



# Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal



## Protocolo de extração de DNA Doyle e Doyle

Modificado de Doyle e Doyle, 1987; e Culling, 1992

1. Preparar em falcon o tampão CTAB (usar dentro de 2 – 3 dias, armazenar fechado): Adicionar primeiro o polivinilpirrolidona (PVP-40T Sigma), dissolver bem e, em seguida,  $\beta$  – mercaptoetanol (M3148-25ML Sigma) e agite para dissolver antes de começar a extração:

CTAB	PVP	$\beta$ – mercapto
0.5 ml	0.02g	2.5 $\mu$ l
5 ml	0.2 g	25 $\mu$ l
10 ml	0.4 g	50 $\mu$ l
20 ml	0.8 g	100 $\mu$ l
30 ml	1.2 g	150 $\mu$ l

2. Pesar de 30 – 40mg e tecido vegetal seco em sílica.
3. Triturar o tecido em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido (triturar o tecido com pistilos azuis de plástico):
  - a. Pistilos podem ser reutilizados, estocados em água sanitária 10% e lavados com água destilada antes do uso.
  - b. A trituração pode ser feita com ou sem acréscimo de nitrogênio líquido e/ou areia lavada e autoclavada
4. Transferir o material triturado para um eppendorf e adicionar 600  $\mu$ l de tampão CTAB (triturar as amostras um pouco mais)
5. Incubar as amostras a 60°C por 2h ou mais, até de um dia para o outro (*overnight*)
6. Adicionar 600  $\mu$ l de 24:1 clorofórmio:álcool isoamil e misturar bem (**devagar**) agitando os tubos
7. Centrifugar por 5 a 10 min na velocidade máxima
  - a. Após centrifugação, você deverá ter três fases: a superior aquosa; a intermediária que conterà detritos e proteínas e a inferior clorofórmio.
  - b. Ir para o próximo passo rapidamente antes que a fases se misturem
8. Pipetar a fase aquosa lentamente com cuidado para não sugar a fase intermediária e a fase do clorofórmio
9. Colocar a fase aquosa pipetada em um novo eppendorf
10. Estimar o volume da fase aquosa
11. Adicionar 0.08 x volume de acetato de amônio 7.5 M (frio)
12. Adicionar 0.54 x volume de isopropanol (=2-propanol) (frio) - usando a combinação do volume da fase aquosa e do AmAc
13. Misturar bem (devagar)
14. Deixar no freezer por 45 min ou até *overnight*
  - a. Longos períodos tenderão a render mais DNA, mas também mais sujeira
15. Centrifugar por 3 min a velocidade máxima



# Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal



16. Despejar ou pipetar para fora o líquido tomando cuidado para não perder o *pellet* (DNA)
17. Adicionar 700 µl de etanol 70% frio
18. Centrifugar por 1 min a velocidade máxima
19. Despejar ou pipetar para fora o líquido tomando cuidado para não perder o *pellet* (DNA)
20. Adicionar 700 µl de etanol 95% frio e misturar
21. Centrifugar por 1 min a velocidade máxima
22. Despejar ou pipetar para fora o líquido tomando cuidado para não perder o *pellet* (DNA)
23. Secar o *pellet*
  - a. Colocar as amostras no “*speed vac.*” por 20 min ou
  - b. Inverter as amostras sobre lenço de papel e deixar repousar por 1h ou até secar
24. Ressuspender amostras em 100 µl de Tampão TE (água). Deixar ressuspender por 1h a 55°C [termomixer] e colocar no refrigerador *overnight*.

## Estoques

### CTAB: para 1l de tampão CTAB

- 100 ml de Tris 1M pH 8,0
- 280 ml de NaCl 5M
- 40 ml de EDTA 0,5 M
- 20 g de CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide, H6269-100g Sigma)

### CTAB: para 150 ml

- 15 ml de Tris 1M pH 8,0
- 42 ml de NaCl 5M
- 6 ml de EDTA 0,5M
- 3 g de CTAB

## Tampão TE

Final	Para 1l – uso
10 mM	10 ml de Tris 1M pH 8.0
1 mM	2 ml de EDTA 0,5M

### Tris 1M pH 8,0: 1l

- 121.1g Tris
- 800ml de dH<sub>2</sub>O
- Dissolva o Tris e complete para 800 ml (atingir pH 8,0 com HCl concentrada – necessitará de  $\cong$  50ml). Depois complete para 1l

### EDTA 0,5M pH 8.0: para 1l

- 186,12 g de EDTA (CAS: 6381-92-6 Química Moderna)
- 750ml de dH<sub>2</sub>O



# Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal



- Adicionar cerca de 20 g NaOH (em pedrinhas) e vagarosamente adicione mais NaOH até atingir o pH 8,0. O ETDA não se dissolverá até que o pH da solução esteja próximo a 8,0.

## **NaCl 5M: para 1l**

292,2 g de NaCl (CAS: 7647-14-5 Química Moderna)

700ml de dH<sub>2</sub>O

- Dissolva e depois complete para 1l

Modificado de:

Cullings KW (1992). Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Mol Ecol* 1:233-240.

Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15