

Extração de DNA plasmidial através da lise alcalina

Incubar uma colônia em 3 ml de LB contendo ampicilina (100µg/ml) à 37° C sob agitação durante 12 horas.

Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos e descartar o sobrenadante.

Ressuspender as células em 100µl de TEG (Tris-HCl 25mM pH 8,0; EDTA 10mM; Glicose 50mM em presença de RNase 1,5µg/µl) Vórtex.

Transferir para tubos eppendorf e adicionar 200µl de NaOH 0,2M; SDS 1%. Misturar vigorosamente por inversão (2x) e incubar por 3-5 minutos à temperatura ambiente (não deixar mais que isso).

A seguir adicionar 200µl de solução contendo ácido acético glacial 6M e acetato de potássio 3M. Misturar por inversão (8x) até coagular e incubar no gelo por 25 minutos.

Centrifugar a 13°C a 13000rpm por 8 minutos.

Coletar com cuidado 400µl do sobrenadante e transferir para tubo contendo 300µl de isopropanol.

Misturar por inversão (4x). Centrifugar a 13°C a 13000rpm por 8 minutos.

Drenar bem os tubos com papel absorvente e lavar o precipitado com etanol 70% (500µl). Misturar por inversão e centrifugar novamente a 13°C a 13000rpm por 8 minutos.

Drenar bem os tubos com papel absorvente. Secar.

Ressuspender em 30µl de água.

Soluções para extração de DNA plasmidial através da lise alcalina

TEG

	q.s.p. 1000ml	q.s.p. 100ml
Tris-HCl 25mM pH8,0	3,027g	0,30g
EDTA 10mM	3,7224g	0,37g
Glicose 50mM	9g	0,9g

NaOH 0,2M + SDS 1%

	q.s.p. 1000ml	q.s.p. 100ml
NaOH	8,0g	0,8g
SDS	10g	1g

Acetato de Potássio 3M + Ácido Acético Glacial 6M

	q.s.p. 1000ml	q.s.p. 100ml
Acetato de Potássio	294,42g	29,5g
Ácido Acético Glacial	360,3ml	36ml