
Arbeitsanleitung – Instruction Manual

peqGOLD Cycle-Pure Kit

(Classic-Line & Safety-Line)



INHALT

| | |
|--------------------------------------|---|
| EINLEITUNG | 1 |
| FUNKTIONSPRINZIP | 1 |
| VORTEILE | 1 |
| BINDEKAPAZITÄT | 1 |
| KITBESTANDTEILE | 2 |
| LAGERUNG | 2 |
| WICHTIGE HINWEISE | 2 |
| GEFÄHRLICHE INHALTSSTOFFE | 3 |
| PEQGOLD CYCLE-PURE PROTOKOLL | 5 |
| AUFKONZENTRIERUNG DER DNA | 6 |
| QUANTIFIZIERUNG UND LAGERUNG DER DNA | 6 |
| KURZANLEITUNG FÜR ERFAHRENE ANWENDER | 7 |
| BESTELLINFORMATIONEN | 8 |
| TROUBLESHOOTING TIPS | 9 |

CONTENT

| | |
|--------------------------------------|----|
| INTRODUCTION | 10 |
| PRINCIPLE | 10 |
| BENEFITS | 10 |
| BINDING CAPACITY | 10 |
| KIT COMPONENTS | 11 |
| STORAGE AND STABILITY | 11 |
| BEFORE STARTING | 11 |
| DANGEROUS COMPONENTS | 12 |
| PEQGOLD CYCLE-PURE PROTOCOL | 14 |
| CONCENTRATION OF DNA | 15 |
| YIELD AND QUALITY OF DNA | 15 |
| SHORT PROTOCOL FOR EXPERIENCED USERS | 16 |
| ORDERING INFORMATION | 17 |
| TROUBLESHOOTING TIPS | 18 |
| | |
| APPENDIX | 19 |

EINLEITUNG

Die peqGOLD Cycle-Pure Kits bieten eine schnelle und einfache Methode, um DNA-Fragmente mit Größen von 50 bp bis 40 kbp aus PCR- und anderen Reaktionsansätzen aufzureinigen. Sie gestatten die Bearbeitung einzelner oder zahlreicher Proben in weniger als 15 Minuten, wobei beliebig große Reaktionsansätze eingesetzt und Ausbeuten von 80 % bis 90 % erreicht werden können.

DNA-Fragmente, die mit den peqGOLD Cycle-Pure Kits aufgereinigt wurden, können direkt für alle Arten von Folgeexperimenten, wie erneute PCR, Sequenzierungen, Restriktionsverdau, Ligationen und Labeling-Reaktionen eingesetzt werden.

peqGOLD Cycle-Pure Kits sind wahlweise mit Safety-Line oder mit Classic-Line Säulen erhältlich (Safety-Line, Best.-Nr. 12-6492-xx; Classic-Line, Best.-Nr. 12-6493-xx). Schnappdeckel sorgen bei den Safety-Line Säulen für einen sicheren Verschluss und dadurch für einen zusätzlichen Schutz vor Kreuzkontaminationen. Classic-Line Säulen haben keinen Deckel und erleichtern so das Handling.

FUNKTIONSPRINZIP

Der (PCR-) Reaktionsansatz wird mit einem speziellen Bindepuffer gemischt und durch eine PerfectBind DNA Column zentrifugiert, in der die DNA reversibel an eine PerfectBind-Silikamembran binden kann. Nach zwei Waschschrinen, die eine effiziente Entfernung von Salzen, freien Nukleotiden, Oligonukleotiden, Polymerasen und anderen Enzymen ermöglichen, wird die gereinigte DNA mit deionisiertem Wasser oder einem Nidrigsalzpuffer eluiert.

VORTEILE

- ! Schnelligkeit – DNA-Aufreinigungen in weniger als 15 Minuten.
- ! Zuverlässigkeit – Optimierte Puffer garantieren reinste DNA.
- ! Sicherheit – Keine Notwendigkeit für organische Extraktionen.
- ! Qualität – Für alle Folgeanwendungen geeignete DNA.

BINDEKAPAZITÄT

Die Bindekapazität der verwendeten PerfectBind DNA Columns beträgt ca. 30 µg DNA.

KITBESTANDTEILE

| peqGOLD Cycle-Pure Kits | 5 Reinigungen | 50 Reinigungen | 200 Reinigungen |
|--|---------------|----------------|-----------------|
| Bestellnummer Classic-Line | 12-6493-00 | 12-6493-01 | 12-6493-02 |
| Bestellnummer Safety-Line | 12-6492-00 | 12-6492-01 | 12-6492-02 |
| Bestandteile | | | |
| PerfectBind DNA Columns | 5 | 50 | 200 |
| 2 ml Collection Tubes | 5 | 50 | 200 |
| CP Buffer | 1.5 ml | 20 ml | 80 ml |
| CG Wash Buffer | 5 ml | 20 ml | 3 x 20 ml |
| Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0) | 1.5 ml | 15 ml | 60 ml |
| Arbeitsanleitung | 1 | 1 | 1 |

LAGERUNG

Die Aufbewahrung des peqGOLD Cycle-Pure Kits sollte bei Raumtemperatur erfolgen. Die Komponenten des Kits bleiben unter diesen Bedingungen für mindestens 12 Monate ab Lieferung stabil. Kristalle, die sich evtl. während der Lieferung oder Lagerung im CP Buffer bilden, können durch Erwärmen auf 37 °C wieder gelöst werden.

WICHTIGE HINWEISE

Bitte lesen Sie das vorliegende Protokoll vor der ersten Verwendung des Kits vollständig durch und legen Sie vor Präparationsbeginn alle für die Isolierung benötigten Materialien bereit. Die peqGOLD-Kits liefern zuverlässig sehr gute Resultate, wenn sorgfältig nach den Anweisungen der Protokolle gearbeitet wird.

! Der CG Wash Buffer wird als Konzentrat geliefert und muss vor seiner ersten Verwendung mit absolutem Ethanol verdünnt werden:


| | |
|------------|--|
| 12-6492-00 | 5 ml CG Wash Buffer mit 20 ml 100 % EtOH mischen. |
| 12-6493-00 | |
| 12-6492-01 | 20 ml CG Wash Buffer mit 80 ml 100 % EtOH mischen. |
| 12-6493-01 | |
| 12-6492-02 | 3 x 20 ml CG Wash Buffer mit 3 x 80 ml 100 % EtOH mischen. |
| 12-6493-02 | |

! Alle Zentrifugationsschritte müssen bei Raumtemperatur ausgeführt werden.

! Verdünnten CG Wash Buffer bei RT lagern

GEFÄHRLICHE INHALTSSTOFFE

peqGOLD Cycle-Pure Kit

| Bestandteile | Signalwort / Symbole | Gefährliche Inhaltsstoffe | H- und P-Sätze |
|--|---|---|---|
| PerfectBind DNA Columns | - | - | - |
| 2 ml Collection Tubes | - | - | - |
| CP Buffer | <p>DANGER</p>  | <p>guanidinium thiocyanate 25-50%, propan-2-ol 20-<25%, polyethylene glycol octylphenol ether 0.3- <1%, CAS: 593-84-0, 67-63-0, 9002-93-1</p> | <p>H225, H302+H312+H332, H314, H336, H412, P101, P102, P103, P210, P241, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P405, P501</p> |
| CG Wash Buffer | - | - | - |
| Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0) | - | - | - |

| H- und P-Sätze | Erläuterungen |
|-----------------------|--|
| H225 | Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. |
| H302+H312+H332 | Gesundheitsschädlich bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen. |
| H314 | Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. |
| H336 | Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen. |
| H412 | Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. |
| P101 | Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten. |
| P102 | Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen. |
| P103 | Vor Gebrauch Kennzeichnungsetikett lesen. |
| P210 | Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen. |
| P241 | Explosionsschutz elektrische Geräte/Lüftungsanlagen/Beleuchtungsanlagen/... verwenden. |
| P303+P361+P353 | BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen. |
| P305+P351+P338 | BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. |
| P405 | Unter Verschluss aufbewahren. |
| P501 | Inhalt/Behälter ... zuführen. |

PEQGOLD CYCLE-PURE PROTOKOLL

Benötigte Materialien, die nicht im Lieferung enthalten sind:

- ! Steriles dH₂O (optional)
- ! 100 % Ethanol
- ! Sterile 1.5 ml Zentrifugenröhrchen

1. Agarosegelanalyse des PCR-Ansatzes

Den Erfolg und die Qualität der PCR-Amplifikationsreaktion durch Agarosegelelektrophorese und anschließende Ethidiumbromidfärbung verifizieren.

2. Laden und Binden

Das Volumen des PCR-Ansatzes bestimmen und gleiches Volumen CP Buffer zugeben. Anschließend durch Vortexen sorgfältig mischen.

Bei PCR-Fragmenten < 200 bp kann durch die Verwendung der dreifachen Menge CP Buffer ein besseres Ergebnis erzielt werden.

Eine PerfectBind DNA Column in ein 2 ml Collection Tube stecken und den mit CP Buffer versetzten Reaktionsansatz auf die Säule pipettieren. Anschließend für 1 Minute bei 10.000 x g* und Raumtemperatur zentrifugieren. Säulendurchfluss verwerfen und Collection Tube weiterverwenden.

3. Waschen

750 µl des komplettierten CG Wash Buffers auf die Säule pipettieren und für 1 Minute bei 10.000 x g* zentrifugieren. Säulendurchfluss verwerfen und Waschschrift einmal wiederholen.

4. Trocknen (Essentieller Schritt! Zeit nicht verkürzen!)

PerfectBind DNA Column in das geleerte 2 ml Collection Tube stecken und durch einminütiges Zentrifugieren bei 10.000 x g* vollständig trocknen.

* Umrechnung g (rcf) / rpm siehe Appendix, S. 19

5. Elution

PerfectBind DNA Column in ein sauberes 1.5 ml Zentrifugenröhrchen stecken und die DNA mit 30 µl bis 50 µl Elution Buffer oder deionisiertem Wasser eluieren. Dazu die Elutionslösung direkt auf die Säulenmatrix pipettieren und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend die Säule für 1 min. bei 5.000 x g* zentrifugieren.

Dabei werden 80 % bis 90 % der gebundenen DNA eluiert. Eine optionale zweite Elution verbessert den absoluten Ertrag auf bis zu 95 %, erniedrigt jedoch die Konzentration.

Bei Fragmenten > 500 bp werden in der Regel Gesamtausbeuten erreicht, die deutlich über 80 % der im PCR-Reaktionsansatz enthaltenen DNA liegen. Die Gesamtausbeuten für Fragmente zwischen 50 bp und 500 bp liegen im Normalfall zwischen 55 % und 80 %.

AUFKONZENTRIERUNG DER DNA

DNA-Fragmente, die mit den peqGOLD Cycle-Pure Kits aufgereinigt wurden, können bei Bedarf noch weiter konzentriert werden. Hierzu zunächst NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0.1 M und danach 2 Volumen absolutes Ethanol zugeben. Ansatz durch Vortexen sorgfältig mischen und für 15 Minuten bei 10.000 x g* zentrifugieren. Anschließend Überstand verwerfen, 700 µl 70 % Ethanol zugeben und für 2 Minuten bei 10.000 x g* zentrifugieren. Überstand verwerfen, Pellet für 2 Minuten lufttrocknen und DNA in 20 µl sterilem, deionisiertem Wasser oder 10 mM Tris-HCl, pH 9.0 lösen.

QUANTIFIZIERUNG UND LAGERUNG DER DNA

Um die Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung zu bestimmen, muss die Absorption eines geeignet verdünnten Aliquots (10- bis 50-fach) bei 260 nm und 280 nm gemessen werden. Eine A₂₆₀-Einheit entspricht dabei 50 µg DNA/ml. Die Konzentration berechnet sich demnach wie folgt:

$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{Absorption}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Das A_{260/280}-Verhältnis ist ein Maß für die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren. Die mit den peqGOLD Cycle-Pure Kits erzielbaren Werte von 1.8 bis 2.0 entsprechen DNA einer Reinheit von 90 % bis 100 %.

Alternativ können der ungefähre Ertrag und die Qualität der erhaltenen DNA auch durch Agarosegelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromidfärbung und Vergleich mit bekannten DNA-Proben bestimmt werden.

DNA-Fragmente, die mit dem peqGOLD Cycle-Pure Kit aufgereinigt wurden, können in Elution Buffer oder sterilem, deionisiertem Wasser für mehrere Jahre bei -20 °C aufbewahrt werden.

* Umrechnung g (rcf) / rpm siehe Appendix, S. 19

KURZANLEITUNG FÜR ERFAHRENE ANWENDER



1. Volumen der PCR Reaktion bestimmen.
2. Gleiches Volumen CP Buffer zugeben.



3. 750 μ l des PCR Reaktions/CP Buffer-Gemisches auf die PerfectBind DNA Column laden.



4. Säule zweimal mit 750 μ l CG Wash Buffer waschen.



5. Säule trocknen.
6. Zentrifugensäule in ein sauberes 1.5 ml Zentrifugenröhrchen stecken und die DNA mit 30 μ l bis 50 μ l Elution Buffer eluieren.



BESTELLINFORMATIONEN

Für die DNA-Extraktion aus Gelen und Reaktionsansätzen:

| | | |
|---|------------|-----------------|
| peqGOLD Gel Extraction Kit | 12-2501-00 | 5 Reinigungen |
| (Classic-Line) | 12-2501-01 | 50 Reinigungen |
| (DNA aus Agarosegelen) | 12-2501-02 | 200 Reinigungen |
| <hr/> | | |
| peqGOLD Gel Extraction Kit | 12-2500-00 | 5 Reinigungen |
| (Safety-Line) | 12-2500-01 | 50 Reinigungen |
| (DNA aus Agarosegelen) | 12-2500-02 | 200 Reinigungen |
| <hr/> | | |
| peqGOLD Cycle-Pure Kit | 12-6493-00 | 5 Reinigungen |
| (Classic-Line) | 12-6493-01 | 50 Reinigungen |
| (DNA aus PCR-Ansätzen) | 12-6493-02 | 200 Reinigungen |
| <hr/> | | |
| peqGOLD Cycle-Pure Kit | 12-6492-00 | 5 Reinigungen |
| (Safety-Line) | 12-6492-01 | 50 Reinigungen |
| (DNA aus PCR-Ansätzen) | 12-6492-02 | 200 Reinigungen |
| <hr/> | | |
| peqGOLD MicroSpin Gel Extraction Kit | 12-6294-00 | 5 Reinigungen |
| (Safety-Line) | 12-6294-01 | 50 Reinigungen |
| (DNA aus Agarosegelen) | 12-6294-02 | 200 Reinigungen |
| <hr/> | | |
| peqGOLD MicroSpin Cycle-Pure Kit | 12-6293-00 | 5 Reinigungen |
| (Safety-Line) | 12-6293-01 | 50 Reinigungen |
| (DNA aus PCR-Ansätzen) | 12-6293-02 | 200 Reinigungen |

TROUBLESHOOTING TIPS

| Problem | Ursache | Abhilfe |
|---|--|--|
| Niedrige DNA-Erträge | PCR-Reaktionsansatz mit zu wenig CP Buffer vermischt | Entsprechend der Angaben im Protokoll ausreichend CP Buffer zugeben |
| Keine DNA im Eluat | CG Wash Buffer-Konzentrat nicht mit absolutem Ethanol verdünnt | CG Wash Buffer-Konzentrat wie angegeben mit absolutem Ethanol verdünnen |
| | PCR-Reaktionsansatz mit zu wenig CP Buffer vermischt | Siehe oben |
| Optische Dichte und Ertrag laut Kontrollgel stimmen nicht überein | Spuren von Kontaminationen erhöhen die Absorption | Säule zweimal mit komplettiertem CG Wash Buffer waschen, wie in Schritt 3 angegeben. Im Zweifelsfall ist die Mengenbestimmung mit Agarosegel/Ethidiumbromidelektrophorese sicherer |
| DNA-Probe fließt beim Laden aus der Geltasche | Ethanol nach den Waschschritten nicht vollständig von der Säule entfernt | Säule vor der Elution trocken zentrifugieren, wie in Schritt 4 angegeben |

INTRODUCTION

The peqGOLD Cycle-Pure Kit is a convenient system for fast and reliable purification of DNA fragments from PCR or other reaction mixes within 15 min. The method uses PerfectBind technology to recover DNA in a range of 50 bp to 40 kb free of oligonucleotides, nucleotides polymerase and other enzymes in yields of 80 % - 90 %. No organic extractions or alcohol precipitations mean safe and rapid processing of multiple samples in parallel.

DNA purified with the peqGOLD Cycle Pure Kit is directly suitable for ligations, PCR sequencing, restriction digestion or various labelling reactions. In addition the kit can be used to purify DNA from any other enzymatic reaction.

peqGOLD Cycle-Pure Kits are available with Safety-Line or Classic-Line columns (Safety-Line, Ordering No. 12-6492-xx; Classic Line, Ordering No. 12-6493-xx). Safety-Line columns can be closed tightly by lids to avoid cross-contamination more effectively. Classic-Line columns do not have lids for a more comfortable handling.

PRINCIPLE

The PCR reaction volume is determined, an equal amount of CP Buffer added to this sample and then applied to a PerfectBind DNA Column. DNA will reversibly bind to the silica matrix and, following two rapid wash steps, where salts, free nucleotides, oligonucleotides and polymerases are removed, the DNA is eluted with deionized water, elution buffer or low salt buffer and ready for further applications.

BENEFITS

- ! Speed - DNA recovery from enzymatic reactions in less than 15 min
- ! Reliability - optimized buffers guarantee pure DNA
- ! Safety - No organic extractions required
- ! Quality - purified DNA suitable for any application

BINDING CAPACITY

Each PerfectBind DNA Column can bind up to ~30 µg DNA.

KIT COMPONENTS

| peqGOLD Cycle Pure Kit | 5 Purifications | 50 Purifications | 200 Purifications |
|--|-----------------|------------------|-------------------|
| Order No. Classic-Line | 12-6493-00 | 12-6493-01 | 12-6493-02 |
| Order No. Safety-Line | 12-6492-00 | 12-6492-01 | 12-6492-02 |
| Components | | | |
| PerfectBind DNA Columns | 5 | 50 | 200 |
| 2 ml Collection Tubes | 5 | 50 | 200 |
| CP Buffer | 1.5 ml | 20 ml | 80 ml |
| CG Wash Buffer | 5 ml | 20 ml | 3 x 20 ml |
| Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0) | 1.5 ml | 15 ml | 60 ml |
| Instruction manual | 1 | 1 | 1 |

STORAGE AND STABILITY

All peqGOLD Cycle-Pure Kit components are stable for at least 12 months from the date of purchase when stored at room temperature (22 – 25 °C). Under cool ambient conditions crystals may form in CP Buffer. Simply warm up to 37 °C to dissolve.

BEFORE STARTING

Briefly examine this booklet and become familiar with each step. Prepare all components and have the necessary materials ready before starting. peqGOLD Kits are designed to be simple, fast and reliable if all steps are followed diligently.

! CG Wash Buffer is concentrated and has to be diluted with absolute ethanol as follows:


| | |
|------------|---|
| 12-6492-00 | Add 20 ml 100 % Ethanol to 5 ml CG Wash Buffer |
| 12-6493-00 | |
| 12-6492-01 | Add 80 ml 100 % Ethanol to 20 ml CG Wash Buffer |
| 12-6493-01 | |
| 12-6492-02 | Add 3 x 80 ml 100 % Ethanol to 3 x 20 ml CG Wash Buffer |
| 12-6493-02 | |

! Store diluted CG Wash Buffer at room temperature.

! All steps must be carried out at room temperature.

DANGEROUS COMPONENTS

peqGOLD Cycle-Pure Kit

| Components | Signal word / symbols | Dangerous components | H and P statements |
|--|---|--|---|
| PerfectBind DNA Columns | - | - | - |
| 2 ml Collection Tubes | - | - | - |
| CP Buffer | <p>DANGER</p>  | <p>guanidinium thiocyanate 25-50%, propan-2-ol 20-<25%, polyethylene glycol octylphenol ether 0.3-<1%, CAS: 593-84-0, 67-63-0, 9002-93-1</p> | <p>H225, H302+H312+H332, H314, H336, H412, P101, P102, P103, P210, P241, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P405, P501</p> |
| CG Wash Buffer | - | - | - |
| Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0) | - | - | - |

| H and P statements | Descriptions |
|---------------------------|--|
| H225 | Highly flammable liquid and vapour. |
| H302+H312+H332 | Harmful if swallowed, in contact with skin or if inhaled. |
| H314 | Causes severe skin burns and eye damage. |
| H336 | May cause drowsiness or dizziness. |
| H412 | Harmful to aquatic life with long lasting effects. |
| P101 | If medical advice is needed, have product container or label at hand. |
| P102 | Keep out of reach of children. |
| P103 | Read label before use. |
| P210 | Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking. |
| P241 | Use explosion-proof electrical/ventilating/lighting/.../ equipment. |
| P303+P361+P353 | IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower. |
| P305+P351+P338 | IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. |
| P405 | Store locked up. |
| P501 | Dispose of contents/container to ... |

PEQGOLD CYCLE-PURE PROTOCOL

Materials to be supplied by user:

- ! Sterile 1.5 ml centrifuge tubes
- ! Sterile deionized water (optional)
- ! 100 % ethanol

1. Agarose gel electrophoresis

Perform agarose gel/ethidium bromide electrophoresis to analyze PCR product.

2. Load and Bind

Determine the volume of the PCR reaction, transfer to a clean 1.5 ml microfuge tube, add an equal volume of CP Buffer and vortex thoroughly to mix.

For PCR products < 200 bp add 3 volumes of CP Buffer.

Apply the sample to a PerfectBind DNA Column assembled in a clean 2 ml Collection Tube (provided) and centrifuge in a microcentrifuge at 10.000 x g* for 1 min at room temperature. Discard the liquid and reuse collection tube in the following steps.

3. Wash

Wash the PerfectBind DNA Column by adding 750 µl of CG Wash Buffer diluted with absolute ethanol. Centrifuge at 10.000 x g* for 1 min at room temperature. Discard liquid and repeat this step.

4. Dry (Important, do not skip this step!)

Discard liquid and centrifuge the empty column for 1 min 10.000 x g* to dry the column matrix. This step is essential for good DNA yields.

5. Elution

Place PerfectBind DNA Column into a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. Add 30 – 50 µl Elution Buffer (depending on desired concentration of final product) or sterile deionized water directly onto the column matrix and centrifuge 1 min at 5.000 x g* to elute DNA. This represents approximately 80 – 90 % of bound DNA. An optional second elution will improve yield up to 95 %, though at a lower concentration.

For fragments > 500 bp you usually get more than 80 % yield. For fragments of 50 bp – 500 bp you usually get 55 % - 80 %.

* Translation g (rcf) / rpm see Appendix, p. 19

CONCENTRATION OF DNA

If required DNA fragments purified with peqGOLD Cycle-Pure Kits can be further concentrated. Therefore add NaCl up to the final concentration of 0.1M and then add 2 volumes of 100 % ethanol. Vortex thoroughly and centrifuge at 10.000 x g* for 15 min. Discard the supernatant, add 700 µl 70 % Ethanol and centrifuge again at 10.000 x g* for 2 min. Discard the supernatant and air-dry the pellet. Solve the dried DNA in 20 µl sterile deionized water, Elution or other low salt buffer.

YIELD AND QUALITY OF DNA

Determine the absorption of an appropriate dilution (20- to 50-fold) of the sample at 260 nm and 280 nm. One A_{260} -unit corresponds to 50 µg DNA/ml. The DNA concentration is calculated as follows:

$$\text{DNA conc. } (\mu\text{g/ml}) = \text{Absorption}_{260} \times 50 \times \text{Dilution Factor}$$

The ratio of $A_{260/280}$ is an indicator for nucleic acid purity. A value 1.8 – 2.0 indicates a purity of 90 % - 100 %.

Alternatively, quantity (as well as quality) can sometimes best be determined by agarose gel/ethidium bromide electrophoresis by comparison to DNA samples of known concentrations.

DNA purified with the peqGOLD Cycle-Pure Kit can be stored in Elution Buffer or sterile, deionized water at –20 °C for years.

* Translation g (rcf) / rpm see Appendix, p. 19

SHORT PROTOCOL FOR EXPERIENCED USERS



1. Determine volume of PCR reaction.

2. Add equal volume of CP Buffer to PCR reaction.



3. Apply 750 μ l of PCR reaction/CP Buffer solution to the PerfectBind DNA Column assembled in a 2 ml Collection Tube.



4. Wash column twice with 750 μ l CG Wash Buffer.



5. Dry column by centrifugation.

6. Place column in a fresh 1.5 ml tube and elute DNA with 30 – 50 μ l of Elution Buffer.



ORDERING INFORMATION

For extraction of DNA from agarose gels and PCR reactions:

| | | |
|---|------------|------------------|
| peqGOLD Gel Extraction Kit | 12-2501-00 | 5 Preparations |
| (Classic-Line) | 12-2501-01 | 50 Preparations |
| <i>(DNA from agarose gels)</i> | 12-2501-02 | 200 Preparations |
| <hr/> | | |
| peqGOLD Gel Extraction Kit | 12-2500-00 | 5 Preparations |
| (Safety-Line) | 12-2500-01 | 50 Preparations |
| <i>(DNA from agarose gels)</i> | 12-2500-02 | 200 Preparations |
| <hr/> | | |
| peqGOLD Cycle-Pure Kit | 12-6493-00 | 5 Preparations |
| (Classic-Line) | 12-6493-01 | 50 Preparations |
| <i>(DNA from PCR reactions)</i> | 12-6493-02 | 200 Preparations |
| <hr/> | | |
| peqGOLD Cycle-Pure Kit | 12-6492-00 | 5 Preparations |
| (Safety-Line) | 12-6492-01 | 50 Preparations |
| <i>(DNA from PCR reactions)</i> | 12-6492-02 | 200 Preparations |
| <hr/> | | |
| peqGOLD MicroSpin Gel Extraction Kit | 12-6294-00 | 5 Preparations |
| (Safety-Line) | 12-6294-01 | 50 Preparations |
| <i>(DNA from agarose gels)</i> | 12-6294-02 | 200 Preparations |
| <hr/> | | |
| peqGOLD MicroSpin Cycle-Pure Kit | 12-6293-00 | 5 Preparations |
| (Safety-Line) | 12-6293-01 | 50 Preparations |
| <i>(DNA from PCR reactions)</i> | 12-6293-02 | 200 Preparations |

TROUBLESHOOTING TIPS

| Problem | Likely cause | Suggestion |
|--|---|---|
| Low DNA yields | Too little CP Buffer added to sample | Add CP Buffer as indicated in the manual |
| No DNA eluted | CG Wash Buffer Concentrate not diluted with absolute ethanol | Complete CG Wash Buffer Concentrate as instructed in the manual with 100 % Ethanol |
| | Too little CP Buffer added to sample | Add CP Buffer as indicated in the manual |
| Optical densities do not agree with DNA yield on agarose gel | Trace contaminants eluted from column increase A_{260} | Wash column twice as instructed in step 3. Alternatively, perform agarose gel/ethidium bromide electrophoresis for quantification |
| DNA floats out of well while loading agarose gel | Ethanol not completely removed from column following wash steps | Centrifuge column as instructed in step 4 to dry before proceeding to elution step |

APPENDIX

| Speed (g/RCF) | Rotor Radius (center of rotor to sample) [cm] | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|--|--|--|
| | 5 | 6 | 7 | 8 | 8,4 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | | | |
| 1000 | 4230 | 3861 | 3575 | 3344 | 3263 | 3153 | 2991 | 2852 | 2730 | 2623 | 2528 | 2442 | | | |
| 1500 | 5180 | 4729 | 4378 | 4095 | 3997 | 3861 | 3663 | 3492 | 3344 | 3213 | 3096 | 2991 | | | |
| 2000 | 5981 | 5460 | 5055 | 4729 | 4615 | 4458 | 4230 | 4033 | 3861 | 3710 | 3575 | 3453 | | | |
| 2500 | 6688 | 6105 | 5652 | 5287 | 5160 | 4985 | 4729 | 4509 | 4317 | 4147 | 3997 | 3861 | | | |
| 3000 | 7326 | 6688 | 6191 | 5792 | 5652 | 5460 | 5180 | 4939 | 4729 | 4543 | 4378 | 4230 | | | |
| 3500 | 7913 | 7223 | 6688 | 6256 | 6105 | 5898 | 5595 | 5335 | 5108 | 4907 | 4729 | 4568 | | | |
| 4000 | 8459 | 7722 | 7149 | 6688 | 6526 | 6305 | 5981 | 5703 | 5460 | 5246 | 5055 | 4884 | | | |
| 4500 | 8972 | 8190 | 7583 | 7093 | 6922 | 6688 | 6344 | 6049 | 5792 | 5564 | 5362 | 5180 | | | |
| 5000 | 9458 | 8634 | 7993 | 7477 | 7297 | 7049 | 6688 | 6376 | 6105 | 5865 | 5652 | 5460 | | | |
| 5500 | 9919 | 9055 | 8383 | 7842 | 7653 | 7393 | 7014 | 6688 | 6403 | 6152 | 5928 | 5727 | | | |
| 6000 | 10360 | 9458 | 8756 | 8190 | 7993 | 7722 | 7326 | 6985 | 6688 | 6425 | 6191 | 5981 | | | |
| 6500 | 10783 | 9844 | 9114 | 8525 | 8319 | 8037 | 7625 | 7270 | 6961 | 6688 | 6444 | 6226 | | | |
| 7000 | 11190 | 10215 | 9458 | 8847 | 8634 | 8341 | 7913 | 7545 | 7223 | 6940 | 6688 | 6461 | | | |
| 7500 | 11583 | 10574 | 9790 | 9157 | 8937 | 8634 | 8190 | 7809 | 7477 | 7184 | 6922 | 6688 | | | |
| 8000 | 11963 | 10921 | 10111 | 9458 | 9230 | 8917 | 8459 | 8065 | 7722 | 7419 | 7149 | 6907 | | | |
| 8500 | 12331 | 11257 | 10422 | 9749 | 9514 | 9191 | 8719 | 8314 | 7960 | 7647 | 7369 | 7119 | | | |
| 9000 | 12689 | 11583 | 10724 | 10031 | 9790 | 9458 | 8972 | 8555 | 8190 | 7869 | 7583 | 7326 | | | |
| 9500 | 13036 | 11901 | 11018 | 10306 | 10058 | 9717 | 9218 | 8789 | 8415 | 8085 | 7791 | 7527 | | | |
| 10000 | 13375 | 12210 | 11304 | 10574 | 10319 | 9969 | 9458 | 9017 | 8634 | 8295 | 7993 | 7722 | | | |
| 10500 | 13705 | 12511 | 11583 | 10835 | 10574 | 10215 | 9691 | 9240 | 8847 | 8500 | 8190 | 7913 | | | |
| 11000 | 14028 | 12806 | 11856 | 11090 | 10823 | 10456 | 9919 | 9458 | 9055 | 8700 | 8383 | 8099 | | | |
| 11500 | 14343 | 13093 | 12122 | 11339 | 11066 | 10691 | 10142 | 9670 | 9258 | 8895 | 8572 | 8281 | | | |
| 12000 | 14652 | 13375 | 12383 | 11583 | 11304 | 10921 | 10360 | 9878 | 9458 | 9087 | 8756 | 8459 | | | |
| 13000 | 15250 | 13921 | 12888 | 12056 | 11766 | 11367 | 10783 | 10281 | 9844 | 9458 | 9114 | 8805 | | | |
| 13500 | 15540 | 14186 | 13134 | 12286 | 11990 | 11583 | 10989 | 10477 | 10031 | 9638 | 9287 | 8972 | | | |
| 14000 | 15826 | 14447 | 13375 | 12511 | 12210 | 11796 | 11190 | 10670 | 10215 | 9815 | 9458 | 9137 | | | |

PerfectSpin

Abb.

1: Umrechnungstabelle rcf/rpm. Werte für Zentrifugen, abhängig vom Rotordurchmesser.

Fig. 1: Table rcf/rpm. Values for centrifuges depending on rotor diameter.

Life Science Competence Center Erlangen

VWR International GmbH | Carl-Thiersch-Str. 2b | D - 91052 Erlangen | Freecall: 0800 100 2016 | Fax: +49 9131 610 70 - 99
E-Mail: info.peqlab@de.vwr.com | Internet: www.peqlab.de

VWR International GmbH

Hilpertstraße 20a | D - 64295 Darmstadt | Freecall: 0800 702 00 07 | Fax: 0180 570 22 22 (0,14 €/Min. aus d. dt. Festnetz)
Email: info@de.vwr.com | Internet: <http://de.vwr.com>