

Extracción de ADN plasmídico usando lisis alcalina (Miniprep). Modificado por Rahul Patharkar, traducido al español por Catherine Espinoza Patharkar.

Solución 1: 10 mM EDTA pH 8.0, 1-20 µg/mL RNAase A. Conservar a 4°C.

Solución 2: 0.1 M NaOH, 1% SDS. Conservar a temperatura ambiente.

Solución 3: 250 g/L Acetato de potasio, 15% vol/vol Ácido acético. Conservar a 4°C.

1. Crecer 2 mL de cultivo bacteriano (o 1.7 mL si utilizas tubos de 2 mL) en caldo LB.
2. Transferir el cultivo bacteria a un tubo de microcentrifugadora de 2 mL (si el cultivo no fue cultivado en un tubo de 2mL). Centrifugar a $\pm 10,000xg$ por 30 segundos. Descargar el sobrenadante.
3. Resuspender el pellet en 100 µL de solución 1, usando el agitador vortex o una micropipeta.
4. Agregar 200 µL de solución 2 y mezclar agitando el tubo suavemente. **Es muy importante no agitar violentamente el cultivo para evitar contaminación con ADN genómico.**
5. Agregar 75 µL de solución 3 fría (4°C) y mezclar invirtiendo los tubos. **Es muy importante no agitar violentamente el cultivo para evitar contaminación con ADN genómico.**
6. Colocar los tubos en un rack congelado a -20°C y congelar -20°C por 1 minuto.
7. Centrifugar por 5 minutos a máxima velocidad ($>10,000xg$).
8. Transferir 375 µL del sobrenadante a otro tubo de 1.5 mL (evitar tomar nada del precipitado blanco).
9. Agregar 225 µL de 100% isopropanol y mezclar usando el agitador vortex. Centrifugar por 5 minutos a máxima velocidad ($>10,000xg$). Descarta cuidadosamente el sobrenadante vertiéndolo. Centrifugar por 5 segundos y remover cualquier residuo del sobrenadante con una pipeta.
10. Agregar ≥ 1 mL de 70% etanol. Remover el etanol vertiéndolo.
11. Centrifugar a $\sim 10,000xg$ por 5 segundos. Pipetear el residuo de etanol.
12. Dejar los tubos con la tapa abierta en forma horizontal por 1-2 minutos, o usar un SpeedVac (Concentrador centrífugo a vacío) por 1 minuto.
13. Resuspender el pellet en 75 µL (o 50-100 µL) de cualquiera de los siguientes: 2mM Tris pH 8.5, agua esterilizada, o TE.

Mira el video protocolo aquí: <https://rahulpatharkar.000webhostapp.com/2019/03/plasmid-dna-isolation-improved-yield-no-kit>