

FFPE DNA WiraSpin®

Extraction Purification Kit

Réf :

EA10-01	20T
EA10-02	50T

Stockage : Conserver à température ambiante (15–25 °C) pendant deux ans pour les composants scellés. Une fois ouverts, la durée de conservation est réduite à un an, à condition que les composants soient manipulés et stockés correctement. Conservez la Protéinase K (poudre) à 4 °C, une fois en solution conserver à -20 °C.

Description

Ce kit offre une solution robuste pour isoler l'ADN à partir d'échantillons de tissus inclus en paraffine fixés au formol (FFPE) en utilisant une technologie de colonnes à spin à base de silice. Conçu pour une utilisation facile et une efficacité maximale, ce kit fournit un protocole simplifié permettant d'éliminer la paraffine, de lyser les tissus et de purifier l'ADN. Il garantit des rendements de haute qualité adaptés à la PCR, au séquençage et à d'autres applications moléculaires. Avec des instructions claires et des précautions de sécurité, les chercheurs peuvent extraire en toute confiance l'ADN d'échantillons FFPE complexes, facilitant des avancées en biologie moléculaire et en pathologie.

Contenu du Kit

Composant	20 T	50 T
Tampon de Liaison et de Lysage (<i>Binding Buffer</i> LBB10)	4 ml	10 ml
Tampon de Nettoyage des Inhibiteurs (<i>Inhibitor Clean Buffer</i> ICB10)	7 ml	15 ml
Tampon de Lavage (<i>Wash Buffer</i> WB10)	5 ml	10 ml
Tampon d'Élution (<i>Elution Buffer</i> EB10)	2 ml	5 ml
Protéinase K Lyophilisée	10 mg	20 mg
Colonnes à ADN avec Tubes de Collecte	20	50

NB : Dissoudre 20 mg de protéinase K lyophilisée dans 1 ml d'eau distillée (ddH₂O) ou 10 mg dans 0,5 ml de ddH₂O pour obtenir une concentration de 20 mg/ml. Conserver à -20°C.

Mode Opérateur

Avant de commencer, ajouter le volume spécifié d'éthanol absolu aux solutions ICB et WB.

Solution	ICB10	WB10
Éthanol (20T)	4,2 ml	20 ml
Éthanol (50T)	11,5 ml	40 ml

Protocole

A/ Déparaffinisation :

- Enlever l'excès de paraffine du bloc FFPE. Couper 0,03–0,05 g de tissu à l'aide d'un scalpel et placer les fragments dans deux tubes Eppendorf.
- Incuber les tubes dans un bain-marie à 56°C pendant 10 minutes.

- Ajouter 1 ml de xylène à chaque tube, puis incuber à 56°C pendant 10 minutes.
- Vortexer pendant 2 minutes, puis centrifuger à 13,000 rpm pendant 10 minutes.
- Répéter les étapes 3 et 4 trois fois.
- Ajouter de l'éthanol absolu (100 %), vortexer pendant 5 minutes, puis centrifuger à 13,000 rpm pendant 10 minutes.
- Répéter cette étape 2 à 3 fois.
- Ajouter de l'éthanol à 70 %, vortexer pendant 5 minutes, puis centrifuger à 13,000 rpm pendant 10 minutes.
- Répéter cette étape deux fois.
- Laisser sécher le culot à 37°C pendant 20 à 30 minutes.

B/ Extraction de l'ADN :

- Placer le fragment de tissu FFPE dans un tube microcentrifuge de 1,5 ml.
- Ajouter 200 µL de Lysis Binding Buffer (LBB) et 20 µL de Protéinase K (20 mg/ml). Mélanger au vortex et incuber à 56°C pendant 1 heure jusqu'à lyse complète. Incuber ensuite à 90°C pendant 1 heure (en surveillant strictement la durée).
 - Si de l'ADN exempt d'ARN est nécessaire, ajouter 10 µL de RNase A et incuber à température ambiante pendant 2 minutes.
- Ajouter 300 µL d'isopropanol, mélanger au vortex, transférer le lysat dans une colonne à spin, centrifuger à 12,000 × g pendant 1 minute, et jeter le filtrat.
- Ajouter 500 µL de Tampon de Nettoyage des Inhibiteurs (ICB) (avec éthanol ajouté), centrifuger à 12,000 × g pendant 30 secondes, et jeter le filtrat.
- Ajouter 500 µL de Tampon de Lavage (WB) (avec éthanol ajouté), centrifuger à 12,000 × g pendant 30 secondes, et jeter le filtrat.
- Répéter l'étape précédente une fois.
- Centrifuger la colonne à spin à 13,000 × g pendant 2 minutes. Laisser sécher à l'air libre dans un tube stérile de 1,5 ml pendant 15 minutes.
- Ajouter 30 à 100 µL de Tampon d'Élution (EB) (préchauffé à 65°C pour un rendement supérieur), laisser reposer à température ambiante pendant 1 minute, puis centrifuger à 12,000 × g pendant 1 minute pour éluer l'ADN.

Remarque :

- Éviter de surcharger la colonne à spin pour garantir un rendement optimal.
- Utiliser des matériaux stériles pour éviter toute contamination.
- Conserver l'ADN extrait à -20°C pour un stockage à long terme.