

*Protocolo de extração de DNA contido em
“slices” de agarose utilizando “glassmilk”*
(LAB. PROTOZOOLOGIA – IMT – FMUSP)

1. Submeter o DNA a uma eletroforese em gel de agarose em TAE sem brometo de etídio;
2. Corar o gel em solução de EtBr (150mL Milli-Q+ 15 μ L EtBr 10 μ g/ μ L) por 15 a 20 minutos;
3. Cortar a banda desejada, observando o gel no transluminador de UV. Limitar a exposição do gel ao ultravioleta ao máximo de 1 minuto;
4. Coletar a banda em um tubo tipo eppendorf de 1,5ml. Adicionar 3 volumes de NaI 6M e incubar a 37-50°C em termobloco até a fusão da agarose.
5. Adicionar 5 μ L da solução de Glassmilk.
6. Incubar 10 minutos à temperatura ambiente.
7. Centrifugar 10 segundos a 13.000xg e descartar o sobrenadante.
8. Ressuspender em 300 μ L de Wash Buffer. Centrifugar como descrito e descartar o sobrenadante. Repetir este passo mais uma vez.
9. Lavar o pellet com EtOH 70% e secar à temperatura ambiente.
10. Adicionar 30 μ L de H₂O Milli-Q[®] estéril e incubar 10 minutos à temperatura ambiente.
11. Centrifugar como descrito e reservar o sobrenadante.

SOLUÇÕES

I) NaI

NaI 6M

Tris (pH 6.8) 10mM

DTT 0.05mM

II) Wash Buffer

20mM TrisHCl pH 7.5

NaCl 0.1M

EDTA pH 8 2mM

EtOH 70%