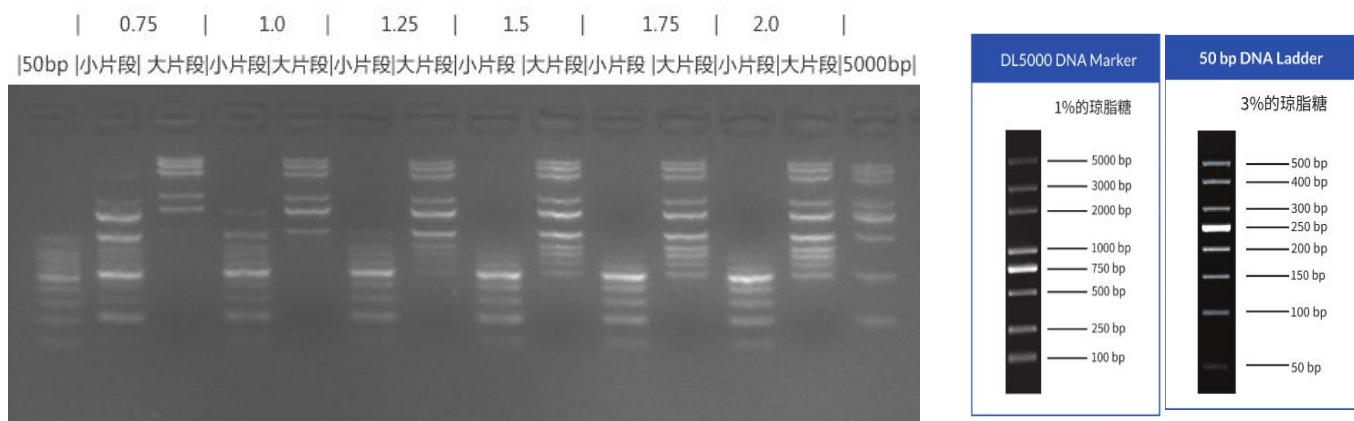


D2125 DNA 分选纯化试剂盒性能验证报告

实验 1: 大量的 DNA 片段分选效果。

- 分选: 取 10ul 50bp DNA Marker 和 10ul 5000bp DNA Marker, 补 180ul PCR Buffer 至总体积为 200ul。分别加入 150ul, 200ul, 300ul 和 400ul Buffer AXL, 颠倒混匀, 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 20ul 洗脱液洗脱出 DNA, 并用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。



结果分析:

- 小片段 DNA 分析 1: 随着 Buffer AXL 加入体积增加, 小片段吸附柱结合得到的 DNA 越来越少。当 Buffer AXL 加入 0.75 倍时, 小片段中含有 750-1000bp 的片段, 2000bp 以上 DNA 片段被充分去除; 当 Buffer AXL 添加至 1 倍时, 750bp 片段只能隐隐可见, 说明 750bp 以上的片段被充分去除; 当加入 1.5 倍的 Buffer AXL 时, 500bp 片段被完全去除, 但 250-400bp 也有少量的损失, 当加入 2.0 倍的 Buffer AXL, 300-400bp 以上的片段被大部分去除, 余下明显可见的 250bp 片段。
- 小片段 DNA 分析 2: 50-100bp 可高效回收。
- 大片段 DNA 分析: 随着 Buffer AXL 加入的体积增加, 大片段吸附柱会吸附更多短片段的 DNA。加入 0.75 倍 Buffer AXL 时, 最小片段是 750bp(只吸附了小部分); 加入 1 倍 Buffer AXL 时, 最小片段是 500bp(约占 30-40%), 而 750bp 被大部分吸附; 加入 1.25-1.5 倍 Buffer AXL 时, 500-300bp 被不同程度的吸附, 其中 500-400bp 被高效的吸附。当加入 2.0 倍的 Buffer AXL 时, 250-300bp 被不同吸附, 其中 250bp 约占 30%。

实验 2：微量的混合 DNA (50~5000bp)回收效率

- 单柱纯化：在 200ul PCR Buffer 中添加 1ul 50bp DNA Marker 和 1ul 5000bp DNA Marker (相当于 121ng)，然后添加 150~400ul Buffer AXL 混匀，然后再加入 0.25 倍体积的异丙醇，混匀，转移至纯化柱离心，用 Buffer DCW2 清洗两次，最后用 20ul 洗脱出 DNA，测量 Qubit，计算回收率。
- 双柱纯化：在 200ul PCR Buffer 中添加 1ul 50bp DNA Marker 和 1ul 5000bp DNA Marker (相当于 121ng)，然后添加 150~400ul Buffer AXL 混匀，转移至纯化柱吸附大片段 DNA，得到的滤液再加入 0.25 倍体积的异丙醇，混匀，转移至纯化柱离心吸附小片段 DNA，得两种纯化柱用 Buffer DCW2 清洗两次，最后用 20ul 洗脱出 DNA，测量 Qubit，计算回收率。

纯化方法		不同 AXL 添加量时，核酸的回收率			
Buffer AXL 添加量		150ul/0.75 倍	200ul/1.0 倍	300ul/1.5 倍	400ul/2 倍
核酸添加量		200ul PCR Buffer 添加 121ng 50/5000bp DNA Marker，得到含 50~5000bp 的 DNA 产物。			
单柱纯化	单柱产量	98.8ng	102.8ng	103.2ng	105.2ng
	单柱回收率	81%	85%	85%	87%
单柱纯化：200ul DNA 产物+150-400ul Buffer AXL，然后加入总体积的 0.25 倍的异丙醇，混匀，过纯化柱，经清洗液 DW2 清洗两次，最后用洗脱液洗脱出 DNA。					
双柱纯化	大片段柱产量	0.654ng	0.995ng	1.2ng	1.43ng
	大片段回收率	22%	33%	40%	48%
	小片段柱产量	2.04	1.42	1.43	1.47
	小片段柱回收率	68%	47%	48%	49%
	合并回收率	90%	80%	87%	96%
双柱纯化：200ul DNA 产物+150-400ul Buffer AXL，过纯化柱吸附大片段（大片段柱），得滤液，加入 0.25 倍的异丙醇，混匀，过纯化柱吸附小片段（小片段柱），两个纯化柱都经清洗液 DW2 清洗两次，最后用洗脱液洗脱出 DNA。					

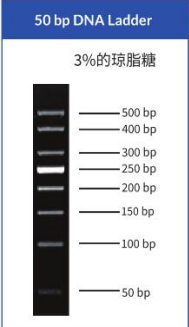
结果分析：

- 单柱纯化效果：从数据来看，在 DNA 产物中，加入 0.75-2 倍 Buffer AXL 和异丙醇，可以高效 50-5000bp 的 DNA 片段，且回收率都超过 80%。
- 双柱纯化效果（大片段）：从数据来看，随着 Buffer AXL 加入量增加，大片段纯化柱从 22%增加至 48%，表明吸附了更多短片段。
- 双柱纯化效果（小片段）：从数据来看，随着 Buffer AXL 加入量增加，小片段纯化柱从 68%下降至 49%，表明大片段吸附了更多片段，只余下更少的小片段被小片段纯化柱吸附。从大片段和小片段的合并回收率超过 80%。

实验 3: 微量 DNA (50~500bp) 以及 (250~5000bp) 回收效率

- 小片段 DNA 的回收率验证: 在 200ul PCR Buffer 中添加 2ul 50bp DNA Marker, 然后添加 150~400ul Buffer AXL 混匀, 然后再加入 0.3 倍体积的异丙醇, 混匀, 转移至纯化柱离心, 用 Buffer DCW2 清洗两次, 最后用 20ul 洗脱出 DNA, 测量 Qubit, 计算回收率。
- 大片段 DNA 的回收率验证: 在 200ul PCR Buffer 中添加 2ul 5000bp DNA Marker, 然后添加 150~400ul Buffer AXL 混匀, 转移至纯化柱吸附大片段 DNA, 得到的滤液再加入 0.3 倍体积的异丙醇, 混匀, 转移至纯化柱离心吸附小片段 DNA, 得两种纯化柱用 Buffer DCW2 清洗两次, 最后用 20ul 洗脱出 DNA, 测量 Qubit, 计算回收率。

50~500bp DNA 产物回收率					
Buffer AXL 添加量		150ul/0.75 倍	200ul/1.0 倍	300ul/1.5 倍	400ul/2 倍
小 DNA 回收率	大片段柱产量	10.6ng	16.4ng	28.5ng	29.9ng
	大片段回收率	4.6%	7%	12%	13%
	小片段柱产量	173ng	174ng	189ng	189.5ng
	小片段柱回收率	76%	76%	83%	83%
	合并回收率	81%	84%	95%	96%



250-5000bp DNA 产物回收率					
Buffer AXL 添加量		150ul/0.75 倍	200ul/1.0 倍	300ul/1.5 倍	400ul/2 倍
大 DNA 回收率	大片段柱产量	237.5	239	244.500	270
	大片段回收率	56.8%	57.2%	58.5%	64.6%
	小片段柱产量	92.5	97	112	118.5
	小片段柱回收率	22.1%	23.2%	26.8%	28.4%
	合并回收率	79%	80%	85%	93%



结果分析:

- 50bp 短片段产物回收 (50-500bp): 从数据可以, 由于 50bp DNA Marker 最大的片段为 500bp, 大片段吸附柱只吸附了少量的核酸 (4.6-13%), 而小片段吸附柱吸附了大量的核酸。
- 5000bp 大片段产物回收 (100-5000bp), 从数据可知, 加入 0.5 倍的 AXL 时, 大片段吸附柱就可以吸附高达 56% 的核酸, 从电泳也可以判断, 超过 750bp DNA 占整体 Marker 的 60%, 这表明, 加入 0.5 倍的 AXL 就可以高效去除大片段, 随着 AXL 加入更多体积, 大片段的吸附柱的回收率有所增加, 也表明吸附了更多 500-750bp 的片段。由于小片段 100-500bp 占比 25~33%, 这个短片须的回收率 22-28% 相符合。

综上所述, D2125 作为 DNA 片段分选试剂盒, 可以高效选择性去除大于 300bp, 或大于 400bp, 或大于 500bp, 或大于 800bp 以上的大片段 DNA。通过单柱纯化时可以去除 DNA 产量的短 DNA 片段 (300-800bp), 只保留大片段 DNA。通过双柱纯化时, 可以去除大片段 DNA, 而纯化得到 100-300bp, 100-400bp, 100-500bp 的 DNA 片段, 这种片段分选方法是磁珠的补充, 对于少量样品的快速操作提供的简易的方法。