

#### **48. Extração de DNA plasmidial (Midiprep)**

1. Crescer em 15 a 20 mL de LB uma colônia isolada. Incubar *overnight* à 37° C,
2. Centrifugar a cultura por 10 minutos a 1.5000 rpm à 4° C em um tubo de 15mL. Remover o sobrenadante pela inversão do tubo e drenar a última gota com auxílio de uma ponteira.
3. Ressuspender o pellet com 400µL da solução I com auxílio do vórtex ou pipeta. Cuidar para não ficar grumos de bactérias.
4. Adicionar 400µL da solução II, misturar por inversão 5 vezes fazendo com a solução entre em contato com toda a superfície do tubo. Incubar 3 minutos em gelo.
5. Adicionar 400µL da solução III (resfriada). Fechar o tubo e misturar por inversão 10 vezes. Incube no gelo por 3 à 5 minutos.
6. Centrifugar o lisado a 14.000 rpm à 4°C por 5 minutos.
7. Transferir o sobrenadante para um novo tubo.
8. Adicionar igual volume de fenol/clorofórmio. Misturar através de rápido vórtex e centrifugar a 14.000 rpm à 4°C por 5 minutos.
9. Coletar a fase aquosa (superior) e transferir para um novo tubo.
10. Precipitar o DNA através da adição de mesmo volume de isopropanol, misturar por vórtex e incubar em temperatura ambiente ou à 4°C durante 5 minutos.
11. Centrifugar à 14.000 rpm à temperatura ambiente durante 5 minutos, desprezar o sobrenadante cuidando para não desfazer o pellet.
12. Adicionar 1mL de etanol 70%, lavar o pellet e centrifugar novamente à 14000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
13. Remover o sobrenadante com auxílio de um pipetador, cuidando para não tocar o pellet. Remover qualquer outra gota ou líquido presente com auxílio de uma swab ou cotonete.
14. Deixar secar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
15. Ressuspender o pellet com 100µL de H<sub>2</sub>O + RNase.