

P1233 性能验证报告

实验数据 1: 取不同体积的 LB 培养过夜的菌液，按 P1233 进行操作并记录抽滤过柱时间，以及用 300ul 进行洗脱时，测量实得体积和核酸浓度。实验流程细化为：取适量 LB 培养过夜的菌液至 50ml 离心管中，离心收集细菌，倒弃培养液。加入适量的 Buffer E1/RNase 重悬细菌，加入适量的 Buffer E2 碱裂解细菌，加入适量的 Buffer E3 酸中和，离心去除基因组 DNA 和蛋白质沉淀，得上清至过滤器中过滤得到澄清滤液，加入 1/3 倍体积的 Buffer E4 混匀。把纯化大柱 FE5 装在抽滤盒中，倒入混合液进行抽滤，记录混合液过柱时间，加入 2.5ml Buffer ETR 清洗柱子，加入 2.5ml Buffer EVB 清洗柱子，加入 5ml Buffer PW2 清洗柱子，空甩干燥柱子，最后加入 300ul Elution Buffer 洗脱出 DNA，测量实得体积和 OD 浓度纯度；再加入 300ul Elution Buffer 进行第二次洗脱，测量实得体积和 OD 浓度和纯度。

菌液用量	样品裂解和中和	抽滤过柱时间	洗脱 ul	实得体积 ul	浓度 ug/ul	A260/280	A260/230	产量 ug	合并浓度 ug/ul	全部总量 (ug)
20ml 培养液过夜的菌液	收集，加入 5ml E1 重悬，5ml E2 裂解，5ml E3 中和，过滤得上清，加入 5ml E4 混匀，得 20ml 混合液。	2 分钟	300ul 第一次	255	505.8	1.93	2.27	129.0	298.5	161.2
			300ul 第二次	285	108.4	1.89	2.22	30.9		
		2 分钟	300ul 第一次	250	527.8	1.93	2.27	131.9	298.7	161.3
			300ul 第二次	290	101.0	1.89	2.25	29.3		
		2 分钟	300ul 第一次	250	489.2	1.93	2.25	122.3	301.8	161.5
				300ul 第二次	285	129.5	1.90	2.15		
60ml 培养液过夜的菌液	收集，加入 5ml E1 重悬，5ml E2 裂解，5ml E3 中和，过滤得上清，加入 5ml E4 混匀，得 20ml 混合液。	7 分钟	300ul 第一次	235	1811.6	1.93	2.29	425.7	1080.7	562.0
			300ul 第二次	285	491.9	1.93	2.28	140.2		
		7 分钟	300ul 第一次	215	1768.8	1.94	2.29	380.3	1106.2	558.7
			300ul 第二次	290	595.7	1.92	2.27	172.8		
		7 分钟	300ul 第一次	240	1875.4	1.94	2.29	450.1	1081.2	573.0
				300ul 第二次	290	114.2	1.86	2.19		
100ml 培养液过夜的菌液	收集，加入 5ml E1 重悬，5ml E2 裂解，5ml E3 中和，过滤得上清，加入 5ml E4 混匀，得 20ml 混合液。	14 分钟	300ul 第一次	260	1625.5	1.94	2.28	422.6	1704.0	937.2
			300ul 第二次	290	1628.7	1.94	2.28	472.3		
		15 分钟	300ul 第一次	250	2858.7	1.96	2.29	714.7	1837.7	1001.6
			300ul 第二次	295	795.3	1.94	2.22	234.6		
		14 分钟	300ul 第一次	255	2713.3	1.95	2.28	691.9	1835.8	1000.5
				300ul 第二次	290	785.3	1.94	2.22		
150ml 培养液过夜的菌液	收集，加入 8ml E1 重悬，8ml E2 裂解，8ml E3 中和，过滤得上清，加入 8ml E4 混匀，得 32ml 混合液。	过滤 20 分钟堵柱后转离心过柱	300ul 第一次	250	4113.6	1.95	2.30	1028.4	2782.4	1474.7
			300ul 第二次	280	885.8	1.94	2.27	248.0		
			300ul 第一次	260	4793.3	1.95	2.30	1246.3	2687.5	1451.2
			300ul 第二次	280	925.5	1.94	2.28	259.1		
			300ul 第一次	260	3883.8	1.94	2.30	1009.8	2709.9	1463.4
			300ul 第二次	280	1440.4	1.94	2.29	403.3		

实验数据 2: 取 600ml LB 培养过夜的菌液，加入按 P1233 进行操作，加入 32ml Buffer P1 重悬，32ml Buffer P2 裂解，32ml Buffer E3 进行中和，离心并过滤得到澄清的滤液，加入 30ml Buffer E4，混匀。然后取不同体积的混合液进行过柱，验证纯化大柱 FE5 的线性度。

柱子	混合液	抽滤时间	洗脱	实得洗脱液体积	浓度 ug/ul	260/280	260/230	产量 ug	合并浓度 ug/ul	全部总量 (ug)
P1112 中的 EF Column	800ul		100ul		538.0	1.94	2.28	54		53
			100ul		521.7	1.93	2.29	52		
P1233 中的纯化大柱 FE5	10 ml	5 分 30 秒	第一次 300ul	250ul	1631.5	1.94	2.32	408	1112	606
			第二次 300ul	295ul	664.3	1.94	2.30	196		
	10 ml	5 分 40 秒	第一次 300ul	255ul	1821.9	1.94	2.32	465	1099	605
			第二次 300ul	295ul	397.0	1.93	2.30	117		
	20 ml	30 分	第一次 300ul	240ul	2688.9	1.96	2.31	645	1945	1041
			第二次 300ul	295ul	1028.2	1.95	2.30	303		
	20 ml	28 分	第一次 300ul	240ul	2868.4	1.95	2.31	688	2025	1084
			第二次 300ul	295ul	908.9	1.95	2.30	268		
	30 ml	离心过柱	第一次 300ul	240ul	3880.1	1.93	2.29	931	3071	1643
			第二次 300ul	295ul	2357.0	1.96	2.32	695		
	30 ml	离心过柱	第一次 300ul	240ul	3278.1	1.93	2.29	787	2694	1441
			第二次 300ul	295ul	1709.3	1.94	2.31	504		

注：当产量载量超过 0.8mg 时，负压抽滤速度会变明显变慢至 15-20 分钟，若需要加快提取速度，可以把柱子转移至 50ml 离心管中，转成离心操作。以上离心都在水平离心机中，5000rpm 进行操作。

实验数据 3: 取 200ml LB 培养过夜的菌液，加入按 P1233 进行操作，加入 20ml Buffer E1 重悬，20ml Buffer E2 裂解，20ml Buffer E3 进行中和，离心并过滤得到澄清的滤液，加入 20ml Buffer E4，混匀。然后取一半体积的混合液进行过柱，验证纯化大柱 FE5 在水平离心机和角度离心机中离心时，产量与洗脱体积的关系。

离心条件	柱子干重	空甩后重量	室温晾干后重量	洗脱	实得洗脱液	核酸 ng/ul	产量 ug	260/280	260/230
水平离心机： 过柱清洗 5000rpm/3min 空甩 5000rpm/10min 室温晾干 10 分钟 洗脱 5000rpm/5min	4.401g	4.413g	4.41g	第一次 150ul	110ul	2787	307	1.94	2.33
				第二次 150ul	150ul	217	33	1.89	2.30
				合并	260ul	1283	334	1.92	2.32
角度离心机， 过柱清洗 7000rpm/3min 空甩 10000rpm/3min 室温晾干 10 分钟 洗脱 10000rpm/3min	4.440g	4.451g	4.446g	第一次 150ul	112ul	2464	276	1.93	2.33
				第二次 150ul	168ul	244	41	1.89	2.31
				合并	280ul	1112	311	1.92	2.32

- 空甩后，柱子只增加~10mg 重量，说明只有极微量的 Buffer PW2 残留在滤膜中，室温晾干后只增加 6mg，说明柱子中残液极低，乙醇残留可以忽略。
- 当柱子产量在 300-400ug 时，一次洗脱就可以达到 80~90%，水平 5000rpm 离心时，柱子会残留 40ul 洗脱液；角度离心 10000rpm，柱子会残留 20ul。