

## *Protocolo de extração de DNA contido em “slices” de agarose*

**(LAB. PROTOZOOLOGIA – IMT – FMUSP)**

1. Submeter o DNA a uma eletroforese em gel de agarose em TAE sem brometo de etídio;
2. Corar o gel em solução de EtBr (150mL Milli-Q+ 15 $\mu$ L EtBr 10 $\mu$ g/ $\mu$ L) por 15 a 20 minutos;
3. Cortar a banda desejada, observando o gel no transluminador de UV. Limitar a exposição do gel ao ultravioleta ao máximo de 1 minuto;
4. Coletar a banda em um tubo tipo eppendorf de 1,5mL e congelar a  $-70^{\circ}\text{C}$  por no mínimo 15 minutos. A reação pode ser interrompida neste ponto até a fase de extração;
5. Colocar o tubo em termobloco ( $65^{\circ}\text{C}$  para agarose “low-melt”; $90^{\circ}\text{C}$  para agarose convencional). Manter até a fusão completa;
6. Adicionar 1 volume de Fenol saturado TE (pH 8,0), vortexar por 30 segundos e congelar a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos;
7. Descongelar a amostra e centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente;
8. Remover a fase superior aquosa para um novo tubo;
9. Adicionar 1 volume de éter e centrifugar como descrito. Repetir este procedimento mais uma vez;
10. Após a última centrifugação, remover o sobrenadante e adicionar 1mL de etanol absoluto. Centrifugar como descrito;
11. Secar o “pellet”: tubos invertidos sobre papel absorvente em fluxo laminar;
12. Ressuspender o material em água Milli-Q estéril (100 $\mu$ L).