

Extracción de ADN genómico a partir de líquido amniótico.

1. Pipetear al menos 2 ml de líquido amniótico fresco o 50000-150000 células de líquido cultivado, previamente resuspendido, en un tubo de 2 ml (incluido en el kit).
Nota: En función de la semana de gestación la concentración final podrá fluctuar. Se ha comprobado de forma reproducible la obtención de >1µg a partir de 2 ml de Líquido Amniótico de 15 semanas o más. Sin embargo, se recomienda utilizar un volumen mayor en la medida de lo posible.
2. Centrifugar a 11200g (12000rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Eliminar el sobrenadante cuidadosamente con la ayuda de una pipeta.
Nota: Repetir los pasos 1-3 si el volumen de muestra utilizado es mayor de 2 ml, hasta que toda la muestra haya sido centrifugada.
4. Añadir 300µl de **Solución A** y agitar con vortex suavemente.
Nota: si la Solución A se ha guardado a 4°C, mezclar suavemente antes de añadirla
5. Incubar a 55°C durante 30 minutos, preferiblemente en agitación horizontal (100-150rpm).
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 6.
6. Enfriar las muestras incubando 5 minutos en hielo o en una nevera.
7. Añadir 100µl de **Solución B** y agitar con vortex unos 15 segundos.
8. Centrifugar a 17000g (aprox. 13500 rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Pipetear el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml (incluido en el kit). Desechar el pellet.
10. Añadir 40µl de **Solución C** y 400µl de **Solución D**.
11. Agitar suavemente por inversión hasta lograr homogeneidad.
12. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos en posición vertical.
13. Centrifugar a 11200g (12000rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
Nota: En la mayoría de los casos es posible observar un pellet pequeño.
14. Eliminar el sobrenadante con cuidado.
15. Añadir 500µl de **Solución E**.
16. 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.
17. Eliminar el sobrenadante con cuidado (*) y dejar el tubo abierto durante 5-10 minutos.
()El pellet se puede desprender fácilmente del fondo del tubo, por lo que el sobrenadante debe ser retirado con extremo cuidado para evitar la pérdida de la muestra.*
18. Añadir 30-50µl de **Solución F** y pipetear arriba y abajo suavemente para solubilizar 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.
19. Opcionalmente se puede incubar a 37°C durante 30 minutos para solubilizar el ADN genómico.
20. Utilizar inmediatamente, o bien, guardar a 4°C (uso en las siguientes 48 horas) o a -20°C (para prolongada conservación).

Extracción de ADN genómico a partir de vellosidad corial

1. Depositar una pequeña cantidad de vellosidad corial (entre 1-5mg) o 50000-150000 células de vellosidad cultivada, en un tubo de 2ml (incluido en el kit).
2. Añadir 300µl de **Solución A** y agitar con vortex suavemente. Si se parte de cultivo celular, centrifugar a 11200g (12000rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente, descartar el sobrenadante con cuidado y añadir 300µl de **solución A**.
Nota: si la Solución A se ha guardado a 4°C, mezclar suavemente antes de añadirla
3. Incubar a 55°C durante 60 minutos, preferiblemente en agitación horizontal (100-150rpm).
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 4.
4. Enfriar las muestras incubando 5 minutos en hielo o en una nevera.
5. Añadir 100µl de **Solución B** y agitar con vortex unos 15 segundos.
6. Centrifugar a 17000g (aprox. 13500 rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Pipetear el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml (incluido en el kit). Desechar el pellet.
8. Añadir 40µl de **Solución C** y 400µl 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 11200g (12000rpm) 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 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.
15. Eliminar el sobrenadante con cuidado(*) y dejar el tubo durante 5-10 minutos.
() El pellet se puede desprender fácilmente del fondo del tubo, por lo que el sobrenadante debe ser retirado con extremo cuidado para evitar la pérdida de la muestra.*
16. Añadir 30-50µl de **Solución F** pipeteando suavemente para solubilizar 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 se puede incubar a 37°C durante 30 minutos para solubilizar 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).