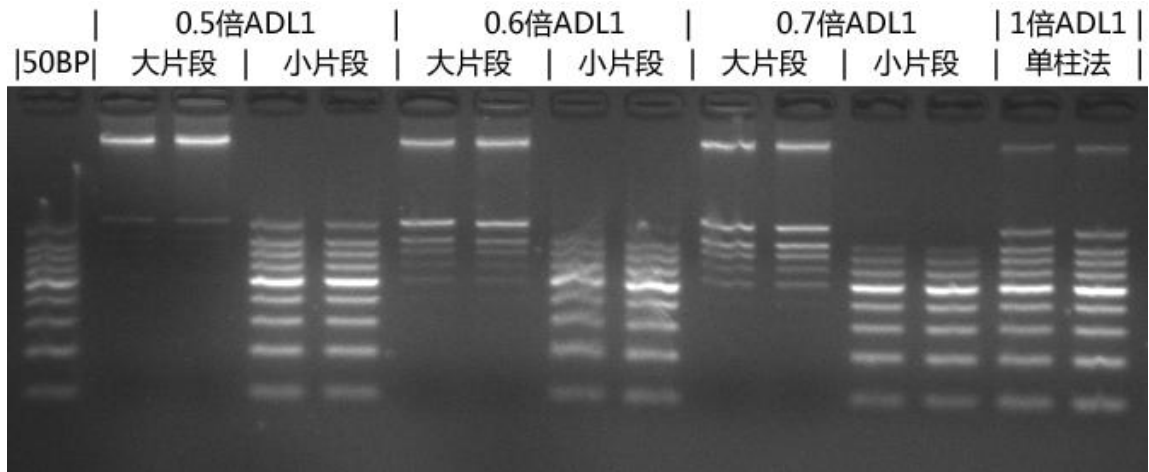
| 大片段 | 分选体积 | 片段 | 洗脱体 积 | 实得洗 脱体积 | 260/2 80 | 260/23 0 | OD 浓度 | QUBIT Ng | 总量 ng | |
|---------------|------------------------------|-----|----------|------------|-------------|-------------|----------|-------------|------------|-----|
| 条件 1 0.4 x | 0.4x, 0.8ml ADL | 大片段 | 60ul | 45 | 1.333 | 0.304 | 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。



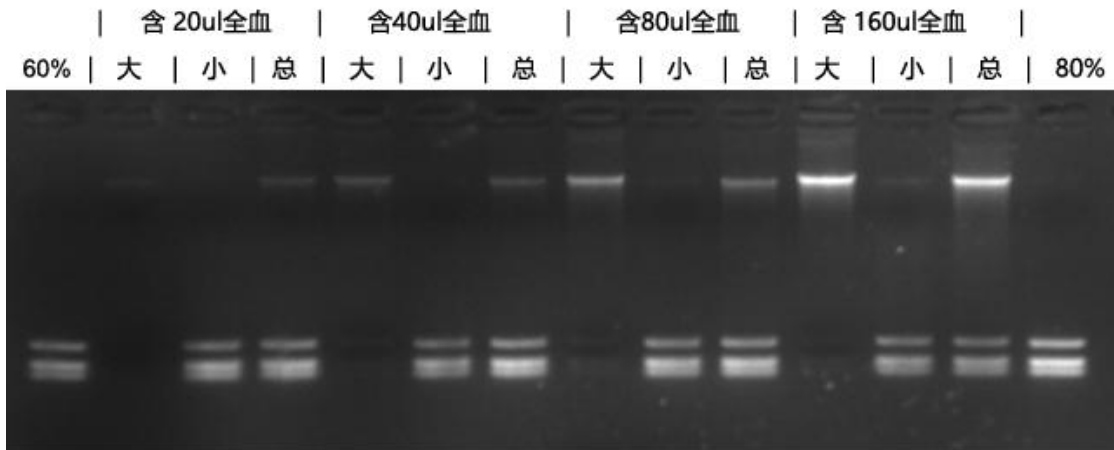
结果分析：

- 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 |

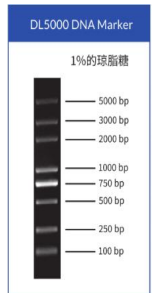
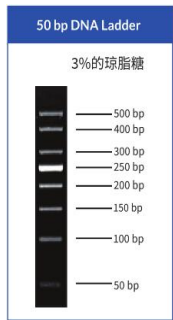
结果分选：

- 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 |
| | | | | | 小片段 DNA | 55ul | 1.906 | 0.008 | 5.958 | 10.128 |
| | | | 猪血浆 | | 大片段 DNA | 52ul | 1.355 | 0.155 | 5.32 | 0 |
| | | | | | 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 |
| | | | | | 小片段 DNA | 55ul | 1.868 | 0.009 | 4.218 | 10.8 |
| | | | 猪血浆 | | 大片段 DNA | 56ul | 1.536 | 0.024 | 7.537 | 0.3 |
| | | | | | 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 | 大片段 DNA | 51ul | 0.825 | 0.018 | 8.558 | 0.48 | |
| | | | | 小片段 DNA | 54ul | 1.446 | 0.048 | 26.839 | 75 | |
| | | | 猪血浆 | 大片段 DNA | 51ul | 1.117 | 0.033 | 2.963 | 0 | |
| | | | | 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 | |
| | | | | 小片段 DNA | 54ul | 1.489 | 0.044 | 22.947 | 81 | |
| | | | 猪血浆 | 大片段 DNA | 54ul | 1.074 | 0.026 | 7.862 | 0.24 | |
| | | | | 小片段 DNA | 54ul | 1.529 | 0.038 | 19.996 | 81.9 | |