

FFPE DNA KIT

Por favor, leia o manual cuidadosamente antes de usar

Cat. No. XP-351

Armazenamento: ambiente

Descrição:

O FFPE DNA Kit é otimizado para a purificação de DNA a partir de secções de tecidos emblocados em parafina e fixados em formalina (FFPE). O protocolo emprega xileno para a desparafinização e proporciona condições exclusivas de lise tecidual, revertendo de forma eficiente as ligações cruzadas (*cross-linking*) induzidas pelo formaldeído no DNA liberado. Combinando uma membrana de sílica para ligação seletiva do ácido nucleico a um sistema flexível de eluição, o kit permite a obtenção de DNA de alta qualidade e rendimento concentrado em pequenos volumes.

O DNA purificado apresenta elevada estabilidade e pureza, sendo diretamente aplicável em análises de PCR convencional, PCR em tempo real (qPCR), genotipagem de SNP, análise de STR e ensaios de farmacogenômica.

Conteúdo do kit:

Componente	Volumes
Tampão de Lise	15ml
Tampão de Ligação	15ml
Tampão de Lavagem I	13ml
Tampão de Lavagem II	15ml
Tampão de Eluição	15ml
Proteinase K	1ml
Tubos de Coleta (2ml)	50 unid.
Colunas RNASE-Free (Spin)	50 unid.

Notas Importantes (Leia atentamente antes de iniciar)

1. Fixação da amostra: As amostras de tecidos devem ser fixadas em formalina a 4–10% imediatamente após a ressecção cirúrgica. O tempo ideal de fixação é de 8 a 24 horas (períodos prolongados de fixação induzem maior fragmentação do DNA, comprometendo o desempenho em ensaios subsequentes).
2. Desidratação: Realize a desidratação completa das amostras antes do embloco em parafina (resíduos de formalina atuam como inibidores da reação de PCR).
3. Integridade do DNA: A integridade do DNA extraído é diretamente dependente do tipo de amostra, do tempo de armazenamento e das condições de fixação. O tempo prolongado de fixação ou

armazenamento (>1 ano) resulta em fragmentação do DNA, inviabilizando a amplificação de fragmentos longos.

4. Dissolução de precipitados: Caso identifique a formação de precipitados nos Tampões de Lise, de Ligação ou de Lavagem I, incube os reagentes a 37 °C até a solubilização completa do precipitado.
5. Conformidade do protocolo: A manipulação de cada reagente deve seguir rigorosamente as instruções deste manual.

Protocolo:

- Preparo prévio: Certifique-se de que os Tampões de Lavagem I e Lavagem II foram suplementados com etanol absoluto. Para o Tampão de Lavagem I adiciona-se 17ml e para o de Lavagem II, 60ml do etanol absoluto.. Todas as etapas de centrifugação devem ser executadas à temperatura ambiente (15–30 °C).

1. Processamento da Amostra

- Cortes em parafina: Obtenha de 5 a 8 cortes micrométricos de tecido emblocado em parafina (espessura de 5 a 10 µm e área superficial aproximada de 1 × 1 cm²).
- Bloco de parafina: Com o auxílio de um bisturi, seccione aproximadamente 30 mg de tecido, removendo o excesso de parafina das bordas do bloco.

Nota: Caso a superfície do bloco tenha ficado exposta ao ar, descarte as primeiras 2 a 3 secções antes da coleta.

- Amostras fixadas em formalina (não emblocadas): Utilizando um bisturi, fragmente cerca de 30 mg da amostra e transfira para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL. Adicione 500 µL de Tampão PBS (10 mM, pH 7,4), submeta à agitação em *vortex* e centrifugue a 12.000 rpm (~13.400 × *g*) por 1 minuto à temperatura ambiente. Repita esse procedimento de lavagem por três vezes consecutivos e, em seguida, prossiga diretamente para o Passo 7.

Etapas do Protocolo de Extração

2. Desparafinização: Transfira as secções ou o fragmento do bloco de parafina para um tubo de 1,5 mL e adicione 1 mL de xileno. Feche o tubo e submeta à agitação vigorosa em *vortex* por 10 segundos.
3. Pelotização e remoção de solvente: Centrifugue a 12.000 rpm (~13.400 × *g*) por 2 minutos à temperatura ambiente. Aspire e descarte cuidadosamente o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta.

Nota: Cuidado para não aspirar nem perturbar o precipitado (*pellet*).

4. Lavagem com etanol: Adicione 1 mL de etanol absoluto (96–100%) ao precipitado e agite em *vortex* por 10 segundos.
5. Remoção de resíduos de solvente: Centrifugue a 12.000 rpm (~13.400 × *g*) por 2 minutos à temperatura ambiente. Remova e descarte o sobrenadante por aspiração.

Nota: Mantenha a integridade do precipitado durante a aspiração.

6. Secagem da amostra: Mantenha os tubos abertos e incube à temperatura ambiente por 5 a 10 minutos (ou até a evaporação completa do etanol residual).
7. Lise tecidual e digestão enzimática: Ressuspenda o precipitado em 200 µL do Tampão de Lise, adicione 20 µL de Proteinase K e homogeneíze bem. Incube a 56 °C por 1 hora (ou até a lise completa do tecido).
8. Reversão das ligações cruzadas (*Cross-linking*): Incube a amostra a 90 °C por 1 hora para desmisturar a formalina do DNA.
9. Digestão de RNA (Opcional): Para eliminação de RNA residual, adicione 2 µL de RNase A (100 mg/mL) e incube à temperatura ambiente por 2 minutos.
10. Ajuste das condições de ligação: Adicione 220 µL do Tampão de Ligação à amostra e homogeneíze vigorosamente em *vortex*. Em seguida, adicione 250 µL de etanol (96–100%) e torne a homogeneizar vigorosamente em *vortex*. Submeta o tubo de 1,5 mL a uma rápida centrifugação (*spin-down*) para recolher as gotículas retidas na tampa.
11. Ligação à coluna de sílica: Transfira cuidadosamente todo o volume do lisado para a coluna de centrifugação (Spin). Feche a tampa e centrifugue a 8.000 rpm ($\sim 6.000 \times g$) por 2 minutos. Descarte o efluente e reposicione a coluna no mesmo tubo de coleta.

Nota: Se o volume total do lisado exceder 700 µL, aplique e centrifugue alíquotas sucessivas na mesma coluna.

12. Primeira lavagem da coluna: Adicione 500 µL do Tampão de Lavagem I à coluna Spin, feche a tampa e centrifugue a 8.000 rpm ($\sim 6.000 \times g$) por 60 segundos. Descarte o efluente (*flow-through*) e reposicione a coluna no tubo de coleta.
13. Segunda lavagem da coluna: Adicione 600 µL do Tampão de Lavagem II à coluna Spin, feche a tampa e centrifugue a 8.000 rpm ($\sim 6.000 \times g$) por 60 segundos. Descarte o efluente e reposicione a coluna no tubo de coleta.
14. Terceira lavagem da coluna: Repita a etapa de lavagem com o Tampão de Lavagem II (Passo 13).
15. Secagem da membrana: Centrifugue a 12.000 rpm ($\sim 13.400 \times g$) por 2 minutos e descarte o efluente. Em seguida, abra a tampa da coluna e incube à temperatura ambiente por 2 a 5 minutos para a evaporação e secagem completa da membrana.

Nota: O encarrilamento ou residual de etanol no eluato pode interferir em aplicações moleculares subsequentes. Contudo, evite tempos excessivos de secagem, pois a dessecação extrema da membrana reduz a eficiência de eluição do DNA.

16. Eluição do DNA: Transfira a coluna para um tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL. Aplique de 30 a 100 µL do Tampão de Eluição (pré-aquecido a 65 °C) ou água ultra-pura deionizada (ddH₂O) diretamente no centro da matriz de sílica. Feche a tampa, incube à temperatura ambiente por 2 a 5 minutos e centrifugue a 12.000 rpm ($\sim 13.400 \times g$) por 2 minutos. Armazene o tubo contendo a solução de DNA purificado a -20 °C.

Notas de Otimização da Eluição

- **Volume de Eluição:** O volume do tampão de eluição deve ser rigorosamente igual ou superior a 30 µL; volumes inferiores reduzem significativamente o rendimento de recuperação do material genético.
- **Aumento do Rendimento:** Para maximizar a recuperação de DNA genômico, o eluato obtido na primeira centrifugação pode ser reaplicado diretamente sobre a membrana da coluna, mantido em repouso por 2 minutos e submetido a uma nova centrifugação a 12.000 rpm ($\sim 13.400 \times g$) por 2 minutos.
- **Efeito do pH:** O pH da solução de eluição interfere diretamente na eficiência de desorção do DNA da membrana de sílica. Caso utilize ddH₂O, certifique-se de que o pH esteja ajustado entre 7,0 e 8,5 (valores de pH abaixo de 7,0 reduzem drasticamente a eficiência da eluição).
- **Armazenamento:** O DNA extraído deve ser mantido estocado sob congelamento a -20 °C para prevenir processos de degradação enzimática ou hidrólise.

Apenas para uso em pesquisa, não para diagnóstico clínico.

Importação e Distribuição:

Genexplore Comércio, Importação e Exportação Ltda

Website: www.genexplore.com.br | E-mail: suporte@genexplore.com.br

CNPJ: 62.359.822/0001-10 | I.E: 155.425.101.110

Endereço: Av. Primeiro de Maio, 379 – sala 04 – Ribeirão Preto – SP – CEP 14030-390

Tel: 16 981172336