



REALPURE DNA FFPE

Ref. **RBMEGS12 50 Test**

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 formulación propia **REAL DESPARAFINIZACIÓN SOLUCIÓN** es utilizada para la completa disolución de la parafina para 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 las siguientes 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.

1. INTRODUCTION

*This kit is optimized for a fast method to isolate **DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue specimen.***

*The procedure omits the use of flammable and malodorous xylene or d-limonene commonly used for deparaffinization, **a proprietary buffer formulation REAL DEPARAFFINIZATION SOLUTION** is used for the complete dissolution of the wax to release the tissue.*

Features:

- *Silica membrane technology with special MicroSpin columns.*
- *Very easy paraffin removal.*
- *Safe method avoids xylene and other toxic.*
- *Complete removal of contaminants and inhibitors for reliable downstream applications.*
- *Low elution volume: 15-30 µl.*
- *The quality of DNA is suitable for the following applications as quantitative PCR or Next generation sequencing (NGS).*

Applications:

- *Rapid isolation of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded samples.*
- *Isolation of DNA from fresh and archived FFPE samples*
- *Isolation of DNA from specimen of object slides Typical downstream application: PCR, pPCR, NGS, STR analysis.*



2. COMPONENTES DEL KIT

KIT COMPONENTS

	Ref.	Ref. RBMEGS12 50 test	T ^a
REAL Desparafinización Solución <i>REAL Deparaffinization solution</i>	DEPSOL	30 ml	RT
Tampón de Lisis de Tejidos <i>Tissue Lysis Buffer</i>	E22	10 ml	RT
Tampón de Lisis/Unión <i>Lysis/Binding Buffer</i>	REA011	15 ml	RT
Proteinasa K * <i>Proteinase K *</i>	REA02	60 mg	4°C/-20°C
Tampón de Desinhibición * <i>Desinhibition Buffer *</i>	REA03	18 ml	RT
Tampón de Lavado * <i>Wash Buffer*</i>	REA04	10 ml	RT
Tampón de Elución <i>Elution Buffer</i>	REA05	10 ml	RT
Columnas MicroSpin <i>MicroSpin Columns</i>	RSC05	50 unid.	RT
Tubos de Recogida <i>Collection Tubes</i>	R30	100 unid.	RT

(*) Estas soluciones deben ser preparadas tal y como se indica en el apartado 3.1 “Preparaciones preliminares”

(*) *These solutions must be prepared as indicated in the 3.1 section “Preliminary Preparations”*

Equipos y reactivos necesarios no incluidos en el kit:

- * Etanol 100 %.
- * Microtubos de 1.5 ml
- * Microcentrifuga.

Equipment and additional reagents required

- * 100 % Ethanol
- * 1.5 ml microtubes
- * Microcentrifuge.

3. PROTOCOLO GENERAL

GENERAL PROCEDURE

3.1 Preparaciones preliminares

- **ATENCIÓN:** El tampón de Lisis/unión (REA011) y el tampón de Desinhibición (REA03) contienen Guanidine hydrochloride que es un agente irritante, por lo que se recomienda el uso de guantes y gafas de seguridad para su manipulación
- Disolver la proteinasa 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.
- 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

3.1 Preliminary Preparations

- **ATTENTION** Both the Lysis/ Binding Buffer (REA011) and the Desinhibition Buffer (REA03) contain Guanidine hydrochloride which is an irritant agent, for this reason we recommend to use gloves and glasses for its manipulation.
- Dissolve the proteinase K in 2.75 ml of nuclease-free water and store at -20°C. It is recommended to do several aliquots to avoid many thaw/freeze cycles. At this temperature it is stable for 1 year.
- Add 10 ml of Ethanol 100 % to the Desinhibition Buffer (REA03). Keep the container closed to avoid the ethanol evaporation
- Add 40 ml of Ethanol 100 % to the Wash Buffer (REA04). Keep the container closed to avoid the ethanol evaporation.
- Pre-heat the Elution Buffer at 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 **400 μl de REAL Desparafinización Solución** y vortex durante 10 segundos.
2. Incubar a 60°C durante 3 minutos para promover la disolución de la parafina.
3. Vortex la muestra inmediatamente a 60°C vigorosamente 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.
6. Añadir 1 ml de etanol 100%. 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 **180 μl de Tampón de lisis de Tejidos + 50 μl de Proteinasa K**. Mezclar por vortex durante 2-5 segundos.
2. **Incubar a 55°C** durante 1 hora o hasta que la lisis sea completa.
3. **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.*
4. **Centrifugar brevemente** para recoger las gotas que se formarán.
5. Añadir **200 μl de Tampón de Lisis / Unión**. Mezclar por vortex. **Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos**. *Permitir que el lisado se enfríe a temperatura ambiente.*
6. Añadir **200 μl de Etanol (96-100%) al lisado**. Mezclar por vortex. Brevemente centrifugar para recoger las posibles gotas presentes en el microtubo.
7. **Pasar la muestra a una MicroSpin columna** con su tubo de recolección.
8. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el tubo de recolección.
9. Si la muestra no ha pasado completamente, repetir el paso de centrifugación.
10. **Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
11. **Añadir 500 μl de Tampón de Lavado**.
12. **Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
13. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual**.
14. Colocar la MicroSpin columna en un microtubo de 1.5 ml y añadir **15-30 μl de Tampón de elución (10 mM Tris.HCl, pH 8.5)**. *Asegurarse que el Tampón de elución es dispensado directamente en el centro de la membrana para una completa elución del ADN unido.*
15. **Incubar 1 minuto**.
16. **Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto**. El microtubo contiene ahora el ADN genómico.

3.2 Protocol for genomic DNA extraction from FFPE samples

DEPARAFFINIZATION SAMPLE

1. Add **400 µl** of **REAL Deparaffinization solution** to one FFPE tissue slice (10µm). Make sure the sample does not comprise more than 15 mg paraffin. **Vortex for 10 seconds.**
2. Incubate **3 minutes at 60°C** to promote the melting of the paraffin.
3. Vortex the sample immediately (at 60°C) at a vigorous speed to dissolve the paraffin. After 3 minutes you will see the tissue floating in the wax remover.
4. **Centrifuge full speed for 3 minutes** to pellet the tissue.
5. **Remove the supernatant** with pipetting, avoiding the tissue.
6. **Add 1 ml ethanol 100%.** Vortex for 20 seconds.
7. **Centrifuge full speed for 3 minutes** to pellet the tissue. Remove the ethanol with pipetting, avoiding the tissue.
8. Place the tubes **at 55°C for 10 minutes** with caps open to evaporate the ethanol.

DNA ISOLATION

1. Add **180 µl** of the **Tissue Lysis Buffer + 50 µl Proteinase K.** Mix by vortexing 2-5 seconds.
2. **Incubate at 55°C** for 1 hour or until the lysis is complete.
3. **Incubate at 90°C for 1 hour.** This incubation partially reverses formaldehyde modification of nucleic acids. If using only one heating block, leave the sample at room temperature after the 55°C incubation until the heating block has reached 90°C.
4. **Briefly centrifuge** to remove drops from the inside of the lid.
5. Add **200 µl** of **Lysis/Binding Buffer.** Mix by vortexing. **Incubate at 70°C for 5 minutes.**
6. Add **200 µl** of **Ethanol (96-100%)** to the lysate. Mix by vortexing. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from inside the lid.
7. **Transfer the lysate** into reservoir of a combined MicroSpin Column –collection tube.
8. **Centrifuge at 8.000 rpm for 60 seconds.** Remove the collection tube. If the sample is not drawn completely through the matrix, repeat the centrifugation step.
9. Place the MicroSpin column in a new collection tube and add **500 µl** of **Deshinhibition Buffer.**
10. **Centrifuge at 12.000-14.000 rpm for 60 seconds.** Remove the liquid.
11. Add **500 µl** of **Wash Buffer** into reservoir of MicroSpin column.
12. **Centrifuge at 12.000-14.000 rpm for 60 seconds.** Remove the liquid.
13. **Centrifuge at maximum speed for 3 minutes** to remove the residual ethanol.
14. Remove the collection tube and insert the MicroSpin column in a 1.5 ml microtube. Add **15- 30 µl** of **Elution Buffer** (preheated at 70°C) directly onto the center of the silica membrane.
15. **Incubate 1 minute.**
16. **Centrifuge at maximum speed for 60 seconds.** The microtube contains now genomic DNA.