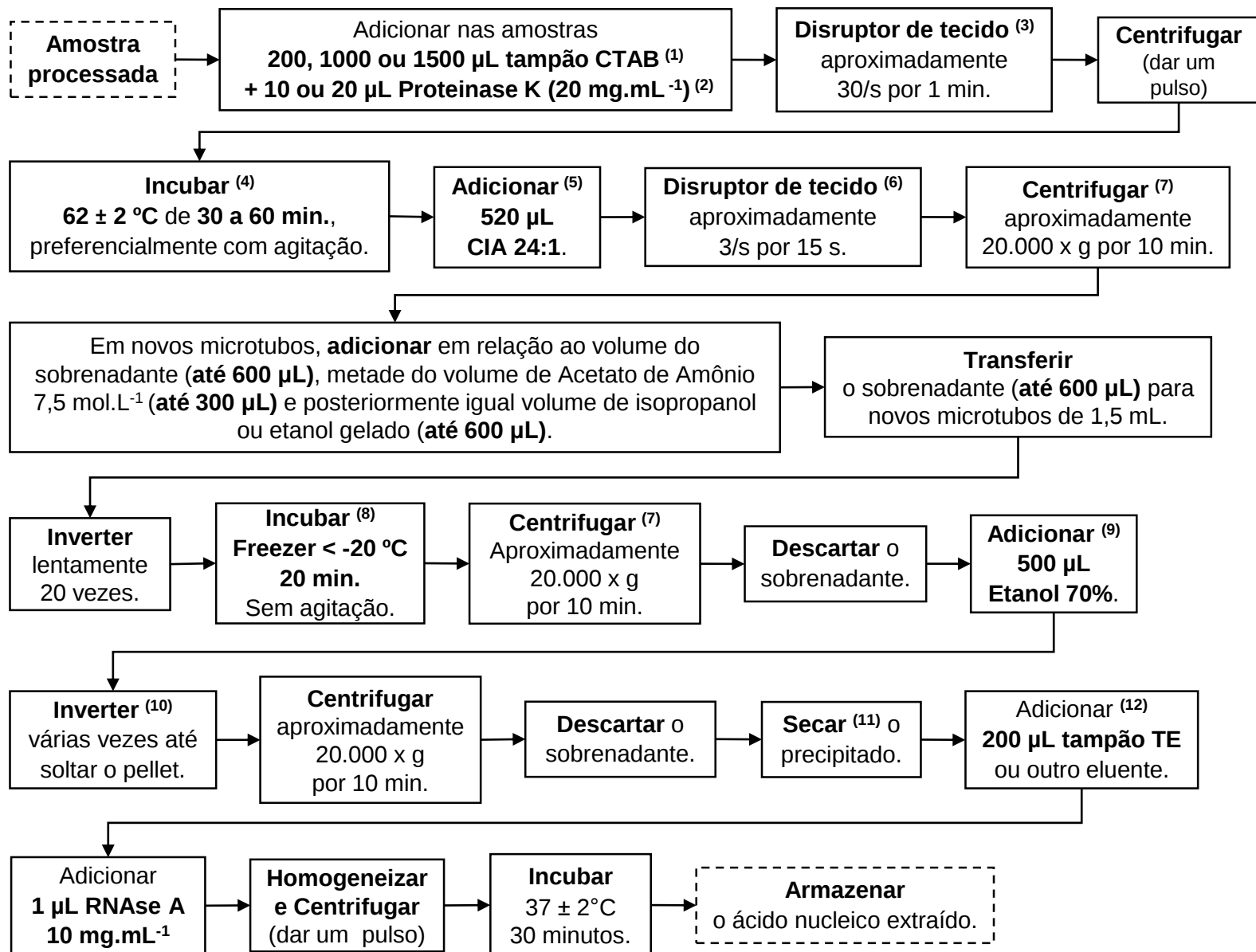


CTAB MODIFICADO – FASE 1



(1) Para amostras foliares em que a solução tampão CTAB já foi adicionada na fase de maceração, adicionar somente a proteinase K. Para amostras que ocupem um volume grande no microtubo ou absorvam muito líquido, como por exemplo sementes de algodão, adicionar 1500 µL do tampão CTAB. Para amostras com menos de 200 mg, como insetos, nematoide, entre outros, acrescentar 200 µL de solução tampão CTAB.

(2) Para as amostras como as de algodão adicionar o dobro de proteinase K (20 µL). Caso utilize a proteinase K do kit DNeasy mericon Food – Qiagen, acrescentar 2,5 µL (amostras que ocupam muito volume no microtubo ou com alto teor de proteína como algodão, inseto, entre outras adicionar 5,0 µL).

(3) Pode-se homogeneizar utilizando o disruptor de tecido ou vórtex.

(4) Para amostras com menor adição do tampão CTAB (< 1000 µL) pode-se incubar por até 24 horas a 56 ± 2 °C.

(5) Nas amostras que foram utilizadas esferas no processamento, pode-se transferir o conteúdo líquido, por pipetagem, para um novo microtubo antes da adição da solução CIA.

(6) Utilizar o disruptor de tecido ou agitar por 96 vezes com movimentos longos, contínuos, lentos e suaves.

(7) Preferencialmente, 20.000 x g, obrigatoriamente, 16.000 x g. Caso o sobrenadante não esteja límpido, repetir a centrifugação.

(8) Incubar preferencialmente no freezer ou à temperatura ambiente. Nesta fase ocorre a precipitação do DNA.

(9) Para grãos de algodão, adicionar 500 µL de etanol P.A., até dissolver a camada gelatinosa e descartá-la, antes de adicionar a solução de etanol 70%. Caso necessário, repetir a lavagem com etanol P.A.

(10) Nesta fase pode-se parar a extração e colocar o material no freezer.

(11) A secagem do precipitado pode ser realizada à temperatura ambiente (inverter os tubos sob um papel toalha) por cerca de 20 minutos ou deixar os tubos abertos à temperatura de 62 ± 2 °C por 10 minutos ou ainda colocar no speedvac à temperatura de 40 °C por 10 a 20 minutos. Caso tenha gotas no tubo, secar com papel mata-borrão.

Neste passo, tomar cuidado para não secar demais o precipitado.

(12) O precipitado poderá ser ressuscitado em menor quantidade de eluente ou, em caso de eluição incompleta, adicionar mais eluente até total eluição. No caso de amostras ricas em polissacarídeos, como de grãos de algodão, ressuspender em 1000 µL de TE ou outro eluente, e proceder a purificação como descrito na fase 2 (CTAB modificado).