
Arbeitsanleitung – Instruction Manual

peqGOLD MicroSpin Cycle Pure Kit



peqlab

Creating the future together.

INHALT

EINLEITUNG	1
FUNKTIONSPRINZIP	1
BINDEKAPAZITÄT	1
KITBESTANDTEILE	2
LAGERUNG	2
WICHTIGE HINWEISE	2
PEQGOLD MICROSPIN CYCLE PURE KIT PROTOKOLL	3
QUANTIFIZIERUNG UND LAGERUNG DER DNA	4
KURZANLEITUNG FÜR ERFAHRENE ANWENDER	4
BESTELLINFORMATIONEN	5
TROUBLESHOOTING TIPS	6

CONTENT

INTRODUCTION	7
PRINCIPLE	7
BINDING CAPACITY	7
KIT COMPONENTS	8
STORAGE AND STABILITY	8
BEFORE STARTING	8
PEQGOLD MICROSPIN CYCLE PURE KIT PROTOCOL	9
YIELD AND QUALITY OF DNA	10
SHORT PROTOCOL FOR EXPERIENCED USERS	10
ORDERING INFORMATION	11
TROUBLESHOOTING TIPS	12

EINLEITUNG

Das peqGOLD MicroSpin Cycle-Pure Kit bietet eine schnelle und einfache Methode, um DNA-Amplifikate mit einer Größe zwischen 60 bp und 40 kb aus PCR-Reaktionsansätzen aufzureinigen. In weniger als 5 Minuten gestattet das Kit die Bearbeitung einzelner oder zahlreicher Proben, wobei beliebig große Reaktionsansätze eingesetzt und Wiederfindungsraten von 80 % erreicht werden können.

PCR-Fragmente, die mit dem peqGOLD MicroSpin Cycle-Pure Kit extrahiert wurden, können direkt für alle Arten von Folgeexperimenten, wie Reamplifikationen, PCR-Sequenzierungen, Restriktionsverdau, Ligationen und Labeling-Reaktionen eingesetzt werden.

FUNKTIONSPRINZIP

Der PCR-Reaktionsansatz wird mit einem speziellen Binde-Puffer gemischt und durch eine PerfectBind MicroSpin DNA-Säule zentrifugiert, wobei die DNA reversibel an eine PerfectBind Silikamembran binden kann. Salze, freie Nukleotide, Oligonukleotide und Polymerasen, die nicht an die Membran binden können, werden durch das Säulenmaterial hindurch gespült. Die gereinigte DNA wird anschließend in einem sehr geringen Volumen von 10 – 20 µl in einem speziellen DNA Elutionspuffer eluiert.

Vorteile

- ! Schnelligkeit – DNA-Extraktionen in weniger als 5 Minuten.
- ! Geringes Elutionsvolumen - Spezielle Säulen ermöglichen die Aufreinigung von konzentrierter DNA.
- ! Zuverlässigkeit – Optimierte Puffer garantieren reinste DNA.
- ! Sicherheit – Keine Notwendigkeit für organische Extraktionen.
- ! Qualität – Für alle Folgeanwendungen geeignete DNA.

BINDEKAPAZITÄT

Jede PerfectBind MicroSpin DNA-Säule kann bis zu 10 µg DNA binden.

KITBESTANDTEILE

peqGOLD MicroSpin Cycle Pure Kit	5 Präparationen	50 Präparationen	200 Präparationen
Bestellnummer	12-6293-00	12-6293-01	12-6293-02
Bestandteile			
PerfectBind MicroSpin DNA-Säulen	5	50	200
2 ml Sammel-Tubes	5	50	200
CP-Puffer	3 ml	30 ml	120 ml
DNA Elutionspuffer	2 ml	15 ml	60 ml
Arbeitsanleitung	1	1	1

Der CP-Puffer enthält hautirritierende chaotrope Salze. Bitte Handschuhe und andere geeignete Sicherheitsmaßnahmen treffen, um Hautirritationen zu verhindern!

LAGERUNG

Die Aufbewahrung des peqGOLD MicroSpin Cycle-Pure Kits sollte bei Raumtemperatur erfolgen. Bei einer Umgebungstemperatur von 22 – 25°C bleiben die Komponenten des Kits für mindestens 12 Monate ab Lieferung stabil. Kristalle, die sich während der Lieferung oder Lagerung im CP-Puffer 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. Das Arbeiten mit peqGOLD Kits liefert zuverlässig sehr gute Resultate, wenn die Extraktionen sorgfältig nach den Anweisungen der Protokolle ausgeführt werden.

! Alle Zentrifugationsschritte müssen bei 22 – 25 °C ausgeführt werden.

PEQGOLD MICROSPIN CYCLE PURE KIT PROTOKOLL

Benötigte Materialien, die nicht im Lieferumfang enthalten sind:

! Sterile 1.5 ml Zentrifugenröhrchen (farblos)

1. Agarosegelanalyse des PCR-Ansatzes

PCR-Ansatz durch Agarosegelelektrophorese fraktionieren und durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar machen, um den Erfolg und die Qualität der Amplifikationsreaktion zu verifizieren.

2. Laden und Binden

Jeweils 50 µl des PCR-Ansatz durch Vortexen sorgfältig mit 500 µl CP-Puffer mischen.

Eine PerfectBind MicroSpin DNA Zentrifugensäule in ein 2 ml Sammel-Tube stecken und maximal 700 µl der Mischung aus PCR-Ansatz und CP-Puffer auf die Säule pipettieren. 2 Minuten bei 10.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren. Säulendurchfluss verwerfen. Bei einem Probenvolumen > 700 µl, Säule erneut beladen und wie oben zentrifugieren.

3. Eluieren

Zentrifugensäule in ein sauberes 1.5 ml Zentrifugenröhrchen stecken und die DNA mit 10 – 20 µl DNA Elutionspuffer eluieren. Dazu den Elutionspuffer direkt auf die Säulenmatrix pipettieren und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend die Säule 1 Minute bei 8.000 x g zentrifugieren.

Dabei werden 80 % bis 90 % der gebundenen DNA eluiert. Eine verlängerte Inkubationszeit von 5 Minuten verbessert den absoluten Ertrag der Elution auf bis zu 95 %.

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 A_{260} -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 Indikator für die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren. Die mit dem peqGOLD MicroSpin Cycle-Pure Kit erzielbaren Werte von 1.8 bis 2.0 entsprechen DNA einer Reinheit von 90 - 100 %.

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

KURZANLEITUNG FÜR ERFAHRENE ANWENDER

1. Volumen der PCR Reaktion bestimmen. 500 µl CP Buffer zu 50 µl PCR-Ansatz zugeben.
2. PerfectBind MicroSpin DNA Säule in ein 2 ml Sammel-Tube stecken und Lösung auf die Säule pipettieren.
3. 2 min bei 10.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren. Säulendurchfluss verwerfen.
4. Zentrifugensäule in ein sauberes 1.5 ml Zentrifugenröhrchen stecken und die DNA mit 20 µl DNA Elutionspuffer eluieren. 1 min bei 8.000 x g zentrifugieren.

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

TROUBLESHOOTING TIPS

Problem	Ursache	Abhilfe
Niedrige DNA-Erträge.	PCR-Reaktionsansatz mit zu wenig CP-Puffer vermischt.	Entsprechend der Angaben im Protokoll ausreichend CP-Puffer zugeben.
Keine DNA im Eluat.	Elutionspuffer konnte nicht durch die Membran gehen	Elutionspuffer direkt auf die Membran pipettieren.
	PCR-Reaktionsansatz mit zu wenig CP-Puffer vermischt.	Entsprechend der Angaben im Protokoll ausreichend CP-Puffer zugeben.
Optische Dichte und Ertrag laut Kontrollgel stimmen nicht überein.	Spuren von Kontaminationen erhöhen die Absorption.	PCR Ansatz mit mehr CP-Puffer versetzen.

INTRODUCTION

The peqGOLD MicroSpin Cycle Pure system is a convenient system for fast and reliable purification of DNA from PCR reactions within 5 minutes. The method uses PerfectBind technology to recover DNA in a range of 60 bp to 40 kb free of oligonucleotides, nucleotides polymerase and other enzymes in yields exceeding 80 %.

DNA purified with the peqGOLD MicroSpin Cycle Pure Kit is directly suitable for ligations, PCR sequencing, restriction digestion or various labelling reactions.

PRINCIPLE

Binding conditions are adjusted by addition of a specially formulated buffer, and the sample is applied to a PerfectBind DNA MicroSpin DNA column where DNA will reversibly bind to the silica matrix. Salts, free nucleotides, oligonucleotides and polymerases are removed. The DNA is eluted with relative small volume of 10 – 20 µl Elution Buffer.

Benefits

- ! Speed - DNA recovery from enzymatic reactions < 5 min.
- ! Low elution volume – Special designed column allows purification of concentrated DNA.
- ! Reliability - optimized buffers guarantee pure DNA.
- ! Safety - No organic extractions.
- ! Quality - purified DNA suitable for any application.

BINDING CAPACITY

Each MicroSpin PerfectBind DNA column can bind ~10 µg DNA.

KIT COMPONENTS

peqGOLD MicroSpin Cycle Pure Kit	5 Purifications	50 Purifications	200 Purifications
Order No.	12-6293-00	12-6293-01	12-6293-02
Components			
MicroSpin PerfectBind DNA Columns	5	50	200
2 ml Collection Tubes	5	50	200
Buffer CP	3 ml	30 ml	120 ml
DNA Elution Buffer	2 ml	15 ml	60 ml
Instruction manual	1	1	1

Buffer CP contains chaotropic salts, which are irritant. Wear gloves and other appropriate laboratory safety measures when handling.

STORAGE AND STABILITY

All peqGOLD MicroSpin Cycle-Pure Kit components are guaranteed for at least 12 months from the date of purchase when stored at 22 – 25 °C. Under cool ambient conditions crystals may form in Buffer CP. Simply warm 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.

! All steps must be carried out at room temperature.

PEQGOLD MICROSPIN CYCLE PURE KIT PROTOCOL

Materials required, but not supplied:

! Sterile 1.5 ml centrifuge tubes

1. Agarose gel electrophoresis

Perform agarose gel/ethidium bromide gel-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 and add 500 μ l of Buffer CP to each 50 μ l of the PCR reaction. Vortex thoroughly.

Apply a maximum of 700 μ l of the sample to a PerfectBind DNA spin-column assembled in a clean 2 ml collection tube (provided) and centrifuge in a microcentrifuge at 10.000 x g for 2 min at room temperature. Discard the liquid. If the sample volume is more than 700 μ l, load the remaining sample to the column and centrifuge as above.

3. Elution

Place column into a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. Add 10 – 20 μ l DNA Elution Buffer directly onto the column matrix and incubate for 1 min at room temperature. Centrifuge 1 min at 8.000 x g to elute DNA.

This represents approximately 80 – 90 % of bound DNA. An optional incubation of 5 min will increase the DNA concentration.

YIELD AND QUALITY OF DNA

Determine the absorbance of an appropriate dilution of the sample at 260 nm and at 280 nm. The DNA concentration is calculated as follows:

$$\text{DNA concentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{Absorbance}_{260} \times 50 \times \text{Dilution Factor}$$

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.

SHORT PROTOCOL FOR EXPERIENCED USERS

1. Determine volume of reaction. Add 500 μl volume of Buffer CP to 50 μl PCR reaction.
2. Apply solution to PerfectBind MicroSpin™ DNA column assembled in 2 ml collection tube.
3. Centrifuge at 10.000 x g for 2 min at room temperature. Discard liquid.
4. Place column into clean 1.5 ml tube and elute DNA with 20 μl DNA Elution Buffer. Centrifuge 1 min at 8.000 x g.

ORDERING INFORMATION

For extraction of DNA from agarose gels and PCR reactions:

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

TROUBLESHOOTING TIPS

Problem	Likely cause	Suggestion
Low DNA yields.	Too little Buffer CP added to sample.	Add Buffer CP as indicated in the protocol.
No DNA eluted	Elution Buffer could not pass membrane	Add Elution Buffer directly to the center of the column.
	Too little Buffer CP added to sample.	Add Buffer CP as indicated in the protocol.
Optical densities do not agree with DNA yield on agarose gel.	Trace contaminants eluted from column increase A_{260}	Add more Buffer CP to PCR reaction mix.



D PEQLAB Biotechnologie GmbH, 91052 Erlangen, Freecall (D): 0800 100 20 16, info@peqlab.de, www.peqlab.de
AT PEQLAB Biotechnologie GmbH, 6404 Polling, Tel: +43 (0) 5238 84 169, info@peqlab.at, www.peqlab.at
UK PEQLAB Ltd., Fareham PO15 5TT, Freecall (UK): 0808 202 1302, info@peqlab.co.uk, www.peqlab.co.uk
USA PEQLAB LLC, Wilmington, DE 19810, Toll-Free (US): 877 737 5220, info@peqlab.us, www.peqlab.us

Creating the future together.