

### **Extracción de ADN genómico a partir de muestras parafinadas**

1. Cortar 5-10 secciones de hasta 10 µm de grosor y colocarlas en un microtubo de 2ml (prproporcionado).
2. Añadir 500 µl de **solución PRB** y agitar con vortex unos 10 segundos.
3. Incubar a 56°C durante 5 minutos.
4. Centrifugar a 11000g (10000rpm) durante 1 minuto a temperatura ambiente.
5. Eliminar el sobrenadante con la ayuda de una pipeta y repetir los pasos 2-5.
6. Añadir 500 µl de etanol 100% e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 11000g durante 5 minutos y eliminar el sobrenadante.
8. Repetir los pasos 6-7 una vez más.
9. Dejar secar la muestra incubando el tubo abierto a 37°C durante 5 minutos.
10. Añadir 300µl de **Solución A** y agitar con vórtex suavemente.  
*Nota: si la Solución A se ha guardado a 4°C, mezclar suavemente antes de añadirla*
11. Incubar a 56°C durante 60 minutos, o hasta que el tejido se haya digerido, preferiblemente en agitación horizontal (100-150rpm). Se recomienda una incubación toda la noche para asegurar la completa lisis del tejido.
12. Incubar a 90°C durante 60 minutos. Si se utiliza el mismo bloque térmico, dejar la muestra a temperatura ambiente tras la incubación a 56°C hasta que el bloque térmico alcance los 90°C.  
**Tratamiento opcional con RNasa:** calentar la muestra a 70°C 5 minutos. Añadir RNasa (no incluida) 100 µg/ml (concentración final) e incubar a 37°C 5 minutos. Continuar con el paso 13.
13. Enfriar las muestras incubando 5 minutos en hielo.
14. Añadir 100µl de **Solución B** y agitar con vortex.
15. Centrifugar a 17000g (aprox. 13500rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
16. Pipetear el sobrenadante cuidadosamente a un tubo tipo eppendorf estéril de 1,5ml. Desechar el pellet.
17. Añadir 40µl de **Solución C** y 400µl de **Solución D**.
18. Agitar suavemente por inversión hasta lograr homogeneidad.
19. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos en posición vertical.
20. Centrifugar a 11200g (12000rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente.  
*Nota: En la mayoría de los casos es posible observar un pellet pequeño.*
21. Eliminar el sobrenadante con cuidado.
22. Añadir 500µl de **Solución E**.
23. Centrifugar a 11200g (12000rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente.  
**Opcional:** Se puede realizar un lavado adicional con etanol al 70% para evitar el exceso de sales en la muestra final.
24. Eliminar el sobrenadante con cuidado y dejar el tubo abierto e invertido sobre un papel de filtro o papel absorbente durante 5-10 minutos.
25. Añadir 20-50µl de **Solución F** y pipetear arriba y abajo suavemente para resuspender el ADN.  
*Nota: Se puede resuspender el ADN en agua libre de nucleasas, pero no es recomendable si se va a almacenar por un período largo de tiempo.*
26. Opcionalmente, incubar a 37°C durante 30 minutos para ayudar a la solubilización el ADN genómico.
27. Utilizar inmediatamente, o bien, guardar a 4°C (uso en las siguientes 48 horas) o a -20°C (para prolongada conservación).

### **Genomic DNA isolation procedure for FFPE samples**

1. Cut 5-10 sections of up to 10 µm thick and place them in a 2 ml microcentrifuge tube (provided).
2. Add 500 µl of **PRB solution** and vortex vigorously for 10 seconds.
3. Incubate at 56°C for 5 minutes.
4. Centrifuge at 11000g (approx. 10000rpm) for 1 minute at room temperature.
5. Discard the supernatant with care and repeat steps 2-5.
6. Add 500 µl of 100% ethanol and incubate at room temperature for 10 minutes.
7. Centrifuge at 11000g for 5 minutes and discard the supernatant.
8. Repeat steps 6-7 one more time.
9. Dry the sample by incubating the tube opened at 37°C for 5 minutes.
10. Add 300 µl of **Solution A** and vortex gently.  
**Note:** *Mix gently before addition if Solution A was stored at 4°C*
11. Incubate at 56°C for 60 minutes or until the sample has been completely lysed. Use of a horizontal shaker (at 100-150rpm) is optional but preferable. An overnight incubation at 56°C is recommended to ensure complete lysis.
12. Incubate at 90°C for 60 minutes. If using the same heating block, leave the sample at room temperature after the 56°C incubation until the heating block has reached 90°C.  
**Optional RNase treatment:** *heat sample at 70°C for 5 minutes. Add RNase (not provided) 100 µg/ml (final concentration) and incubate at 37°C for 5 minutes. Finally, continue to step 13.*
13. Cool the samples (from step 12) by incubating them approximately 5 minutes on ice.
14. Add 100µl of **Solution B** and vortex gently.
15. Centrifuge at 17000g (approx. 13500rpm) for 10 minutes at room temperature.
16. Carefully pipet the supernatant into a sterile 1.5 ml eppendorf type tube, discarding the pellet.
17. Add 40µl of **Solution C** and 400µl of **Solution D**.
18. Shake slightly by inverting the tube several times until a homogenous solution is observed
19. Incubate the tube at room temperature for 10 minutes in a vertical position.
20. Centrifuge at 11200g (12000rpm) for 5 minutes at room temperature.  
**Note:** *Usually, a little pellet forms.*
21. Discard the supernatant with care.
22. Add 500µl of **Solution E**.
23. Centrifuge at 11200g (12000rpm) for 5 minutes at room temperature.  
**Optional:** *An additional wash with 70% ethanol can be done to avoid salt excess in the final sample.*
24. Discard the supernatant with care and place the tube (containing the pellet) open and upside down, over a filter paper, for 5-10 minutes.
25. Add 20-50µl of **Solution F** and pipet up and down carefully to re-suspend the genomic DNA.  
**Note:** *Nuclease-free water can be used but is not recommended for long time storage.*
26. Optional, incubate the tube at 37°C for 30 minutes to help DNA solubilisation.
27. Use immediately or store at 4°C (if to be used during the next 48 hours) or at -20°C (for longer storage).