



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: 15-30 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*	60 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 **2,75 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** overnight y si es posible con agitación. Centrifugar brevemente para recoger las gotas.
3. Añadir **20 µl Proteinasa K e incubar 1-2 h a 55°C**. 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 1 minuto.**
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.