



## 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       |
|--------------------------------------|---------------------|----------------------|
| <b>Solución de Desparafinización</b> | <b>30 ml</b>        | Temperatura ambiente |
| <b>Tampón de Lisis de Tejidos</b>    | <b>10 ml</b>        | Temperatura ambiente |
| <b>Tampón de Lisis/Unión</b>         | <b>15 ml</b>        | Temperatura ambiente |
| <b>Proteinasa K*</b>                 | <b>65 mg</b>        | -20°C                |
| <b>Tampón de Desinhibición*</b>      | <b>18 ml</b>        | Temperatura ambiente |
| <b>Tampón de Lavado*</b>             | <b>10 ml</b>        | Temperatura ambiente |
| <b>Tampón de Elución</b>             | <b>10 ml</b>        | Temperatura ambiente |
| <b>MicroSpin Columns</b>             | <b>50 unidades</b>  | Temperatura ambiente |
| <b>Tubos de Recogida</b>             | <b>100 unidades</b> | 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  $\mu$ 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.