

## Materiais

- Tubos eppendorf 1,5 ml
- Caneta permanente (tinta não sai com álcool)
- Etanol Merck
- Kit DNeasy

## Procedimentos

### Dia 1: Digestão da cauda

- 1- Adicionar 180 µl de tampão **ATL** nos tubos com caudas;
- 2- Adicionar 20 µl de Proteinase K;  
*PtnK do Kit ou PtnK feita no lab (10mg/ml em PBS)*
- 3- Vortexar e verificar que todas as caudas estão imersas;
- 4- Incubar a 56°C de um dia para o outro;

### Dia 2: Extração

- 5- Ligar a centrífuga e colocar na temperatura de 20°C;
- 6- Tirar amostras do banho e vortexar todas por 30”;
- 7- Verificar se caudas foram completamente digeridas;  
*Se precisar pipetar com p1000 para dissolver  
Sempre trocar de tip entre as amostras*
- 8- Adicionar 200 µl de tampão **AL** e vortexar amostras;
- 9- Adicionar 200 µl de Etanol Merck;  
*Se aparecerem agregados pipetar com p1000  
Sempre trocar de tip entre as amostras*
- 10- Numerar colunas novas com o número das amostras;
- 11- Transferir para colunas de acordo com numeração;
- 12- Centrifugar a 8000 rpm (6000g) por 1 minuto;  
*ATENÇÃO: Sempre equilibrar tubos no rotor da centrífuga*
- 13- Enquanto centrifuga, separar tubos de coleta novos;
- 14- Transferir colunas para tubos de coleta novos;
- 15- Descartar tubos de coleta usados com “flow-through”;
- 16- Adicionar 500 µl de **AW1** as colunas;
- 17- Centrifugar a 8000 rpm (6000g) por 1 minuto;
- 18- Enquanto centrifuga, separar tubos de coleta novos;
- 19- Transferir colunas para tubos de coleta novos;
- 20- Descartar tubos de coleta usados com “flow-through”;

## Procedimento (cont.)

- 21- Adicionar 500 µl de **AW2**;
- 22- Centrifugar a 15000 rpm (veloc. máx./ 20000g) por 3 minutos;
- 23- Pegar tubos eppendorf de 1,5 ml;
- 24- Nesse passo é necessário cuidado ao retirar tubos da centrífuga, pois não se deve molhar a parte de baixo da coluna com o “flow-through”;
- 25- Transferir colunas para tubos eppendorf de 1,5 ml;
- 26- Descartar tubos de coleta usados;
- 27- Adicionar 200 µl de tampão **AE**;
- 28- Esperar por 1 minuto;
- 29- Centrifugar a 8000 rpm (6000g) por 1 minuto;
- 30- Descartar colunas;
- 31- Guardar DNAs na geladeira.

Reagentes	Fonte
Eppendorf 1,5 ml	Axygen- MCT-150-C (311-08-051)
Etanol	Merck 1.00983.1000
Proteinase K	Sigma P2308
Kit DNeasy	Qiagen 69506