

## **TÉCNICAS DE VIROLOGIA MOLECULAR**

## 1 - EXTRACÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENOMAS DE PARTÍCULAS VIRAIS

### Objectivos

- 1 - Extrair e purificar os genomas das partículas virais produzidas nas aulas práticas, a partir de vírus concentrado.
- 2 - Caracterizar o ácido nucleico extraído.

### Introdução

Os genomas do EMCV e dos iridovírus podem ser extraídos e purificados após desproteínização (enzimática e/ou através de fenolizações) de suspensões virais com título elevado.

Também podem ser utilizados “kits” de extracção e purificação de ácidos nucleicos, em que amostras com os ácidos nucleicos solubilizados são aplicadas a colunas com uma matriz adequada (normalmente de sílica). Após a ligação a essa matriz, seguem-se lavagens para remover os restantes constituintes dessa solução, e por fim a eluição num pequeno volume de água ou tampão.

No que respeita ao EMCV, ainda que as moléculas de RNA sejam de difícil manipulação, uma vez que as RNases são proteínas ubíquas e extremamente resistentes aos processos usuais de esterilização, é possível obter RNAs de qualidade (e consequentemente infeccioso) desde que se tomem as devidas precauções: trabalhar com luvas, sempre que possível no frio, e utilizar material e soluções que sofreram uma esterilização eficaz, nomeadamente mais prolongada.

São diversos os processos disponíveis para a caracterização de genomas de RNA. De entre eles, destacam-se aqueles que vão ser utilizados nas aulas práticas:

- A incubação de amostras de ácido nucleico viral quer com RNase, quer com DNase, permitirá verificar a sua natureza química.
- O genoma viral pode ser visualizado por coloração com brometo de etídeo, após análise electroforética em gel de agarose. É possível verificar a sua integridade e concentração, e ainda a sua dimensão, se a electroforese se efectuar em condições desnaturantes.
- No que respeita ao EMCV, as moléculas de RNA viral (por serem de sentido positivo) podem ser traduzidas *in vitro*, seguindo-se a ulterior análise dos produtos dessa tradução.

No que respeita aos iridovírus, as moléculas de DNA viral podem ser digeridas com enzimas de restrição, e comparados os respectivos perfis de restrição, após análise electroforética.

### 1.1- EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS GENOMAS DOS VÍRUS PRODUZIDOS

#### Procedimento

- 1 - Descongelar as amostras de vírus (4 X 1,8ml) e concentrar durante 3 horas a 18 000 Xg. Rejeitar os sobrenadantes e ressuspender os sedimentos em 400 µl (4 X 100µl) de:
  - PBS-A + RNase + DNase + Mg Cl<sub>2</sub> - Iridovírus
  - PBS-A + DNase + Mg Cl<sub>2</sub> - EMCVIncubar durante 10 minutos a 37 °C.
- 2 - Reunir as 4 amostras num dos tubos e adicionar 40 µl de uma mistura de proteinase K a 2 mg ml<sup>-1</sup> + SDS a 2%. Incubar durante 10 minutos a 56°C.

(Salvo indicação em contrário, os passos seguintes realizam-se a baixa temperatura: mantendo, sempre que possível as amostras em gelo)

- 3 - Após a incubação adicionar a cada tubo, cerca de 400 µl de fenol equilibrado com H<sub>2</sub>O, no caso das amostras de RNA (EMCV) ou com Tris-HCl, para as amostras de DNA (Iridovírus). Misturar (por inversão dos tubos ou por pipetagem) durante 2 minutos. Centrifugar a 5 000 Xg durante 2 minutos.
- 4 - Rejeitar a fase fenólica (se não se observar interfase) ou colher a fase aquosa para outro microtubo (se existir interfase). Extrair a fase aquosa com igual volume (cerca de 400 µl) de fenol + clorofórmio + álcool isoamílico (25+24+1), pipetando repetidas vezes (durante cerca de 1 minuto). Centrifugar a 5000 Xg durante 2 minutos.
- 5 - Rejeitar a fase orgânica (se não se observar interfase) ou colher a fase aquosa para outro microtubo (se existir interfase). Extrair a fase aquosa com igual volume (cerca de 400 µl) de clorofórmio + álcool isoamílico (24+1), pipetando repetidas vezes. Centrifugar a 5000 Xg durante 2 minutos.
- 6 - Colher a fase aquosa para outro microtubo e repetir a extracção com igual volume (cerca de 400 µl) de clorofórmio + álcool isoamílico (24+1), pipetando repetidas vezes. Centrifugar a 5000 Xg durante 2 minutos.
- 7 - Colher a fase aquosa para um **microtubo de 1,5 ml devidamente etiquetado**, e medir o volume. Precipitar com etanol absoluto (2,5 volumes) e NH<sub>4</sub> Ac 10 M (1/40 volumes), durante pelo menos 16 horas a - 20 °C.

## 1.2- CARACTERIZAÇÃO DOS GENOMAS VIRAIS

### Preparação das amostras:

#### Genoma do EMCV

- 1 - Sedimentar o RNA precipitado a -20 °C, por centrifugação a 15 000 Xg durante 10 minutos a 0 - 4 °C.
- 2 - Rejeitar o sobrenadante e lavar o sedimento, adicionando-lhe 200 µl de etanol a 70%. Efectuar uma centrifugação de 5 minutos nas condições referidas anteriormente.
- 3 - Rejeitar de novo o sobrenadante e secar bem o sedimento (durante cerca de 2 minutos em vácuo).
- 4 - Ressuspender o RNA em 40 µl de água ultrapura fria, e manter em gelo. Distribuir em 3 amostras de 10 µl; guardar o restante (amostra de 10 µl) a -80 °C (para a tradução *in vitro*).
- 5 - As restantes amostras são para análise electroforética após tratamento com RNase A (amostra A), ou com DNase I "RNase free" (amostra B), ou sem qualquer tratamento (amostra C).  
Amostra A: Incubar durante 5 minutos a 37 °C com 1µl de DNase I (10 unidades) + MgCl<sub>2</sub> 50mM  
Amostra B: Incubar durante 5 minutos a 37 °C com 1µl de RNase A a 20µg ml<sup>-1</sup>
- 6 - Adicionar 2 µl de tampão de arrastamento às amostras, após os respectivos tratamentos, e aplicar num gel de agarose a 0,6% em TBE com Et Br.

#### Genoma dos Iridovírus

- 1 - Sedimentar o DNA precipitado a -20 °C, por centrifugação a 15 000 Xg durante 10 minutos a 0 - 4 °C.
- 2 - Rejeitar o sobrenadante e lavar o sedimento, adicionando-lhe 200 µl de etanol a 70%. Efectuar uma centrifugação de 5 minutos nas condições referidas anteriormente.
- 3 - Rejeitar de novo o sobrenadante e secar o sedimento (durante cerca de 1 minuto em vácuo).

- 4 - Ressuspender o DNA (pipetando suavemente) em 100 µl de água ultrapura fria, e manter em gelo. Retirar 2 amostras de 10 µl e guardar o restante a 4°C.
- 5 - Digerir o DNA de uma das amostras durante 2h a 37 °C, com a enzima *Hind* III, na presença do respectivo tampão.
- 6 - Adicionar 2 µl de tampão de arrastamento às duas amostras (DNA digerido e DNA intacto), e aplicar num gel de agarose a 0,6% em TBE com Et Br.

### 1.2.1 - ANÁLISE ELECTROFORÉTICA

#### Introdução

As moléculas de DNA intacto migram de acordo com a sua conformação. As amostras de DNA digerido com enzimas de restrição migram de acordo com a sua massa molecular (a migração é inversamente proporcional ao logaritmo decimal da sua massa molecular).

Ainda que os RNAs sejam moléculas de cadeia simples, não migram electroforeticamente de acordo com a sua massa molecular, mas sim de acordo com a sua estrutura secundária, a menos que se trabalhe com amostras desnaturadas e em géis desnaturantes. Tendo em conta esta limitação, podem no entanto efectuar-se electroforeses não desnaturantes (menos morosas e permitindo maior sensibilidade na visualização do RNA) para decidir sobre a integridade, composição e concentração de uma preparação de RNA.

#### Procedimento

- 1 - Preparar um minigel de agarose a 0,6% em TBE, com EtBr.
- 2 - Adicionar às amostras a analisar electroforeticamente, tampão de amostra (TE pH 7,5 + sacarose a 50% + Azul de bromofenol a 0,5%).
- 3 - Aplicar as amostras no gel e efectuar a electroforese a 100 volts até o corante (azul de bromofenol) ter migrado até cerca de 2/3 do fim do gel.
- 4 - Observar em transiluminador de U.V., e fotografar.
- 5 - Comparar as diferentes amostras no que respeita a:
  - grau de fluorescência
  - número e posição relativa das bandas discretas observáveis
  - existência de arrastamento susceptível de ser interpretado como resultado de degradação.

No que respeita às amostras de DNA digeridas com enzimas de restrição, comparar as bandas observadas, entre si, e em relação às bandas do marcador de massas moleculares (1Kb plus DNA ladder, Invitrogen).

### 1.2.2 – TRADUÇÃO *in vitro*

Protocolo a apresentar noutra aula