

Extracción de DNA total de E. Coli.

La metodología siguiente es una de las primeras que se usó para la extracción de DNA genómico.

Para extraer DNA total es conveniente partir de un cultivo fresco y saturado.

Debido a su gran tamaño (4.7×10^6 pb), y a su extrema fragilidad su extracción debe realizarse con sumo cuidado. No se debe usar el vortex en ningún paso después de que la lisis celular tuvo lugar. En cambio debe mezclarse por inversión del tubo eppendorff.

Este método consta de tres etapas principales: un crecimiento celular, un paso de lisis que se efectúa con lisozima y Tritón, y un último paso de precipitación alcohólica.

Por la gran cantidad de DNA que se logra precipitar es posible verlo como una gran fibra que se puede extraer físicamente enrollándola en un tip de micropipeta o en una varilla de vidrio.

- a) Crecer un cultivo de 5 ml overnight 37°C.
- b) Peletear en eppendorff de 1.5 ml tres veces, 1 min. a 14000 rpm.
- c) Resuspender en 200 ul de TE
- d) Centrifugar 1min a 14000 rpm
- e) Descartar el sobrenadante
- f) Resuspender en 200 ul de buffer TE (5X) a 4°C + 20 % de sacarosa .
- g) Agregar lisozima sólida (punta de espátula). Incubar a 37 °C 15 min.
- h) Agregar 0.05 ml EDTA (0.5 M, pH 8.5).
- i) Añadir 0.4 ml de Triton 10%. Mezclar por **inversion**.
- j) Agregar 0.8 vol de isopropanol
- k) Incubar a -20°C 10 min.
- l) Tomar un tips y enrollar en el mismo el ovillo de DNA observable.
- m) Pasar a otro eppendorf y dejar secar .
- n) Redisolver el precipitado en 200 ul de H₂O

Referencias

1)Molecular cloning. Vol 1. Maniatis

2)Experiments in Molecular Biology. Cap 1 Robert J. Slater