

EXTRACCIÓN DE DNA

- Triturar la muestra hasta completa pulverización (aprox. 200mg de tejido).
- Añadir 700µl de tampón de extracción y vortear unos segundos.
- Añadir 0.5 µl de β-mercaptoetanol (campana de gases).
- Agitar e incubar en baño a 65°C durante 30 minutos (campana de gases).
- Dejar enfriar 5 minutos y centrifugar 13000rpm/ 10 minutos
- Rescatar sobrenadante (± 650 µl) y pasarlo a un tubo nuevo.
- Añadir 400 µl de cloroformo isoamílico.
- Mezclar bien mediante vuelco y centrifugar 13000rpm/10min
- Recuperar la fase acuosa superior (± 650 µl) y pasarlo a un tubo nuevo.
- Añadir 240 µl de isopropanol y mezclar varias veces mediante vuelco.
- Mantener en nevera al menos 10 minutos.
- Centrifugar 13000rpm/5 minutos/4°C
- Eliminar sobrenadante mediante vuelco.
- Añadir 700 µl de tampón de lavado y agitar golpeando con los dedos hasta que se despegue el pellet del fondo del tubo.
- Incubar a temperatura ambiente 10 minutos.
- Centrifugar 13000rpm/5 minutos
- Eliminar el sobrenadante por decantación.
- Dejar secar las muestras manteniendo los tubos abiertos en posición horizontal sobre la bancada.
- Disolver en 50 µl de TE y dejar a 4°C toda la noche.
- Centrifugar 13000rpm/5 minutos y pasar el sobrenadante a un tubo nuevo.
- Añadir 1 µl de RNAsa e incubar en la bancada 30 minutos.

TAMPONES Y SOLUCIONES STOCK NECESARIOS

- Tampón de extracción CTAB modificado:

2% CTAB

1% PVP

Tris-HCl 0.1M

NaCl 1.4M

EDTA 0.02M

0.1%NaHSO₃

- β-mercaptoetanol

- Cloroformo isoamílico (24:1)

- Isopropanol

- Tampón de lavado: 0.1M acetato NH₄+etanol 76%

- TE: Tris-HCl 0.01M+EDTA 0.001M

- RNAsa A (10mgr/ml)