



Protocolo de Extração de DNA Modificado de Ferreira e Grattapaglia (1995)

1. Pesar 50 a 200 mg de folhas (dependendo se secas ou frescas)
2. Dispor os fragmentos de folhas verticalmente em eppendorfs de 2 mL para permitir a maceração
3. Se o material estiver seco, adicionar duas esferas (*beads*) de 7 mm por eppendorf e colocar no macerador automático, por 5 min na velocidade de 50 batidas por segundo
4. Se o material estiver fresco, adicionar nitrogênio líquido até encher o tubo, esperar que o material esteja bem congelado e macerar da mesma forma
5. Adicionar 700 μ L do tampão de extração
6. Adicionar 1,4 μ L de 2- β -mercaptoetanol
7. Incubar a 65°C por 50 min, numa velocidade de 650 rpm, invertendo a cada 10 min
8. Deixar esfriar na bancada
9. Adicionar 600 μ L de Clorofórmio-álcool IsoAmílico 24:1 (CIA) gelado
10. Agitar os tubos durante 5 min até formar uma emulsão homogênea
11. Centrifugar a 14.000 rpm por 5 min
12. Regular a pipeta para 180 μ L e pipetar 3 vezes a parte superior para transferi-la para um novo tubo eppendorf de 1,5 mL
13. Adicionar 50 μ L de uma solução de 10% CTAB/1,4 M NaCl (solução bastante viscosa)
14. Misturar durante 5 min até homogeneizar
15. Repetir a extração com 600 μ L de CIA gelado
16. Transferir a fase aquosa (superior) para um novo tubo eppendorf de 1,5 mL
17. Adicionar 400 μ L de isopropanol a -20°C
18. Misturar para a formação do precipitado (nuvem). Se não precipitar, colocar o tubo a -20°C por 30 min ou mais
19. Centrifugar a 7.500 rpm por 5 min para a formação do *pellet*
20. Descartar o sobrenadante cuidadosamente
21. Lavar o *pellet* uma vez em 1 mL de etanol 70% por 10 min (se necessário, deixar *overnight* a -20°C)
22. Retirar o etanol 70%
23. Lavar o *pellet* em 1 mL de etanol absoluto por 3 min
24. Retirar o etanol e deixar secar o *pellet* na estufa a 37°C
25. Ressuspender o *pellet* em 100 μ L de TE

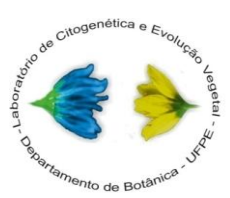
Tampão de extração 2x CTAB

Para preparar 50 mL:

2 % CTAB	1 g
1,4 M NaCl	4,06 g
20 mM EDTA	2ml de um estoque 0,5 M
100 mM Tris-HCl pH 8,0	5ml de um estoque 1 M
1% de Polyvinylpyrrolidone (PVP)	500 mg
Adicionar água até 50 mL	



Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal



Solução de 10% CTAB/1,4 M NaCl

Para preparar 1 mL:
0,1 g de CTAB
0,0812 g de NaCl
Adicionar água até 1 mL

Tampão TE

Para preparar 1000 mL:
10 mM Tris-Cl pH 8,0 10 mL de um estoque 1M Tris-Cl (pH 8,0)
1 mM EDTA 2 ml de um estoque 0,5M EDTA (pH 8,0)
Água até 1000 mL

Modificado de: Ferreira ME, Grattapaglia D. 1995. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220p.