

## P1159 无内质粒超大提性能验证报告

### 实验 1：不同菌液用量的时提取数据

**实验步骤：**取 100ml/250ml/500m 培养 14 小时的 LB 培养菌液(含 pcDNA3.1 载体),8000rpm 离心 3 分钟收集管细菌,加入 12ml P1/RNase A 重悬, 12ml Buffer P2 裂解, 加入 12ml Buffer NS3 中和离心得上清液, 加入 0.2 倍 Buffer ERS4 混匀, 室温放置 5 分钟, -20 度放置 10 分钟沉淀内毒素, 倒入至 60ml 针筒中过滤得滤液, 加入 0.1 倍滤液体积的异丙醇混匀, 取全部混合液至红色大柱 C7 抽滤过柱, 5ml GWP 洗一次, 8ml PW2 清洗一次, 空甩, 烘干, 加入 1.5ml Elution Buffer 洗脱两次, 并测量每次的实得体积。

菌液用量	洗脱体积	实得洗脱体积(ul)	洗脱液损失	浓度	260/280	260/230	产量 (ug)
100ml	第一次 1.5ml	1395	105ul	274.12	1.90	2.16	411
	第二次 1.5ml	1500	/	49.56	1.83	1.47	74
	合并	2895	105ul	164.39	1.89	1.93	493
250ml	第一次 1.5ml	1320	180ul	682.53	1.94	2.08	1024
	第二次 1.5ml	1500	/	131.91	1.89	1.52	198
	合并	2820	180	397.05	1.93	1.99	1191
500ml	第一次 1.5ml	1310	190ul	1271.11	1.93	2.23	1907
	第二次 1.5ml	1500	/	418.92	1.92	2.13	628
	合并	2810	190ul	818.86	1.94	2.20	2457

结论：上述实验表明，试剂盒在 100~500ml 菌液用量时，质粒产量显良好的线性度，产量最高产量可达到 2.5mg，一次 1.5ml Elution Buffer 可洗脱出 70-80%的质粒 DNA，第二次洗脱还可以得到 15-25% DNA。

### 实验 2：质粒 DNA 保存于-20oC 的变化

**实验步骤：**取 200ml/500m 培养 13 小时的 LB 培养菌液（含 pcDNA3.1 载体），用 P1159 进行提取，提取后用 Nanodrop 2000 测量 OD 值，然后保留于-20oC 共 15 天，取出质粒，常温溶解，此时发生质粒 DNA 溶液中产生少量的沉淀物，取质粒 DNA 于 10000xg 离心 1 分钟可以沉淀去除杂质，然后重新测量 OD 值；测量后，再涡旋重悬后，37°C 温育 20 分钟，沉淀不可溶解。该沉淀再加入 SDS 和蛋白酶 K，55 度温育 30 分钟也不能溶解，表明沉淀物不是蛋白质。

菌液量	实验前后的 OD 值				-20°C 保存 15 天							
	是否产生沉淀	核酸 (ng/ul)	260/280	260/230	是否产生沉淀	有沉淀离心后测浓度			离心后再重悬, 37°C 20 分钟			
						核酸 (ng/ul)	260/280	260/230	沉淀是否可溶	核酸 (ng/ul)	260/280	260/230
200ml	无	458.5	1.93	2.17	是	452.8	1.93	2.21	否	457.8	1.92	2.18
500ml	无	1022.4	1.91	2.25	是	1026.5	1.93	2.22	否	1016.3	1.93	2.27

结论：P1159 提取的质粒，-20 度放置一段时间后，复溶后质粒中存在少量的沉淀物，沉淀物温育或蛋白酶 K 处理不能消化，表明非蛋白来源。离心去除沉淀后并不影响 OD 值读数。目前推测质粒中含有少量的玻璃超细微纤维和细菌多糖，经-20 度放置时，这些杂质在低温下会因分子运动减慢、疏水相互作用增强而聚集沉淀，因为建议若质粒产量出现沉淀时，离心去除即可。

### 实验 3: P1159, 红色大柱 C7 的乙醇残留和去除

实验步骤: 取 P1159 的红色大柱 C7, 先称重记录重量, 然后用两种方式过柱甩干:

- 离心过柱再甩干: 加入 9ml PW2 至柱子, 8000rpm 离心 3 分钟 (称重), 倒弃滤液后再 8000rpm 离心 10 分钟甩干称重, 然后室温放置 20 分钟或 65 度烘干 10 分钟称重。
- 离心甩干合并: 加入 9ml PW2 至柱子, 8000rpm 离心 10 分钟 (称重), 然后室温放置 20 分钟或 65 度烘干 10 分钟称重。

PW2 清洗后的重量		甩干		进一步晾干	
操作	柱子增加重量	操作	柱子增加重量	室温 20 分钟	或 65 度 10 分钟
9ml Buffer PW2 至柱子, 8000rpm 离心 3 分钟	180mg	8000rpm 甩干 10 分钟	138 mg	50 mg	0 mg
	180mg		122 mg	60 mg	0 mg
9ml PW2 至柱子, 8000rpm 离心 10 分钟			136 mg	50 mg	0 mg
			136 mg	60 mg	0 mg

结论: P1159 红色大柱 C7, 可以将离心和甩干合并成一步, 以减少操作步骤。8~9ml PW2 至柱子, 8000rpm 离心 10 分钟, 此时红色大柱 C7 增加了 136mg, 约含有 130ul Buffer PW2(80%乙醇), 为了更彻底去除乙醇, 甩干后柱子, 红色大柱需放置于 65 度烘箱中进一步烘干柱子 10 分钟是必要的。

### 实验 4: 红色大柱 C7 的洗脱体积与洗脱效率

实验步骤: 取 250ml/500ml 培养 14 小时的 LB 培养菌液 (含 pcDNA3.1 载体), 8000rpm 离心 3 分钟收集管细菌, 加入 12ml P1/RNase A 重悬, 12ml Buffer P2 裂解, 加入 12ml Buffer NS3 中和离心得上清液, 加入 0.2 倍 Buffer ERS4 混匀, 室温放置 5 分钟, -20 度放置 10 分钟沉淀内毒素, 倒入至 60ml 针筒中过滤得滤液, 加入 0.1 倍滤液体积的异丙醇混匀, 取全部混合液至红色大柱 C7 抽滤过柱, 5ml GWP 洗一次, 8ml PW2 清洗一次, 空甩, 烘干, 洗脱三次, 每次加入不同洗脱体积进行洗脱, 然后测量实得洗脱体积和浓度。

菌液用量	洗脱体积	实得洗脱体积	浓度	260/280	260/230	产量 (ug)	洗脱效率
500ml 菌液	第一次 1.5ml	1220ul	1090.1	1.91	2.28	1329.9	73.5%
	第二次 1.0ml	1000ul	284.6	1.91	2.28	284.6	15.7%
	第三次 1.0ml	1000ul	166.1	1.91	2.27	166.1	9.2%
	合并	3220ul	561.7	1.93	2.31	1808.6	
200ml 菌液	第一次 0.8ml	610ul	1392.2	1.92	2.33	849.3	62.3%
	第二次 0.8ml	780ul	511.9	1.92	2.26	399.3	29.3%
	第三次 0.8ml	800ul	125.8	1.89	2.05	100.7	7.4%
	合并	2190ul	622.6	1.93	2.29	1363.4	

结论: P1159 试剂盒采用超厚的玻纤滤膜, 柱子滤膜用量大, 除乙醇比较难晾干外, 洗脱比较难, 在 8000rpm 离心时, 滤膜约吸附 280-300ul 洗脱液 (提高离心速度至 10000rpm, 约损失 200ul), 因此最佳的洗脱是 1.5ml Elution Buffer 洗脱两次, 或 1.5ml Elution Buffer 洗脱第一次, 然后再加入 1.0ml Elution Buffer 洗脱第二次。