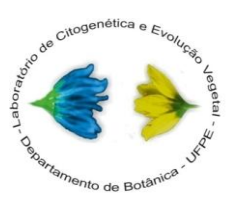




Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal



Protocolo de extração de DNA – CTAB 1

Modificado de Weising et al. 2005

1. Aquecer a 60°C 15 ml de tampão de extração por amostra em falcons (50 ml) identificados
2. Adicionar 30 µg (0.2%) de β-mercaptoetanol ao tampão de extração de cada falcon (capela!)
3. Pesar ca. 3 g (material fresco) ou ca. 0.5 g (material seco) de folhas
4. Esfriar o almofariz e o pistilo com nitrogênio líquido
5. Dispor as folhas no almofariz, adicionar nitrogênio líquido e macerar até obter um pó fino e esbranquiçado
6. Transferir rapidamente o pó para o falcon com o tampão de extração (cuidado para não deixar o material pegar umidade) e misturar bem a solução invertendo o tubo
7. Incubar em banho-maria a 60°C por 40 min, invertendo a cada 10 min
8. Adicionar 15 ml (1 vol.) de clorofórmio-álcool isoamílico
9. Agitar os falcons durante 10 min de forma suave, mas suficiente para permitir a mistura das duas fases
10. Centrifugar por 10 min a 4000 rpm (à temperatura ambiente - TA)
11. Transferir a parte superior (fase aquosa, ca. 10 ml) para um novo falcon (50 ml), usando pipeta de vidro
12. Adicionar 0,6× volume (ca. 6 ml) de isopropanol 100%; misturar com cuidado, mas completamente
14. Incubar no freezer (-20°C) por pelo menos 1 h (pode ser overnight)
15. Centrifugar por 10 min a 4000 rpm (4°C)
16. Adicionar 20 ml de etanol 70%
17. Agitar cuidadosamente e centrifugar novamente (10 min, 4000 rpm, 4°C)
18. Descartar o sobrenadante
19. Secar o pellet
20. Adicionar TE (1 ml, ou menos, se o pellet for pequeno)



Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal



21. Ressuspender o pellet na geladeira (4°C), sem agitar, durante uma a várias horas (dependendo da solubilidade do pellet)
22. Transferir para um tubo Eppendorf 1,5 ml
23. Adicionar 12,5 µl de RNase (conc. final 250 µg/ml) para 1 ml (ou proporcionalmente menos), misturar e deixar incubar à 37°C por 2 h
24. Adicionar 50,6 µl (0,05 v) de NaCl (5 M) e misturar
25. Adicionar 367,7 µl (0,35 v) de etanol 100% e misturar suavemente
26. Incubar em gelo durante 10 min
27. Centrifugar por 30 min a 4000 rpm (4°C)
28. Transferir 1 ml do sobrenadante para um novo tubo Eppendorf (2 ml) descartando o resto
29. Adicionar 1 ml de isopropanol 100% e misturar suavemente
30. Incubar no freezer por 1 h à -20°C
31. Centrifugar por 10 min a 4000 rpm (4°C)
32. Descartar o sobrenadante
33. Adicionar ca. 1 ml de etanol 70%
34. Centrifugar por 10min a 4000 rpm (4°C)
35. Secar o pellet
36. Ressuspender o pellet em volume apropriado de tampão TE (50-500 µl)

Reagentes e soluções

Tampão de extração (100 ml, 15 ml/amostra)

2% p/v CTAB	2 g
1,4 M NaCl	35 ml de uma solução de 4 M ou 28 ml de uma solução de 5 M
20 mM EDTA	4 ml de uma solução de 0.5 M

