



### Protocolo de Extração de DNA – Fenol:Clorofórmio

1. Preparar o mix com 490 µl de digestão (SNET) + 10 µl de proteinase k para cada amostra.
2. Selar as amostras com parafilme e fita.
3. Agitar a 55°C / 150 rpm overnight.
4. Reservar a centrifuga para o dia seguinte e checar a quantidade de microtubos, se tem álcool 70% e água ultra pura congelada.
5. Fazer a extração na capela, pegar 3 pipetas sorológicas e pipetador.
6. Preparar o seguinte mix: (total 500 µl por amostra) 25:24:1 de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Para isso fazer duas alíquotas sendo a metade do volume de fenol e o dobro da metade do volume para mistura clorofórmio e álcool isoamílico.  
.ex: Para 5 amostras alíquotar 2 ml de fenol (1,250 + sobra) e alíquotar 5 ml da mistura isoamílico + clorofórmio (200 µl de iso + 4800 µl de clorofórmio).
7. Aliquotar 500 µl (vezes o numero de amostras) de álcool isopropanol.
8. Pipetar 250 µl de fenol e em seguida 250 µl de clorofórmio + álcool isoamilico. Agitar por inversão.
9. Agitar por 30 minutos (75 de velocidade) e centrifugar na velocidade máxima por 5 minutos.
10. Remover o sobrenadante (~ 400 µl) com cuidado, não remover tudo para não remover a interfase.
11. Adicionar 400 µl da mistura clorofórmio + álcool isoamílico e agitar por inversão e centrifugar como no passo anterior.
12. Programar a centrifuga para 4°C.
13. Remover o sobrenadante, adicionar 500 µl de isopropanol, homogeneizar por inversão e centrifugar a 13000 g a 15 minutos por 4°C.
14. Programar a centrífuga para temperatura ambiente.
15. Remover o sobrenadante tomando cuidado para não remover o pellet, adicionar 1 ml de etanol 70%, homogeneizar uma ou duas vezes visualizando o pellet e centrifugar por 5 minutos a 13000 g a temperatura ambiente.
16. Descongelar a água ultra pura.
17. Remover todo o álcool e deixar secar por aproximadamente por 15 minutos e re-suspender o pellet em 150 µl de água ultra pura. Deixar overnight na geladeira e no dia seguinte guardar no - 20°C.