

Consideraciones:

- I. Utilizar los filtros que contienen el material recuperado según protocolo para la filtración y recuperación de microorganismos.
- II. Para extraer el DNA utilizaremos el kit **BIONEER AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit** (Ref#K-3032), junto a tratamientos enzimáticos utilizando enzimas no provistas en el kit.

Procedimiento:

1. Retirar el conservante de RNA (RNA Later) cuidadosamente desde los tubos que almacenan los filtros que poseen los microorganismos, mediante micropipeta.
2. Preparar previamente los tubos falcon de 15 mL con perlas de vidrio autoclavadas.
3. Recuperar los filtros y pasarlos a un tubo falcon de 15 mL evitando arrastrar el RNA Later y agregar 540 µL de **buffer TL**. Es importante girar los filtros para que la parte donde se recuperaron los microorganismos quede expuesta al medio de extracción. Evitar arrastrar conservante de RNA. Utilizar el vortex para soltar los microorganismos desde los filtros.
4. (opcional) Realizar tratamiento con **DNAsa I** (Roche, #4716728001) para eliminar cualquier rastro del DNA ambiental, utilizando 1 µL **DNAsa I** (5 U/µL), a 25 °C por 30 minutos. Luego, inactivar la **DNAsa I** calentando por 5 minutos a 85 °C. Enfriar rápidamente.
5. Agregar 60 µL de **LISOZIMA** (100mg/mL) y 60 µL de **PROTEINASA K** (20mg/mL) **simultáneamente**, mezclar en vortex.
6. Incubar a 37°C por 1 hora para facilitar digestión con Lisozima.
7. Incubar a 55°C por 1 hora para facilitar digestión con Proteinasa K.
8. Agitar en Vortex para soltar los microorganismos desde los filtros.
9. Agregar 600 µL de **GB Buffer**, mezclar por vortex 15 segundos.
10. Agregar 1200 µL de **ETANOL** (96-100%) a la muestra, mezclar por vortex por 15 segundos.
11. Agregar cuidadosamente **800 µL** de la mezcla obtenida en el punto 10 a la columna de extracción (Binding column-I), la cual debe rotularse previamente. Centrifugar a 8000 rpm x por 1 min. Descartar el eluido y reusar el tubo colector. **Nota:** Repetir esta operación unas 3 veces, hasta lograr que la muestra pase del todo por la columna.
12. Agregar 500 µL de buffer **WA1**. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Descartar el eluido y reusar el tubo colector. **Nota:** Asegurarse que WA1 tenga el etanol añadido.
13. Agregar 500 µL de buffer **WA2**. Centrifugar a máxima velocidad, 8000 rpm por 1 min. Descartar el eluido y reusar el tubo colector.
14. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 min con el fin de eliminar residuos de etanol desde la columna.
15. Colocar la columna en un tubo eppendorf de 1,5 ml (previamente rotulado) y agregar **35 µL (o 50 µL)** de **EA Buffer en el centro de la membrana de la columna**. Incubar 1 min a temperatura ambiente y centrifugar a 8000 x g por 1 min para eluir.
16. Sin descartar la columna, volver a agregar **35 µL** de buffer **EA** en el centro de la membrana de la columna. Incubar 1 min a temperatura ambiente y centrifugar a 8000 x g por 1 min.
17. Cuantificar en Nanodrop (ng/µL) y realizar electroforesis utilizando al menos 300 ng de DNA total por pocillo para visualizar calidad del DNA extraído.
18. Almacenar el DNA a -20 °C.