

IMPORTANTE

PCRs de genotipagem que funcionam pra esse método de extração (até dezembro de 2017):

- Nestina –Cre
- Pax6-Cre
- Rho-Cre
- Atrip lox
- p53 KO
- p53 Flox
- Rint lox
- GFP
- Rad51 lox
- NBS1 (somente por 2 semanas após extração)
- ...

Materiais

- Tubos eppendorf 0,6 mL ou 1,5mL contendo rabo
- Caneta permanente (tinta não sai com álcool)
- Solução NaOH 25 mM;
- Solução Tris-HCl 10 mM pH 7.5;
- Banho-maria ou
- Placa aquecedora (*Loccus*)

Soluções

- **Solução 1: NaOH 25mM**
 - Pesar 0,05 grama (50mg) de NaOH;
 - Dissolver em 50 mL de água mill Q em tubo falcon de 50 mL novo;
 - Vortexar bastante até ter dissolvido tudo;
- **Solução 2: Tris-HCl 10 mM pH 7.5**
 - Pesar 1,21 grama de Tris;
 - Dissolver em 800 mL de água mill Q;
 - Ajustar pH p/ 7.5
 - Avolumar para 1 L com proveta.

Procedimentos

- 1- Adicionar 100 µl de NaOH 25mM em tubo epp de 0,6 mL ou 1,5mL contendo pedaço de rabo (0,2 - 0,3 cm) ou a pontinha da orelha;
- 2- Se certificar que o material (rabo/orelha) esteja completamente submerso na solução;
- 3- Colocar tubos na placa metálica para tubos de 0,6 mL ou 1,5mL do banho seco

Procedimento (cont.)

4- Colocar sobre os tubos outra placa metálica como um peso

OBS: Vai impedir que as tampas se abram durante fervura.

5- Ligar Banho Seco “Dry Bath”, selecionar “Run” e usar o programa # 5 *Loccus DryBath*

Passo 1: 30 minutos a 95°C;

Passo 2: Para sempre a 4°C (temperatura de geladeira).

- Normalmente, 30 minutos a 1 hora é suficiente para lisar os rabos de neonatos;
- O passo 2 serve caso o usuário queira ir para casa antes da 1 hora de fervura;
- Caso contrário, essa é uma boa hora para listar suas amostras, incluindo controles e o branco (conferir controles no protocolo do genótipo a ser realizado) – anotar na folha de verificação de PCR/Gel;
- Pode-se ainda adiantar a preparação do Mix para PCR, levando em conta a margem de erro de pipetagem na conta final de amostras.

OBS: Não esquecer de ligar o termociclador antes de iniciar a preparação do Mix.

OBS 2: Pegar a Taq apenas no momento de utilização. Não deixar fora do freezer!

6- Vortexar e verificar se tecido foi completamente lisado;

7- Adicionar 400 µl de Tris-HCl 10 mM em cada um dos epp e vortexar;

8- Estocar DNAs no FREEZER (-20°C)

Reagentes	Fonte
Eppendorf 0,6 ml ou 1,5mL contendo rabo	
NaOH	Sigma 367176
Trizma Base	Sigma T1503