

47. Extração de DNA plasmidial (Miniprep)

1. Transfira a cultura para um microtubo de 2 mL e centrifugue 1 minuto a 14.000 rpm.
2. Descarte o sobrenadante e adicione o restante da cultura se necessário.
3. Ressuspenda o *pellet* com 150µL da Solução I. Misture até dissolver o pellet.
4. Adicione o 150µL da Solução II, misture por inversão 5 vezes e incube 1 minuto à temperatura ambiente ou em gelo por 5 minutos.
5. Adicione 150µL da Solução III (resfriada). Incube 1 minuto em temperatura ambiente ou em gelo por 5 minutos. Centrifugue 10 minutos a 14.000 rpm.
 ***Opcional:** Colete o sobrenadante e transfira para um novo microtubo, adicione 1x o volume de fenol/clorofórmio (ou seja, 450µL de sobrenadante: 450µL de fenol/clorofórmio), misture por agitação e centrifugue 3 minutos a 14.000 rpm.
6. Colete o sobrenadante e transfira para um novo microtubo, adicione 2 X o volume de etanol 100% (ou seja, 450µL de sobrenadante : 900µL de etanol 100%). Incube por 30-60 minutos à -20°C. Centrifugue 10 minutos a 14.000 rpm.
7. Remova o sobrenadante cuidadosamente, adicione 100µL de etanol 70% e centrifugue novamente a 14.000 rpm por 2 minutos,
8. Remova o sobrenadante com auxílio de uma pipeta, centrifugue novamente por 30 segundos, e remova a última gota com auxílio de uma pipeta.
9. Incube a temperatura ambiente durante 3 minutos para secar. Ressuspenda o pellet com 50µL de H₂O + RNase.

Reagentes e Soluções:
1. Solução I:

Reagente	Quantidade
Tris-HCl 1M (pH8,0)	500µL
EDTA (0,5M)	100µL
Água ultrapura	qsp 50mL

2. Solução II:

Reagente	Quantidade
NaOH (10M)	1mL
SDS (10%)	5mL
Água ultrapura	qsp 50mL

3. Solução III:

Reagente	Quantidade
Acetato de Potássio	14,72g
Ácido Acético Glacial	5,75mL
Água ultrapura	qsp 50mL

4. H₂O + RNase (0,25µg/mL):

Reagentes	Quantidades
RNase 10mg/mL	25µL
Água ultrapura	1mL

OBS.: O DNA resultante será de baixa qualidade (sujo), somente será indicado para digestão com enzima de restrição, e não deve ser usado para PCR, sequenciamento, ou transcrição *in vitro*.

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 H₂O + RNase.