

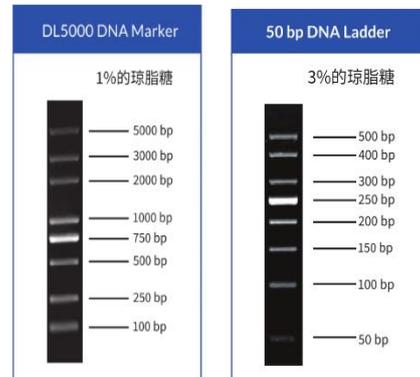
## D6335 磁珠法游离 DNA 富集试剂盒性能验证报告

### 实验 1：血浆中 DNA 分选效果

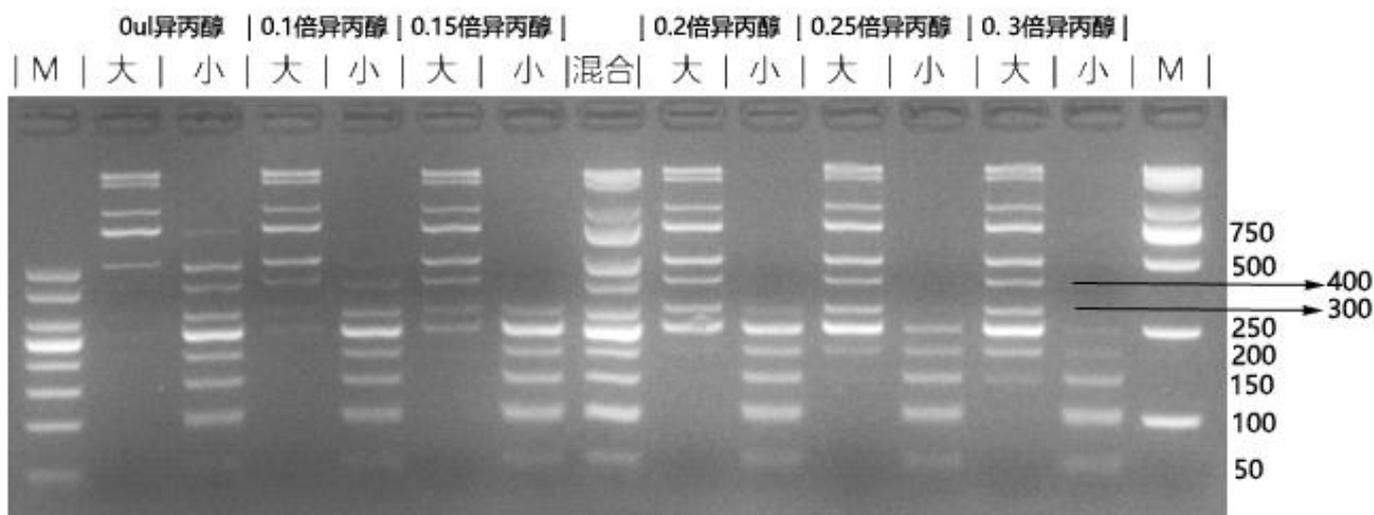
- 分选：在 0.27ml 猪血浆中，加入 1.5ul 50bp DNA Marker 和 1.5ul 5000bp DNA Marker，按 D6335 试剂盒进行操作。操作简化为：

**吸附大片段：**转移含 DNA Marker 的 300ul 猪血浆至 1.5ml 离心管，加入 300ul Buffer CXP 和 20ul Protei nase K 和 10ul 磁珠 MPG2 混匀，加入 0, 0.1 倍(30ul), 0.15 倍(45ul), 0.2 倍(60ul), 0.25 倍(75ul)或 0.3 倍(90ul)样品体积的异丙醇混匀，室温振荡 10 分钟吸附大片段 DNA，磁力架收集磁珠，用 80%乙醇清洗磁珠，干燥，最用 30ul Elution Buffer 洗脱出大片段和小片段，取 15ul 上样于 2%琼脂糖凝胶。

**吸附小片段：**转移上清液（含小片段）至新的离心管，加入 120ul 结合液 IP 和 15ul 磁珠 MPG2 混匀，室温放置 5 分钟吸附小片段，磁力架收集磁珠，用 80%乙醇清洗磁珠，干燥，最用 30ul Elution Buffer 洗脱出大片段和小片段，取 15ul 上样于 2%琼脂糖凝胶。



### DNA 片段分选效果



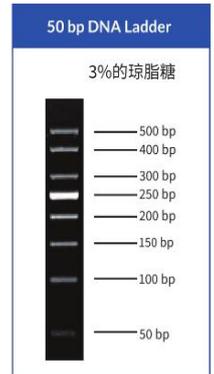
由电泳图可知，D6335 游离 DNA 分选试剂盒对大片段和小片段的分选是充分的，通过加入不同体积的异丙醇可以达到片段分选效率。随着异丙醇增加，大片段磁珠可以吸附更多的 DNA，加入 0 倍异丙醇，大片段磁珠可以吸附部分 500bp 片段(30%)和大部分的 750bp 片段 (>90%)；加入 0.1 倍异丙醇，500 片段可以充分吸附；加入 0.15 倍异丙醇，可充分吸附 300bp 以上的 DNA 片段；加入 0.25 倍异丙醇，可以充分去除 300bp 以上片段，250bp 可以去除 60%以上；加入 0.3 倍异丙醇时，200bp 以上的 DNA 片段可以被充分去除（可以去除产前孕妇血浆的母体 cfDNA，富集得到 50-150bp 的胎儿 cfDNA）。

## 实验 2：含基因组 DNA 的血浆中 DNA 片段分选效果。

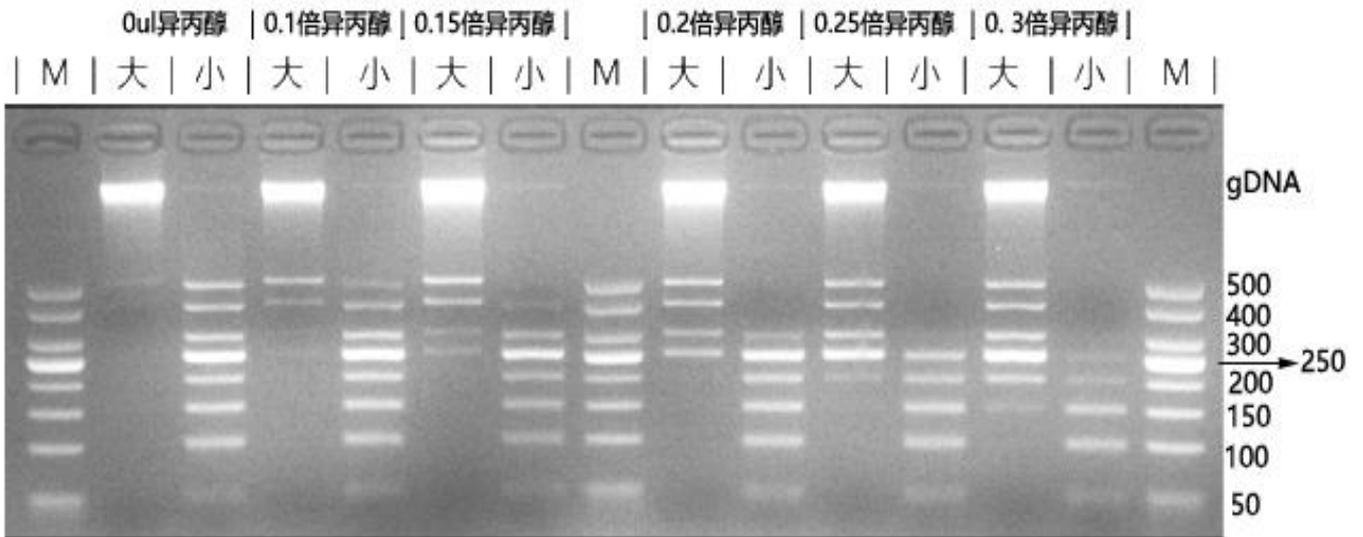
- 分选：在 0.27ml 猪血浆中，加入 10ul 50bp DNA Marker 和 20ul 猪血（含基因组 DNA），按 D6335 试剂盒进行操作。操作简化为：

**吸附大片段：**转移含 DNA Marker/猪血的 300ul 猪血浆至 1.5ml 离心管，加入 300ul Buffer CXP 和 20ul Proteinase K 和 10ul 磁珠 MPG2 混匀，加入 0, 0.1 倍(30ul), 0.15 倍(45ul), 0.2 倍(60ul), 0.25 倍(75ul) 或 0.3 倍(90ul) 样品体积的异丙醇混匀，室温振荡 10 分钟吸附大片段 DNA，磁力架收集磁珠，用 80%乙醇清洗磁珠，干燥，最用 30ul Elution Buffer 洗脱出大片段和小片段，取 15ul 上样于 2%琼脂糖凝胶。

**吸附小片段：**转移上清液（含小片段）至新的离心管，加入 120ul 结合液 IP 和 15ul 磁珠 MPG2 混匀，室温放置 5 分钟吸附小片段，磁力架收集磁珠，用 80%乙醇清洗磁珠，干燥，最用 30ul Elution Buffer 洗脱出大片段和小片段，取 15ul 上样于 2%琼脂糖凝胶。



### 基因组DNA去除效果



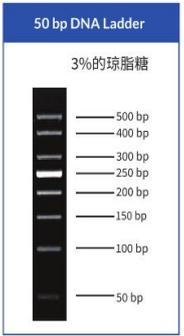
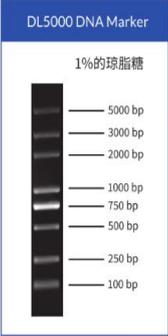
由电泳图可知，D6335 游离 DNA 分选试剂盒对大片段和小片段的分选是充分的，特别是去除大片段基因组 DNA 是高效的，在大量基因组 DNA 污染的血浆中，99%的基因组 DNA 被大片段磁珠吸附，小片段中基本不含基因组 DNA 污染。

### 实验 3：微量 DNA 的分选效果和回收率

- 分选：在 0.3ml 纯水中，分别加入 70ng 50bp DNA Marker 或 162ng 5000bp DNA Marker，然后按 D6335 试剂盒进行操作。操作简化为：

**吸附大片段：**转移含 DNA Marker 的 300ul 纯水至 1.5ml 离心管，加入 300ul Buffer CXP 和 20ul Protei nase K 和 10ul 磁珠 MPG2 混匀，加入 0, 0.1 倍(30ul), 0.15 倍(45ul)和 0.2 倍(60ul)样品体积的异丙醇混匀，室温振荡 10 分钟吸附大片段 DNA，磁力架收集磁珠，用 80%乙醇清洗磁珠，干燥，最用 100ul Elution Buffer 洗脱出大片段，用 qubit 测量浓度，计算回收率。

**吸附小片段：**转移上清液（含小片段）至新的离心管，加入 120ul 结合液 IP 和 15ul 磁珠 MPG2 混匀，室温放置 5 分钟吸附小片段，磁力架收集磁珠，用 80%乙醇清洗磁珠，干燥，最用 100ul Elution Buffer 洗脱出大片段，用 qubit 测量浓度，计算回收率。

3.12 微量回收率				
异丙醇加入体积和倍数	0 倍	0.1 倍 (30ul)	0.15 倍(45ul)	0.2 倍 (60ul)
短片段核酸分选回收率: 0.3ml 纯化中，添加 70ng 50bp DNA Marker，然后进行回收				
大片段磁珠吸附产量	0	4.54	14.9	25.6
大片段磁珠回收率	0	6%	21%	37%
小片段磁珠产量	68.8	64.4	54.6	42.8
小片段磁珠回收率	98%	92%	78%	61%
总回收率	98%	98%	99%	98%
				
大片段核酸分选回收率: 0.3ml 纯水中，添加 162ng 5000bp DNA Marker，然后进行回收				
大片段磁珠吸附产量	60.6	110	127	130
大片段磁珠回收率	37%	68%	78%	80%
小片段磁珠产量	99.2	42.6	30.4	26.4
小片段磁珠回收率	61%	26%	19%	16%
总回收率	99%	94%	97%	97%
				

#### 实验 4：血浆 DNA 的分选效果和产量

- 分选：0.3ml 猪血浆和 0.3ml 猪血浆（含 10ul 猪血），按 D6335 试剂盒进行操作，操作简化为：
- **吸附大片段：**转移含 DNA Marker 的 300ul 样品至 1.5ml 离心管，加入 300ul Buffer CXP 和 20ul Protei nase K 和 10ul 磁珠 MPG2 混匀，加入 0, 0.1 倍(30ul), 0.15 倍(45ul)和 0.2 倍(60ul)样品体积的异丙醇混匀，室温振荡 10 分钟吸附大片段 DNA，磁力架收集磁珠，用 80%乙醇清洗磁珠，干燥，最用 100ul Elution Buffer 洗脱出大片段，用 qubit 测量浓度，计算回收率。
- 吸附小片段：**转移上清液（含小片段）至新的离心管，加入 120ul 结合液 IP 和 15ul 磁珠 MPG2 混匀，室温放置 5 分钟吸附小片段，磁力架收集磁珠，用 80%乙醇清洗磁珠，干燥，最用 100ul Elution Buffer 洗脱出大片段，用 qubit 测量浓度，计算回收率。

3.12 微量回收率				
异丙醇加入体积和倍数	0 倍	0.1 倍 (30ul)	0.15 倍(45ul)	0.2 倍 (60ul)
纯血浆核酸产量				
大片段磁珠吸附产量	1.93	2.5	2.44	1.5
小片段磁珠产量	5.6	6.4	4.44	4.22
血浆中添加 10ul				
大片段磁珠吸附产量	380	386	388	382
小片段磁珠产量	17.7	12.7	12.9	9.72

## 实验 5: 磁珠 MPG2 敏感性

- 分选: 在 0.27ml 猪血浆中, 加入 15ul 50bp DNA Marker 和 15ul 5000bp DNA Marker, 按 D6335 试剂盒进行操作。操作简化为:

**吸附大片段:** 转移含 DNA Marker 的 300ul 猪血浆至 1.5ml 离心管, 加入 300ul Buffer CXP 和 20ul Protei nase K 和 10ul 磁珠 MPG2 混匀, 加入 0, 0.1 倍(30ul), 0.15 倍(45ul)和 0.2 倍(60ul)样品体积的异丙醇, 加入 7.5/10/15ul 磁珠 MPG2 混匀, 室温振荡 10 分钟吸附大片段 DNA, 磁力架收集磁珠, 用 80%乙醇清洗磁珠, 干燥, 最用 30ul Elution Buffer 洗脱出大片段和小片段, 取 15ul 上样于 2%琼脂糖凝胶。

**吸附小片段:** 转移上清液 (含小片段) 至新的离心管, 加入 120ul 结合液 IP 和 15ul 磁珠 MPG2 混匀, 室温放置 5 分钟吸附小片段, 磁力架收集磁珠, 用 80%乙醇清洗磁珠, 干燥, 最用 30ul Elution Buffer 洗脱出大片段和小片段, 取 15ul 上样于 2%琼脂糖凝胶。

