

Extracción de ADN genómico a partir de sangre.

1. Pipetear al menos 50 µl de sangre fresca o congelada (se recomienda utilizar 200 µL) en un microtubo de 1,5 ml (proporcionado).
2. Añadir un volumen de **buffer EW** y agitar con vortex.
3. Centrifugar a 11200g (12000rpm) durante 2 minutos a temperatura ambiente.
4. Eliminar el sobrenadante con la ayuda de una pipeta.
5. Repetir los pasos 2-4 al menos una vez más.
Importante: lavar la muestra, al menos dos veces, con el buffer EW aumenta considerablemente el rendimiento de ADN obtenido.
6. 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
7. 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 8.
8. Enfriar las muestras incubando 5 minutos en hielo o en una nevera.
9. Añadir 100µl de **Solución B** y agitar con vortex unos 15 segundos.
10. Centrifugar a 17000g (aprox. 13500rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
11. Pipetear el sobrenadante cuidadosamente a otro microtubo de 1,5 ml (proporcionado). Desechar el pellet.
12. Añadir 40µl de **Solución C** y 400µl de **Solución D**.
13. Agitar suavemente por inversión hasta lograr homogeneidad.
14. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos en posición vertical.
15. Centrifugar a 11200g (12000rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
Nota: En la mayoría de los casos es posible observar un pellet pequeño.
16. Eliminar el sobrenadante con cuidado.
17. Añadir 500µl de **Solución E**.
18. 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.
19. Eliminar el sobrenadante con cuidado y dejar el tubo abierto e invertido sobre un papel de filtro o papel absorbente durante 5-10 minutos.
20. 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.
21. Opcionalmente, incubar a 37°C durante 30 minutos para ayudar a la solubilización el ADN genómico.
22. 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 blood samples

1. Take at least 50 μL of fresh or frozen blood (200 μL are recommended) and put it into a 1.5 ml microtube (provided).
2. Add 1 volume of **buffer EW** and vortex gently.
3. Centrifuge at 11200g (approx. 12000rpm) for 2 minutes at room temperature.
4. Discard the supernatant with care.
5. Repeat steps 2-4 at least one more time.
***Important:** washing sample at least two times with EW buffer, increases DNA yields.*
6. Add 300 μl of **Solution A** and vortex gently.
***Note:** Mix gently before addition if Solution A was stored at 4°C*
7. Incubate at 55°C for 60 minutes. Use of a horizontal shaker (at 100-150rpm) is optional but preferable.
***Optional RNase treatment:** heat sample at 70°C for 5 minutes. Add RNase (not provided) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (final concentration) and incubate at 37°C for 5 minutes. Finally, continue to step 8.*
8. Cool the samples (from step 6) by incubating approximately 5 minutes on ice or refrigerator.
9. Add 100 μl of **Solution B** and vortex gently.
10. Centrifuge at 17000g (approx. 13500rpm) for 10 minutes at room temperature.
11. Carefully pipet the supernatant into a new 1.5 ml microtube (provided), discarding the pellet.
12. Add 40 μl of **Solution C** and 400 μl of **Solution D**.
13. Shake slightly by inverting the tube several times until a homogenous solution is observed
14. Incubate the tube at room temperature for 10 minutes in a vertical position.
15. Centrifuge at 11200g (12000rpm) for 5 minutes at room temperature.
***Note:** Usually, a little pellet forms.*
16. Discard the supernatant with care.
17. Add 500 μl of **Solution E**.
18. 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.*
19. Discard the supernatant with care and place the tube (containing the pellet) open and upside down, over a filter paper, for 5-10 minutes.
20. Add 30-50 μl 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.*
21. Optional, incubate the tube at 37°C for 30 minutes to help DNA solubilisation
22. Use immediately or store at 4°C (if to be used during the next 48 hours) or at -20°C (for longer storage)