



Extração de DNA de BACs - *MIDIPREP*

Adaptado do *Qiagen Plasmid Midi Handbook (Qiagen Plasmid Midi Kit Cat. No. 12143)*

- a) Prepare um pré-inóculo transferindo uma colônia de bactérias crescida em meio sólido em placa de Petri para 2 mL de meio líquido em tubos de ensaio de 10 mL e deixe crescer por aproximadamente 6 h a 37°C sob agitação (300 rpm, em uma estufa agitadora) formando um ângulo de 45°.
- b) Utilize 1 mL desse pré-inóculo para inocular 100 mL de meio de líquido e deixe crescendo até o dia seguinte a 37°C sob agitação.
- c) Centrifugue os 100 mL em Falcon (centrifugar 2x 50 mL) a 3.000 rpm por 15 min, descarte o sobrenadante vertendo o tubo e deixando escorrer sobre papel absorvente o excesso de líquido.
- d) Ressuspenda o *pellet* de bactérias em 4 mL de tampão P1 com RNase (20µL de RNase por amostra, com o mínimo de vórtex necessário).
- e) Adicione 4 mL do tampão P2, misture gentilmente por inversão (cerca de seis vezes, observe se a solução está homogênea) e deixe à temperatura ambiente por exatos 5 min.

Atenção

- ✓ Mais de 5 min neste tampão pode degradar o DNA.
- ✓ Se o tampão P2 estiver com precipitação, aqueça-o a 37°C antes de usar.
- ✓ Mantenha o frasco de tampão P2 sempre fechado para evitar reação entre o NaOH do tampão e o CO₂ do ar.
- f) Adicione 4 mL do tampão P3 gelado, misture logo em seguida gentilmente por inversão e incube em gelo por 15 min. Inverta novamente.
- g) Centrifugue a 4.000 rpm por 30 min à 4°C.



Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal



Atenção

- ✓ Durante a centrifugação, coloque as colunas (uma coluna por clone e devidamente identificadas) sobre um Falcon de 15 mL utilizando os suportes fornecidos pelo *kit*.
- h) Após a centrifugação, com um pipetador, transfira o sobrenadante transparente para outro tubo (cuidadosamente para não trazer sujeira) e centrifugue o novo tubo por 10 min para que apenas o sobrenadante, e não o *pellet* formado no fundo, seja aplicado à coluna na etapa j.

Atenção

- ✓ Se necessário, transfira o sobrenadante para um novo tubo e repita esse procedimento, para uma melhor limpeza.
- i) Equilibre a coluna adicionando 4 mL de tampão QBT.
- j) Pipete o sobrenadante numa coluna, 1 mL por vez. Nesta etapa o DNA ficará preso à coluna.
- k) Lave a coluna com tampão QC 2 x, usando 10 mL em cada lavagem.
- l) Coloque falcons de 15 mL novos (1 por coluna) sob as colunas.
- m) Elua o DNA da coluna adicionando 5 mL de tampão QF aquecido a 65°C.

Atenção

- ✓ Se precisar, pode parar nessa etapa, deixando as amostras na geladeira durante a noite. Antes de precipitar com isopropanol, a amostra deve voltar à temperatura ambiente.
- n) Precipite o DNA com 3,5 mL de isopropanol à temperatura ambiente. Misture bem por inversão (cerca de 20 vezes).
- o) Coloque a mistura num eppendorf e centrifugue imediatamente 2x 15 min a 14.000 rpm. Descarte o sobrenadante, invertendo-o cuidadosamente e retirando o restante com uma pipeta e deixando o tubo invertido sobre papel absorvente.



Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal



- p) Adicione 1,5 mL de etanol 70% à temperatura ambiente e centrifugue imediatamente a 14.000 rpm por 10 min. Descarte o sobrenadante, invertendo-o cuidadosamente e retirando o restante com uma pipeta.
- q) Deixe o *pellet* de DNA secar à temperatura ambiente, o mínimo de tempo necessário para o líquido não ser mais visível, e ressuspensa em 30 μ L de Tris HCl 10 mM pH 8,5.
- r) Deixe na geladeira durante a noite para ressuspender bem.

Atenção

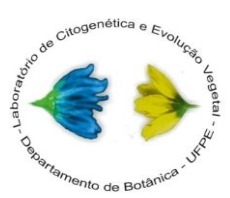
- ✓ O DNA do BAC é em geral de difícil ressuspensão. No dia seguinte, verifique se o DNA está bem ressuspensa pipetando a solução para cima e para baixo até ficar homogênea e, caso não esteja, aqueça a 55°C por 30 min e repita a pipetagem. Se a solução estiver muito viscosa, é possível adicionar mais 10 μ L de Tris HCl 10 mM pH 8,5 e repetir o procedimento.
- ✓ Para a quantificação do DNA obtido do BAC em gel, clive 1 μ l com uma enzima de restrição (em geral HindIII), em um volume total de 10 μ L e separe em gel de agarose 1% por 30 min a 80 V. Compare a intensidade do total das bandas geradas com a do total das bandas de uma escada de 1 kb aplicada em quantidades de 125 ng, 250 ng e 500 ng. Em geral, é obtida uma solução de aproximadamente 250 ng/ μ L de DNA de BAC usando esse protocolo, embora o rendimento da reação varie de clone para clone.

Preparo das Soluções Tampão P1, P2, P3, QF, QC e QBT

- Tampão P1: Composição: Tris-Cl 50 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM. Dissolva 0,606 g de Tris base e 0,372 g de EDTA·2H₂O em 80 ml de dH₂O. Ajuste o pH para 8,0 com HCl. Ajuste o volume para 100 ml com dH₂O.
- Tampão P2: Composição: NaOH 200 mM, SDS 1%. Dissolva 0,8 g de *pellets* de NaOH em 95 ml dH₂O e acrescente 5 ml de solução SDS 20%. O volume final deve ser 100 ml.
- Tampão P3: Composição: acetato de potássio 3,0 M, pH 5,5. Dissolva 29,45 g de acetato de potássio em 50 ml de dH₂O. Ajuste o pH para 5,5 com ácido acético glacial (~11 ml) e ajuste o volume para 100 ml com dH₂O.



Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal



Observação: Autoclave os 3 tampões. Guarde P1 e P3 a 4°C e P2 a temperatura ambiente.

- Tampão QF: Composição: NaCl 1,25 M; Tris.Cl 50 mM, pH 8.5; isopropanol 15%. Misturar 50 ml 3M NaCl, 12 ml 0.5 M Tris pH 8.5 e 18 ml isopropanol 100% em 40 ml de dH₂O.

- Tampão QC: Dissolva 5,84g de NaCl e 1,46g de MOPS em 80mL de dH₂O e ajuste o pH para 7.0 com NaOH. Adicione 15mL de isopropanol puro. Ajuste o volume para 100mL.

- Tampão QBT: Dissolva 4,38g de NaCl e 1,46g de MOPS em 80mL de dH₂O. Ajuste o pH para 7.0 com NaOH. Adicione 15mL de isopropanol puro e 1,5mL de Triton X-100 10%. Ajuste o volume para 100mL.