

# D6915 Endo-free Plasmid Midi Kit

## 无内毒素中量提取 常见问题及排除方法

1. 实验前检查试剂盒中的 Solution II 和 HBC Buffer 是否有沉淀物析出，久置或低温都会让 Solution II 和 HBC Buffer 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。
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. 菌液培养时间不宜过长，用量不宜超过说明书中建议的最大体积 50mL，如菌密度较大，需按照比例酌情增加 Solution I、Solution II 和 N3 Buffer 的用量，以免过载。
5. 离心收集菌体后，加入 Solution I 重悬，注意一定要将菌体彻底打散，不要留下菌团，可对着光检查。如菌团未能彻底打散，则加入 Solution II 后会无法彻底裂解，这是导致提取结果不稳定的关键因素之一。
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 D6915B 型试剂盒，节省更多实验时间。
7. 将混合液转移到 HiBind<sup>®</sup> DNA Midi 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. 在洗脱前必须按照说明书步骤空柱子离心，如离心后取出柱子仍闻到明显的乙醇的气味，建议按照说明书中的选做步骤进一步干燥柱子。
9. 如产物浓度偏低，建议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<sup>®</sup> DNA Midi Column，室温等待 2-3min，再次离心。

10. 不要随意缩小说明书中的洗脱体积至小于 0.5mL, 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 $\mu$ g/ $\mu$ l 的要求, 可采用异丙醇沉淀浓缩办法。

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。