

CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS VIRAIS

1 – POLIPÉPTIDOS SINTETIZADOS A PARTIR DE RNAs VIRAIS (DE VIRIÕES DO EMCV) E DE CÉLULAS INFECTADAS (TRADUÇÃO *in vitro*)

Introdução

Os RRL comerciais tratados com nuclease microcócica para serem dependentes de RNA exógeno, quando incubados com uma preparação de RNA na presença de um aminoácido radioactivo, incorporam-no nos polipéptidos traduzidos *de novo* a partir dos mRNAs presentes nessa preparação.

As diferentes misturas de tradução podem ser analisadas por SDS-PAGE, seguindo-se a autorradiografia do gel para visualização dos polipéptidos marcados radioactivamente.

Procedimento

1 - Para traduzir 3 amostras de RNA, preparar 50µl de mistura de tradução:

4 µl mistura de tradução 12,5X sem metionina

1 µl Acetato de magnésio 25mM

2 µl Acetato de Potássio 2,5M

30 µl de RRL

25 µCi de ³⁵S Met (uma solução de aquisição recente tem uma concentração radioactiva de 15 mCi ml⁻¹)

H₂O até 50 µl

NOTA: Para traduzir um número diferente de amostras, preparar uma mistura de tradução proporcional à apresentada

2 - Distribuir 10 µl da mistura por:

- 3 amostras de RNA a traduzir (virião de EMCV ou de extractos citoplasmáticos de células infectadas e testemunho). Os RNAs são previamente aquecidos a 67°C durante 10 minutos. Em seguida mantêm-se em gelo.

- 1 amostra contendo 1µl de RNA de TMV (testemunho positivo fornecido com os RRL)

- 1 amostra contendo 1µl de H₂O (testemunho negativo).

3 - Incubar as amostras num banho a 30 °C durante 1h.

4 - Colocar as amostras em gelo e adicionar a cada uma, 20µl de tampão de amostra para proteínas 1,5X concentrado.

5 - Aquecer todas as amostras durante 10 minutos a 70 °C, e analisar electroforéticamente num gel NU-PAGE (Invitrogen), ou conservar a -20 °C (nesse caso devem ser novamente aquecidas antes da sua aplicação no gel).

NOTA: Os procedimentos relativos à análise electroforética e à visualização dos polipéptidos sintetizados *in vitro*, são apresentados em 2.2, “Caracterização dos polipéptidos celulares e virais”.

2 - EXTRACÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLIPÉPTIDOS DE CÉLULAS INFECTADAS

Objectivos

- 1 - Marcação radioactiva dos polipéptidos sintetizados em células Vero e em células infectadas com o EMCV e com os iridovírus (FV3, LMO, Ma e BoA).
- 2 - Extracção das proteínas das células testemunho e das células infectadas, após um período de incubação com o/os aminoácidos marcados radioactivamente.
- 4 - Caracterização dos polipéptidos extraídos
- 4.1- Análise electroforética, em gel NU-PAGE
- 4.2- Visualização dos polipéptidos totais, por coloração com azul de Coomassie.
- 4.3- Visualização dos polipéptidos sintetizados *de novo*, por autorradiografia.

2.1- MARCAÇÃO RADIOACTIVA E EXTRACÇÃO DE PROTEÍNAS

Introdução

São utilizadas células Vero, crescidas a 37 °C em atmosfera húmida com 5% de CO₂, em placas de 35 mm de diâmetro (P 35) ou em placas de 4 ou de 48 poços. Durante o período da infecção, as placas com as células infectadas com o EMCV são incubadas a 37 °C e as placas com as células infectadas com os Iridovírus são incubadas a 28 °C.

A extracção de proteínas efectua-se, nas células infectadas com o EMCV, 8 horas pós infecção (p.i.), e após uma marcação radioactiva de 4h. Nas células infectadas com os iridovírus, a marcação efectua-se durante o período compreendido entre as 8 e 24h p.i., altura em que se efectua a extracção de proteínas.

Nas células testemunho, a extracção de proteína efectua-se após um período de marcação idêntico ao das células infectadas.

A infecção efectua-se com suspensões virais cujos títulos permitam obter multiplicidades de infecção (m.o.i.) superiores a 10.

A marcação radioactiva obtém-se substituindo o meio de cultura por DME-NCS₂ diluído 1:10 em meio sem metionina e cisteína, e a que se adicionou 0,25 µCi ml⁻¹ de ³⁵S-(metionina + cisteína) (0,1ml por poço de P48 poços, 0,2ml por poço de P4 poços ou 0,5 ml por P35).

Procedimento

É imprescindível forrar a bancada com papel absorvente, utilizar luvas e material descartável, e ter o cuidado de rejeitar para os recipientes devidamente assinalados as soluções e materiais contaminados. No final do trabalho deverá ser efectuada a monitorização pessoal, da bancada e do material circundante, com o contador Geiger.

- 1 - Aspirar (com pipeta Pasteur descartável) o meio de cultura e lavar a monocamada celular por duas vezes, com PBS-A frio (100 a 500µl).
- 2 - Depois de aspirar o PBS-A, adicionar de novo 50 - 200 µl de PBS-A, conforme o tipo de placa utilizada.
- 3 - Raspar as células (com a pipeta de Pasteur de plástico) para o PBS-A, e transferir a suspensão celular para um microtubo de 1,5ml. Centrifugar durante 1 minuto a 12 000Xg.
- 4 - Ressuspender os sedimentos em 40 - 100 µl de tampão de amostra NU-PAGE 1X
- 5- Desnaturar as amostras durante 10 minutos a 70 °C, e manter em gelo até aplicar no gel.
- 6 - Aplicar num gel de NU-PAGE (Invitrogen), ou conservar a - 20 °C (nesse caso devem ser novamente aquecidas antes da aplicação no gel).

2.2- CARACTERIZAÇÃO DOS POLIPÉPTIDOS CELULARES E VIRAIS

Introdução

Os polipéptidos extraídos de células testemunho, de células infectadas e de partículas virais encontram-se em amostras contendo tampão adequado a uma análise electroforética em condições desnaturantes e foram previamente desnaturadas por aquecimento.

Num gel NU-PAGE aplicam-se 10 µl de cada uma dessas amostras, uma amostra de marcadores de massa molecular (nesta situação, utilizar-se-ão polipéptidos marcados com ^{14}C), e ainda 10 µl de cada uma das amostras resultantes da tradução *in vitro*.

Terminada a electroforese, que se realiza em condições desnaturantes (com SDS ou LDS no electrólito) o gel é processado para coloração com azul de Coomassie, e depois de observado e fotografado, é seco sob vácuo para ser autorradiografado.

A coloração com azul de Coomassie permite visualizar todos os polipéptidos presentes nas amostras aplicadas no gel, desde que existam numa molaridade detectável por esta técnica.

A autorradiografia permite distinguir os polipéptidos sintetizados *de novo*, uma vez que só se visualizam aqueles que são radioactivos.

Procedimento

- 1- Após paragem da corrida (cerca de 60 minutos a 200 volts) desmontar o sistema de electroforese e corar o gel durante a noite com 10ml de azul de Coomassie R250 a 0,1% em metanol a 50% + ácido acético a 10%.
- 2- Descorar, com agitação, em várias mudas de metanol a 50% + ácido acético a 10%.
- 3 -Fotografar e em seguida secar o gel (1h a 80 °C num secador de géis), depois de montado sobre uma folha de papel de filtro 3MM e coberto com película aderente.
- 8 - Expor o gel numa cassete, com uma película fotográfica sensível a raios X (p.e. Cronex 4), a -80 °C, durante 2 a 15 dias, conforme o sinal radioactivo emitido.
- 9 - Revelar e fixar a chapa, e, se necessário proceder a nova reexposição do gel.