

## HiPure PCR Pure 96 Kit

PCR 产物回收 DNA 试剂盒

### 产品简介

本产品为 PCR 产物，酶促反应液、粗制基因组 DNA 片段回收纯化提供一条快速的解决方案。试剂盒采用硅胶柱纯化技术，适合于从 PCR 产物、限制性内切酶切体系、或其它酶促反应液中回收 50bp-20Kbp DNA 片段。纯化的 DNA 可直接用于自动测序，连接，酶切，PCR，标记等。HiPure PCR Pure 96 Kit 采用 96 孔结合板，适合于高通量处理 PCR 产物或酶促反应液。

### 产品组份

产品编号	D2124-01	D2124-02	D2124-03
纯化次数	1 x 96 Preps	4 x 96 Preps	20 x 96 Preps
Buffer DP	60 ml	250 ml	5 x 250 ml
Buffer DW2*	50 ml	3 x 50 ml	7 x 100 ml
Elution Buffer	20 ml	60 ml	2 x 120 ml
HiPure DNA Plate	1	4	20
1.6 ml Collection Plate	1	4	20
0.5ml Elute Plate	1	4	20

### 保存条件

本产品在室温下可以保存 18 个月。HiPure PCR Pure 96 kit 可结合 20 $\mu$ g 的 DNA。

## 准备事项

- 在 Buffer DW2 中，加入 4 倍体积的无水乙醇，并于室温保存。
- 水平式离心机 (3,000~5,000 × g)

## 实验步骤

1. 短暂离心 PCR 产物、酶促反应产物、或粗制基因组 DNA，用移液枪测量其体积，并转移 0.5-2.2ml 深孔板中（自备）。  
不需去除矿物油。测量体积时只需测 PCR 反应液体积，不包括矿物油的体积。
2. 加入合适体积的 Buffer DP 至 PCR 产物中，贴上封口膜，颠倒混匀数次，短暂离心收集孔口的液滴。
  - a) 回收 >100bp 片段：加入 3 倍体积 Buffer DP。
  - b) 回收 <100bp 片段：加入 3 倍体积 Buffer DP 和 1 倍体积异丙醇。
  - c) 回收基因组 DNA：把 DNA 稀释至 200ul，加入 400ul Buffer DP 和 200ul 异丙醇。

## 离心方案

3. 将 HiPure DNA Plate 放在 1.6ml 收集板中。把第 2 步的混合液转移至结合板中。  
3,000~ 5,000 × g 离心 3 分钟。
4. 倒弃滤液，把结合板放回收集板中。加入 700ul Buffer DW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。3,000~ 5,000 × g 离心 3 分钟。  
Buffer DW2 使用前，按瓶子上的标签指示，用无水乙醇进行稀释。
5. 倒弃滤液，把结合板放回收集板中。再加入 700ul Buffer DW2 至柱子中。3,000~ 5,000 × g 离心 3 分钟。
6. 倒弃滤液，把结合板套回收集板中，3,000~5,000 × g 离心 3 分钟。取下结合板，放置 55°C 烘箱中干燥 10 分钟。
7. 把结合板放在 0.5ml 收集板中，加入 50~100ul Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央。

**放置 3 分钟。>3,000 × g 离心 3 分钟。**

为充分洗脱出 DNA，减少洗脱液损耗，这一步离心速度最好超过 4500 × g。4500 × g 离心洗脱时约为 15ul 洗脱液损失。若需要获得最高产量，建议重复第 7 步进行第二步洗脱。

若回收大于 5KB 以上片段时，最好把 Elution Buffer 预热至 55°C，并重复 2 次洗脱。重复洗脱时，把得到洗脱液再转移至柱子进行第二次洗脱，以获得高浓度 DNA。

Elution Buffer 成分为 10mM Tris,pH8.5 可以用 Buffer TE 或灭菌水(pH>6.5)代替。

加热浓缩 DNA: 把洗脱板放置于 55°C 烘箱干燥 30~60 分钟蒸发水份来浓缩 DNA，水份完全挥发后，补加入 20~30ul Elution Buffer 至孔中，贴上封口膜，振荡数分钟溶解 DNA。

### 负压抽滤方案

4. 把废液收集槽放在真空抽滤盒底盒的内部。盖上真空抽滤盒的上盖，把 HiPure DNA Plate 放在抽滤盒上盒的内槽中。连接好真空泵和真空抽滤盒。
5. 用 8 道移液枪，把第 2 步的混合液转移至结合板中。打开真空泵，用手压紧结合板。压力上升后松开手。抽滤 1~3 分钟直至全部溶液过滤完毕，关闭真空泵。
6. 当压力降至零时，每孔中加入 700ul Buffer DW2。打开真空泵，用手压紧结合板。压力上升后松开手，抽滤 1~2 分钟。  
Buffer DW2 使用前，按瓶子上的标签指示，用无水乙醇进行稀释。
7. 每孔中再加入 700ul Buffer DW2，抽滤 1~2 分钟。
8. 每孔中再加入 300 ul 无水乙醇，抽滤 5 分钟。
9. 关闭真空泵，当压力降至零度时，取下结合板。在一叠吸水纸上用力垂直拍打 7-8 次，使孔壁的液滴流出。
10. 把结合板放回抽滤盒中。打开真空泵，用手压紧结合板。压力上升后松开手。再抽滤 10 分钟，把结合板放置于 55°C 烘箱中进一步干燥 10 分钟。
11. 移开抽滤盒的上盖，倒弃废液槽中的液体。把废液槽放回抽滤盒中，并在其上部放置一块 96 孔 500ul 收集板。盖上抽滤盒的上盖，调整结合板的位置，使之结合板底部的每个突出部分都插入收集板。
12. 加入 100ul Elution Buffer 或灭菌水至结合板的膜中央。静置 3 分钟。打开真空泵，

用手压住上盖，当压力上升至最高时，松开手，抽滤 5 分钟。丢弃结合板，在收集板上贴上封口膜，把 DNA 保存于 4℃ 或 -20℃。

抽滤时洗脱体积损耗比较多，洗脱体积不要低于 70 $\mu$ l。这一步可以按离心方案的第 7 步进行洗脱。若回收大于 5KB 以上片段时，最好把 Elution Buffer 预热至 55℃，并重复 2 次洗脱。重复洗脱时，把得到洗脱液再转移至柱子进行第二次洗脱，以获得高浓度 DNA。

Elution Buffer 成分为 10mM Tris,pH8.5 可以用 Buffer TE 或灭菌水(pH>6.5)代替。

加热浓缩 DNA: 把洗脱板放置于 55℃ 烘箱干燥 30~60 分钟蒸发水份来浓缩 DNA，水份完全挥发后，补加入 20~30 $\mu$ l Elution Buffer 至孔中，贴上封口膜，振荡数分钟溶解 DNA。

## 常见问题

### 1. 回收效率低

- **洗脱不充分:** 建议用洗脱液洗脱两次，以获得最高的回收率。洗脱液必须加入柱子的膜中央。洗脱效率取决于洗脱体积和次数。
- **试剂准备有误:** Buffer DW2 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。
- **结合液加入体积不足:** Buffer DP 的体积是样品体积的 3 倍。
- **样品含有表面活性剂:** 处理含表面活性剂的酶促反应液时，加入 3 倍体积 Buffer DP 和 1 倍体积异丙醇至反应液进行回收。

### 2. 连接不理想

- **乙醇污染:** 洗脱 DNA 前，打开柱子的盖子，空气干燥 10~15 分钟。
- **引物二聚体去除不干净:** 当引物二聚体超过 100bp 时，建议使用 MagPure A3 XP(Cat.No. BP-5)进行回收。通过调整 MagPure A3 XP 与产物体积比例，可高效去除 100~300bp 的杂带。