PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE BACTÉRIAS

*Previamente a aula:* 5 mL de meio de cultura inoculado com *Escherichia coli* e incubado a 37oC “*overnight*”.

1. Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos o tubo Falcon contendo a cultura pré-cultivada. Desprezar o sobrenadante.
2. Lavar as células adicionando ao sedimento 500 μL de tampão Tris-EDTA (ressuspender por pipetagem, usar ponteira azul) e transferir para um microtubo de 1,5 mL previamente esterilizado.
3. Centrifugar novamente à 6000 rpm/ 5 minutos. Desprezar o sobrenadante.
4. Ressuspender o sedimento (por pipetagem) em 200 μL do tampão Tris-EDTA contendo 1% de Triton X-100 e selar a tampa dos tubos com Parafilm®.
5. Lisar as células aquecendo os tubos em banho-maria a 100 oC por 10 minutos.
6. Esperar esfriar até temperatura ambiente e centrifugar à 13.000 rpm/ 3 min. Coletar o sobrenadante (com ponteira azul) e transferir para outro microtubo (1,5 mL) previamente esterilizado. O tubo contendo o sedimento será desprezado.
7. Adicionar 1/50 do volume de NaCl 5M e 2 volumes de álcool etílico absoluto (previamente resfriado à 4 oC). Homogeneizar por lenta e gentil inversão (10 x), até formação de ‘nuvem’ de DNA.
8. Centrifugar à 13 000 rpm por 10 minutos. Desprezar o sobrenadante (não tocar no sedimento [DNA]).
9. Adicionar 1 mL de álcool etílico 70 % (4 oC) e centrifugar à 10 000 rpm por 10 minutos. Desprezar o sobrenadante, tendo cuidado para não tocar no sedimento.
10. Posicionar o frasco em posição invertida e com tampa aberta à temperatura ambiente para evaporação natural e completa do álcool (~ 20 minutos).
11. Suspender o DNA pela adição de 100 μL de tampão Tris-EDTA. Não agitar em vórtex ou com ponteira, pois o DNA é frágil e pode fragmentar-se.
12. A solução de DNA é então mantida à temperatura de 4 ºC.

\*\*\*Para verificação da integridade do DNA este deverá ser visualizado em gel de agarose (1%). Efetuar a separação eletroforética a 60V por 60 min.

**Soluções necessárias para extração:**

**Tampão Tris-EDTA** (final 1000 mL)

10 mM Tris pH 8.0 , pH ajustável com HCl – 1,211 g

1 mM EDTA - 0,37224 g. Esterilizar em autoclave à 121 oC/ 15 minutos.

# Tampão Tris-EDTA Triton X-100 (1000 mL)

10 mM Tris pH 8.0 , pH ajustável com HCl – 1,211g

1 mM EDTA - 0,37224 g

1 % Triton X-100 – 10 mL. Esterilizar em autoclave à 121 oC/ 15 minutos.

### Álcool etílico 70% (final 10 mL)

3 mL de água deionizada estéril

7 mL de etanol absoluto

**NaCl 5M** (100 mL)

Pesar 29,25 g para 100 mL de água de destilada. Esterilizar por autoclavação.

**Para gel de agarose:**

**Tampão TBE (×10, estoque)**

Tris base 60,5 g

Ácido Bórico – 30,915 g

EDTA – 9,306 g

Dissolver em 300 mL, ajustar pH final 8,0 com HCl. Completar o volume final para 500 mL e esterilizar em autoclave a 121 oC por 15 min.

## Gel de Agarose 1,0 %

A corrida será realizada em cuba pequena, de modo que os cálculos serão os seguintes:

Pesar 0,2 g de agarose para 20 mL (volume do gel). Dissolver a mistura em manta aquecedora, agitando lentamente com frequência. Depois de dissolvido, esperar esfriar até temperatura aproximada de 60 oC e adicionar 1 μL de solução de brometo de etidio 10 mg/mL (na concentração final de 0,5 μg/mL). Adicionar a agarose à bandeja de eletroforese. Em seguida posicionar o pente na posição desejada e aguardar solidificar.

**Preparo da amostra para a corrida:**

Carregar em cada poço do gel a seguinte mistura: 3 μL de DNA extraído, 2 μL de Tampão de Carregamento (*loading dye*) e 7 μL de H2O destilada (total 12 μL). Adicionar marcador de peso molecular de 100 pb (5 μL).

Após o término da corrida revelar o gel em Transiluminador UV.