

# D3182 中 Buffer ACB 升级

**实验目的一：测量 HiPure CFDNA Mini Column 的稳定性。[从 5 万个 HiPure CFDNA Mini Column 中，取样 50 个 HiPure CFDNA Mini Column，其中取 22 个用 D3182 进行抽提，每个柱子用 2ml 灭菌水加 50ng 的 DNA (100bp~2000bp)作为样品，]**

**实验步骤：**取 50ml 灭菌水至 250ml 的瓶子中，加已纯化的 DNA marker 125ul，加 40ml ACL，涡旋 1min，60 度水浴 30min，期间颠倒混合，加 90ml ACB，涡旋混匀，在冰上放置 5min，分别加入 7.4ml 混合液，进行抽滤，观察抽滤时间与膜的状态，600ul DCW1 洗涤 1 次，600ul DCW2 洗涤 1 次，600ul 无水乙醇洗涤一次，空甩 3min，55 度干燥 10min，加 50ul free water 于柱子膜上，静置 3min，再次洗脱，测 qubit，加 30ul free water 再次洗脱。

**结果表明：22 个柱子产量相当稳定，只有 3 个柱子在 75%，82%和 83.6%的回收率，表明柱子的回收率是相当稳定的。余下的 28 个柱子用于质粒 DNA 抽提实验，在 DNA 产量波动不超过 10%。**

实验数据：

	一次洗脱 qubit	二次洗脱 qubit	总 Qubit	总产量 (ug)	总回收率
原液稀释	0.98			0.05	
1-1	0.745	0.19	0.94	0.07	153.0%
1-2	0.690	0.22	0.91	0.07	149.2%
2-1	0.710	0.20	0.91	0.07	148.9%
2-2	0.810	0.23	1.04	0.08	170.1%
3-1	0.438	0.17	0.61	0.05	99.3%
3-2	0.505	0.18	0.69	0.06	112.5%
4-1	0.381	0.12	0.50	0.04	82.1%
4-2	0.510	0.20	0.71	0.06	115.6%
5-1	0.398	0.11	0.51	0.04	83.6%
5-2	0.433	0.14	0.57	0.05	93.2%
6-1	0.565	0.14	0.71	0.06	115.4%
6-2	0.370	0.09	0.46	0.04	75.3%
7-1	0.650	0.23	0.88	0.07	143.7%
7-2	0.480	0.23	0.71	0.06	115.9%
8-1	0.76	0.20	0.95	0.08	155.8%
8-2	0.73	0.20	0.93	0.07	152.2%
9-1	0.72	0.23	0.95	0.08	155.4%
9-2	0.55	0.23	0.78	0.06	127.2%
10-1	0.451	0.16	0.61	0.05	99.9%
10-2	0.680	0.13	0.81	0.07	132.9%
11-1	0.575	0.14	0.72	0.06	117.4%
11-2	0.560	0.15	0.71	0.06	116.6%

## 实验目的 2：对比 2ml 样品体系和 5ml 样品体系对微量 marker 回收率的影响

### 实验步骤：

2ml 样品体系：取 10ml 灭菌水至 120ml 的瓶子中，加已纯化的 DNA marker 50ul，加 8ml ACL，涡旋 15s，60 度水浴 30min，期间颠倒混合，加 18ml ACB，涡旋混匀，在冰上放置 5min，取 5 个 CF DNA 柱，分别加入 7.4ml 混合液，进行抽滤，观察抽滤时间与膜的状态，600ul DCW1 洗涤 1 次，600ul DCW2 洗涤 1 次，600ul 无水乙醇洗涤一次，空甩 3min，55 度干燥 10min，加 50ul free water 于柱子膜上，静置 3min，测 qubit，再次洗脱，测 qubit。

5ml 样品体系：取 25ml 灭菌水至 120ml 的瓶子中，加已纯化的 DNA marker 50ul，加 20ml ACL，涡旋 15s，60 度水浴 30min，期间颠倒混合，加 45ml ACB，涡旋混匀，在冰上放置 5min，取 5 个 CF DNA 柱，分别加入 18.5ml 混合液，进行抽滤，观察抽滤时间与膜的状态，600ul DCW1 洗涤 1 次，600ul DCW2 洗涤 1 次，600ul 无水乙醇洗涤一次，空甩 3min，55 度干燥 10min，加 50ul free water 于柱子膜上，静置 3min，测 qubit，再次洗脱，测 qubit。

实验现象：抽滤时间：(2ml 样品体系) ACB，8min。 (5ml 样品体系) ACB，21min。

	50ul 洗脱 1 次 qubit	产量 1 (ng)	回收率	50ul 再次洗脱 qubit	产量 2 (ng)	回收率
原液稀释	1.58ng/ul				79	
2ml 样品体系	0.995	49.75	63.0%	1.28	64	81.0%
2ml 样品体系	1.2	60	75.9%	1.46	73	92.4%
	1.32	66	83.5%	1.59	79.5	100.6%
	0.965	48.25	61.1%	1.36	68	86.1%
	1.2	60	75.9%	1.52	76	96.2%
5ml 样品体系	0.91	45.5	57.6%	1.18	59	74.7%
	0.82	41	51.9%	1.14	57	72.2%
	0.935	46.75	59.2%	1.22	61	77.2%
	0.73	36.5	46.2%	1	50	63.3%
	1.06	53	67.1%	1.3	65	82.3%

### 实验结论：

1. 从 qubit 测定数据看，第一次洗脱不能把 DNA 全部洗脱，需要进行第二次重新洗脱。
2. 2ml 样品体系的回收效率基本在 85% 以上，5ml 样品体系的回收效率基本在 70% 以上，5ml 样品回收率偏低。

### 实验目的 3 : 升级 Buffer ACB2(提升过滤速度), 提升回收率, 2ml 体系

实验步骤: 取 2ml 灭菌水至 15ml 离心管中, 加已纯化的 DNA marker 10ul, 加 1.6ml ACL, 涡旋 15s, 60 度水浴 30min, 期间颠倒混合, 加 3.6ml ACB 或 ACB2, 涡旋混匀, 在冰上放置 5min, 取 CF DNA 柱, 加入混合液, 进行抽滤, 观察抽滤时间与膜的状态, 600ul DCW1 洗涤 1 次, 600ul DCW2 洗涤 1 次, 600ul 无水乙醇洗涤一次, 空甩 3min, 55 度干燥 10min, 加 50ul free water 于柱子膜上, 静置 3min, 再次洗脱, 测 qubit。

实验现象: **抽滤时间: ACB, 12min; ACB2, 8min。**

实验数据:

	Qubit 值	产量 (ng)	回收率
原液稀释	2.15	107.5	第一次实验
ACB	2.3	115	107.0%
	1.9	95	88.4%
ACB2	2.15	107.5	100%
	2.6	130	121%
原液稀释	2.28	114	第二次实验
ACB	2.88	144	126.3%
	2.32	116	101.8%
	2.2	110	96.5%
	1.89	94.5	82.9%
ACB2	2.12	106	93.0%
	2.34	117	102.6%
	2.31	115.5	101.3%
	2.19	109.5	96.1%

实验结论:

- 1: 在 2ml 样品体系中, Buffer ACB2 过滤速度明显快一些。
- 2: 在 2ml 样品体系, Buffer ACB 2 的加磁率与 Buffer ACB 的回收效率差别不大, 但 Buffer ACB2 更为稳定一点。

#### 实验目的 4：升级 Buffer ACB2(提升过滤速度)，提升回收率, 5ml 体系

实验步骤：取 5ml 灭菌水至 50ml 离心管中，加已纯化的 DNA marker 10ul，加 4ml ACL，涡旋 15s，60 度水浴 30min，期间颠倒混合，加 9ml ACB 或 ACB2，涡旋混匀，在冰上放置 5min，取 CF DNA 柱，加入混合液，进行抽滤，观察抽滤时间与膜的状态，600ul DCW1 洗涤 1 次，600ul DCW2 洗涤 1 次，600ul 无水乙醇洗涤一次，空甩 3min，55 度干燥 10min，加 60ul free water 于柱子膜上，静置 3min，再次洗脱，测 qubit。 **实验现象：抽滤时间：ACB，24min；ACB2，13min。**

实验数据：

	Qubit 值	产量 (ng)	回收率
原液稀释	2.15	107.5	第一次实验
ACB	1.7	85	79.1%
	1.7	85	79.1%
ACB2	2.12	106	98.6%
	2.1	105	97.7%
原液稀释	2.28	114	第 2 次实验
ACB	1.68	84	73.7%
	1.74	87	76.3%
	1.78	89	78.1%
	1.79	89.5	78.5%
ACB2	1.88	94	82.5%
	2.19	109.5	96.1%
	2.26	113	99.1%
	2.04	102	89.5%
原液稀释	1.87	112.2	第 3 次实验
ACB	1.62	97.2	86.6%
	1.88	112.8	100.5%
	1.92	115.2	102.7%
	1.99	119.4	106.4%
ACB	1.84	110.4	98.4%
ACB2	1.88	112.8	100.5%
	1.92	115.2	102.7%
	2.01	120.6	107.5%
	1.9	114	101.6%
	1.85	111	98.9%
原液稀释	1.96	117.6	第 4 次实验
ACB	1.54	92.4	78.6%
	1.33	79.8	67.9%
	1.44	86.4	73.5%
	1.36	81.6	69.4%
	1.24	74.4	63.3%
	1.36	81.6	69.4%
ACB2	1.77	106.2	90.3%
	1.87	112.2	95.4%
	1.56	93.6	79.6%
	1.84	110.4	93.9%
	1.9	114	96.9%
	1.76	105.6	89.8%

实验结论：

- 1: 在 5ml 样品体系中，Buffer ACB2 过滤速度明显快了很多，Buffer ACB2 只需要 13min，而 Buffer ACB 需要 24min.
- 2: 在 5ml 样品体系，Buffer ACB 2 的加量率与 Buffer ACB 的回收效率差别明显，但 Buffer ACB2 更为稳定一点和回收率更高。

## 实验目的 5 : 升级 Buffer ACB2(提升过滤速度), 提升回收率, 8ml 体系

实验步骤 : 取 8ml 灭菌水至 50ml 离心管中, 加已纯化的 DNA marker 10ul , 加 6.4ml ACL, 涡旋 15s, 60 度水浴 30min , 期间颠倒混合, 加 14.4ml ACB 或 ACB2, 涡旋混匀, 在冰上放置 5min, 取 CF DNA 柱, 加入混合液, 进行抽滤, 观察抽滤时间与膜的状态, 600ul DCW1 洗涤 1 次, 600ul DCW2 洗涤 1 次, 600ul 无水乙醇洗涤一次, 空甩 3min, 55 度干燥 10min, 加 60ul free water 于柱子膜上, 静置 3min, 再次洗脱, 测 qubit。

**实验现象 : 抽滤时间 : ACB, 52min ; ACB2, 22min。**

实验数据 :

	Qubit 值	产量 ( ng )	回收率
原液稀释	1.6	96	
ACB	1.52	91.2	95.0%
	1.26	75.6	78.8%
	0.98	58.8	61.3%
	1.33	79.8	83.1%
ACB2	1.58	94.8	98.8%
	1.7	102	106.3%
	1.39	83.4	86.9%
	1.74	104.4	108.8%

实验结论 :

- 1: 在 8ml 样品体系中, Buffer ACB2 过滤速度明显快了很多, Buffer ACB2 只需要 22min, 而 Buffer ACB 需要 52min.
- 2: 在 8ml 样品体系, Buffer ACB 2 的加撮率与 Buffer ACB 的回收效率差别明显, 但 Buffer ACB2 更为稳定一点和回收率更高。

## 实验目的 6：离心法与抽滤法进行对比

实验步骤：取 8ml 灭菌水至 50ml 离心管中，加已纯化的 DNA marker 10ul，加 6.4ml ACL，涡旋 15s，60 度水浴 30min，期间颠倒混合，加 14.4ml ACB 或 ACB2，涡旋混匀，在冰上放置 5min，取 CF DNA 柱，加入混合液，进行抽滤，观察抽滤时间与膜的状态，600ul DCW1 洗涤 1 次，600ul DCW2 洗涤 1 次，600ul 无水乙醇洗涤一次，空甩 3min，55 度干燥 10min，加 60ul free water 于柱子膜上，静置 3min，再次洗脱，测 qubit。

**实验现象：抽滤时间：ACB，52min；ACB2，22min。**

实验数据：

	Qubit 值	产量 (ng)	回收率
原液稀释	1.6	96	
ACB	1.52	91.2	95.0%
	1.26	75.6	78.8%
	0.98	58.8	61.3%
	1.33	79.8	83.1%
ACB2	1.58	94.8	98.8%
	1.7	102	106.3%
	1.39	83.4	86.9%
	1.74	104.4	108.8%

实验结论：

- 1: 在 8ml 样品体系中，Buffer ACB2 过滤速度明显快了很多，Buffer ACB2 只需要 22min，而 Buffer ACB 需要 52min.
- 2: 在 8ml 样品体系，Buffer ACB 2 的加撮率与 Buffer ACB 的回收效率差别明显，但 Buffer ACB2 更为稳定一点和回收率更高。

## 实验目的 6：对比 5ml 样品体系中，ACB 和 ACB2 在抽滤法和离心法下对微量 marker 回收效率的影响

实验步骤：取两个 250ml 瓶子，取 55ml 灭菌水至瓶子中，加已纯化的 DNA marker 100ul，加 40ml ACL，涡旋 15s，60 度水浴 30min，期间颠倒混合，加 90ml ACB 或 ACB2，涡旋混匀，在冰上放置 5min，

抽滤法：取 8 个 CF DNA 柱，4 个加入 18.5ml ACB 混合液，4 个加入 18.5ml ACB2 混合液，进行抽滤，观察抽滤时间与膜的状态，

离心法：取 8 个 CF DNA 柱，连接延长管和支撑柱，放入 50ml 离心管中，分两次加入 18.5ml ACB/ACB2 混合液，3000xg 离心 3min，观察离心效果与膜的状态，

600ul DCW1 洗涤 1 次，600ul DCW2 洗涤 1 次，600ul 无水乙醇洗涤 1 次，空甩 3min，55 度干燥 10min，加 60ul free water 于柱子膜上，静置 3min，再次洗脱，测 qubit。

实验现象：抽滤时间：ACB，26min；ACB2，16min。离心时间：3000xg 离心 3 分钟即可，5ml 需要二次离心。

实验数据：

抽滤法	Qubit 值	产量 ( ng )	回收率
原液稀释	1.82	109.2	
ACB	1.7	102	93.4%
	1.62	97.2	89.0%
	1.7	102	93.4%
	1.8	108	98.9%
ACB2	1.88	112.8	103.3%
	1.64	98.4	90.1%
	1.85	111	101.6%
	1.96	117.6	107.7%

离心法	Qubit 值	产量 ( ng )	回收率
原液稀释	1.82	109.2	
ACB	2.06	123.6	113.2%
	2.06	123.6	113.2%
	2.02	121.2	111.0%
	1.92	115.2	105.5%
ACB2	1.92	115.2	105.5%
	2.04	122.4	112.1%
	2.02	121.2	111.0%
	1.84	110.4	101.1%

实验结论：抽滤法中，ACB 的回收效率基本达到 90%以上，波动较大；而 ACB2 的回收效率基本达到 100%，波动较小。离心法中，ACB 和 ACB2 的回收效率均能达到 100%。由于离心时，5ml 样品的过柱时间短，每一次只需 2-3 分钟就可以处理完 14ml 的混合液，处理 5ml 样品时，只需 4-6 分钟就可能处理所有的混合液，所以在离心操作中，ACB 与 Buffer ACB2 的回收率基本相当，差别不大。但 Buffer ACB 在抽滤法，回收率只需达到 90-95%，而 Buffer ACB2 都达到 100%以上。

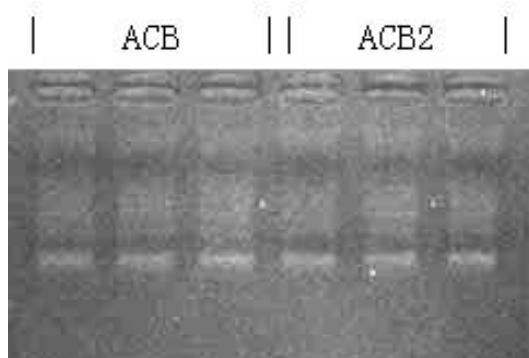
## 实验目的 7：对比 5ml 猪血浆体系中，ACB 和 ACB2 对猪血浆里游离核酸回收效果的影响

实验步骤：取 2ml 蛋白酶 K，20ml 猪血浆至 120ml 的瓶子中，加 16ml ACL，涡旋 15s，60 度水浴 30min，期间颠倒混合，加 36ml ACB 或 ACB2，涡旋混匀，在冰上放置 5min，取 3 个 CF DNA 柱，加入 18.5ml 混合液，进行抽滤，观察抽滤时间与膜的状态，600ul DCW1 洗涤 1 次，600ul DCW2 洗涤 1 次，600ul 无水乙醇洗涤一次，空甩 3min，55 度干燥 10min，加 60ul free water 于柱子膜上，静置 3min，再次洗脱，测 qubit。

实验现象：抽滤时间：ACB，25min；ACB2，14min。

电泳图：

### D3182-猪血浆提取



实验数据：

	Qubit 值	产量 (ng)
ACB	2.24	134.4
	2.14	128.4
	2.23	133.8
ACB2	2.20	132
	2.08	124.8
	2.14	128.4

实验结论：

- 1: 在 5ml 猪血浆样品体系中，Buffer ACB2 过滤速度明显快了很多，Buffer ACB2 只需要 14min，而 Buffer ACB 需要 25min.
- 2: 在 5ml 猪血浆样品体系，Buffer ACB 2 的回收率与 Buffer ACB 的回收效率差别不明显，这可以是因为猪血浆中存在明显的基因组 DNA，这种大片段 DNA 比较容易回收，对 Buffer ACB / ACB 2 影响不大。



## 综合结论:

- (1) D3182 的抽滤速度取决于抽滤力的压力，流程，以及 Buffer ACB 的盐离子浓度，与血浆的粘稠度没有关系。在 5ml 体系中，不管灭菌水或血浆作为样品时，Buffer ACB 抽滤速度都在 24-26min。而采用 Buffer ACB2(离子浓度降低)，抽滤速度在 12-14min，这一个抽滤速度与 qiagen 的抽滤速度相当，说明 Buffer ACB2 中的离子浓度更接近于 qiagen Buffer ACB。
- (2) 在 2ml 和 5ml 和 8ml 体系中，Buffer ACB 的回收率不一致。在 2ml 体系中，Buffer ACB 抽滤时间为 12-15 分钟，其回收率比较稳定，不同柱子的差别不明显，基本可以达到 85% 的回收率。但在 5ml 体系中，Buffer ACB 抽滤时间为 25-30min，其回收率会变得不稳定，不同柱子间有明显的波动。在 8ml 体系中，Buffer ACB 抽滤时间为 45~52min，其回收率也会变得不稳定，不同柱子间有明显的波动。这种原因，我们推测是因为在柱子在长时间浸泡过程中，会引起膜的物理性质发生微小的变化(膜吸水膨胀，孔径会发生改变)而造成回收率不稳定，回收率降低的现象。
- (3) 在 2ml 和 5ml 和 8ml 体系中，Buffer ACB 2 的回收率相当一致。在 2ml 体系中，Buffer ACB2 抽滤时间为 7 分钟，其回收率比较稳定，不同柱子的差别不明显，基本可以达到 90% 的回收率。但在 5ml 体系中，Buffer ACB2 抽滤时间为 12~14min，其回收率会比较稳定，不同柱子间没有明显的波动。在 8ml 体系中，Buffer ACB2 抽滤时间为 20~22min，其回收率也很稳定，不同柱子间没有明显的波动。这处现象，表明，降低 Buffer ACB2 的离子浓度（表面活性剂），可以降低 Buffer ACB2 的溶液的粘稠度，就可以大大加速过滤时间。减少柱子的过滤时间，可防止滤膜在过滤时发生物理性质的改变，从而提高和稳定 DNA 回收率。
- (4) 在长时间稳定测试中，HiPure CFDNA Mini Column 在室温放置 3 年，2 年，1 年，6 个月，1 个月，其 DNA 回收率不会发生改变。{ 数据未显示 }
- (5) 在稳定性测试中，把用于生产 HiPure CFDNA Mini Column 的滤膜（可生产 10 万），把滤膜进行抽检(50 个)，50 个柱子的回收率波动不大，在微克级的核酸提取时，DNA 产量波动不超过 10%，在纳克级的核酸回收时，DNA 回收率的波动不超过 15%，而且都超过 80% 以上。这表明同一批 Kit 中，不同柱子的回收率不存在波动。