

## Extração de DNA

### Protocolo desenvolvido por David Vieites – U.C. Berkeley

#### Soluções:

Tampão de extração  
ddH<sub>2</sub>O estéril / TE  
SDS 10%  
Proteinase K 20mg/mL  
Isopropanol  
Etanol 80%

1. Com auxílio de uma pinça e um bisturi, corte o tecido em cima de um Parafilm dentro de uma placa de petri. Usar hipoclorito 10%, álcool 70% e flambar para esterilizar a pinça e o bisturi cada vez que trocar de tecido. Adicione o tecido picado a um tubo de 1,5mL.
2. Adicionar a solução de lise aos tubos (410µL de buffer de extração + 80µL SDS 10% + 15µL proteinase K (20mg/mL). (Acréscitar apenas 10µL de proteinase K quando o tecido for digerir overnight) (opcional: + 2µL Rnase A).
3. Incubar a 55°C por aproximadamente 2 horas, passando no vortex a cada 10 minutos até a completa digestão do tecido.
4. Centrifugar a 13.700xg\* por 5 minutos.
  - Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 1,5mL;
  - Adicionar 180 µL NaCl (5M);
  - Inverter o tubo 50 vezes para homogeneizar. Um precipitado branco sera formado. Se a coloração do precipitado não for branca, o reagente NaCl está velho.
5. Centrifugar a 13.700xg\* por 5 minutos.
  - Enquanto centrifuga, adicionar 800µL\*\* de isopropanol gelado em novo tubo de 1,5mL (pode ser mantido em bloco gelado);
  - Transferir o sobrenadante para o tubo com isopropanol;
  - Misturar gentilmente.
6. Centrifugar a 13.700xg\* por 7 minutos.
  - Descartar sobrenadante;
  - Adicionar 250 µL etanol 80%;
  - Inverter 50 vezes para misturar;
  - Ligar o banho seco para aquecer a 50°C.
7. Repetir o passo 6.
8. Centrifugar a 13.700xg por 7 minutos.
  - Descartar o sobrenadante;
  - Remover o álcool completamente no banho seco ou estufa (50-55°C).
9. Ressuspender o DNA em 50-100 µL de água ultrapura ou tampão TE.  
OBS: Sem pellet colocar 25 µL. Com muito pellet colocar até 200µL.
10. Deixar na geladeira *overnight* (4°C) para diluir o pellet.

\* Rotação da centrífuga – 13.700xg (RCF) = 13.000 RPM (centrífuga HT)

\*\* Usar 1.000µL em tubo de 2,0mL.