

Extração de RNA / DNA
Pure Link Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen Cat. 12280-050)

1. Macerar amostra:
 - a. Para sementes, macerar tecido em nitrogênio líquido (cadinho) e adicionar 1000 ul de tampão CTAB, dar um spin (1 minuto a 12000 rpm) para retirar o excesso de tecido e utilizar o sobrenadante
 - b. Para colônia fúngica macerar micélio diretamente no tubo de 1,5 mL em 500 ul de tampão CTAB, dar um spin (1 minuto a 12000 rpm) para retirar o excesso de micélio e utilizar o sobrenadante
2. Retirar 200 ul do sobrenadante e adicionar 200 uL de lysis buffer + 5.88 uL carrier RNA (armazenado à - 20 °C), + 25 uL proteinase K (armazenado na geladeira)
3. Dar um vortex durante 15 segundos
4. Incubar 56 °C durante 15 minutos
5. Adicionar 250 uL de etanol 96-100%
6. Vortex durante 15 segundos
7. Incubar 5 minutos em temperatura ambiente
8. Transferir a mistura para coluna
9. Centrifugar 12000 rpm durante 1 minuto
10. Descartar o precipitado e utilizar um novo tubo coletor
11. Adicionar 500 uL Wash Buffer
12. Centrifugar 12000 durante 1 minuto
13. Repetir as etapas 11 e 12
14. Centrifugar em máxima velocidade, durante 1 minuto
15. Em um novo tubo, eluir o DNA em 50 uL de água
16. Incubar 1 minuto à temperatura ambiente
17. Centrifugar em máxima velocidade por 1 minuto
18. Armazenar à -20 °C

Tampão de Extração CTAB (para 12 amostras)

NaCl 1.4 M (3.36 ml de 5 M)
Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM (1.2 ml de 1 M)
EDTA, pH 8.0, 20 mM (0.48 ml de 500 mM)
Polivinilpirrolidona (PVP-40), 1% (120 mg)
CTAB, 2% (2.4 ml de 10%)
Proteinase K, 100 µg/ml (60 µl de 20 mg/ml)
β-Mercaptoetanol, 0.2% (24 µl)
Água Milli-Q (4.476 ml)

PCR Convencional: ITS
Primer ITS1 e ITS4 (tamanho 600 bp)
ITS 1: 5'-TCCGTAGTGAACCTGCGG -3'
ITS 4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'

ITS Mix	Concentração final	Volume por amostra (µL)	Mix (6 reações) (ul)
Master mix (Promega)	2x	12,5	75,0
ITS 1 (10 µM)	0.5 µM	1,0	6,0
ITS 4 (10 µM)	0.5 µM	1,0	6,0
DNA	-	2,0	-
Água nuclease-free	-	10,5	63,0
Total		25	

Condições da reação:

1 Holding de 94°C por 3 min;
94°C por 45 s;
50°C por 40 s;
72°C por 1 min;
72°C por 10 min.

} 35 ciclos

Referência:

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322.

Preparo de gel de agarose 1%

	Concentração final	Volume
TAE	1x	100 ml
Agarose	-	1 g
Intercalante de DNA *	-	3 ul

* gel red, para diferentes intercalantes consultar o protocolo do fabricante.

Preparo de TAE 10X:

48,4g Tris Base

11,42 mL de Acido Acético

200 mL de EDTA (0,5 M)

Completar com 1000 mL de água destilada.

Preparo de TAE 1X:

900 ml de Água miliQ

100 ml de TAE 10X

Preparo da amostra:

Misturar 5 ul da amostra em 1 ul de corante;

Pipetar amostra no gel;

Add um marcador de padrão molecular, EX: 1 KB plus.