

2) Miniprep a partir de cultivo líquido

- a) Inocular una colonia en 5 ml de medio LB con ampicilina* (solución stock 100 mg/ml, se considera como 1000x), crecer *overnight* (a saturación) en baño con agitación (37°C, 200-220 rpm).
- b) Colocar 1,5 ml del medio de cultivo en un tubo *Eppendorf de 1500 µl*, centrifugar 30 seg a 14000 rpm. Retirar el sobrenadante. Repetirlo hasta haber bajado 4,5 ml.
- c) Resuspender el *pellet* obtenido en 200 µl de solución I, (con RNAsa 5ul de solución 10 mg/ml) (agitar suavemente con el *vortex hasta resuspensión total*).
- d) Agregar 300 µl de sol II prerarada fresca, mezclar por inversión hasta que la solución quede transparente.
- e) Incubar durante 5' a Temp. ambiente.
- f) Agregar 300 µl de sol III. Mezclar por inversión (se debe formar un precipitado blanco).
- g) Centrifugar 10' a 14000 rpm, temperatura ambiente para que la RNAsa siga actuando.
- h) *Retirar el sobrenadante ($\cong 700 \mu\text{l}$) cuidando de no tomar el precipitado (Opcional: al sobrenadante agregar 5 ul mas de RNasa si la muestra es para secuenciar e incubar a 37°C 10 min.)*
Agregar de 0,5 vol de cloroformo: isoamilico, mezclar c/vortex 5 segundos.
Centrifugar 5 min a 14000 rpm (a 4°C o a temperatura ambiente es igual), y tomar la fase acuosa.
Agregar 0,8 volúmenes de isopropanol. Mezclar por inversión.
- i) Incubar durante 20' a -20° o 5' a -80°C .
- j) Centrifugar 15' a 14000 rpm a 4 °C. Volcar el isopropanol cuidando de no perder el *pellet*.
- k) Lavar el precipitado con 400 ul de etanol 70%. Centrifugar 3' a 14000 rpm a 4°C.
- l) Extraer con p200 el etanol 70% y secar el *pellet*, 5 min a 55 °C. No dejar que se reseque el *pellet*!!!
- m) Disolver el *pellet* en 20 ul de agua bidestilada estéril.

* Concentración de uso de la ampicilina: 35- 50 µg/ml

Medio LB: disolver 10 gr de triptona, 10 gr de NaCl y 5 gr de extracto de levadura en un litro de agua bidestilada. Para preparar medio sólido incorporar 15 gr de agar por litro de medio.