



UNIVERSIDADE
DE ÉVORA

VIROLOGIA

Protocolos das aulas práticas

Ano letivo 2023/24

Patrick Materatski

Ana Catarina Sousa

TÍTULO:

VIROLOGIA: Protocolos das Aulas Práticas, Ano letivo 2023/24

AUTORES:

Patrick Materatski

Ana Catarina Sousa

ENDEREÇO:

Universidade de Évora, Largo dos Colegiais, 2, 7004-516 Évora

EDITOR: UNIVERSIDADE DE ÉVORA

COPYRIGHT © 2024

ISBN: 978-972-778-376-2

Ano Letivo 2023/24

Unidade Curricular de Virologia

Departamento de Biologia
Escola de Ciências e Tecnologia
Universidade de Évora

Docentes:

Ana Catarina Sousa

Professora Associada

Departamento de Biologia, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora

E-mail: acsousa@uevora.pt

Website institucional: <https://www.uevora.pt/pessoas?id=213457>

Ciência Vitae: <https://www.cienciavitae.pt/pt/3B1D-8A50-D412>

Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0001-6424-7414>

Patrick Materatski

Investigador Auxiliar

MED—Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento &
CHANGE—Global Change and Sustainability Institute, IIFA—Instituto de Investigação e
Formação Avançada, Universidade de Évora,

E-mail: pmateratski@uevora.pt

Website institucional: <https://www.uevora.pt/pessoas?id=37663>

Ciência Vitae: <https://www.cienciavitae.pt/portal/9010-F718-9E95>

Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0001-5769-1963>

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABELAS	6
LISTA DE ACRÓNIMOS	7
INTRODUÇÃO	8
PROTOCOLO 1 – Inoculação viral	9
PROTOCOLO 2 – Curvas de crescimento e formação de placas	13
PROTOCOLO 3 – Isolamento de vírus	19
PROTOCOLO 4 – Caracterização viral	25
PROTOCOLO 5 – Extração e eletroforese de RNA	30
PROTOCOLO 6 – Diagnóstico viral: Transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia (RT-PCR)	34
PROTOCOLO 7 – PCR em tempo real: teste covid	38

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plantas de <i>N. benthamiana</i> ; (1) planta saudável; (2) folha saudável (antes da inoculação viral); (3) 12h após inoculação com vírus OMMV; e (4) 5 dias após inoculação com vírus OMMV.	9
Figura 2. Fases da curva de crescimento da bactéria <i>E. coli</i> ; Fase de Latência (Lag); Fase Exponencial ou Logarítmica (Log); Fase Estacionária e Fase de Declínio.....	14
Figura 3. Agroinfiltração do gene GFP na face abaxial da folha de <i>N. benthamiana</i>	16
Figura 4. Valores de crescimento (absorvância a 660 nm) da bactéria <i>E. coli</i> em dois meios específicos TSB e CSHA ao longo de 530 minutos. Medições realizadas a cada 30 minutos.....	17
Figura 5. Diagrama representativo dos vários passos da purificação viral, adaptado de Bhat & Rao (2020).	20
Figura 6. Preparação de um gradiente de sacarose contínuo, adaptado de Bhat & Gao (2020).....	23
Figura 7. Representação esquemática do processo de amplificação de DNA por PCR, adaptado de Bhat & Rao (2020).	34

INDICE DE TABELAS

Tabela 1. Preparação dos tampões de fosfato de sódio; monobásico e dibásico para a inoculação e extração viral.	10
Tabela 2. Primers e sondas para identificação de 2019-novo coronavírus (2019-nCoV) por real time PCR. Adaptado de Prudêncio et al. (2020).	41

LISTA DE ACRÓNIMOS

Carburundum	Carbeto de silício
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico complementar)
CSHA	<i>Adhesin Reducing Minimal Media</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DO	Densidade Ótica
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Proteína verde fluorescente)
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanossulfónico
OMMV	<i>Olive mild mosaic virus</i>
PCR	<i>Polymerase Chain reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PEG	Polietilenoglicol
RLT	<i>RNeasy Lysis Buffer</i> (Tampão de lise RNeasy)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
RPE	<i>Second RNA wash buffer with Ethanol</i> (Segundo tampão de lavagem de RNA com etanol)
RPM	Rotações por minuto
RW1	<i>RNA wash buffer</i> (tampão de lavagem de RNA)
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecilsulfato de sódio – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
TEMED	Tetrametiletlenodiamina
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i> (Meio trípico de soja)
VIGS	<i>Virus-Induced Gene Silencing</i>

INTRODUÇÃO

A Unidade Curricular (UC) de Virologia (BIO12418L), é uma UC obrigatória para a Licenciatura em Biologia Humana, sendo oferecida como optativa aos cursos de Biologia, Bioquímica e Biotecnologia.

Esta UC compreende, para além das aulas teóricas, uma componente teórico-prática e uma componente de prática-laboratorial, nas quais se pretende demonstrar os conceitos abordados nas teóricas, utilizando ferramentas usadas rotineiramente em virologia e aplicando os procedimentos práticos em material biológico de baixo risco de contaminação para o operador e para o ambiente. Assim, os protocolos aqui descritos recorrem à utilização de plantas e dos seus vírus. Uma vez que os protocolos usados em vírus de plantas são transversais aos restantes vírus, os estudantes apreendem de forma segura e sem riscos, as principais metodologias usadas rotineiramente num laboratório de virologia.

Este manual descreve os protocolos a realizar nas aulas práticas no ano letivo de 2023/24.

VIROLOGIA

Código: BIO12418L

6 ECTS

Área Científica: Ciências Biológicas

Objetivos de Desenvolvimento Sustentável



PROCOLO 1 – Inoculação viral

INTRODUÇÃO

O método de inoculação viral é regularmente usado: *i)* para diagnosticar um vírus através da indução de sintomas numa grande variedade de hospedeiros, incluindo plantas; *ii)* para testar a infecciosidade dos vírus; e *iii)* para propagar vírus de interesse (Hull, 2014).

Este método consiste na introdução do vírus infeccioso, ou do ácido nucleico viral, numa planta, através de feridas realizadas na superfície das folhas. A indução de feridas é essencial uma vez que os vírus são incapazes de penetrar por si só nas células vegetais.

A preparação viral é obtida através do uso da seiva de uma planta infetada, macerando extrato vegetal, na presença de um abrasivo e de seguida friccionando-a numa ou mais folhas de plantas indicadoras. As plantas indicadoras são plantas suscetíveis a vírus e que manifestam sintomas facilmente observáveis. Para isso devem ser plantas jovens. Nem todos os vírus são transmitidos mecanicamente, muitos são transmitidos apenas durante a alimentação de vetores artrópodes em plantas infetadas. Nestes casos, os vírus podem ser inoculados em plantas com o recurso aos vetores ou em alternativa podem ser inseridos em ser usados para clones infecciosos de DNA ou cDNA (no caso de vírus de RNA) e de seguida agroinfiltrados em plantas através de *Agrobacterium tumefaciens*.

Nesta aula prática, pretende-se inocular mecanicamente o vírus *Olive mild mosaic virus* (OMMV) em plantas de *Nicotiana benthamiana* a partir de plantas infetadas sintomáticas. A figura 1 mostra o resultado esperado após a inoculação de OMMV.

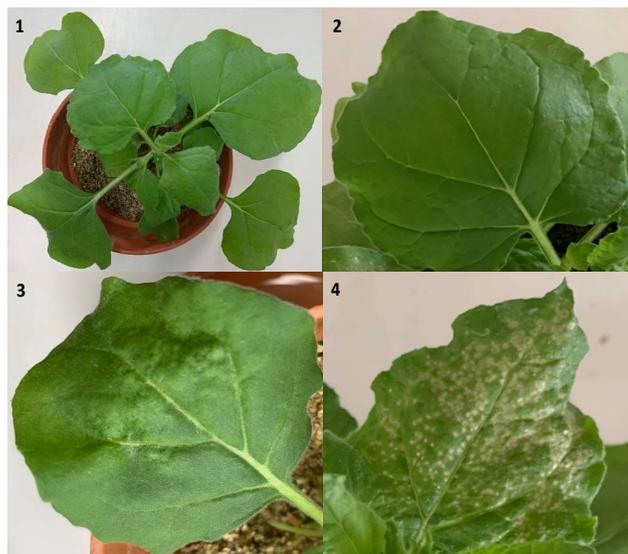


Figura 1. Plantas de *N. benthamiana*; (1) planta saudável; (2) folha saudável (antes da inoculação viral); (3) 12h após inoculação com vírus OMMV; e (4) 5 dias após inoculação com vírus OMMV.

MATERIAL, REAGENTES E EQUIPAMENTO:

- Carborundum (malha de 400 μm , 40.0962 g/mol)
- Planta indicadora com 2 semanas pós germinação (*Nicotiana benthamiana*)
- Solução tampão de fosfato de sódio*
- Material viral (extrato de plantas infetadas ou folhas secas de tabaco)

- Almofariz esterilizado
- Cotonete
- Esguicho com água destilada
- Pipetas descartáveis
- Rótulos e lápis

*Preparação do tampão para inoculação viral

Tampão fosfato de sódio 0,05M pH7.0:

A partir do 0,5L de fosfato de sódio monobásico acertar o pH a 7.0 com o fosfato de sódio dibásico (**Tabela 1**).

Tabela 1. Preparação dos tampões de fosfato de sódio; monobásico e dibásico para a inoculação e extração viral.

Composto	Massa molar (g/mol)	Volume a preparar (L)	Concentração desejada (M)	Massa a pesar (g)
Fosfato de sódio monobásico $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	137,99	0,5	0,05	3,45
Fosfato de sódio dibásico $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	177,99	1	0,05	8,9

PROTOCOLO EXPERIMENTAL:

baseado protocolo descrito por Hull (2009)

O material viral (folhas) será macerado num almofariz na presença de uma solução tampão para inoculação viral* e de um abrasivo (carborundum) usado para produzir microferimentos nas folhas e permitir a entrada do vírus nas células vegetais. O tampão é importante para minimizar a degradação viral. Será usado um controlo realizado nas

mesmas condições que as descritas, mas usando folhas saudáveis em vez de folhas infetadas. Tal irá permitir descartar eventuais necroses causadas por algumas feridas causadas no procedimento da inoculação.

1. Selecionar as plantas saudáveis (planta indicadora) a serem inoculadas e rotular com uma etiqueta de papel escrita a lápis.
2. Cortar e colocar o material vegetal infetado no almofariz.
3. Adicionar 1 ml de tampão de inoculação, 100mg de tecido vegetal (aproximadamente 1 folha infetada) e adicionar 0,001mg de carborundum ao almofariz. (Em alternativa, o material infetado pode ser congelado com azoto líquido e reduzido a pó antes de adicionar o tampão).
4. Macerar o material vegetal até obter uma mistura homogénea.
5. Espalhar e friccionar a mistura obtida em folhas da planta indicadora com a ajuda de um cotonete.
6. Lavar as folhas inoculadas com o esguicho de água destilada (para retirar resíduos que poderão dificultar a visualização dos sintomas).
7. Colocar as plantas na câmara de crescimento com fotoperíodo de 12h, temperatura de 23 ± 2 °C, e humidade relativa de 80%.

Observação dos resultados:

Os sintomas devem ser registados por cada grupo no caderno de laboratório e os registos devem, sempre que possível, ser acompanhados de fotografias.

1. Registrar os sintomas dois a três dias após a inoculação (horário a combinar com o docente).
2. Registrar os sintomas semanalmente no início de cada aula prática.

Resultados esperados:

2 a 3 dias após a inoculação devem começar a aparecer sintomas locais nas plantas indicadoras, como pequenas lesões cloróticas nos pontos de entrada do vírus na planta. Duas a três semanas após a inoculação devem aparecer sintomas sistémicos como alteração no tamanho da planta, mosaicos, amarelecimentos.



Dicas

- ✓ Para otimizar a inoculação devemos cortar os locais das folhas das plantas onde existem lesões, excluindo aquelas que não existem.
- ✓ Não é necessário pesar o carburundum, basta polvilhar uma vez dentro do almofariz.
- ✓ A inoculação na planta com o cotonete deve ser feita de forma suave para evitar destruição total do tecido.

REFERÊNCIAS:

Hull, R. (2014) Plant Virology. 5th Edition, Academic Press, London, 854 p.

PROTOCOLO 2 – Curvas de crescimento e formação de placas

INTRODUÇÃO

O silenciamento de genes em plantas através de vírus (VIGS, do inglês *Virus-Induced Gene Silencing*) é um dos métodos mais usados em genética reversa e tem sido muito usado no estudo de funções de genes em plantas (Robertson, 2004).

O VIGS permite o silenciamento específico de genes estranhos que podem ser inseridos num vírus vetor e de seguida, inoculados ou infiltrados em plantas. Quando uma sequência de um gene é introduzida num vetor VIGS, a planta infetada com este vetor terá como alvo o RNA viral introduzido, acionando o seu mecanismo de defesa que consiste em degradar o RNA estranho e todo o RNA homólogo. Quando a planta expressa constitutivamente RNA com elevada homologia ao RNA introduzido, vai destruir também esse seu RNA, traduzindo-se em alterações no seu fenótipo. Tal pode ser desencadeado com o uso de plantas de *N. benthamiana* que expressam constitutivamente GFP (16C) (do inglês, *green fluorescent protein*) que ao serem infiltradas com vetores que expressam a GFP vão silenciar a sua GFP, sendo possível verificar essa alteração de fenótipo sob luz UV.

O VIGS pode ser desencadeado com recurso a agrobactérias. Para o sucesso da agroinfiltração é essencial conhecer a curva de crescimento das bactérias de forma a determinar o momento preciso da infiltração. Não só no caso das agrobactérias, mas também por exemplo no caso de bactérias que infetam animais, é essencial conhecer a curva de crescimento de forma a detetar a fase de crescimento para detetar o momento da infeção viral, que é dependente da ativação metabólica do hospedeiro.

Enquanto o crescimento dos organismos é determinado pelo aumento do seu tamanho, no caso das bactérias o crescimento é determinado pelo aumento da população. As bactérias multiplicam-se assexuadamente, essencialmente por fissão binária. Sabe-se que as bactérias crescem segundo um padrão: a fase de latência 'lag', fase exponencial 'log', fase estacionária e fase de declínio ou morte (Koneman et al., 2001). A fase de latência é uma fase de adaptação em que as bactérias estão a sintetizar RNA, enzimas e a adaptar-se ao novo meio. A fase exponencial consiste na divisão celular e é caracterizada pela duplicação da população (1 passa a 2, 2 passa a 4, 4 passa a 8,...), nesta fase as células estão em crescimento previsível, ativo e uniforme. A fase estacionária atinge-se quando o crescimento começa a ser inibido por falta de nutrientes e de espaço e nesta fase o crescimento é igual ao número de células que morrem. A fase de declínio ou morte é atingida quando o número de células viáveis diminui de forma previsivelmente exponencial (Figura 2).

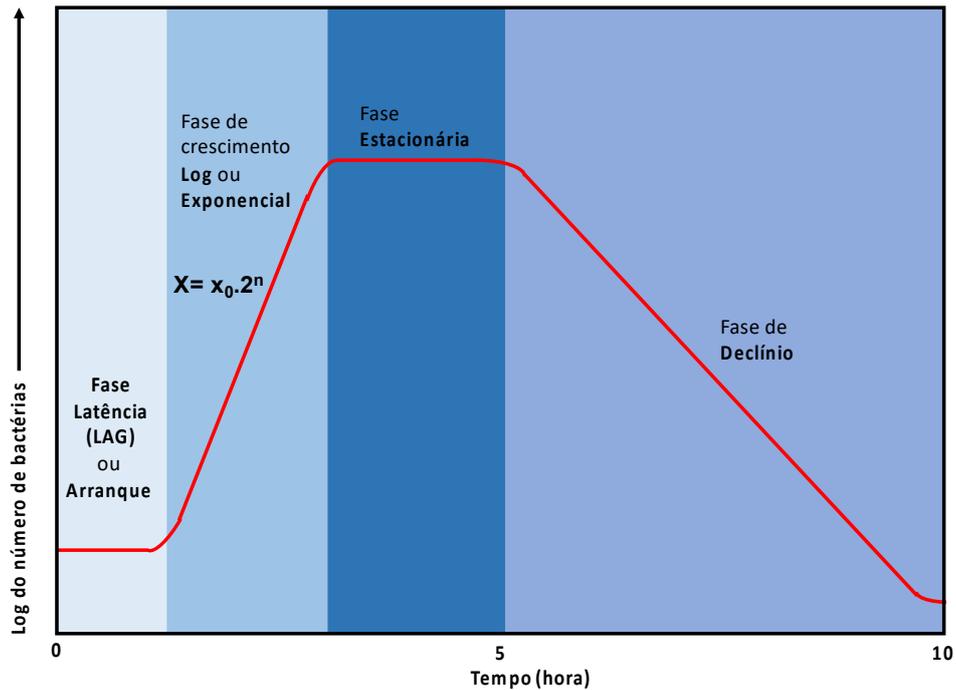


Figura 2. Fases da curva de crescimento da bactéria *E. coli*; Fase de Latência (Lag); Fase Exponencial ou Logarítmica (Log); Fase Estacionária e Fase de Declínio.

MATERIAL, REAGENTES E EQUIPAMENTO:

Nesta aula será determinada a curva de crescimento da bactéria Gram-negativa de solo em forma de bastonete *Agrobacterium tumefaciens*. Em alternativa será usada a bactéria Gram-negativa em forma de bastonetes (bacilos), que se encontra normalmente no trato gastrointestinal de mamíferos (inclui o homem *E. coli*).

As bactérias (*A. tumefaciens*) utilizadas nos protocolos de virologia, por exemplo o protocolo 'VIGS', passam por um crescimento inicial em meio sólido, neste caso, no meio LB líquido é acrescentado agar para a solidificação e são adicionados antibióticos específicos (gentamicina, espectinomicina e rifampicina) que permitem apenas o crescimento das bactérias *A. tumefaciens* de interesse. As bactérias serão de seguida colocadas em meio líquido para obter as quantidades necessárias de agrobacterium, para futura agroinfiltração (Figura 3) e verificação do silenciamento de plantas através de vírus.

Nesta aula será efetuado o crescimento de *Agrobacterium* em meio sólido e em meio líquido de forma a obter células bacterianas para agroinfiltração. Será ainda registada a ocorrência de silenciamento nos 14 dias posteriores.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL:

1. Serão usadas agrobacterium competentes C58c1 contendo pK7Wg2 + GFP (Varanda et al., 2018) que serão colocadas a crescer em meio LB sólido com antibióticos para crescimento no escuro em temperatura de 28°C durante 16h (overnight).
2. Após o crescimento das colónias overnight, estas devem ser picadas com palito esterilizado (ou uma ponta de pipeta) as colónias com crescimento mais regular (mais redondas) e transferir o palito para 5ml de LB em meio líquido com antibióticos. A agrobacterium *A. tumefaciens* será cultivada durante 16h (overnight) com agitação constante (200 rpm) e temperatura de 28°C.
3. Após 16h (overnight), pipetar 1 mL da *A. tumefaciens* e adicionar 20 mL de novo meio LB líquido com antibióticos.
4. Crescer novamente a 28 °C, 200 rpm.
5. Registrar a densidade ótica a 600 nm (DO600) de hora a hora até atingir o valor de densidade ótica de 0,6 – 0,8.
6. Após aproximadamente 6 horas, o crescimento bacteriano deve atingir o valor exponencial e pode-se iniciar o próximo protocolo (*preparação para a agroinfiltração).

Registo e análise dos resultados:

1. Registrar as leituras de DO e relacionar com o tempo de incubação
2. Determinar o número de colónias/mL de cada suspensão
3. Registrar a concentração de bactérias e relacionar com o tempo de incubação
4. Relacionar as DO600 com a concentração de bactérias

Resultados esperados:

Após aproximadamente 6 horas, o crescimento bacteriano chegará ao crescimento exponencial, e as bactérias estarão prontas para o próximo protocolo, que é a preparação das agrobacterium para agroinfiltração.

É esperado um crescimento em meio líquido com uma cor densa em comparação com o meio líquido sem bactérias, por isso é importante termos meio sem bactérias ao lado para compararmos visualmente as densidades.

***Preparação para a Agroinfiltração:**

1. Determinar a concentração da agrobacterium e verificar se as bactérias estão em crescimento exponencial (entre 0,6 – 0,8 DO).
2. Precipitar a *A. tumefaciens*: centrifugar a 5000 rpm por 5 minutos e ressuspender na seguinte solução aquosa (pH 5.6):

Para uma solução stock de 45,0ml:

450 μ l – 10 μ M MgCl₂

450 μ l – 10 μ M MES

90 μ l – 100 μ M Acetoseríngona

3. Com esta solução deve-se ressuspender e também perfazer para a quantidade necessária para a agroinfiltração (por exemplo 2ml)
4. Deixar a solução bacteriana 1h na bancada (escuro) antes de proceder à agroinfiltração.
5. Proceder à agroinfiltração com uma seringa de 2 ml (sem agulha).
6. Pressionar a seringa na parte de baixo (face abaxial) da folha de *N. benthamiana* (Figura 3).
7. Exercer uma contra pressão com o dedo, do lado oposto da folha.
8. Infiltrar o número máximo de folhas com o volume total da seringa.



Figura 3. Agroinfiltração do gene GFP na face abaxial da folha de *N. benthamiana*.

Resultados esperados:

Espera-se que o silenciamento sistêmico ocorra em 7 dias após a agroinfiltração das folhas (plantas com aproximadamente 3 semanas). Por exemplo, em caso de agroinfiltração de genes GFP em plantas *N. benthamiana* 16C, que apresentam o gene GFP expresso constitutivamente, espera-se que o local da folha de *N. benthamiana* 16C que foi agroinfiltrado apresente alteração da cor sob luz ultravioleta após 12 horas. A GFP sob luz UV tem a cor verde e a inibição da GFP sob luz UV mostra a cor vermelha.



Dicas

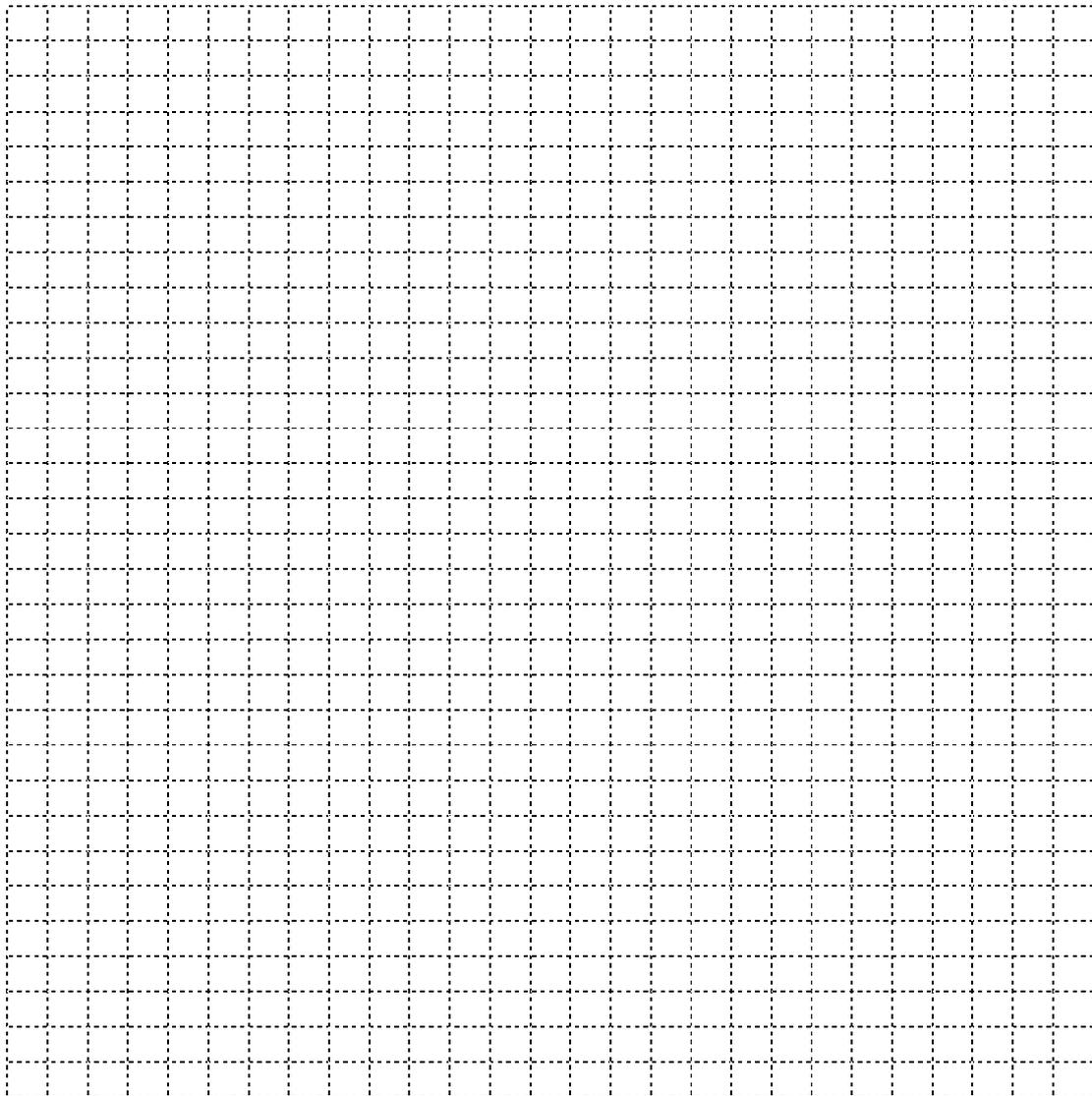
- ✓ Quando a densidade ótica a 600 nm do crescimento das bactérias atingir o intervalo entre 0,6 – 0,8, indica que chegámos ao crescimento exponencial.
- ✓ Para a agroinfiltração deve-se exercer pressão suficiente para não romper as folhas e para que o líquido entre nas folhas, o líquido não deve escorrer da folha. É importante treinar antes com água em folhas de *N. benthamiana* para não desperdiçar as bactérias transformadas.

Exercício:

Fazer um gráfico em papel com base no crescimento da bactéria *Escherichia coli* em dois meios específicos; 'Tryptic Soy Broth' (TSB) e 'Adhesin Reducing Minimal Media' (CSHA) (Figura 4) e indicar as fases do crescimento bacteriano descritas acima.

	A	B	C	D	E
1	Tryptic Soy Broth (TSB)				
2	adhesin reducing CSHA minimal (CSHAM) media				
3	Absorvância em 660nm				
4		Minutos			
5		Incubação	CSHA	TSB	
6		0	0.01	0.014	
7		30	0.022	0.015	
8		60	0.025	0.019	
9		90	0.034	0.033	
10		120	0.051	0.065	
11		150	0.078	0.124	
12		180	0.118	0.238	
13		210	0.179	0.46	
14		240	0.273	0.698	
15		270	0.42	0.91	
16		300	0.598	1.07	
17		330	0.661	1.221	
18		360	0.692	1.423	
19		390	0.741	1.601	
20		420	0.72	1.599	
21		450	0.69	1.589	
22		480	0.689	1.581	
23		510	0.642	1.223	
24		530	0.451	1.009	

Figura 4. Valores de crescimento (absorvância a 660 nm) da bactéria *E. coli* em dois meios específicos TSB e CSHA ao longo de 530 minutos. Medições realizadas a cada 30 minutos.



REFERÊNCIAS:

Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M. et al. (2001) Diagnóstico Microbiológico: texto e Atlas Colorido, 5ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI. P. 1465

Robertson, D. (2004) VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. Annual Review of Plant Biology 55: 495-519

Varanda, C.M., Materatski, P., Campos, M.D., Clara, M.I.E., Nolasco, G., Félix, M.D.R. (2018) Olive Mild Mosaic Virus Coat Protein and P6 Are Suppressors of RNA Silencing, and Their Silencing Confers Resistance against OMMV. Viruses 10, 416.

PROTOCOLO 3 – Isolamento de vírus

INTRODUÇÃO

Este protocolo permite a purificação das partículas virais, ou seja, a separação das partículas virais dos componentes do hospedeiro. O vírus purificado pode depois ser usado em inúmeras aplicações, desde a observação ao microscópio eletrónico, à produção de anticorpos, à extração do RNA viral, purificação das proteínas e do ácido nucleico, entre outras.

Os métodos de isolamento de vírus diferem de acordo com o tipo de vírus, não existindo um protocolo universal. No caso das plantas, a purificação de vírus envolve vários passos (Figura 5).

O primeiro passo da purificação é a **destruição das células vegetais** e extração da seiva das plantas.

Segue-se a **clarificação**, que consiste na remoção dos materiais macromoleculares do hospedeiro, enquanto o vírus fica em suspensão; tal pode ser realizado com recurso a solventes orgânicos, alta temperatura ou tampão fosfato, dependendo do vírus em questão. Centrifugações a baixa velocidade removem facilmente os cloroplastos, mitocôndrias e componentes da parede celular. As proteínas das plantas e os ribossomas são os constituintes vegetais mais difíceis de eliminar durante a purificação viral (Hull, 2014).

Após a clarificação, segue-se a **concentração** do vírus, que pode ser feita por centrifugações de elevada velocidade, precipitação com polietilenoglicol (PEG), precipitação com sal ou precipitação no ponto isoelétrico. O último passo é a purificação viral propriamente dita e que consiste na eliminação dos contaminantes do hospedeiro de baixo peso molecular ainda remanescentes. Tal é realizado com o recurso à centrifugação diferencial (ciclos de centrifugações altas e baixas), centrifugação por gradientes de densidade, entre outras técnicas (Bhat & Gao, 2020).

A pureza da purificação pode ser determinada por exemplo por microscopia eletrónica, espectrofotometria e eletroforese. Uma vez purificados, os vírus podem ser preservados e armazenados em glicerol ou congelados a -20°C.

Nesta aula será realizado o isolamento das partículas virais de OMMV propagadas na aula anterior.

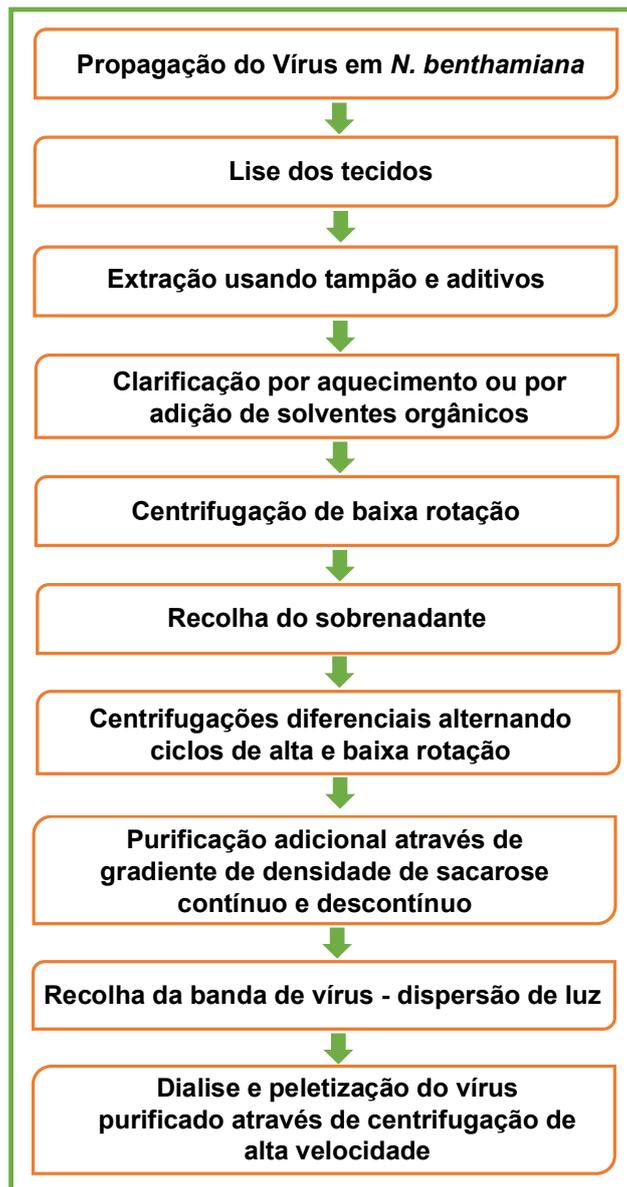


Figura 5. Diagrama representativo dos vários passos da purificação viral, adaptado de Bhat & Rao (2020).

MATERIAL, REAGENTES E EQUIPAMENTO:

- Copos de 500 ml (2)
- Parafilme
- Provetas graduadas (2)
- Seringa e agulha

- Tecido vegetal (100 gr)
- Tubos de centrifuga Corex de baixa rotação
- Tubos de ultracentrifuga de 30 mL
- Tubos de gradiente de polietileno

- Gaze humedecida com água destilada
- 1% de ascorbato de sódio
- Butanol
- Clorofórmio
- Sacarose
- Tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,0 (1:3) (p/v)*
- Tampão fosfato de sódio 0,02M pH 6,0 (1:3) (p/v)*
- Centrífuga de baixa rotação
- Centrífuga de alta rotação
- Centrífuga de bancada
- Liquidificador
- Espectrofotômetro

PROCOLO EXPERIMENTAL:

Isolamento do *Alphanecrovirus Olive mild mosaic virus*

Adaptado de Bhat & Rao (2020)

I - Homogeneização

1. Colocar o material vegetal num liquidificador.
2. Num copo, dissolver, 3 gr de ascorbato de sódio em 300 ml de tampão fosfato de sódio 0.1 M pH 6.0.
3. Após a dissolução do ascorbato de sódio no tampão, juntar esta solução ao material vegetal que está no liquidificador e homogeneizar durante 2 min a uma velocidade alta.
4. Colocar a gaze humedecida sobre o copo e verter o homogeneizado, espremer o homogeneizado que fica na gaze até deixar de sair líquido.
5. Quantificar o volume líquido com o auxílio de uma proveta.

II – Clarificação

1. Colocar o homogenado líquido obtido a agitar em banho de gelo e juntar 10% de butanol-clorofórmio (1:1) (v/v).
2. Agitar esta mistura durante 30 min.
3. Centrifugar a 10410 g durante 20 min.

4. Retirar o sobrenadante e quantificar o volume obtido com uma proveta graduada.

III – Precipitação das partículas virais

1. Distribuir todo o volume obtido no passo anterior por tubos de centrífuga de baixa rotação.
2. Centrifugar a 10400 g durante 10min a 4°C.
3. Recolher o sobrenadante para um copo e distribuir por tubos de ultracentrifuga.
4. Centrifugar a 124000 g durante 2 horas a 4°C (guardar os tubos em excesso a 4 °C até centrifugar).
5. Descartar o sobrenadante e secar ligeiramente o pellet invertendo os tubos sobre papel absorvente.
6. Ressuspender o pellet em 150µL de tampão fosfato 0,02M, pH 6,0.
7. Juntar todas as ressuspensões num tubo de centrífuga de baixa rotação.
8. Recolher o sobrenadante para um tubo de ultracentrifuga e perfazer o volume máximo do tubo com tampão fosfato 0,02M, pH 6,0.
9. Centrifugar a 124000 g durante 2 horas a 4 °C.
10. Ressuspender o pellet resultante em 300µL de tampão 0,02M, pH 6,0.
11. Guardar no frio até aplicar 200µL da amostra viral em cada gradiente de sacarose* preparado no dia anterior.
12. Ultracentrifugar a 150000 g, durante 40 min, a 4 °C.
13. Identificar a banda viral através de uma luz incidente no topo do tubo e retirar essa banda (fração que contém vírus) com uma seringa esterilizada por perfuração lateral do tubo para o tubo de ultracentrifuga.
14. Centrifugar a suspensão viral a 186000 g durante 4h a 4°C.
15. Ressuspender o pellet, constituído pelo vírus purificado, em 100-200µL de tampão fosfato de sódio 0,02M pH6,0, num eppendorf. O vírus purificado pode ser mantido a 4 °C por 90 dias.
16. Determinar a concentração viral através de espectrofotometria.



Determinação da concentração viral

A absorvância a 260 nm (1mg/mL) de TNV é de 5,5 e a relação 260/280 é de 1,5 (Babos & Kassanis, 1963).

Ex. Leitura 260 nm = 0,9 DO (densidade ótica):

1 mg/mL ----- 5,5 DO

X ----- 0,9 DO

X=0,16 mg/mL de vírus

*Preparação do gradiente de sacarose:

1. Em tubos de polietileno colocar camadas sucessivas de soluções de sacarose em tampão fosfato de sódio 0,02M pH6,0: 1,2mL de solução 40%, 1mL de solução 30%, 1mL de solução 20%, 1mL de solução 10%.
2. Colocar no frio durante 18h até à aplicação das amostras de modo a formar um gradiente contínuo (figura 6).

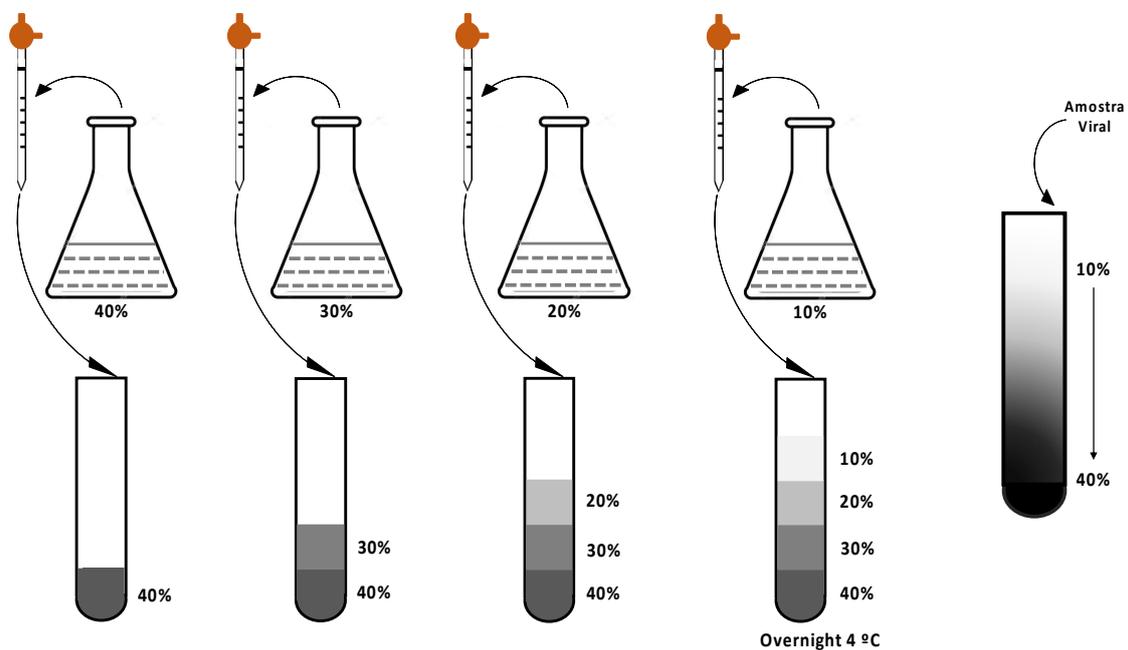


Figura 6. Preparação de um gradiente de sacarose contínuo, adaptado de Bhat & Gao (2020).

*Preparação dos tampões de isolamento:

1. Preparar uma solução de 500 mL de fosfato monobásico 0,1M ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $M=137,99\text{g/mol}$): num copo de vidro de capacidade de 1L, colocar 450 mL de água

destilada, adicionar 6.9g de fosfato monobásico e de seguida perfazer 500 mL de volume.

2. Preparar uma solução de 1 L de fosfato dibásico 0,1M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $M=177,99\text{g/mol}$): num copo de vidro colocar 950 mL de água destilada, adicionar 17,8g de fosfato dibásico e de seguida perfazer 1 L de volume.
3. Tampão fosfato de sódio 0,1M pH6.0: No copo de vidro contendo os 500 mL de fosfato monobásico, adicionar fosfato dibásico preparado no volume suficiente até atingir o pH6.
4. Tampão fosfato de sódio 0,1M pH6.0: No copo de vidro contendo os 500 mL de fosfato monobásico, adicionar fosfato dibásico preparado no volume suficiente até atingir o pH6.
5. Tampão fosfato de sódio 0,02M pH6.0: Diluir 5× a solução 0,1M para 0,5L 0,02M pH6.0 (100mL 0,1M e perfazer até 500mL)

Resultados esperados:

Espera-se observar uma banda única correspondente à acumulação das partículas virais nos gradientes de sacarose.

A purificação de partículas virais de OMMV com o procedimento descrito permite a obtenção de cerca de 0,3 mg de vírus por cada 100 g de planta infetada.



Dicas

- ✓ **Nas centrifugações deve-se sempre colocar tubos com os mesmos pesos para manter o equilíbrio no rotor. Quando os tubos são em número ímpar, deve-se colocar outro a contrapor com o mesmo peso em água.**

REFERÊNCIAS:

Babos, P., Kassanis, B. (1963) The behaviour of some tobacco necrosis virus strains in plants. *Virology* 20: 3, 498-506.

Bhat, A.I., Rao, G.P. (2020) Purification of Plant Viruses. In: *Characterization of Plant Viruses*. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY.

Hull, R. (2014) *Plant Virology*. 5th Edition, Academic Press, London, 854 p.

PROTOCOLO 4 – Caracterização viral

INTRODUÇÃO

O peso molecular das subunidades que constituem a cápside proteica é um dos critérios para a identificação da espécie viral. Para determinar o peso molecular da cápside proteica viral, é essencial desnaturar as subunidades de proteína na presença de SDS (sodium dodecyl sulphate) e temperatura elevada. As proteínas desnaturadas são de seguida sujeitas a eletroforese (Laemmli, 1970) com gel de poliacrilamida e SDS (SDS-PAGE). O peso molecular da proteína viral é depois estimado através da comparação da sua mobilidade em gel, com a de outras proteínas de peso molecular conhecido (Bhat & Rao, 2020).

Nesta aula será realizada a caracterização viral das proteínas de OMMV, a partir da purificação viral obtida na aula anterior.

MATERIAL, REAGENTES E EQUIPAMENTO:

1. Soluções tampão e reagentes:

0,5 M Tris pH 6.8

Solução de 40% de acrilamida (29 acrilamida:1 bisacrilamida)

Tris pH 8.8

2. Tampão do reservatório

24,8 mM Tris

192 mM glicina

0,1% (p/v) SDS

Nota: Neste tampão não se acerta o pH

3. Tampão das amostras 4X

5% de mercaptoetanol (2 mL)

2% de SDS (0,92 g)

0,0625M Tris pH 6.8 (2,5 ml de 0.5 M Tris pH 6,8)

10% de glicerol (4 ml)

0,001% Bromofenol blue (apenas uma pitada, só para dar cor)

Perfazer para 10 ml

Distribuir em eppendorfs e congelar

4. Solução corante (1 litro)

400 ml de metanol

0,25 gr de Comassie blue R-250

70 ml de ácido acético

Perfazer com H₂O

5. Solução descorante (2 litros)

140 ml de ácido acético

400 ml de metanol

Perfazer com H₂O

6. Solução de persulfato de amónio 10% (preparada imediatamente antes do gel)

0,1 g de persulfato de amónio

colocar num eppendorf de 1.5 ml

adicionar 1 ml de H₂O destilada

agitar no vortex até o pó estar dissolvido.

7. Reagentes do gel de poliacrilamida

SDS 10%

TEMED

Butanol saturado com água

Marcador de proteínas de baixo peso molecular (Marcadores Sigmamarker Low range - SIGMA):

66 kDa - albumina de bovino;

45 kDa - albumina de ovo;

36 kDa - gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenase;

29 kDa - anidrase carbónica;

24 kDa – tripsinogénio;

20,1 kDa - inibidor de tripsina;

14,2 kDa - α -lactalbumina

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

I - Preparação do gel de poliacrilamida:

1. Limpar bem os vidros com álcool e montar os vidros nos suportes.

2. Dois copos de vidro de 50 ml cada:

Copo 1 (para fazer o gel separador com 12,5% de poliacrilamida):

3,1 ml de solução 40% de poliacrilamida

3,1 ml de H₂O destilada

2,5 ml de 1.5 M Tris (pH 8,8)

100 µl de 10% SDS

100 µl de 10% de persulfato de amônio

10 µl de TEMED

Nota: Deve homogeneizar-se bem, com movimentos circulares, entre cada adição.

3. Com uma pipeta Pasteur transferir RAPIDAMENTE para o suporte de placas de vidro.

4. Colocar imediatamente sobre o gel aproximadamente 1 ml de butanol saturado com água:

Copo 2 (para fazer o gel concentrador com 4% de poliacrilamida):

0,4 ml de solução 40% de poliacrilamida

7,0 ml de H₂O destilada

2,5 ml de 0,5 M Tris (pH 6,8)

100 µl de 10% SDS (não se adicionam os restantes componentes até as placas que já têm o gel separador estarem preparadas).

5. O gel separador está polimerizado quando o que restou (que ficou dentro da pipeta) estiver sólido.

6. Nesta fase, retirar o butanol vertendo a placa de vidro e lavar muito bem com água destilada.

7. Secar com um triângulo de papel de filtro

8. Continuação da preparação do gel concentrador:

100 µl de 10% de persulfato de amônio

1% de TEMED (10 µl)

9. Com uma pipeta Pasteur transferir RAPIDAMENTE para cima do gel separador já polimerizado e colocar o pente.

II - Preparação das amostras para colocar no gel:

1. Marcar os eppendorfs (um eppendorf por cada amostra e um para o marcador)
2. Em cada eppendorf de amostra colocar:
 - 5 μ l de tampão da amostra
 - 15 μ l de preparação viral
 - Duas pedrinhas de açúcar
3. No eppendorf do marcador colocar:
 - 5 μ l de marcador
4. Colocar os eppendorfs com a amostra num banho a 100^o C durante 5 min para permitir a separação das subunidades proteicas.
5. em seguida, colocar os eppendorfs em gelo durante 5 minutos para evitar a agregação das subunidades proteicas.
6. Colocar as amostras no gel com pontas de bico fino e registar a ordem de colocação.
7. Ligar a tina à fonte de alimentação, durante 10 min a 80 V seguidos de 1h a 120V
8. Retirar o gel dos vidros, com o auxílio de um bisturi, para uma caixa de plástico e mergulhar o gel na solução corante durante 30 minutos.
9. Retirar o corante e substituir pela solução descorante.
10. Observar as bandas. Ao fim de 10-15 minutos as bandas tornam-se visíveis, poderá ser necessário substituir a solução descorante.
11. Determinar o peso molecular das subunidades proteicas por comparação com o marcador.

Resultados esperados:

No gel de proteínas realizado, espera-se a observação de uma banda única de 39 kDa correspondente à acumulação das subunidades proteicas das partículas de OMMV cujo peso descrito é de 39 kDa.



Dicas

- ✓ **No ponto 4 deve-se encostar a ponta da pipeta na parte interna do vidro para diminuir a quantidade de bolhas, evitando-se assim uma junção irregular entre os dois géis.**

REFERÊNCIAS:

Bhat, A.I., Rao, G.P. (2020) Purification of Plant Viruses. In: Characterization of Plant Viruses. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685

PROTOCOLO 5 – Extração e eletroforese de RNA

INTRODUÇÃO:

O genoma viral pode ser constituído por DNA ou RNA, podendo este último ser de cadeia simples ou dupla. O OMMV, como cerca de 90% dos vírus de plantas, é um vírus de RNA de cadeia simples, envolvido por uma cápside proteica consistindo em muitas cópias de subunidades proteicas. O primeiro passo do isolamento do ácido nucleico a partir de vírus purificado envolve a eliminação da cápside proteica da partícula viral seguida da precipitação do ácido nucleico em etanol. A quantidade do ácido nucleico extraído pode ser quantificada por espectrofotometria e a qualidade através de eletroforese, tal como descrito no protocolo anterior.

A extração do ácido nucleico viral permite a sua identificação, caracterização molecular e desenvolvimento de métodos de diagnóstico sensíveis. O genoma pode ser clonado, sequenciado, expressado e usado para transformação de plantas para, por exemplo, obter plantas transgênicas resistentes a vírus (Bhat & Gao, 2020).

MATERIAL, REAGENTES E EQUIPAMENTO:

- Vírus purificado (OMMV extraído na aula anterior)
- Kit de extração de RNA (RNeasy plant mini kit)
- ‘Greensafe’ (NZYTech)

- Agarose
- Orange G 6x

- Centrífuga de bancada
- Espectrofotómetro
- Micropipetas

PROTOCOLO EXPERIMENTAL:

I - Extração de RNA do vírus purificado (QIAGEN)

Nota: Durante todo o protocolo, deve utilizar-se material tratado com DEPC e autoclavado de modo a evitar a degradação do RNA por RNases. O RPE deve ser previamente diluído em 4 volumes de etanol 96-100%.

1. Num *ependorf* de 1,5 mL, adicionar 460 μ L de tampão de lise **RLT** (contendo 10 μ L de β -mercaptoetanol/mL).
2. No mesmo *ependorf*, adicionar 100 μ L de amostra de vírus purificado.
3. Adicionar 460 μ L de etanol 70% e fazer vortex.
4. Aplicar no máximo 700 μ L numa coluna cor-de-rosa do kit, centrifugar 15seg a 10000rpm e descartar o que fica no tubo coletor.
5. Aplicar o volume restante na mesma coluna, centrifugar 15seg a 10000rpm e descartar o que fica no tubo coletor.
6. Lavar a coluna com 700 μ L de tampão **RW1**.
7. Centrifugar 15seg a 10000 rpm.
8. Descartar o tubo coletor e o seu conteúdo.
9. Transferir a coluna para um novo tubo coletor de 2mL.
10. Aplicar 500 μ L de tampão **RPE** (previamente diluído).
11. Centrifugar durante 15seg a 10000rpm e descartar o que fica no tubo coletor.
12. Aplicar 500 μ L de tampão **RPE** na coluna.
13. Centrifugar durante 2min à velocidade máxima para secar a membrana da coluna e descartar o que fica no tubo coletor.

II - Eluição do RNA

1. Transferir a coluna para um novo tubo coletor (*ependorf* que vem com o kit e ao qual se corta a tampa).
2. Aplicar 50 μ L de água RNase free e fechar o tubo
3. Centrifugar 1min a 10000rpm

Nota: Guardar o tubo coletor e a coluna para fazer nova eluição caso a quantidade de RNA seja inferior a 20 μ g (fazer esta nova eluição com o próprio RNA obtido anteriormente para não diminuir a concentração)

III - Eletroforese de RNA (Visualização e quantificação)

1. Preparação das amostras: colocar 12 μ L de amostra + 2 μ L de corante OrangeG 6X em tubo *ependorf*.
2. Preparação do gel: colocar 1% de agarose (1 grama) em 100ml de TBE (0.5x) em um copo erlenmeyer.

3. Com recurso a um micro-ondas derreter a agarose (potência máxima) por aproximadamente 2 minutos.
4. Após derreter a agarose, deve-se resfriar o líquido colocando o copo erlenmeyer por 3 min sobre bancada à temperatura ambiente.
5. Pipetar 1,0µL do corante de ácido nucleico 'Greensafe' (NZYTech) e agitar gentilmente para homogeneizar.
6. Colocar o TBE com a agarose e o 'Greensafe' no berço já com um pente para solidificar.
7. Após solidificar o gel, retirar o pente para expor os poços de aplicação das amostras, colocar o gel na tina de eletroforese, aplicar a amostra e o marcador no gel e ligar por 1 hora a 80V.

A quantificação do RNA será também realizada por espectrofotometria através da determinação da densidade ótica a 260 nm, e deve-se aplicar 1 µL de RNA total. A pureza do RNA é determinada através da razão 260/280. Valores de 1,8 a 2 indicam preparações sem contaminação, ao passo que valores inferiores mostram contaminação de proteínas ou fenóis (Bhat & Gao, 2020).



Determinação da quantidade de RNA viral

Uma OD de 1 a A260 nm equivale a 40 µg/ml de RNA.

Ex. Leitura 260 nm = 0,5 DO (densidade ótica):

$$\begin{array}{rcl} 40 \mu\text{g/ml} & \text{-----} & 1 \text{ DO} \\ X & \text{-----} & 0,5 \text{ DO} \end{array}$$

X=20 µg/ml de RNA

Resultados esperados:

Espera-se valores entre 1,8 e 2 da razão 260/280, que indicam preparações sem contaminantes. Indicando que a extração do RNA total das partículas virais foi bem realizada.



Dicas

- ✓ O equipamento de espectrofotometria calcula automaticamente a concentração de RNA total na amostra, bem como a qualidade, não sendo necessário quando este equipamento é usado calcular concentração de RNA total através das fórmulas acima.
- ✓ A agarose deve ser derretida lentamente no micro-ondas. Para tal, deve ir retirando o copo erlenmeyer do micro-ondas durante o processo e deve observar o conteúdo do copo contra a luz, até que não se visualize agarose por dissolver. Assim garantimos que a agarose está toda dissolvida e não interfere na migração da amostra.
- ✓ A adição dos 10 μ L de β -mercaptoetanol/mL ao tampão RLT só deve ser feita imediatamente antes de iniciar o protocolo.

REFERÊNCIAS:

Bhat, A.I., Rao, G.P. (2020) Purification of Plant Viruses. In: Characterization of Plant Viruses. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY.

PROTOCOLO 6 – Diagnóstico viral: Transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia (RT-PCR)

INTRODUÇÃO

A reação da polimerase em cadeia (PCR) é a técnica mais usada para detetar vírus. Permite amplificar um segmento de DNA que esteja entre duas sequências conhecidas, podendo fazer milhões de cópias de uma sequência em poucas horas. Uma reação de PCR apresenta três etapas caracterizadas por diferentes temperaturas: (1) desnaturação (90–95 °C), que separa as duas cadeias de DNA, (2) hibridação de primers específicos (45–60 °C), que permite o emparelhamento dos primers às suas bases complementares do novo DNA de cadeia simples e (3) extensão do primer usando uma polimerase de DNA que vai fazer uma cópia do DNA alvo a 72 °C (Figura 7).

Existem diferentes variantes e adaptações da técnica de PCR. Por exemplo o RT-PCR (transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia), permite que o PCR seja precedido pela transcrição reversa, ou seja, conversão do RNA em DNA complementar usando a enzima transcriptase reversa. Como a maioria dos vírus de plantas, e muitos vírus que afetam animais e seres humanos, possui genoma de RNA, esta variante permite a amplificação destes genomas (Martelli et al., 1996; Varanda et al., 2010).

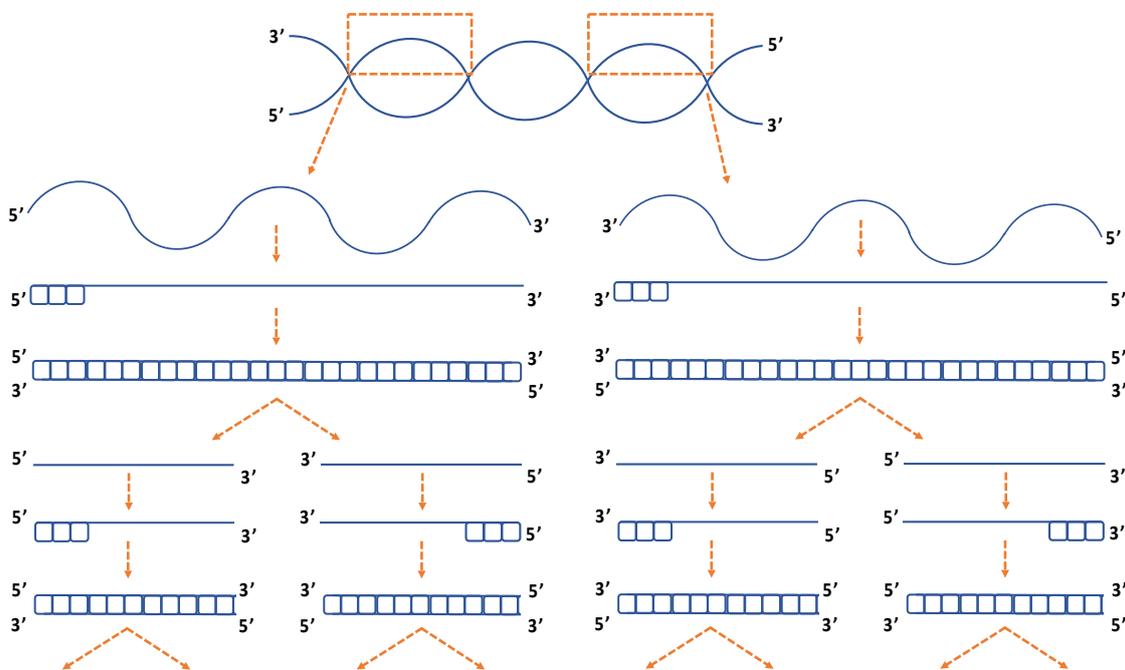


Figura 7. Representação esquemática do processo de amplificação de DNA por PCR, adaptado de Bhat & Rao (2020).

Nesta aula será amplificado o genoma de OMMV, a partir do RNA extraído na aula anterior.

Material, reagentes e equipamento:

- Banho seco
- Centrífuga de bancada
- Equipamento de eletroforese
- Espectrofotômetro
- Gelo
- Micropipetas
- Termociclador

Transcriptase Reversa

Água ultrapura

Enzima transcriptase reversa M-MLV e tampão RT 5X

dNTPs

Random primers

RNA total extraído na aula anterior

Reação em cadeia da Polimerase (RT-PCR)

Agarose

Água ultrapura

cDNA (resultado do passo anterior)

dNTP's

Enzima DNA polimerase (DreamTaq)

MgCl₂

Primers (Forward and Reverse)

Tampão '10X DreamTaq Green Buffer' 'Greensafe' (NZYTech)

PROTOCOLO EXPERIMENTAL:

1. Juntar 1 µL RNA viral + 1,5 µL random hexamers (diluição de trabalho 1:5).
2. Incubar a 70 °C, em banho seco, durante 10 minutos e de seguida em gelo durante 15 minutos para hibridação dos primers.

3. **Transcrição reversa**

Adicionar:

9,5 μ L água ultrapura

4 μ L tampão 5X

2 μ L DTT

1 μ L dNTPs

1 μ L transcriptase reversa M-MLV

Incubar 1 hora a 37 °C em banho seco

4. **PCR**

Adicionar:

38 μ L água ultrapura

5 μ L tampão 10X

1,5 μ L dNTPs

2,5 μ L Primer 5' (OMMVd5' ou PB)

2,5 μ L Primer 3' (OMMVd3' ou PA)

1 μ L produto da transcrição reversa

0,5 μ L DreamTaq

5. **Programa de amplificação**

Deve-se programar a seguinte reação no termociclador, que já está otimizada para o vírus OMMV.

1X: Desnaturação inicial - 95°C, 2 min

35X: Desnaturação – 95°C, 1 min; Hibridação – 60 °C, 1 min; Extensão – 72 °C, 2 min

1X: Extensão final – 72 °C, 10 min

6. **Visualização dos produtos amplificados**

15 μ l amostra em gel de agarose 1% em TBE 0,5X preparado com greensafe, 1 hora a 80V.

De seguida o gel é observado sob luz UV para visualização dos fragmentos de PCR.

Resultados esperados:

No gel de agarose realizado, espera-se a observação de uma banda única de 934 nt correspondente à região do genoma de OMMV delimitada pelo par de primers usado na reação.



Dicas

- ✓ **As enzimas são fornecidas em tampões com base em glicerol. Para uma correta pipetagem da enzima deve ter-se o cuidado no momento da pipetagem de mergulhar a ponta no mínimo volume possível, para evitar a aderência de enzimas na parte exterior da ponta.**

REFERÊNCIAS:

Martelli, G.P., Yilmaz, M.A., Savino, V., Baloglu, S., Grieco, F., Güldür, M.E., Greco, N., Laforzezza, R. (1996) Properties of a citrus isolate of olive latent virus 1, a new necrovirus. *European Journal of Plant Pathology* 102: 527-536.

Varanda, C.M.R., Cardoso, J.M.S., Félix, M.R.F., Oliveira, S., Clara, M.I.E. (2010) Multiplex RT-PCR for detection and identification of three necroviruses that infect olive trees. *European Journal of Plant Pathology* 127: 161-164

PROTOCOLO 7 – PCR em tempo real: teste covid

INTRODUÇÃO

O PCR em tempo real, ou PCR quantitativo, detecta a presença do vírus em tempo real durante a amplificação por PCR sem a necessidade de eletroforese em gel. A detecção em tempo real dos produtos amplificados é possível pela marcação de primers e sondas com moléculas fluorescentes. A quantificação do produto amplificado é feita através da medição do sinal de fluorescência produzido durante a amplificação. Os resultados do PCR em tempo real são mostrados através de uma curva que possui quatro fases diferentes que são usadas para determinar o limite de ciclo (Ct) e a eficiência da amplificação (Bhat & Gao, 2020).

Nesta aula os alunos irão preparar uma reação de PCR em tempo real e aprender o procedimento de um teste COVID, desde a colheita das amostras até à obtenção dos resultados de PCR em tempo real.

MATERIAL, REAGENTES E EQUIPAMENTO:

- Banho seco
- Centrífuga de bancada
- Equipamento de eletroforese
- Espectrofotómetro
- Gelo
- Micropipetas
- Equipamento de Real time qPCR

Transcriptase Reversa

- Água ultrapura
- Enzima transcriptase reversa M-MLV e tampão RT 5X
- dNTPs
- Random primers
- RNA total extraído da amostra de esfregaço nasal

Real-time PCR (qPCR)

- Água ultrapura
- cDNA (resultado do passo anterior)

- NZYSpeedy One-step RT-qPCR Probe Master Mix (2x)
- primers + sonda região N1 do gene viral
- primers + sonda região N2 do gene viral
- primers + sonda do gene humano RNase P

PROCOLO EXPERIMENTAL:

I - Extração do RNA (ilustra RNAspinMini, GE Healthcare)

1. Marcar as colunas com a numeração das amostras e tubos de 1,5 mL que corresponderão aos tubos finais onde ficarão armazenadas as amostras extraídas.
2. Adicionar 500 µL de etanol 70% a cada tubo.
3. Vortex 2x durante 5 seg.

II - RNA Binding

1. Transferir o lisado para a coluna, no máximo 750 µL de cada vez, até usar todo o lisado.
2. Centrifugar 30 seg a 11000 xg.
3. Após a última centrifugação, colocar a coluna num novo tubo coletor.
4. Adicionar 350 µL de *Desalting Buffer*.
5. Centrifugar 1 min a 11000 xg. Não descartar o *flow-through*.

III - Digestão do DNA

1. Preparar a reação da DNase: adicionar o volume total da DNase (150 µL) ao tubo com DRB e misturar gentilmente.
2. Adicionar 95 µL da reação anterior ao centro da coluna (sem tocar na membrana).
3. Tapar a coluna e incubar à temperatura ambiente durante 15 min.

IV - Lavagens

1. Adicionar 200 µL de *wash buffer I*.
2. Centrifugar 30 seg a 11000 xg.
3. Colocar a coluna num novo tubo coletor.
4. Adicionar 600 µL de *wash buffer II*.

5. Centrifugar 30 seg a 11000 xg.
6. Descartar o líquido do tubo coletor e colocar a coluna no mesmo tubo coletor.
7. Adicionar 250 µL de *wash buffer II*.
8. Centrifugar 2 min a 11000 xg.
9. Transferir a coluna para o tubo de 1,5 mL e adicionar 50 µL de água no centro da coluna sem tocar na membrana. Se a coluna tocar no líquido, repetir a centrifugação 30 seg a 11000 xg.
10. Centrifugar 1 min a 11000 xg.

V - Real-time PCR (NZYSpeedy One-step RT-qPCR Probe Master Mix (2x))

1. Deve-se aplicar os seguintes reagentes em cada poço da placa de reação do qPCR.
2. Todas as sondas são lidas na fluorescência FAM e cada detecção de gene (N1, N2 e RP) requer uma reação de PCR individual, ou seja, a mesma amostra deve ter 3 reações; com os primers N1; com os primers N2; e com os primers RP (Tabela 2).

1,8 µl Combined PP (10 µM cada primer e sonda)

10 µl *Master mix* (2x)

3,2 µl Água

5,0 µl cDNA (passo anterior)

Volume total/poço: 20 µL

3. Após a aplicação de todos os reagentes e amostras nos respectivos poços, deve-se selar a placa, centrifugá-la e colocar no equipamento de PCR em tempo real para o início da reação.

VI - Programa de amplificação

Deve-se programar previamente no equipamento de PCR em tempo real a seguinte reação, que já está otimizada para o vírus SARS-CoV-2.

1X: 50 °C, 20 min

1X: 95 °C, 5 min

45X: 95 °C, 3 seg; 55 °C, 30 seg

Tabela 2. Primers e sondas para identificação de 2019-novo coronavírus (2019-nCoV) por real time PCR. Adaptado de Prudêncio et al. (2020).

2019-Novo Coronavírus (2019-nCoV) Primers e Sondas para o PCR em tempo Real (qPCR)			
Nome	Descrição	Sequência de Oligonucleotídeos (5'>3')	Fluoróforo
2019-nCoV_N1-F	Forward Primer	5'-GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT-3'	Não
2019-nCoV_N1-R	Reverse Primer	5' -TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG-3'	Não
2019-nCoV_N1-P	Sonda	5'-FAM-ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC-BHQ1-3'	FAM, BHQ-1
2019-nCoV_N2-F	Forward Primer	5'-TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA-3'	Não
2019-nCoV_N2-R	Reverse Primer	5-GCG CGA CAT TCC GAA GAA-3'	Não
2019-nCoV_N2-P	Sonda	5'-FAM-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AG-BHQ1-3	FAM, BHQ-1
RP-F	Forward Primer	5'-AGA TTT GGA CCT GCG AGC G-3'	Não
RP-R	Reverse Primer	5'-GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT-3'	Não
RP-P	Sonda	5'-FAM-TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG-BHQ1-3'	FAM, BHQ-1

Resultados esperados:

Espera-se uma amplificação do gene humano RNase P com Ct abaixo de 35, que indica que a amostra foi bem retirada. No caso de resultado positivo para a presença do vírus SARS-CoV-2 o Ct deve apresentar valores abaixo de 35 para ambos os genes virais.



Dicas

- ✓ Quando temos muitas amostras deve-se fazer um mix total para cada gene e aplicar nos poços específicos. Este processo diminui o número de pipetagens e também reduz a margem de erro.

REFERÊNCIAS:

Prudêncio, M., Luís, V.Z., Costa, J. (2020) iMM Covid19 Diagnostic, Standard Operating Procedure and Risk Assessment. Instituto de Medicina Molecular.