

## Protocolo Miniprep Caseira (sem coluna)

\*\*\*Este protocolo se destina a produção de plasmídeo (método in house -sem colunas e kit) para ser usado em clonagem (digestão com enzimas de restrição, amplificação por PCR, ligação de insertos, etc).

\*\*\*NÃO SERVE PARA TRANSFECCÃO pois é uma miniprep suja.

1. Inocule 1 colônia em **5 mL** de LB/amp
2. Cresça overnight **200 rpm/37°C**
3. Guarde uma fração em glicerol (**200 uL** bactéria + **100 ul** glicerol30%)/-80C
4. Peletar a bactéria a **5800 x g/2min**, descartar sobrenadante
5. Ressuspender em **250 uL de P1** (+RNase)/ 5 min TA
6. Adicione **250 uL de P2**/ inverta 10X (não deixar lisando muito tempo)
7. Adicione **250 uL de P3**/ inverta 10X
8. Centrifugue **16000 x g/10min/TA**
9. Colete o sobrenadante em um tubo novo (~700uL)
10. Adicione 0.7 vol isopropanol (**500uL**)/ inverta 10X
11. Centrifugue **16000 x g/10min/TA**
12. Descarte o sobrenadante (é possível ver o pellet)
13. Adicione **500 uL** etanol 70%
14. Centrifugue **16000 x g/5min/TA**
15. Descarte o sobrenadante
16. Secar o pellet por **3-5 min/TA**
17. Eluir em **50 uL** água/ quantificar
18. Plasmídeo está pronto para sequenciar ou digerir.

---

### Receita de Buffers

#### Buffer P1 – Buffer de ressuspensão

50mM Tris-Cl, pH 8.0, 10mM EDTA, 100 ug/mL RNase A

Condições de armazenamento: 4°C após adicionar RNase A

Preparação: Dissolver 6.06g Tris base e 3.72g EDTA-2H<sub>2</sub>O em 800 mL dH<sub>2</sub>O. Ajustar o pH para 8.0 com HCl. Ajustar o volume para 1 litro com dH<sub>2</sub>O. Adicionar 100mg de RNase A por litro de P1.

#### Buffer P2 – Buffer de lise

200 mM NaOH, 1% SDS

Condições de armazenamento: Temperatura ambiente

Preparação: Dissolver 8.09g de NaOH em 950mL de dH<sub>2</sub>O e adicionar 50mL de 20% SDS. O volume final deverá ser 1 litro.

**Buffer P3 – Buffer de neutralização**

3.0 M acetato de potássio, pH 5.5

Condições de armazenamento: 4°C ou RT

Preparação: Dissolver 294.5g acetato de potássio em 500mL dH<sub>2</sub>O. Ajustar o pH para 5.5 com ácido acético glacial (aproximadamente 110mL). Ajustar o volume para 1 litro com dH<sub>2</sub>O.

---

Lab Edicao Gênica / ICB-USP