

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).

Circulating DNA isolation procedure

1. Take **0.5 ml** of sample and put it into a 1.5 ml microtube (provided)
Note: To avoid cellular contamination, it is important the way samples have been treated before storage or DNA isolation (see page 7).
When using less than 0.5 ml, reduce the volume of the kit solutions proportionally.
2. Add **100µl** of **Solution A** and **30 µl of proteinase K** and vortex gently
Note: Incubate solution A at 55°C and mix gently before addition to avoid salt precipitates.
3. Incubate at 55°C overnight.
4. Cool the samples from step 3 by incubating approximately 5 minutes on ice.
5. Add **200µl** of **Solution B** and vortex gently about 15 seconds.
6. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 10 minutes at room temperature.
7. Carefully pipet the supernatant into a new 1.5 ml microtube (provided), discarding the remaining pellet.
8. Add **80µl** of **Solution C** and **600µl** of **Solution D**
9. Shake slightly by inverting the tube several times until a homogenous solution is observed
10. Incubate the tube at room temperature for 10 minutes in a vertical position
11. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 5 minutes at room temperature
Note: Usually, a little pellet forms.
12. Discard the supernatant with care
13. Add **500µl** of **Solution E**
14. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 5 minutes at room temperature.
Optional: An additional wash with 70% ethanol can be done to avoid salt excess in the final sample.
15. Discard the supernatant with care and place the tube (containing the pellet) open for 5-10 minutes to dry the pellet.
Note: Pellet is easily removable from the bottom of the tube, so supernatant must be discarded very carefully to avoid sample loss.
16. Add **10-50µl** of **Solution F** and pipet up and down carefully to re-suspend the purified DNA.
Note: Nuclease-free water can be used but is not recommended for long time storage.
17. Optional, incubate the tube at 37°C for 30 minutes to help DNA solubilisation
18. Use immediately or store at 4°C (if to be used during the next 48 hours) or at -20°C (for longer storage)