

REAL FFPE DNA KIT

Ref. RBMEGS12: (para 50 EXTRACCIONES)

(for 50 EXTRATION)

1. INTRODUCCIÓN

Este kit está optimizado para un método rápido de aislamiento de ADN a partir de muestras de tejido fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE).

El procedimiento omite el uso del inflamable y maloliente xileno o d-limoneno comúnmente utilizados para la desparafinización, una formulación tampón patentada **DEPARAFFINIZATION SOLUTION** se utiliza para la completa disolución de la cera para liberar el tejido.

Características:

- Tecnología de membrana de sílice con columnas especiales MicroSpin.
- Eliminación muy fácil de la parafina.
- Método seguro que evita el xileno y otros tóxicos.
- Eliminación completa de contaminantes e inhibidores para aplicaciones posteriores fiables.
- Bajo volumen de elución: 15-30 l.
- La calidad del ADN es adecuada para las siguientes aplicaciones como PCR cuantitativa o Next generation sequencing (NGS).

Aplicaciones:

- Aislamiento rápido de ADN a partir de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina.
- Aislamiento de ADN a partir de muestras FFPE frescas y archivadas.
- Aislamiento de ADN a partir de muestras de portaobjetos
- Aplicación típica aguas abajo: PCR, pPCR, NGS, análisis STR.

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 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 l.
- 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

Componentes/ <i>Components</i>	REF.	Ref. RBMEGS12 (50 Extrac.)	T ^a
Solución de Desparafinización/ <i>Deparaffinization solution</i>		30 ml	RT
Tampón Lisis de Tejidos/ <i>Tissue Lysis Buffer</i>		10 ml	RT
Tampón Lisis /Unión / <i>Lysis Buffer / Binding</i>		15 ml	RT
Proteinasa K* / <i>Proteinase K*</i>		65 mg	-20°C
Tampón de Desinhibición*/ <i>Disinhibition Buffer*</i>		18 ml	RT
Tampón de Lavado* / <i>Wash Buffer*</i>		10 ml	RT
Tampón de Elución / <i>Elution Buffer</i>		10 ml	RT
Spin Columns / <i>Spin Columns</i>		50 unid	RT
Tubos de Recogida / <i>Collection Tubes</i>		100 unid	RT

(*) Estas soluciones deben prepararse como se indica en la sección Preparaciones preliminares del protocolo/ These solutions must be prepared as indicated in the Preliminary Preparations section of the protocol

Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- * Etanol 100%.
- * Microtubos de 1.5 ml.
- * Microcentrifuga o centrifuga clínica.

Equipment and reagents needed and not provided

- * 100% ethanol.
- * Microtubes of 1.5 ml.
- * Microcentrifuge or clinical centrifuge

3. PROTOCOLO GENERAL

3. GENERAL PROCEDURE

3.1 Preparaciones preliminares

- Tanto el Tampón de Lisis/Unión como el Tampón de Desinhibición contienen clorhidrato de Guanidina que es un agente irritante, por lo que se recomienda utilizar guantes y gafas para su manipulación.
- Disolver la proteinasa K en **3,10 ml** de agua libre de nucleasas y conservar a -20°C . Se recomienda hacer varias alícuotas para evitar muchos ciclos de descongelación/congelación. A esta temperatura es estable durante 1 año.
- Añadir **10 ml** de Etanol 100 % al Tampón de Desinhibición. Mantener el recipiente cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Añadir **40 ml** de Etanol 100 % al Tampón de Lavado. Mantener el recipiente cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Precalentar el Tampón de Elución a 70°C .

3.1 Preliminary preparations

- Both the Lysis/ Binding Buffer and the Desinhibition Buffer 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 **3.10 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. Keep the container closed to avoid the ethanol evaporation
- Add **40 ml** of Ethanol 100 % to the Wash Buffer. Keep the container closed to avoid the ethanol evaporation.
- Pre-heat the Elution Buffer at 70°C .

3.2 Protocolo de extracción de ADN genómico de muestras FFPE para la:

3.2 Protocol for genomic DNA extraction from FFPE samples para la:

DESPARAFINIZACIÓN DE LA MUESTRA

1. Añadir **400 μl de Solución de Deparaffinización** a un corte de tejido FFPE (10 μm). Asegúrese de que la muestra no contiene más de 15 mg de parafina. Agitar en **vórtex durante 10 segundos**.
2. Incubar **3 minutos a 60°C** para favorecer la fusión de la parafina.
3. Vortexear la muestra inmediatamente (a 60°C) a una velocidad enérgica para disolver la parafina. Después de 3 minutos verá el tejido flotando en el removedor de cera.
4. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos** para granular el tejido.
5. **Eliminar el sobrenadante** con pipeteo, evitando el tejido.
6. **Añadir 1 ml de etanol 100%**. Agitar durante 20 segundos.
7. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos** para granular el tejido. Eliminar el etanol mediante pipeteo, evitando el tejido.
8. Colocar los tubos **a 55°C durante 10 minutos** con los tapones abiertos para evaporar el etanol.

DEPARAFFINIZATION SAMPLE

1. Add **400 μl of Deparaffinization solution** to one FFPE tissue slice (10 μm). *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.

AISLAMIENTO DEL ADN

1. Añadir **200 μl de tampón de lisis tisular + 40 μl de proteinasa K**. Mezclar agitando en vórtex durante 20 segundos.
2. **Incubar a 55°C** durante 1 hora o hasta que se complete la lisis (si es posible con agitación a 600 rpm). Centrifugar brevemente para recoger las gotas.
3. Añadir **20 μl de Proteinasa K** e incubar 1-2 h a 55°C . Después de esta incubación no debe haber partículas de tejido visibles. Centrifugar para eliminar cualquier resto de tejido que pueda quedar. Transferir el sobrenadante a un nuevo microtubo.
4. **Incubar a 90°C durante 1 hora**. Esta incubación invierte parcialmente la modificación por formaldehído de los ácidos nucleicos. Si sólo se utiliza un bloque calefactor, dejar la muestra a temperatura ambiente después de la incubación a 55°C hasta que el bloque calefactor haya alcanzado los 90°C .

DNA ISOLATION

1. Add **200 μl of the Tissue Lysis Buffer + 40 μl Proteinase K**. Mix by vortexing 20 seconds.
2. **Incubate at 55°C** for 1 hour or until the lysis is complete (if possible with agitation 600 rpm). Centrifuge briefly to collect the drops.
3. Add **20 μl Proteinase K** and incubate 1-2 h at 55°C . After this incubation there should be no visible tissue particles. Centrifuge to remove any remaining tissue that may remain. Transfer the supernatant to a new microtube.
4. **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 .*

5. **Centrifugar brevemente** para eliminar las gotas del interior de la tapa.
6. Añadir **300 µl de tampón de lisis/unión**. Mezclar mediante vórtex. **Incubar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos**. Dejar enfriar el lisado a temperatura ambiente.
7. Añadir **100 µl de isopropanol al lisado**. Centrifugar brevemente el tubo de 1,5 ml para eliminar las gotas del interior de la tapa.
8. **Transferir el lisado** al depósito de un tubo de recogida combinada MicroSpin Column.
9. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 60 segundos**.
10. Retirar el tubo de recogida. Si la muestra no atraviesa completamente la matriz, repetir el paso de centrifugación.
10. Colocar la columna MicroSpin en un nuevo tubo de recogida y añadir **500 µl 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** en el depósito de la columna MicroSpin.
13. **Centrifugar a 12.000-14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
14. **Centrifugar a velocidad máxima durante 3 minutos para eliminar el etanol residual**.
15. Retirar el tubo de recogida e introducir la columna MicroSpin en un microtubo de 1,5 ml. **Añadir 25-30 µl de tampón de elución** (precalentado a 70°C) directamente sobre el centro de la membrana de sílice.
16. **Incubar 2 minutos**.
17. **Centrifugar a velocidad máxima durante 60 segundos**. El microtubo contiene ahora ADN genómico.

5. **Briefly centrifuge** to remove drops from the inside of the lid.
6. Add **300 µl of Lysis/Binding Buffer**. Mix by vortexing. **Incubate at room temperature for 5-10 minutes**. Allow the lysate to cool to room temperature.
7. Add **100 µl of Isopropanol to the lysate**. Mix by vortexing. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from inside the lid.
8. **Transfer the lysate** into reservoir of a combined MicroSpin Column –collection tube
9. **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.
10. Place the MicroSpin column in a new collection tube and add **500 µl of Desinhibition Buffer**.
11. **Centrifuge at 12.000-14.000 rpm for 60 seconds**. Remove the liquid.
12. **Add 500 µl of Wash Buffer** into reservoir of MicroSpin column.
13. **Centrifuge at 12.000-14.000 rpm for 60 seconds**. Remove the liquid.
14. **Centrifuge at maximum speed for 3 minutes to remove the residual ethanol**.
15. Remove the collection tube and insert the MicroSpin column in a 1.5 ml microtube. **Add 25- 30 µl of Elution Buffer** (preheated at 70°C) directly onto the center of the silica membrane.
16. **Incubate 2 minutes**.
17. **Centrifuge at maximum speed for 60 seconds**. The microtube contains now genomic DNA.

4. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- Todos los componentes son estables durante 12 meses desde la fecha de la compra siendo almacenados como se indica.

ATENCIÓN: El Tampón de Lisis/Unión y el Tampón de Desinhibición contiene guanidine hydrochloride que es irritante, utilizar guantes y gafas.

STORAGE AND STABILITY

- All components are stable for 12 months from date of purchase when stored as directed.








CAUTION: Lysis/Union Buffer and Desinhibition Buffer contain guanidine hydrochloride which is irritating, use gloves and goggles.

5. GUIA DE PROBLEMAS Y POSIBLES SOLUCIONES / TROUBLESHOOTING

Para cualquier duda o consulta adicional sobre el protocolo pónganse en contacto con el servicio técnico de DURVIZ s.l. en durviz@durviz.com.

For any further questions or doubts about the protocol, please contact DURVIZ s.l. technical service at durviz@durviz.com.

6.SIMBOLOS / SYMBOLS

	Número de catálogo / <i>Catalogue number</i>
	Limitación de temperatura / <i>Temperature limitation</i>
	Fecha de caducidad / <i>Expiration date</i>
	Lote / <i>Lot</i>
	Contiene suficiente para n pruebas / <i>Contains enough for n tests</i>
	Fabricante / <i>Manufacturer</i>
	Uso exclusivo en investigación / <i>Research use only</i>



B65699985