

Extracción de ADN circulante.

1. Poner **0,5 ml** de muestra en un microtubo de 1,5 ml (proporcionado).
Nota: Para evitar contaminación con ADN celular, es importante la manera de tratar las muestras previamente al almacenaje o la purificación de ADN circulante.
Si se utiliza menos de 0,5 ml de muestra, reducir el volumen de las soluciones del kit proporcionalmente.
2. Añadir **100 µl** de **Solución A** y **30 µl** de **proteínasa K** y agitar con vórtex suavemente.
Nota: *incubar unos minutos la Solución A a 55°C y mezclar suavemente antes de añadirla para disolver las sales precipitadas.*
3. Incubar a 55°C durante toda la noche.
4. Enfriar las muestras del paso 3 incubando 5 minutos en hielo.
5. Añadir **200µl** de **Solución B** y agitar con vórtex unos 15 segundos.
6. Centrifugar a velocidad máxima (20.000 x g; 14.000 rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Pasar cuidadosamente el sobrenadante a un nuevo microtubo de 1,5 ml (proporcionado). Desechar el pellet.
8. Añadir **80µl** de **Solución C** y **600µl** de **Solución D**
9. Agitar suavemente por inversión hasta lograr homogeneidad.
10. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos en posición vertical.
11. Centrifugar a velocidad máxima (20.000 x g; 14.000 rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
Nota: *En la mayoría de los casos es posible observar un pellet pequeño.*
12. Eliminar el sobrenadante con cuidado.
13. Añadir **500µl** de **Solución E**.
14. Centrifugar a velocidad máxima (20.000 x g; 14.000 rpm) 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.*
15. Eliminar el sobrenadante con cuidado y dejar el tubo abierto durante 5-10 minutos para secar el pellet.
Nota: *El pellet se desprende con facilidad del fondo del tubo por lo que el sobrenadante debe retirarse con mucho cuidado para evitar perder la muestra.*
16. Añadir **30-50µl** 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 periodo largo de tiempo.*
17. Opcionalmente, incubar a 37°C durante 30 minutos para ayudar a la solubilización el ADN genómico.
18. Utilizar inmediatamente, o bien, guardar a 4°C (uso en las siguientes 48 horas) o a -20°C (para prolongada conservación).