

P1158B 无内质粒大提性能验证报告

实验 1：抽滤与离心操作方式的对比

实验步骤：取 150ml 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 8ml P1/RNase A 重悬，8ml Buffer P2 裂解，加入 4ml Buffer LEN3 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 0.6 倍滤液体积的 LN4 混匀，取全部混合液至红色大柱 C7 抽滤过柱，10ml EWV 洗一次，10ml PW2 清洗一次，5ml PW2 清洗一次，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(μl)	浓度 μg/μl	260/280	260/230	产量 μg
抽滤过柱	100ml	第一次 1.5ml	1250	340.72	1.92	2.26	425.90
		第二次 1.0ml	1000	80.15	1.92	1.98	80.15
		合并	2250	224.59	1.91	2.17	505.33
	100ml	第一次 1.5ml	1230	314.76	1.91	1.37	387.15
		第二次 1.0ml	1000	99.82	1.90	0.72	99.82
		合并	2230	217.50	1.91	1.15	485.02
离心过柱	100ml	第一次 1.5ml	1250	330.45	1.92	2.28	413.07
		第二次 1.0ml	1000	88.65	1.92	2.27	88.65
		合并	2250	221.46	1.92	2.22	498.27
	100ml	第一次 1.5ml	1260	326.68	1.92	2.30	411.62
		第二次 1.0ml	1000	92.96	1.90	2.28	92.96
		合并	2260	221.94	1.92	2.26	501.59

实验 2：P1158B 红色大柱 C7 的乙醇残留和去除

实验步骤：取 P1158B 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：P1158B 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 ml 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 3: P1158B 菌液梯度与产量

实验步骤: 取 50ml/100ml/250ml 培养 14 小时的 LB 培养菌液 (含 pUC18 载体), 8000rpm 离心 3 分钟收集管细菌, 加入 8ml P1/RNase A 重悬, 8ml Buffer P2 裂解, 加入 4ml Buffer LEN3 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 0.6 倍滤液体积的 LN4 混匀, 取全部混合液至红色大柱 C7 抽滤过柱, 8ml Buffer EVVB 洗一次, 8ml Buffer PW2 清洗一次, 8ml Buffer PW2 清洗一次, 烘干, 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(μl)	浓度 μg/μl	260/280	260/230	产量 μg
50ml 菌液	第一次 1.5ml	1.1	277.51	1.89	1.92	305
	第二次 1.0ml	1.0	112.22	1.86	1.92	112
	合并	2.1	198.50	1.89	2.01	417
100ml 菌液	第一次 1.0ml	0.69	521.95	1.91	0.86	360
	第二次 1.0ml	1.0	294.56	1.91	1.21	295
	合并	1.69	385.27	1.91	0.99	651
250ml 菌液	第一次 1.5ml	1.13	942.54	1.88	2.27	1065
	第二次 1.0ml	1.05	402.31	1.92	2.31	422
	合并	2.18	662.88	1.90	2.30	1445