



DANAGENE FFPE DNA KIT

Ref. 0610.1 50 extracciones

1. INTRODUCCIÓN

Este kit está optimizado para ser un método rápido para aislar **ADN de muestras de tejidos fijados en formalina, embebidos en parafina (FFPE)**.

El procedimiento omite el uso del xileno o d-limoneno, compuestos inflamables y con mal olor que son comúnmente utilizados para desparafinar, una **SOLUCIÓN DE DESPARAFINIZACIÓN** de formulación propia es utilizada para una completa disolución de la parafina que nos permitirá liberar el tejido.

Características:

- **Utiliza la tecnología de MicroSpin columnas con membranas de sílica, con un diseño especial que permite volúmenes de elución pequeños.**
- **Fácil eliminación de la parafina.**
- **Método seguro que evita el uso de xileno u otros tóxicos.**
- **Completa eliminación de contaminantes e inhibidores.**
- **Volumen de elución: 25-30 µl.**
- **La calidad del ADN es óptima para aplicaciones como PCR cuantitativa o Secuenciación masiva.**

Aplicaciones:

- **Rápida extracción de ADN a partir de muestras fijadas en formalina, embebidas en parafina (FFPE).**
- **Extracción de ADN de muestras FFPE frescas o archivadas.**
- **Extracción de muestras en portaobjetos.**
- **Aplicaciones posteriores típicas: PCR, PCR cuantitativa, análisis de STR, Secuenciación masiva.**

2. COMPONENTES KIT

	50 extracciones	Almacenamiento
Solución de Desparafinización	30 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Lisis de Tejidos	10 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Lisis/Unión	15 ml	Temperatura ambiente
Proteinasa K*	65 mg	-20°C
Tampón de Desinhibición*	18 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Lavado*	10 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Elución	10 ml	Temperatura ambiente
MicroSpin Columns	50 unidades	Temperatura ambiente
Tubos de Recogida	100 unidades	Temperatura ambiente

(*) Estas soluciones deben ser preparadas como se indica en la secciones de Preparaciones Preliminares del protocolo.

3. PROTOCOLO

3.1 Preparaciones Preliminares

- Disolver la **proteínasa K** en **3,10 ml** de agua libre de nucleasas y conservar a -20°C. Se recomienda realizar varias alícuotas para evitar demasiados ciclos de descongelado-congelado. A esta temperatura es estable durante 1 año.
- **Tanto el tampón de Lisis/unión** como el **Tampón de Desinhibición** contiene Guanidine hydrochloride que es un agente irritante, por esta razón, recomendamos el uso de gafas y guantes para su manipulación.
- Añadir **10 ml Etanol 100 %** al **Tampón de Desinhibición** indicado en la etiqueta. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Añadir **40 ml** de **Etanol 100 %** al **Tampón de Lavado** indicado en la etiqueta. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Pre-calentar el **Tampón de Elución** a 70°C.

3.2 Protocolo para la extracción de ADN genómico a partir de muestras FFPE

DESPARAFINIZACIÓN DE LA MUESTRA

1. A una sección de 10 µm con un máximo de 15 mg de parafina añadir **400µl Solución de Desparafinización** y agitar con vortex durante 10 segundos.
2. Incubar a 60°C durante 3 minutos para promover la disolución de la parafina.
3. Inmediatamente, agitar vigorosamente con vortex la muestra a 60°C para disolver la parafina.
4. Centrifugar a velocidad máxima durante 3 minutos para recoger el tejido.
5. Eliminar el sobrenadante con pipeta, evitar tocar el tejido precipitado.

6. Añadir 1 ml de **etanol** 100%. Agitar con vortex durante 20 segundos.
7. Centrifugar a velocidad máxima durante 3 minutos. Eliminar el **etanol** con pipeta, evitando tocar el tejido.
8. Colocar los tubos abiertos a 55°C durante 10 minutos para evaporar el **etanol**.

EXTRACCIÓN DE ADN

1. Añadir **200 µl de Tampón de lisis de Tejidos + 40 µl Proteinasa K**. Mezclar con vortex durante 2-5 segundos.
2. **Incubar a 55°C** hasta que la lisis sea completa o overnight (si es posible con agitación 600 rpm). Centrifugar brevemente para recoger las gotas.
3. Añadir **20 µl Proteinasa K e incubar 1-2 h a 55°C**. Después de esta incubación no deberían haber partículas de tejido visibles. Centrifugar para eliminar cualquier resto de tejido que pueda quedar. Traspasar el sobrenadante a un nuevo microtubo.
4. **Incubar a 90°C durante 1 hora**. Esta incubación parcialmente reducirá las modificaciones de formaldehído de los ácidos nucleicos. *Si sólo se dispone de un baño, colocar la muestra a temperatura ambiente hasta que el baño haya alcanzado los 90°C.*
5. **Centrifugar brevemente** para recoger las gotas que se forman.
6. Añadir **300 µl de Tampón de Lisis / Unión**. Mezclar con vortex. **Incubar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos**. *Permitir que el lisado se enfríe a temperatura ambiente.*
7. Añadir **100 µl de Isopropanol al lisado**. Mezclar con vortex. Brevemente centrifugar para recoger las posibles gotas presentes en el microtubo.
8. **Pasar la muestra a una MicroSpin columna** con su tubo de recolección.
9. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el tubo de recolección. Si la muestra no ha pasado completamente, repetir el paso de centrifugación.
10. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recolección y añadir **500µl de Tampón de Desinhibición**.
11. **Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
12. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado**.
13. **Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
14. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual**.

15. Colocar la MicroSpin columna en un microtubo de 1,5 ml y añadir **25-30 μ l de Tampón de elución (5mM Tris.HCl, pH 8,5) precalentado a 70°C.** *Asegurarse que el Tampón de elución es dispensado directamente en el centro de la membrana para una completa elución del ADN unido.*
16. **Incubar 2 minutos.**
17. **Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.** El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

4. GUIA DE PROBLEMAS Y SOLUCIONES

Recomendamos ponerse en contacto con el servicio técnico de DanaGen-BioTed para cualquier consulta adicional respecto a los protocolos de trabajo o problemas que puedan surgir durante el trabajo.