

## P1230 性能验证报告

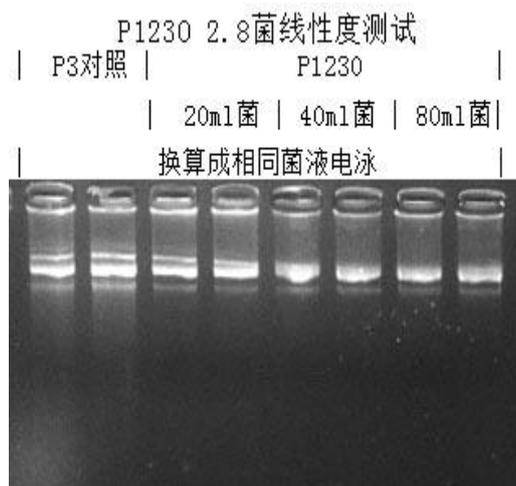
### 实验 1: 验证 P1230 试剂盒提取质粒效果

- 样品类型: 低拷贝载体的培养液 (25ml 和 50ml)
- 洗脱体积: 100ul
- 提取时间: 30 分钟
- 检测试剂盒: P1230
- 检测方法: nanodrop 和电泳

低拷贝菌线性度测试								
A260/230	A260/280	质粒浓度 (ng/ul)	质粒总量 (ug)	菌液用量 ml	1ml 菌液平均产量 ug	得率	试剂盒	菌种
2.85	1.91	31	3.1	2ml	1.56	100%	P1001C	低拷贝载体 1ml 培养 16 小时的 LB 培养液中含 1.5ug 质粒。
3.4	1.92	29	2.9		1.46	100%		
1.65	1.79	315	31.5	20ml	1.58	105%	P1230	
1.99	1.78	336	33.6		1.68	112%		
2.09	1.77	490	49.0	40ml	1.23	82%		
1.91	1.76	524	52.4		1.31	87%		
1.67	1.76	520	104.0	80ml	1.3	87%		
2	1.77	471	94.3		1.18	79%		

实验结论: 本次实验, 用 P1001C 作对照, 验证用 P1230 试剂盒提取低拷贝载体的质粒 DNA 以及核酸纯度。提取的质粒 DNA 用 Nanodrop 进行分析, 结果以下:

1. P1230 提取的低拷贝载体时, 质粒 DNA 的 A260/280 在 1.76-1.80., A260/230 在 1.6-2.5, 表明该试剂盒提取的质粒 DNA 纯度是达标的。
2. P1230 处理低拷贝载体时, 处理 20ml, 40ml, 80ml 菌液时, 质粒产量显线性上升, 产量高达 100ug(达到柱子最高结合力)。质粒 DNA 得率能达到经典质粒小提试剂盒 P100102C 的 80~100%。
3. P1154 处理低拷贝载体时, 采用超厚的小量柱设计, 低至 60ul 洗脱体积, 可以提高低拷贝载体时提取时, 质粒浓度无法上升的现象。
4. 从电泳来看, P1230 提取的质粒 DNA, 与经典的质粒小提取试剂 P1001-02C 没有差别, 说明提取效果好。



## 实验 2：验证 P1230 试剂盒不同载体的提取质粒效果

- 样品类型：低拷贝载体的培养液（10ml, 20ml, 40ml）
- 洗脱体积：200ul
- 提取时间：30 分钟
- 检测试剂盒：P1230
- 检测方法：nanodrop 和电泳

P1230 在不同拷贝菌提取效果								
A260/230	A260/280	质粒浓度 ng/ul	质粒总量 (ug)	菌液用量 ml	1ml 菌液质粒 平均产量 ug	得率	试剂盒	菌种
1.59	1.77	50.54	5.05	2ml	2.5	100%	P1001C	F 菌 低拷贝
1.13	1.76	49.32	4.93			100%		
1.8	1.78	122.54	24.51	10ml	2.5	98%	P1230	
2.07	1.83	236.18	47.24	20ml	2.4	94%		
2.13	1.83	436.20	87.24	40ml	2.2	87%		
1.03	1.73	30.82	3.08	2ml	1.5	100%	P1001C	R 菌 低拷贝
0.97	2.05	29.05	2.91			100%		
1.93	1.75	72.44	14.49	10ml	1.4	97%	P1230	
2.21	1.82	143.14	28.63	20ml	1.4	95%		
2.22	1.81	275.25	55.05	40ml	1.4	92%		
1.04	1.75	36.04	3.6	2ml	1.8	100%	P1001C	sul 菌 低拷贝
1.2	1.78	34.82	3.48			100%		
1.7	1.78	83.12	16.62	10ml	1.7	92%	P1230	
2.04	1.87	172.68	34.54	20ml	1.7	96%		
2.02	1.83	362.52	72.504	40ml	1.8	101%		
1.95	1.82	205.76	20.58	2ml	10.0	100%	P1001C	7-1 菌 高拷贝
2.13	1.83	207.21	20.72			100%		
2.25	1.82	413.74	82.75	10ml	8.2	82%	P1230	
2.23	1.84	485.17	97.03	20ml	4.9	49%		

实验结论：本次实验，用 P1001C 作对照，验证用 P1230 试剂盒提取不同载体的质粒 DNA 以及核酸纯度。提取的质粒 DNA 用 Nanodrop 进行分析，结果以下：

1. P1230 提取的低拷贝载体时，质粒 DNA 的 A260/280 在 1.76-1.90.，A260/230 在 1.6-2.5，表明该试剂盒提取的质粒 DNA 纯度是达标的。
2. P1230 处理低拷贝载体时，处理 10ml, 20ml, 40ml 菌液时，质粒产量显线性上升，质粒 DNA 得率能达到经典质粒小提试剂盒 P100102C 的 80~100%。
3. P1230 处理高拷贝载体时，最高产量可达到 100ug，超过载量的质粒不结合。

### 实验数据 3: 柱子升级后, 角度离心机和水平离心机的对比

**混合液的制备:** 取 300ml LB 培养过夜细菌, 加入 12ml Buffer P1/RNase 重悬, 12ml Buffer P2 碱裂, 6ml Buffer LEN3 中和, 离心并过滤得到澄清滤液, 加入等倍体积的 Buffer LN4, 得到约 60ml 混合液。

试剂盒	离心条件	混合液体积	洗脱	实得洗脱液	产量 ug	260/280	260/230	DNA 得率
对照 P1154	转移 0.8ml 混匀液至 DNA 小量柱中, 离心过柱, 0.5ml EWB 清洗, 用 0.65ml PW2 清洗, 空甩后最用 100ul EB 洗脱作为对照.				4.4	1.87	1.13	参考
					4.8	1.86	1.22	
P1230	水平离心机: 过柱清洗 5000rpm/3min。 空甩 5000rpm/10min。 洗脱 5000rpm/5min	11ml	第一次 150ul	102ul	42.8	1.91	2.04	67.7%
			第二次 150ul	150ul	21.7	1.88	1.32	34.2%
			<b>合并</b>	<b>252ul</b>	58.7	1.89	1.63	92.8%
		17ml	第一次 150ul	100ul	62.2	1.92	1.94	63.7%
			第二次 150ul	150ul	24.1	1.89	1.69	24.7%
			<b>合并</b>	<b>250ul</b>	85.5	1.90	1.75	87.4%
	角度离心机, 过柱清洗: 7000rpm/3min 空甩 10000rpm/3min。 洗脱 10000rpm/3min	11ml	第一次 100ul	88ul	52.0	1.92	1.89	82.6%
			第二次 100ul	96ul	9.0	1.88	1.83	14.3%
			<b>合并</b>	<b>184ul</b>	54.0	1.90	1.73	85.6%
		17ml	第一次 100ul	90ul	58.1	1.84	0.44	59.5%
			第二次 100ul	97ul	26.0	1.88	0.49	26.6%
			<b>合并</b>	<b>187ul</b>	84.7	1.88	0.51	86.6%

由表格可得到如下结果:

- 水平离心机, 柱子会残留 50ul 残液, 第 1 次 150ul 洗脱时, 可洗脱出 60-70% 的 DNA。
- 角离离心机, 柱子会残留 16-20ul 残液, 第 1 次 100ul 洗胶时, 可洗脱出 60-80% 的 DNA。
- 与对照小量相比, 800ul 混合液得 4.6ug 质粒 DNA; P1230 时, 取 11ml 混合液过柱得 58.7/54ug, 提取效率达 85-93%; 取 17ml 混合液过柱, 提取效率高达 86~88%, 说明 P1230 的纯化大柱 FC8 提取效率与小柱相当。

## 实验数据 4：新旧柱子的最高结对比

**混合液的制备：**取 500ml LB 培养过夜细菌，加入 24ml Buffer P1/RNase 重悬，24ml Buffer P2 碱裂，12ml Buffer LEN3 中和，离心并过滤得到澄清滤液，加入等倍体积的 Buffer LN4。转移 10ml 混合液（约 100ug 质粒 DNA）和 15ml 混合液（约 150ug）至 P1230 的两种柱子中，5000rpm 水平离心机离心 3 分钟过柱，2.5ml EWB 清洗一次；4.5ml PW2 清洗一次；角度离心机 10000rpm 空甩 3 分钟，加入 100ul Elution Buffer 洗脱两次，角度离心机 10000rpm 离心出洗脱液，并计算洗脱液体积，和测量 OD 值。

投入量	柱子	洗脱液	实得洗脱液	核酸(ng/ul)	产量 (ug)	260/280	260/230
100ug	旧柱子 HiPure DNA Mini Column III	第一次 100ul	81ul	889.2	88.9	1.91	2.20
		第二次 100ul	100ul	231.2	23.1	1.90	2.05
		<b>合并</b>	<b>181ul</b>	<b>531.4</b>	<b>106.3</b>	1.92	2.14
	新柱子 纯化大柱 FC8	第一次 100ul	80ul	789.0	78.9	1.89	2.25
		第二次 100ul	97ul	298.0	29.8	1.90	2.21
		<b>合并</b>	<b>177ul</b>	<b>520.3</b>	<b>104.1</b>	1.91	2.22
150ug	旧柱子 HiPure DNA Mini Column III	第一次 100ul	80ul	1053.4	105.3	1.90	2.24
		第二次 100ul	96ul	249.1	24.9	1.91	1.90
		<b>合并</b>	<b>176ul</b>	<b>613.9</b>	<b>122.8</b>	1.93	2.14
	新柱子 纯化大柱 FC8	第一次 100ul	80ul	933.2	93.3	1.90	2.17
		第二次 100ul	100ul	437.1	43.7	1.91	1.91
		<b>合并</b>	<b>180ul</b>	<b>646.5</b>	<b>129.3</b>	1.89	2.05

由表格可得到如下结果：

- 纯化大柱 FC8 和 HiPure DNA Mini Column III（分体柱）一样，最高结合力只能达到 120ug。
- 角度离心机,10000rpm 离心机，洗脱液会损失 20ul。
- 角度离心机，第一次 100ul 洗脱时，能洗脱出 70-80%的 DNA，属于高浓度 DNA。第二次洗脱时，能洗脱出 90-95%的 DNA，但也会降低质粒浓度。