

D6948 Endo-Free Plasmid Mini Kit I

无内毒素质粒小提 I 常见问题及排查方法

1. 实验前检查 Solution II 是否有沉淀物析出,久置或低温都会让 Solution II 析出沉淀,如有沉淀析出,需按照说明书提示:在 37°C 水浴至沉淀完全溶解;如 Solution II 未能完全溶解,可能会导致菌体无法裂解。

2. 实验前, HBC Buffer 必须按照说明书加入【异丙醇】稀释备用。请开盖闻气味确认已加入醇类稀释。稀释错误或未稀释会导致 DNA 无法挂柱结合,致提取失败。

3. 实验前, DNA Wash Buffer 必须按照说明书加入【无水乙醇】稀释备用。请开盖闻气味确认是否已加入醇类稀释。稀释错误或未稀释会导致 DNA 无法挂柱结合,致提取失败。

4. 加完 Solution I 后注意彻底涡旋混匀,必须对光观察直至看不到有任何菌体颗粒。

5. 加入 Solution II 和 N3 Buffer 后应注意充分混匀,可进行多次颠倒混匀。

6. 如加入 ETR Solution 后分层不明显,可按照以下方法改进:

1) 按照说明书步骤,在加入上清 0.1 倍体积的 ETR Solution 后,涡旋混匀,冰浴 10min,将孵育温度调整到 50°C 孵育 10min;

Note: 因为 ETR Solution 在低温呈溶解状态,升高温度可帮助析出,使 ETR Solution 与上清更容易分层。

2) 孵育完成后,离心时首先确定离心机设置温度是常温(有些离心机可控温至 4°C,低温离心条件 ETR Solution 不易分层);

3) 如 ETR Solution 与上清分层不明显,还可将离心速度提高至 13,000xg,延长离心时间至 8min 促进分层。

以上步骤为针对 ETR Solution 与上清分层不明显的操作,如认为 ETR Solution 处理步骤过多,推荐使用快速法 D6948B 型试剂盒,节省更多实验时间。

7. 将混合液转移到 HiBind® DNA Mini Column 前,必须加入转移出上清的 0.5 倍体积的无水乙醇混匀,正确调节 DNA 与柱子的结合条件。如没有加入乙醇, DNA 将被全部冲掉,致提取失败。

8. 如试剂盒购买时间较长,或 HiBind® DNA Mini Column 暴露在空气中的时间较长,可配制 3M NaOH 活化柱子,具体操作如下:

1) 将一个新的 HiBind® DNA Mini Column 套入到 2mL 收集管中,加入 200µl 3M NaOH 平衡缓冲液至柱子中;

2) 室温放置 3-5min;

3) 室温下, 12,000xg 离心 2min, 弃滤液;

4) 将 HiBind® DNA Mini Column 重新套回到 2mL 收集管中,加入 700µl 灭菌水

至柱子中；

5) 室温下，12,000xg 离心 2min，弃滤液；

6) 将 HiBind® DNA Mini Column 重新套回到 2mL 收集管中。

以上操作称为柱平衡，平衡好的柱子即可按照说明书中的步骤提取，经过柱平衡处理的柱子可在室温下放置 1-2 周。

9. 如产物浓度偏低：

(1) 按照说明书进行第二次洗脱。洗脱方法：将第一次洗脱的 Elution Buffer 重新吸回 HiBind® DNA Mini Column，室温等待 2-3min，再次离心；

(2) 建议将菌体重新划固体平板活化，在锥形瓶内摇菌利于菌体生长，摇菌时间控制在 12-16h。

10. 不要随意缩小说明书中的洗脱体积 30-100 μ l，过低的洗脱体积会大幅降低洗脱效率。如果有高浓度譬如 1 μ g/ μ l 的要求，可采用异丙醇沉淀浓缩办法，或采用 D6950 无内毒素小提 II 型试剂盒，可在 2mL 离心机内操作 15ml 菌液。

11. 如跑电泳没有条带或条带不正常：

1) 先检查 Loading Buffer 是否正常，可尝试更换新的 Loading Buffer 重新点样；

2) 检查肉眼可见的 Loading Buffer 指示带是否还在电泳胶上，排除由于跑胶时间过长跑脱板的情况；

3) 如产物点电泳时无法正常沉降，绝大部分情况下由于空甩不完全，乙醇残留所致，可在下次提取中，提高离心机速度或延长空甩时间至 5~10min，可解决残留问题；

4) 尝试检测产物浓度，若浓度过低，请保证上样质粒总量在 100ng 左右，才能跑出较正常的条带。

如按照上述步骤仍无法排查问题，请提供单位名称及试剂盒条形码（即盒外标签 Lot 开头数字字母组合）核验正品货源，添加技术支持 QQ: 800848200 获取更多信息。