

新芝超声波仪 DNA 片段化测试--美吉生物

测试目的:

- 1、验证适配器不同位置尤其是内外圈 DNA 片段化能力的差异;
- 2、验证不同耗材、不同体积、不同浓度、不同物种对 DNA 片段化结果的影响;
- 3、摸索合适的常见片段化条件, 如 200bp、250bp、300bp、400bp、500bp、800bp 等;

测试设备: Scientz08-III + DLK-5003

测试耗材: 0.2ml PCR 管 (Axygen PCR-02-C)
0.5ml PCR 管 (Axygen PCR-05-C)

测试试剂: λ DNA、动物 DNA、植物 DNA、细菌 DNA

实验过程:

对适配器进行编号, 从外向内用数字编号, 从 1 开始, 外圈用 W 标示 (1~22), 中圈用 Z 标示 (23~37), 内圈用 N 标示 (38~45)。

实验一:

测试不同离心管、不同体积、不同浓度、不同位置、不同物种 DNA 对打断结果的影响;

按照说明书要求, 为了保护仪器并避免样品快速升温, 第一次测试设置条件为:

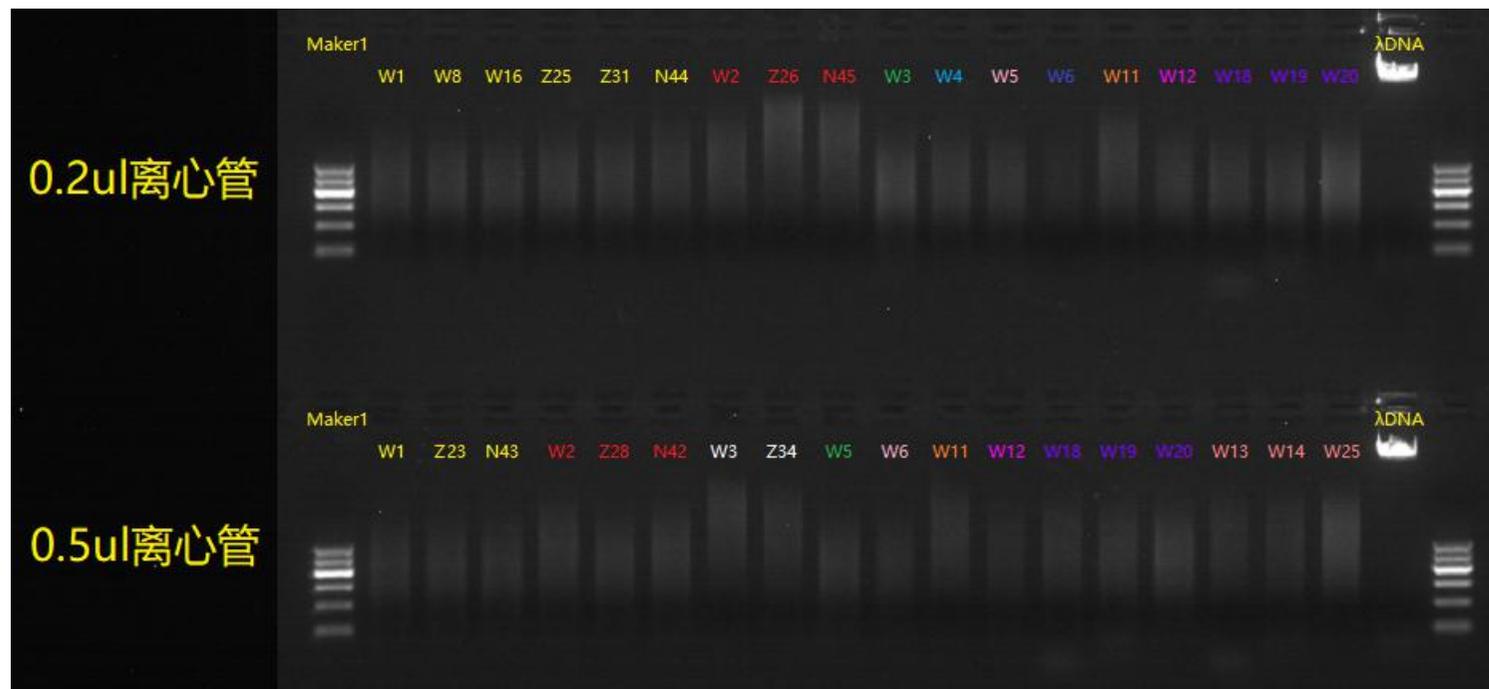
功率=80%, 打 25s 停 5s (定义为 1 循环), 其余条件如下

离心管	0.2ml	0.2ml	0.2ml	0.2ml														
体积 ul	50	50	50	50	50	50	100	100	100	50	50	50	50	100	100	50	50	50
浓度 ng/ul	20	20	20	20	20	20	20	20	20	50	10	5	2	10	5	20	20	20
位置	W1	W8	W16	Z25	Z31	N44	W2	Z26	N45	W3	W4	W5	W6	W11	W12	W18	W19	W20
样品	λ DNA	动物	植物	细菌														
循环	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

离心管	0.5ml																	
体积 ul	50	50	50	100	100	100	200	200	50	50	100	100	50	50	50	100	100	100
浓度 ng/ul	20	20	20	20	20	20	20	20	50	5	10	5	20	20	20	10	10	10

位置	W1	Z23	N43	W2	Z28	N42	W3	Z34	W5	W6	W11	W12	W18	W19	W20	W13	W14	W15
样品	λ DNA	动物	植物	细菌	动物	植物	细菌											
循环	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

打断后 2%琼脂糖凝胶电泳，5V/cm，15min 后鉴定结果为：



Marker1 从下往上是 100、200、300、400、500、600bp

实验结果：

1. 其他实验条件相同，离心管大小不同， 打断效果：0.2ul>0.5ul(离心管)
2. 其他实验条件相同，样品放置圈位置不同，打断效果：W>Z>N (W:外圈，Z:中圈，N:内圈)
3. 其他实验条件相同，相同圈的不同位置， 打断效果：无显著差别
4. 其他实验条件相同，体积多少不同， 打断效果：50ul>100ul
5. 其他实验条件相同，浓度大小不同， 打断效果：无显著差别
6. 其他实验条件相同，来源不同的样本， 打断效果：无显著差别（测试样本较少，有待进一步验证）
7. 400~500bp 片段的最佳打断条件是：0.2ml 离心管，50ul 体系，最外圈打断 5cycles
8. 打 25s 停 5s 体系升温较快，需要在后续实验中进行调整

实验二：

根据实验一的结果，选择 0.2ml 离心管，50ul 体系进行后续尝试，考虑到打 25s 停 5s 体系升温较快，且总时间设置只能以分钟为单位，后续实验调整为打 7S 停 3S 或打 6S 停 3S，实验设置如下：

离心管	0.2ml	0.2ml	0.2ml	0.2ml	0.2ml	0.2ml	0.2ml	0.2ml	0.2ml	0.2ml
体积 ul	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
浓度 ng/ul	20	20	20	20	20	20	20	10	10	10
位置	W1	W8	W12	Z23	Z30	N38	W43	W2	W9	W19
样品	λ DNA	λ DNA	λ DNA	λ DNA	λ DNA	λ DNA	λ DNA	λ DNA	λ DNA	λ DNA
总设置时间	(打 7S 停 3S) : 1min、2min、3min、4min、5min、6min;						(打 6S 停 3S) : 15min、23min、15min*3			

对应时间如下：

总设置时间	1min	2min	3min	4min	5min	6min	15min	23min	15min*3
有效打断时间	42s	84s	126s	168s	210s	252s	10min	15.3min	30min
时间间隔	打 7S 停 3S	打 6S 停 3S	打 6S 停 3S	打 6S 停 3S					

打断后 2%琼脂糖凝胶电泳，5V/cm，15min 后鉴定结果为：

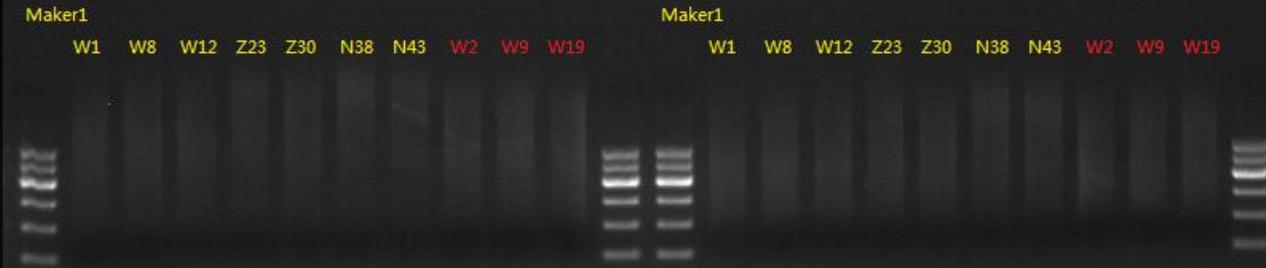
测试样本：λDNA稀释液

黄色字体：20ng/ul；50ul

红色字体：10ng/ul；50ul

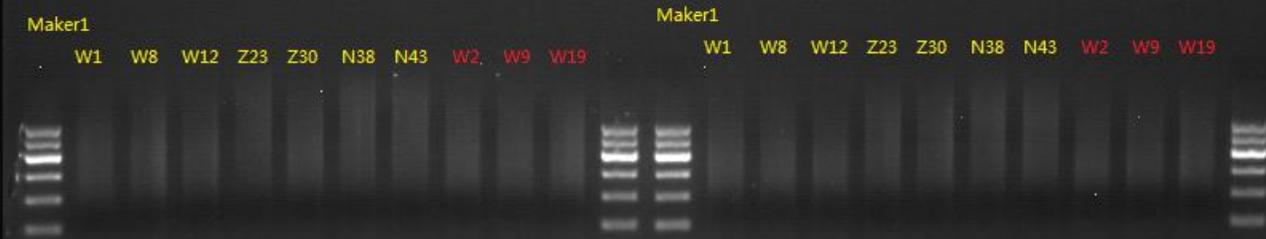
备注：初始温度：10°C，约2min/+2°C

总时间：1min
打断时间：7s
间隔时间：3s
(总打断时间：42s)



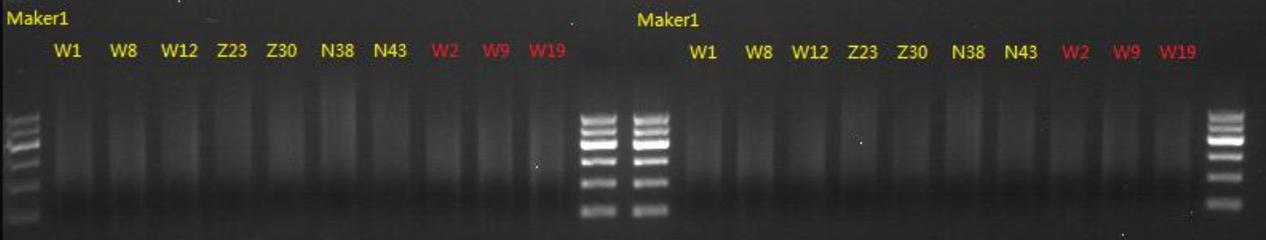
总时间：2min
打断时间：7s
间隔时间：3s
(总打断时间：84s)

总时间：3min
打断时间：7s
间隔时间：3s
(总打断时间：126s)

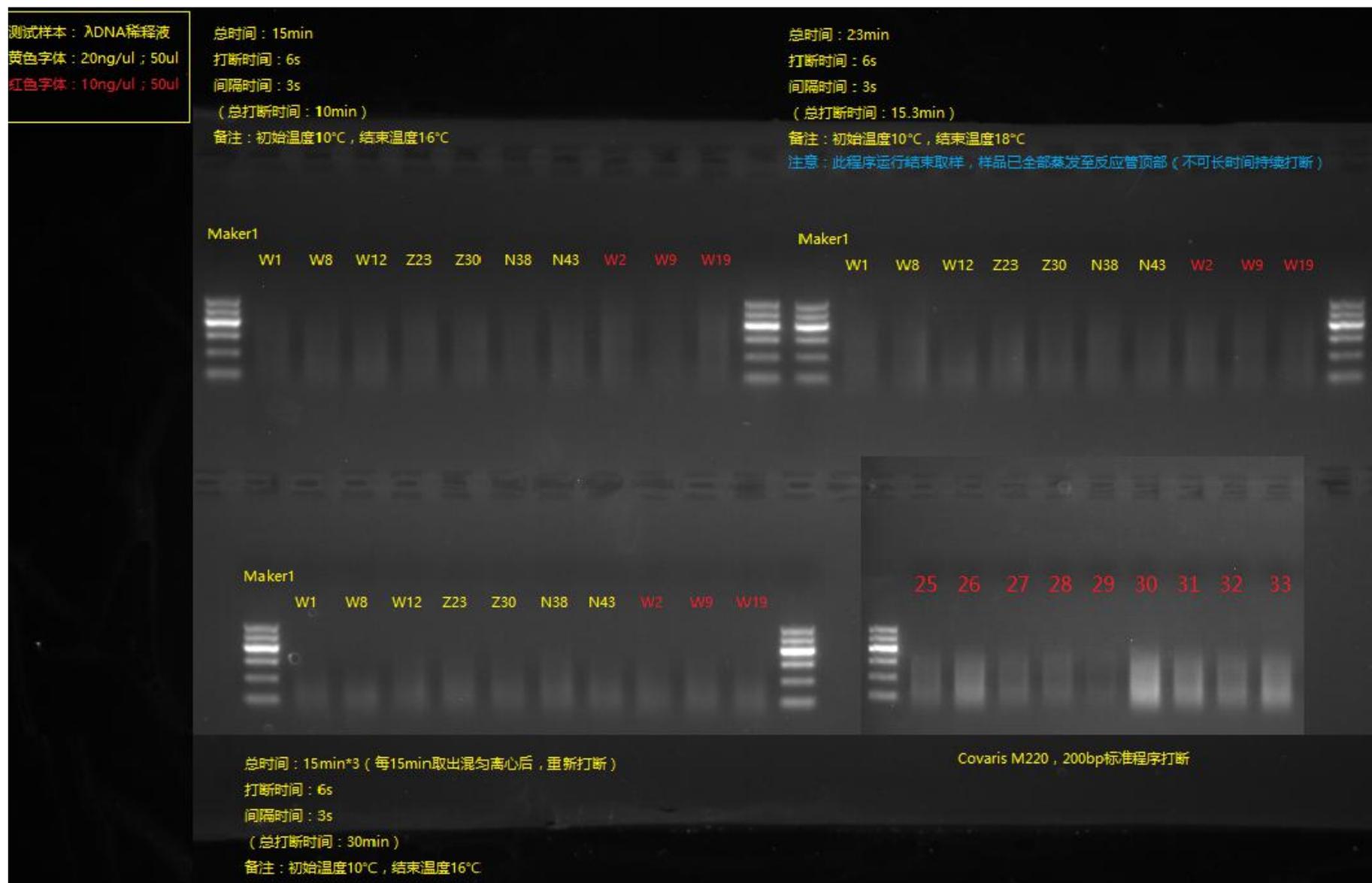


总时间：4min
打断时间：7s
间隔时间：3s
(总打断时间：168s)

总时间：5min
打断时间：7s
间隔时间：3s
(总打断时间：210s)



总时间：6min
打断时间：7s
间隔时间：3s
(总打断时间：252s)



实验结果：

- 再次证实其他实验条件相同，样品放置圈位置不同，打断效果：W>Z>N (W:外圈，Z:中圈，N:内圈)，相同圈的不同位置，打断效果无明显差别，浓度对打断效果影响不显著
- 400~500bp 最佳有效打断时间 126s（总时间 3min）

3. 300~400bp 最佳有效打断时间 168~210s (总时间 4~5min)
4. 200bp 左右最佳有效打断时间为 15.3min (总时间 23min), 这个打断条件下, 条带分布于 100~500bp, 不如 Covaris 标准打断程序的 100~400bp, 可以酌情增加打断时间

优点:

相比 Covaris 可以显著降低打断成本, 相比常规超声波清洗仪可以提高打断通量, 且理论上打断效果更加稳定;

缺点和建议:

1. 总时间设置只能以分钟为单位, 使打断灵活性不足, 建议调整为秒为单位, 或者直接设置更为人性化 (如 总有效打断时间: S, 工作时间: S, 间隔时间: S)
2. 没有条件保存功能, 可以考虑增加, 设置不同的程序, 快速选择去打断, 条件可以设置为: 温度、总时间、工作时间、间隔时间、功率%、离心管、体积、位置
3. 收放样品不够方便, 建议调整为卡扣式; 取放样品需要关闭电源, 建议增加开关
4. 制冷能力不足, 持续打断的时候升温较快, 被迫间歇性使用
5. 总体积太大, 占地面积需要 0.91 m², 是 Covaris M220 的 4.5 倍