



VIROLOGIA

Protocolos das aulas práticas

Ano letivo 2024/25

Patrick Materatski

Ana Catarina Sousa

TÍTULO:

VIROLOGIA: Protocolos das Aulas Práticas, Ano letivo 2024/25

AUTORES:

Patrick Materatski

Ana Catarina Sousa

ENDEREÇO:

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

EDITOR: UNIVERSIDADE DE ÉVORA

COPYRIGHT © 2025

ISBN:

Ano Letivo 2024/25

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
Investigadora integrada

Comprehensive Health Research Centre (CHRC), 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: <http://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 – ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO VIRAL	13
2.1. ISOLAMENTO VIRAL	13
2.2. CARACTERIZAÇÃO VIRAL	20
PROTOCOLO 3 – EXTRAÇÃO E ELETROFORESE DE RNA	24
PROTOCOLO 4 – DIAGNÓSTICO VIRAL: TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (RT-PCR)	28
PROTOCOLO 5 – IDENTIFICAÇÃO VIRAL	32
PROTOCOLO 6 – PCR EM TEMPO REAL: TESTE COVID	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> ; (1) planta saudável; (2) folha saudável (antes da inoculação viral); (3) folha 12h após inoculação com vírus OMMV; e (4) folha 5 dias após inoculação com vírus OMMV.	9
Figura 2. Diagrama representativo dos vários passos da purificação viral, adaptado de Bhat & Rao (2020).	14
Figura 3. Preparação de um gradiente de sacarose contínuo, adaptado de Bhat & Gao (2020).	17
Figura 4. Representação esquemática do processo de amplificação de DNA por PCR, adaptado de Bhat & Rao (2020).	28
Figura 5. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação do ícone de abertura dos ficheiros do cromatogramas (.AB1).	33
Figura 6. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação do ícone de abertura dos ficheiros do cromatogramas (.AB1).	33
Figura 7. Exemplificação da qualidade de um cromatograma aberto pela ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA.	34
Figura 8. Cromatograma (ficheiro .AB1) da sequência forward aberto pela Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação do início (região 3') dos picos dos nucleótidos de melhor qualidade.	35
Figura 9. Cromatograma (ficheiro .AB1) da sequência forward aberto pela Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação do fim (região 5') dos picos dos nucleótidos de melhor qualidade.	36
Figura 10. Cromatograma (ficheiro .AB1) da sequência forward aberto pela Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA após a seleção da região de melhor qualidade a ser exportada para o 'Explorador de alinhamentos' em formato ficheiro FASTA.	36
Figura 11. Sequência exportada do cromatograma para a interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA em formato ficheiro FASTA após a seleção da região de melhor qualidade.	36
Figura 12. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação do ícone de abertura dos ficheiros do cromatogramas (.AB1).	37
Figura 13. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação da abertura dos ficheiros do cromatogramas (.AB1).	37
Figura 14. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação para a seleção da 'Sequência 2 Rev'.	38
Figura 15. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação da opção 'Reverse Complement'.	38
Figura 16. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação das sequências selecionadas bem como a indicação de alinhamento das sequências.	39
Figura 17. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação da criação da sequência 'contig'.	39
Figura 18. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação da criação da sequência 'contig' na região 3'.	40
Figura 19. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação da criação da sequência 'contig' na região 5'.	41
Figura 20. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação para a procura de sequências homólogas na base de dados GenBank através da ferramenta básica de alinhamento local, BLAST, do 'National Center for Biotechnology Information (NCBI)'.	42
Figura 21. Interface da ferramenta básica de alinhamento local, BLAST, do 'National Center for Biotechnology Information (NCBI)' com a indicação dos parâmetros para a procura de sequências homólogas na base de dados 'GenBank'.	42
Figura 22. Interface da ferramenta básica de alinhamento local, BLAST, do 'National Center for Biotechnology Information (NCBI)' com os resultados obtidos após procura de sequências homólogas na base de dados 'GenBank'.	43

INDICE DE TABELAS

Tabela 1. Preparação dos tampões de fosfato de sódio; monobásico e dibásico para a inoculação e extração viral.....	10
Tabela 2. <i>Primers</i> e sondas para identificação de 2019-novo coronavírus (2019-nCoV) por real time PCR. Adaptado de Prudêncio et al. (2020).....	47

LISTA DE ACRÓNIMOS

Carburundum	Carbeto de silício
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico complementar)
CSHA	<i>Adhesin Reducing Minimal Media</i> (Meio mínimo de redução de adesinas)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DO	Densidade Ótica
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Proteína verde fluorescente)
LB	<i>Lysogeny Broth</i> (Meio Lisogénico)
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanossulfónico
OMMV	<i>Olive mild mosaic virus</i>
PCR	<i>Polimerase 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	Tetrametiletilenodiamina
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, incluem as principais etapas realizadas num laboratório de virologia, desde a inoculação viral, à purificação e identificação viral, com recurso a plantas e aos seus plantas. 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 2024/25.

VIROLOGIA

Código: BIO12418L

6 ECTS

Área Científica: Ciências Biológicas

Objetivos de Desenvolvimento Sustentável



PROTOCOLO 1 – INOCULAÇÃO VIRAL

INTRODUÇÃO

O método de inoculação viral é geralmente 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 o 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 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.

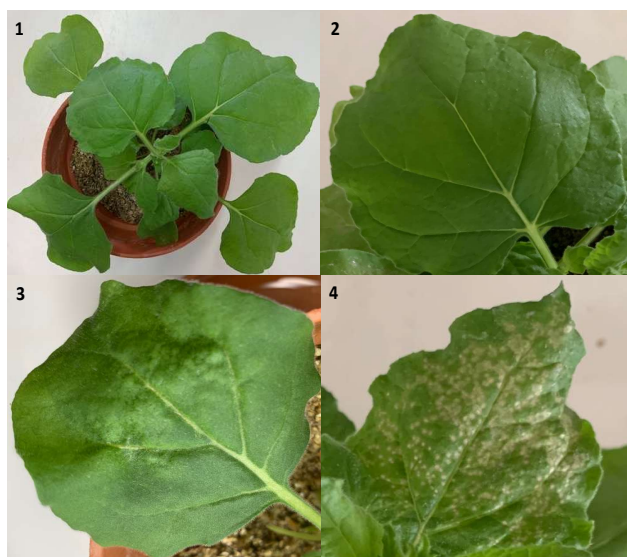


Figura 1. Plantas de *Nicotiana benthamiana*; (1) planta saudável; (2) folha saudável (antes da inoculação viral); (3) folha 12h após inoculação com vírus OMMV; e (4) folha 5 dias após inoculação com vírus OMMV.

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 0,05 M pH 7,0:

A partir do 0,5 L 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, mas usando folhas saudáveis em vez de folhas infetadas. Este

controle permitirá descartar eventuais necroses causadas por eventuais 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. (Não esquecer colocar a data e o nome do grupo).
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 aproximadamente 2-3 mg 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. Registar os sintomas dois a três dias após a inoculação (horário a combinar com o docente).
2. Registar 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, e 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 – ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO VIRAL

2.1. ISOLAMENTO VIRAL

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 2).

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, espectralfotometria 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.

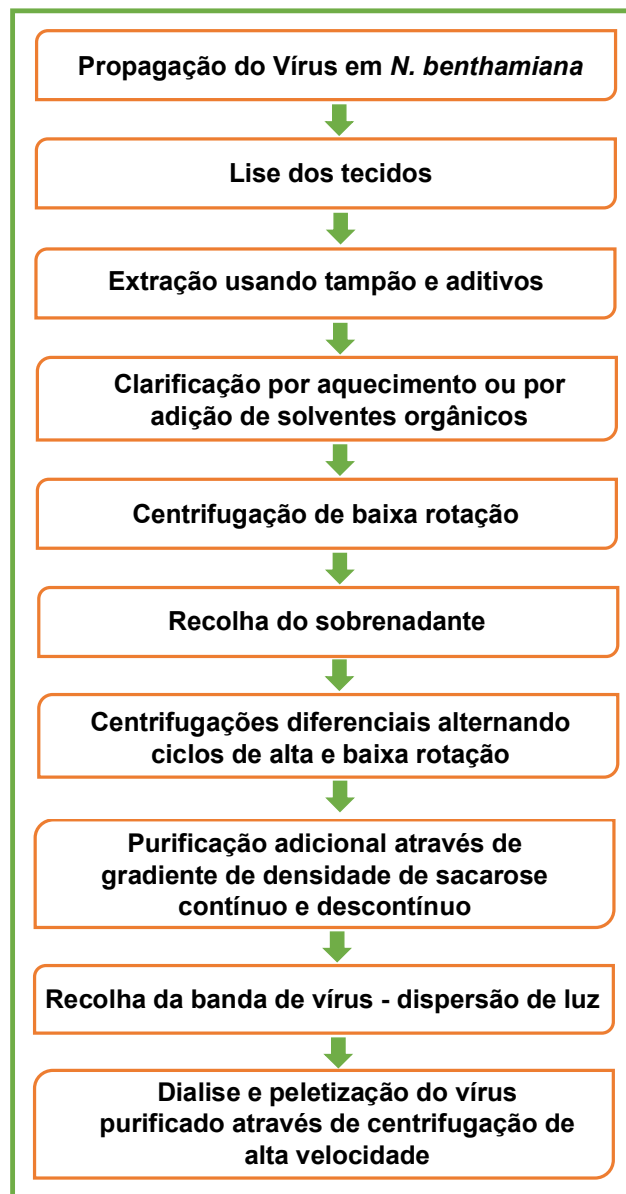


Figura 2. Diagrama representativo dos vários passos da purificação viral, adaptado de Bhat & Rao (2020).

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 0,1 M pH 6,0 (1:3) (p/v)*
- Tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 6,0 (1:3) (p/v)*
- Centrífuga de baixa rotação
- Centrífuga de alta rotação
- Centrífuga de bancada
- Liquidificador
- Espectrofotômetro

PROTOCOLO 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. Registrar o volume obtido.

II – Clarificação

1. Num banho de gelo, adicionar 10% de butanol-clorofórmio (1:1) (v/v) à solução homogeneizada obtida no ponto anterior.
2. Agitar a 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. Não esquecer de registar o volume obtido no caderno de laboratório.

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 o papel absorvente.
6. Ressuspender o *pellet* em 150 µL de tampão fosfato 0,02 M, 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 0,02 M, pH 6,0.
9. Centrifugar a 124000 *g* durante 2 horas a 4 °C.
10. Ressuspender o *pellet* resultante em 300 µL de tampão 0,02 M, pH 6,0.
11. Guardar no frio até aplicar 200 µL 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 a banda (fração que contém vírus) com uma seringa esterilizada por perfuração lateral 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 0,02 M pH 6,0, 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 0,02 M pH 6,0:

- 1,2mL de solução 40%,
- 1mL de solução 30%,
- 1mL de solução 20%,
- 1mL de solução 10%.

2. Colocar no frio durante 18 h até à aplicação das amostras, de modo a formar um gradiente contínuo (figura 3).

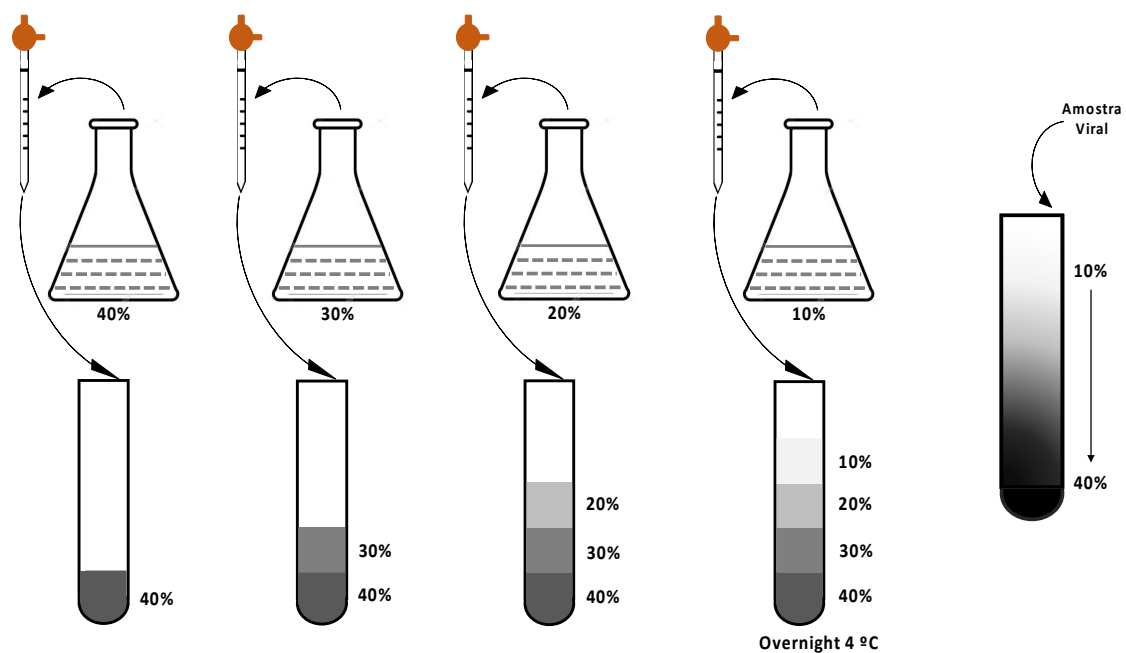


Figura 3. Preparação de um gradiente de sacarose contínuo, adaptado de Bhat & Gao (2020).

***Preparação dos tampões de isolamento:**

1. Preparação da 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 1 L, colocar 450 mL de água destilada, adicionar 6,9 g de fosfato monobásico e de seguida perfazer até 500 mL de volume.

2. Preparação da solução de 1 L de fosfato dibásico 0,1 M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $M=177,99\text{g/mol}$):

Num copo de vidro colocar 950 mL de água destilada, adicionar 17,8 g de fosfato dibásico e de seguida perfazer até 1 L de volume.

3. Preparação do tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,0:

No copo de vidro contendo os 500 mL de fosfato monobásico, adicionar fosfato dibásico preparado no volume suficiente até atingir o pH 6,0.

4. Preparação do tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,0:

No copo de vidro contendo os 500 mL de fosfato monobásico, adicionar fosfato dibásico preparado no volume suficiente até atingir o pH 6,0.

5. Preparação do tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 6,0:

Diluir 5× a solução 0,1 M para 0,5 L 0,02 M pH 6,0 (100 mL 0,1 M e perfazer até 500 mL).

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 equilibra 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.

2.2. 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)

0,0625 M 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 *ependorf* 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 (Tetrametiletilenodiamina)

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. Preparar o **Gel Separador**: Num copo de vidro de 50 ml (**Copo 1**) 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 amónio
 - 10 µl de TEMED

Nota: Deve homogeneizar-se bem, com movimentos circulares, entre cada adição.
3. Com uma pipeta Pasteur transferir RAPIDAMENTE o gel separador para o suporte de placas de vidro.
4. Imediatamente após a colocação do gel separador adicionar aproximadamente 1 ml de butanol saturado com água.
5. Deixar solidificar o gel de poliacrilamida e iniciar a preparação do **Gel Concentrador**:
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).
6. O gel separador está polimerizado quando o que restou (que ficou dentro da pipeta) estiver sólido. 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. Finalização da preparação do gel concentrador (copo 2):
 - 100 µl de 10% de persulfato de amónio
 - 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 µl de tampão da amostra
 - 15 µl de preparação viral

- Duas pedrinhas de açúcar
3. No *eppendorf* do marcador colocar:
 - 5 µl de marcador
 4. Colocar os *eppendorfs* com a amostra num banho a 100° 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. Com o auxílio de um bisturi, retirar o gel dos vidros 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 9 deve encostar a ponta da pipeta à 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 3 – 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, expresso 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 µL de tampão de lise **RLT** (contendo 10 µL de β-mercaptoetanol/mL).
2. No mesmo *ependorf*, adicionar 100 µL de amostra de vírus purificado.
3. Adicionar 460µL de etanol 70% e fazer vortex.
4. Aplicar no máximo 700 µL numa coluna cor-de-rosa do kit, centrifugar 15 seg a 10000 rpm e descartar o que fica no tubo coletor.
5. Aplicar o volume restante na mesma coluna, centrifugar 15 seg a 10000 rpm e descartar o que fica no tubo coletor.
6. Lavar a coluna com 700 µL de tampão **RW1**.
7. Centrifugar 15 seg a 10000 rpm.
8. Descartar o tubo coletor e o seu conteúdo.
9. Transferir a coluna para um novo tubo coletor de 2 mL.
10. Aplicar 500 µL de tampão **RPE** (previamente diluído).
11. Centrifugar durante 15 seg a 10000 prm e descartar o que fica no tubo coletor.
12. Aplicar 500 µL de tampão **RPE** na coluna.
13. Centrifugar durante 2 min 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 µL de água RNase free e fechar o tubo
3. Centrifugar 1 min a 10000 rpm

Nota: Guardar o tubo coletor e a coluna para fazer nova eluição caso a quantidade de RNA seja inferior a 20 µg (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 µL de amostra + 2 µL de corante OrangeG 6X em tubo *ependorf*.
2. Preparação do gel: colocar 1% de agarose (1 grama) em 100 mL de TBE (0,5x) nm copo erlenmeyer.

3. Num micro-ondas derreter a agarose (potência máxima) durante aproximadamente 2 minutos.
4. Após a agarose estar derretida, deve ser arrefecida colocando o copo erlenmeyer durante 3 min sobre bancada à temperatura ambiente.
5. Pipetar 1,0 μL do corante de ácido nucleico 'Greensafe' (NZYTech) e agitar suavemente 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 durante 1 hora a 80V.

A quantificação do RNA será também realizada por espectrofotometria através da determinação da densidade ótica a 260 nm. Para tal deve se aplicado 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 DO (densidade ótica) de 1 a A260 nm equivale a 40 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ de RNA

Resultados esperados:

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



Dicas

- ✓ O equipamento de espectrofotometria usado nas aulas calcula automaticamente a concentração de RNA total na amostra, bem como a qualidade. Assim, quando usamos este equipamento não é necessário usar as fórmulas anteriormente descritas para calcular concentração de RNA total.
- ✓ 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-se 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 μL 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 4 – 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 na detecção de 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 4).

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).

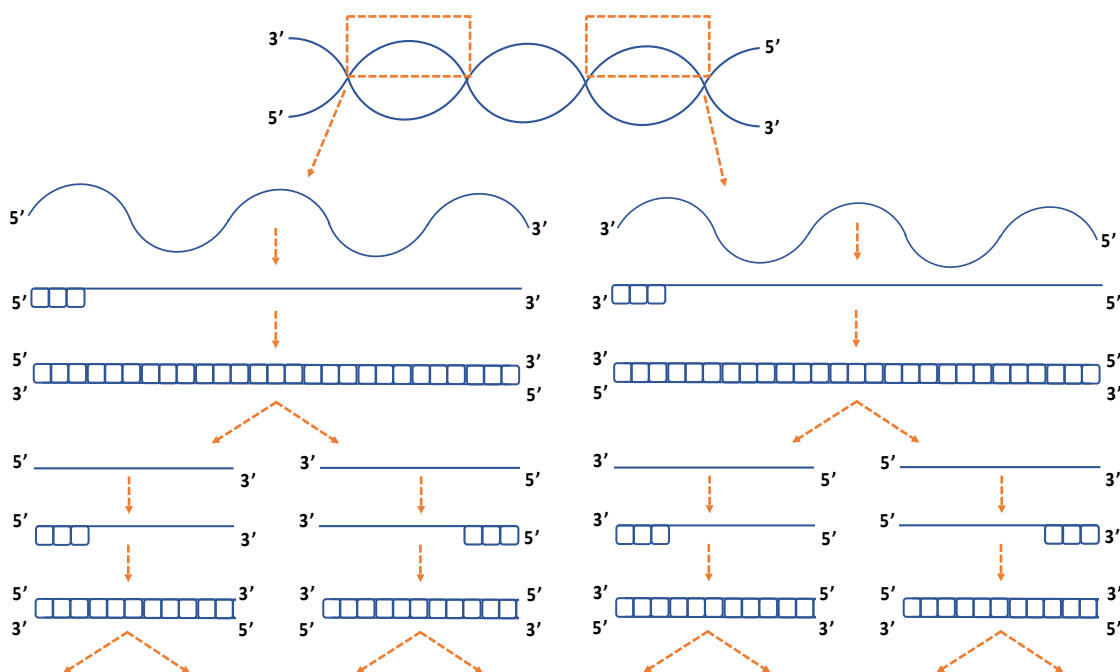


Figura 4. Representação esquemática do processo de amplificação de DNA por PCR, adaptado de Bhat & Rao (2020).

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 µL água ultrapura

4 µL tampão 5X

2 µL DTT

1 µL dNTPs

1 µL transcriptase reversa M-MLV

Incubar 1 hora a 37 °C em banho seco .

4. PCR

Adicionar:

38 µL água ultrapura

5 µL tampão 10X

1,5 µL dNTPs

2,5 µL Primer 5' (OMMVd5' ou PB)

2,5 µL Primer 3' (OMMVd3' ou PA)

1 µL produto da transcrição reversa

0,5 µL *DreamTaq*

5. Programa de amplificação

Programação da reação no termociclador (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

Colocar 15 µl da amostra em gel de agarose 1% em TBE 0,5X preparado com *greensafe*, 1 hora a 80V.

Observar o gel 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 5 – IDENTIFICAÇÃO VIRAL

INTRODUÇÃO

O produto de PCR que foi amplificado e revelado em gel de agarose nas aulas anteriores, foi em seguida purificado com kit de purificação Nzytech (Nzytech, Lisbon, Portugal) de acordo as instruções do fabricante e enviado para sequenciação SANGER na empresa Macrogen (Madrid, Espanha). Após a sequenciação dos produtos de PCR a Macrogen envia (por via eletrónica) os resultados, que são ficheiros com terminação .AB1, e que dão origem aos cromatogramas, que são os resultado da sequenciação realizada.

Para posterior análise das sequências de nucleótidos, será utilizado o software MEGA versão 10.1.8 (Kumar, et al., 2018) com recurso ao CLUSTAL W. No presente protocolo o software MEGA é utilizado como uma ferramenta de integração para a realização de leitura de cromatogramas (ficheiros .AB1) e alinhamento de sequências de nucleótidos de forma automática ou manual. As sequências alinhadas através do software MEGA serão utilizadas para identificar sequências homólogas na base de dados GenBank (versão 242.0) (Benson, et al., 2013). Esta procura é realizada através da ferramenta básica de procura de alinhamento local, BLAST, do 'National Center for Biotechnology Information (NCBI)'.

Neste protocolo iremos analisar os cromatogramas resultantes da sequenciação do produto de PCR amplificado em aula, para tal será realizada a transformação dos cromatogramas (ficheiros .AB1) em sequências de nucleótidos (ficheiros .FASTA), será feita a procura de homologias de sequências em bases de dados internacionais e finalmente faremos a identificação ao nível da espécie do vírus inoculado nos protocolos anteriores.

MATERIAL e EQUIPAMENTO:

- Computador
- Software MEGA versão 10.1.8
- Ficheiros (.AB1) com sequências 'forward' e 'reverse'.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL:

I – Abertura de componentes no software MEGA

1. Abrir o software MEGA e seleccionar a opção ALINHAMENTO.
2. Seleccionar a opção EDITAR/CRIAR NOVO ALINHAMENTO.
3. Seleccionar a opção CRIAR NOVO ALINHAMENTO.

4. Após esta última seleção, o software apresentará a pergunta: 'Are you building a DNA or a protein sequence alignment?'. Deve ser selecionada a opção de DNA. Nesta fase o software MEGA abre a ferramenta 'Explorador de Alinhamentos'.

II – Abertura dos Cromatogramas

1. No 'Explorador de Alinhamentos', selecionar a opção nucleótidos na parte superior esquerda da tela (Figura 5).

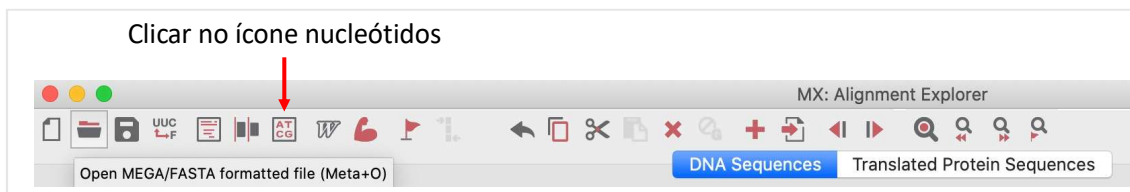


Figura 5. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação do ícone de abertura dos ficheiros do cromatogramas (.AB1).

2. Abrir o ficheiro . AB1. Procurar no computador a pasta onde estão os ficheiros .AB1, selecionar o ficheiro 'Sequencia1FWD.ab1' e abrir o ficheiro (Figura 6). Nesta fase o software MEGA abre o cromatograma.

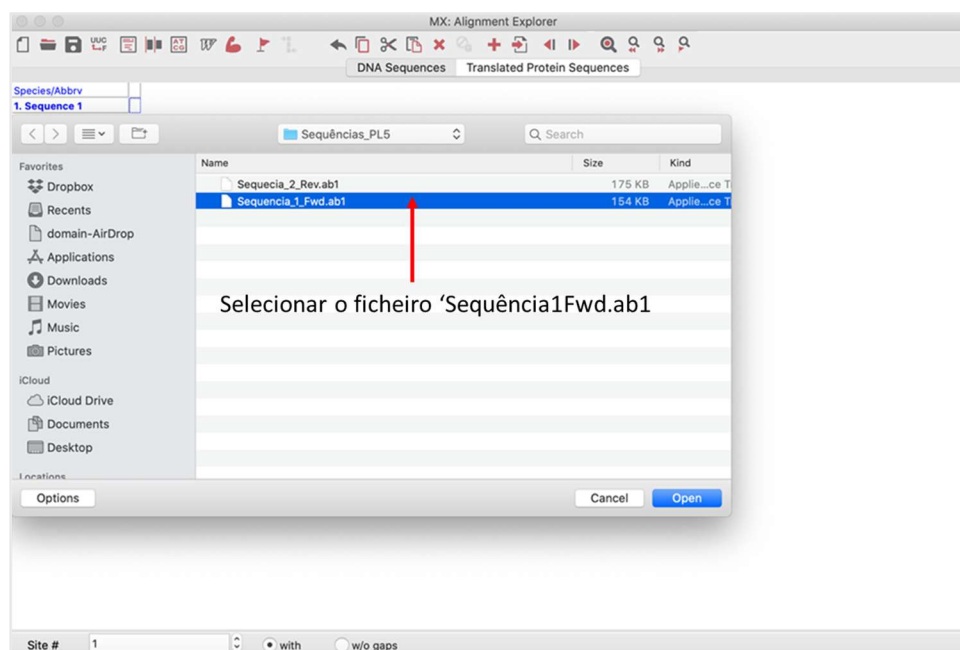


Figura 6. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação do ícone de abertura dos ficheiros do cromatogramas (.AB1).

II – Seleção da sequência 'forward'

1. Após a abertura do cromatograma, devemos avaliar a sua qualidade para futura utilização. Partindo do pressuposto de que nas aulas anteriores os resultados foram os esperados, a sequenciação SANGER apresentará bons resultados até aproximadamente 600 nucleótidos, podendo estes resultados variar para mais ou para menos.

No cromatograma, cada nucleótido está representado por um pico de cor diferente, permitindo assim a diferenciação de cada nucleótido (A, T, C, G) da nossa sequência. Bons resultados são verificados com picos únicos (sem mistura de cor) e longos (indicam um sinal forte) tal como ilustrado na Figura 7.

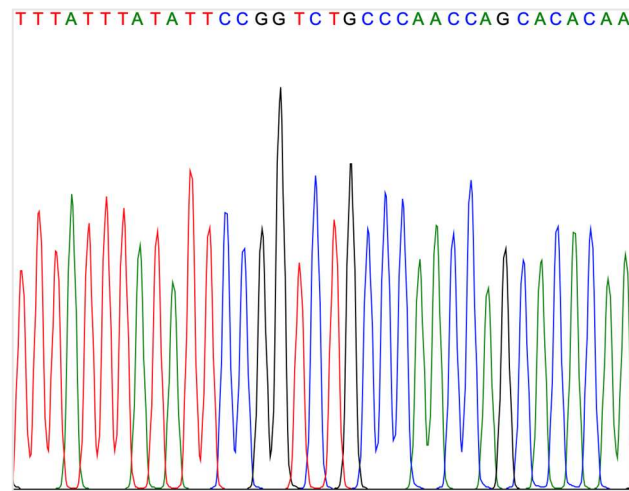


Figura 7. Exemplificação da qualidade de um cromatograma aberto pela ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA.

2. Para **selecionar a melhor sequência para a futura identificação do vírus** deve-se começar pela região 3', verificando onde começam os picos únicos, sem a interferência de outros picos. Por vezes, na região terminal 3' os picos ainda são pouco intensos (curtos), indicado um sinal ainda fraco, uma vez que se trata do início da sequenciação. Nestes casos, deve-se utilizar este início, mesmo com picos pouco intensos, desde que sejam únicos e sem interferência de outros picos. Logo que seja encontrado este início de qualidade dos picos deve-se marcar no cromatograma o início, clicando na letra do nucleótido referente ao pico, ficando este nucleótido sombreado. Seguidamente, deve-se selecionar a opção específica que **descarta os picos de baixa qualidade, localizados na região 3'** (região sombreada) do nucleótido selecionado (Figura 8).

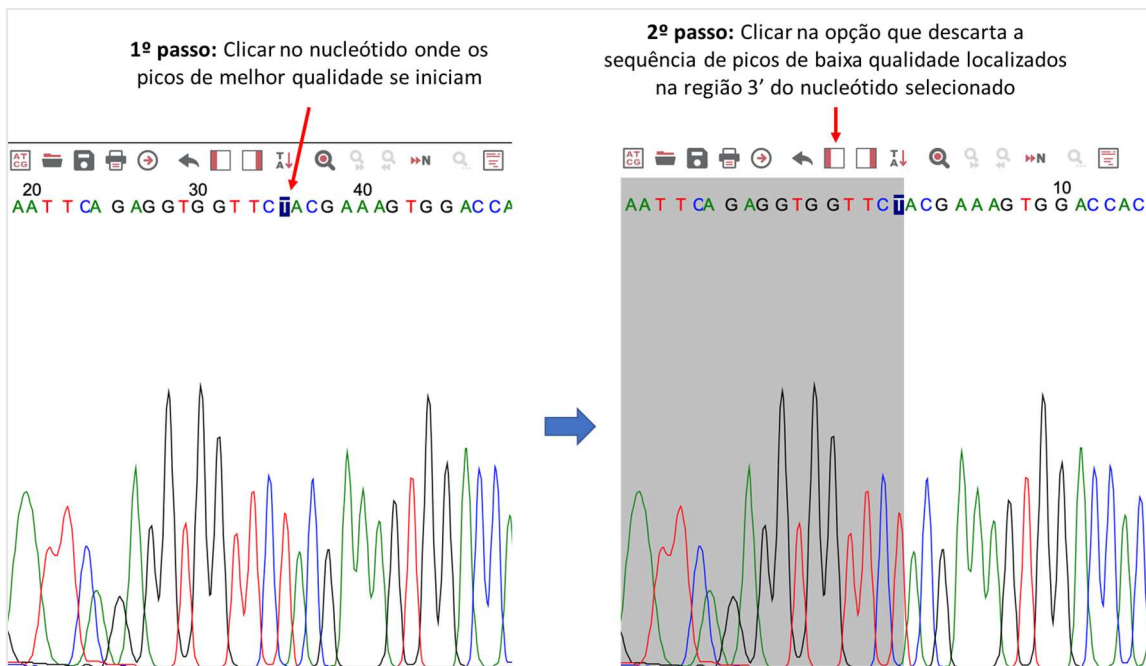


Figura 8. Cromatograma (ficheiro .AB1) da sequência forward aberto pela Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação do início (região 3') dos picos dos nucleótidos de melhor qualidade.

3. À semelhança ao passo anterior, deve-se verificar a **qualidade dos picos em direção a região 5' do cromatograma** e logo que seja encontrado o fim da qualidade dos picos deve-se marcar no cromatograma o fim, clicando na letra do nucleótido referente ao pico, ficando este nucleótido sombreado. Seguidamente seleciona-se a opção específica **que descarta os picos de baixa qualidade, localizados na região 5'** (região sombreada) do nucleótido selecionado (Figura 9).

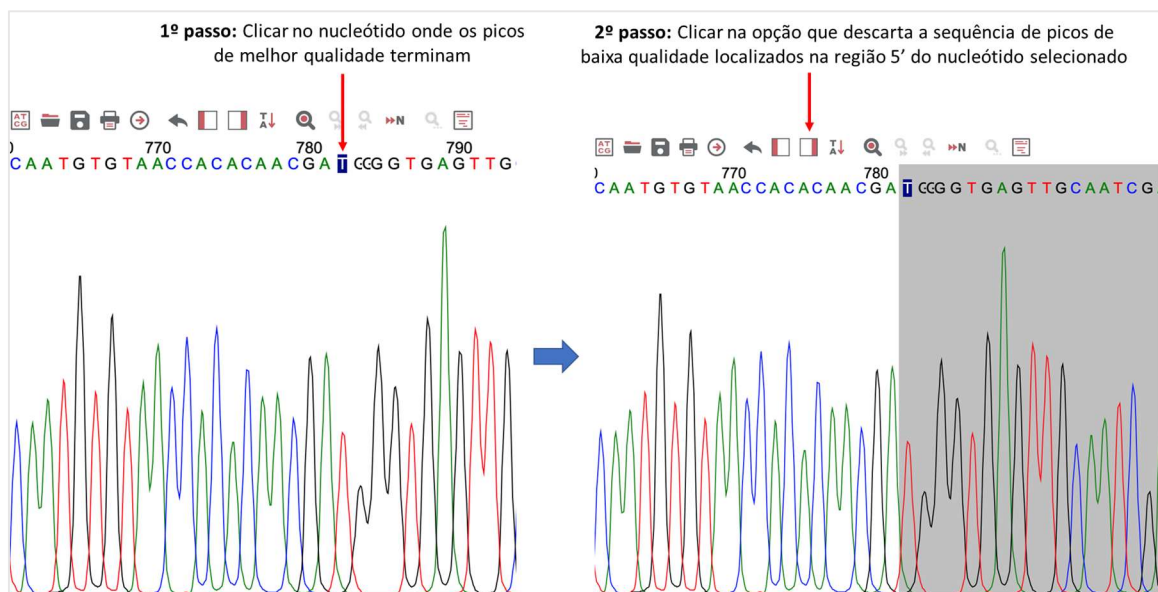


Figura 9. Cromatograma (ficheiro .AB1) da sequência forward aberto pela Interface da ferramenta ‘Explorador de alinhamentos’ do software MEGA com a indicação do fim (região 5’) dos picos dos nucleótidos de melhor qualidade.

4. Para finalizar a seleção da sequência ‘forward’ deve-se selecionar a opção do ícone ‘seta para direita’ que enviará, para o ‘Explorador de Alinhamentos’, toda a sequência de nucleótidos que se considerou ter melhor qualidade com base na qualidade dos picos do cromatograma (Figura 10).



Figura 10. Cromatograma (ficheiro .AB1) da sequência forward aberto pela Interface da ferramenta ‘Explorador de alinhamentos’ do software MEGA após a seleção da região de melhor qualidade a ser exportada para o ‘Explorador de alinhamentos’ em formato ficheiro FASTA.

5. Nesta fase, a sequência ‘forward’ é enviada para o ‘Explorador de Sequências’ (Figura 11).

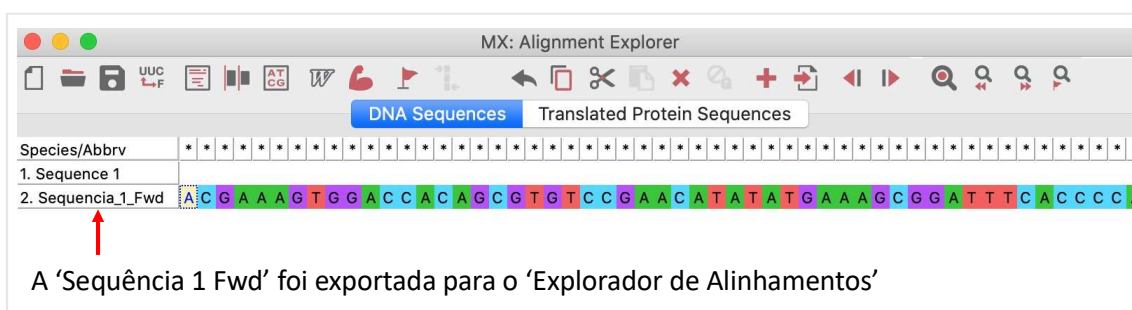


Figura 11. Sequência exportada do cromatograma para a interface da ferramenta ‘Explorador de alinhamentos’ do software MEGA em formato ficheiro FASTA após a seleção da região de melhor qualidade.

III – Seleção da sequência ‘reverse’

1. No ‘Explorador de Alinhamentos’, selecionar a opção nucleótidos na parte superior esquerda da tela (Figura 12).

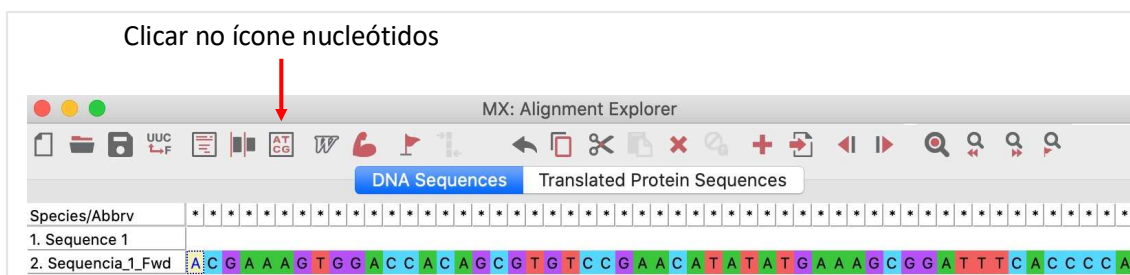


Figura 12. Interface da ferramenta ‘Explorador de alinhamentos’ do software MEGA com a indicação do ícone de abertura dos ficheiros do cromatogramas (.AB1).

2. Em seguida, abrir o “nosso” ficheiro. Para tal, devem procurar no computador a pasta onde estão os ficheiros .AB1 e devem selecionar o ficheiro ‘Sequencia2Rev.ab1’ e abrir. Nesta fase o software MEGA abre o cromatograma (Figura 13).

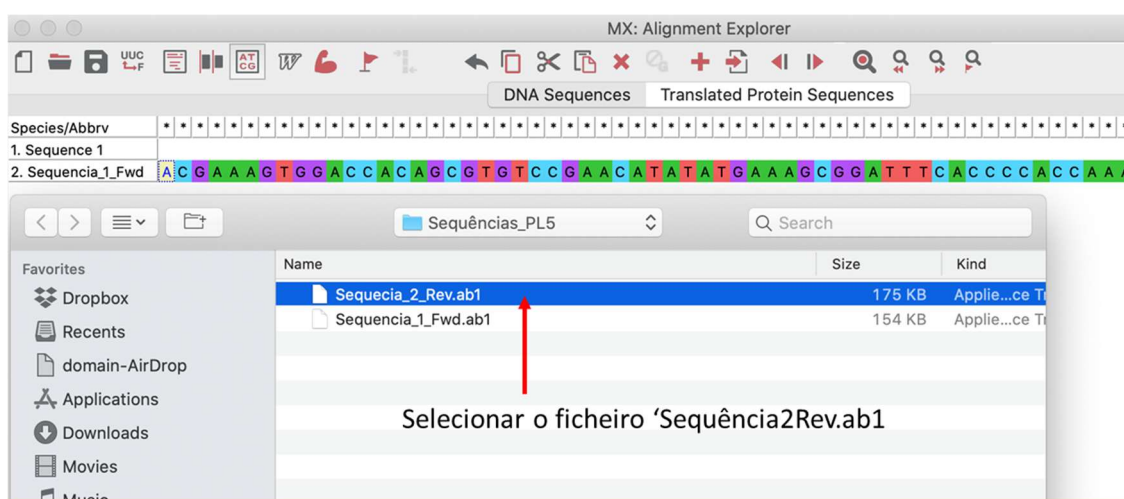


Figura 13. Interface da ferramenta ‘Explorador de alinhamentos’ do software MEGA com a indicação da abertura dos ficheiros do cromatogramas (.AB1).

3. Para a seleção da melhor sequência ‘reverse’ no cromatograma, realizar os passos descritos no ponto II – Seleção da sequência ‘forward’.
4. Após o envio da sequência selecionada no cromatograma para o ‘Explorador de Sequências’, deve-se clicar no ficheiro ‘Sequência2Rev.ab1’ e toda a sequência será selecionada (Figura 14).

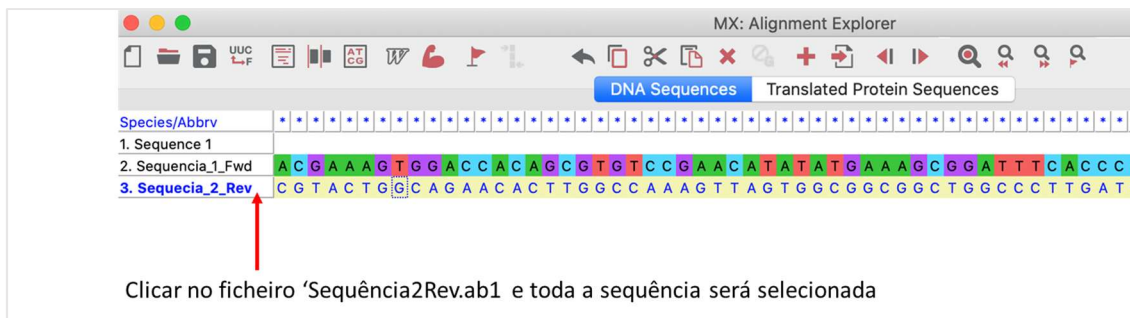


Figura 14. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação para a seleção da 'Sequência 2 Rev'.

- Em seguida, deve-se clicar com o botão direito do rato e seleccionar a opção 'Reverse Complement' que irá fazer a cadeia complementar reversa, ficando assim no mesmo sentido da cadeia 'forward' e pronta para o alinhamento entre cadeias (Figura 15).

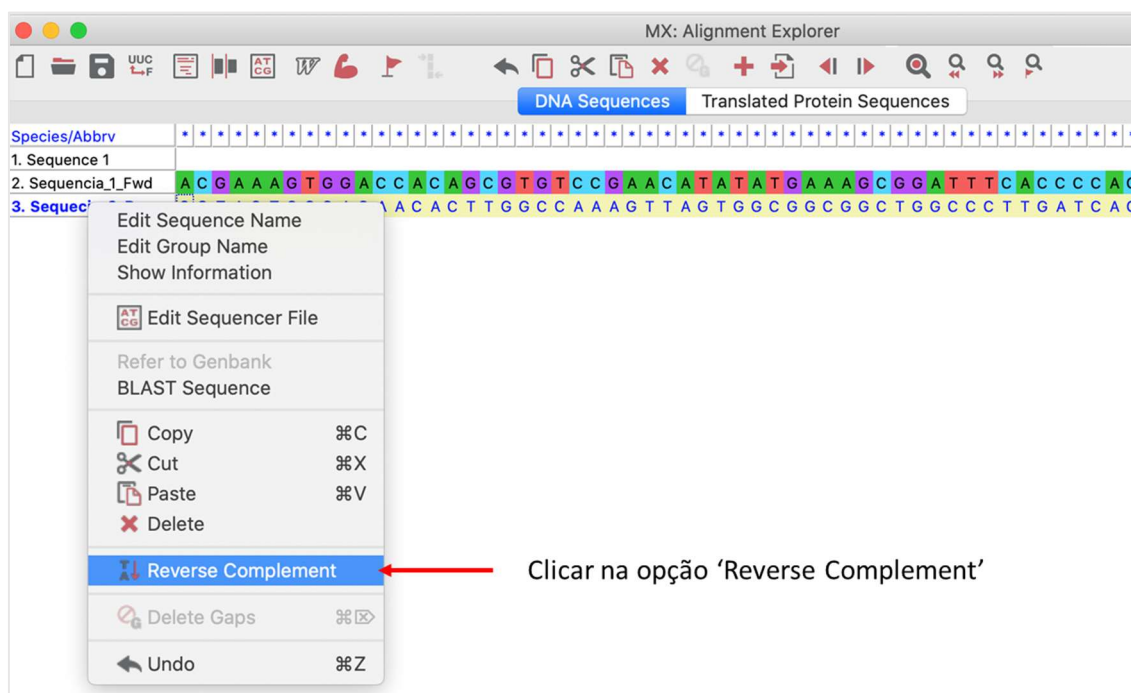


Figura 15. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação da opção 'Reverse Complement'.

IV – Alinhamento das sequências e criação da sequência 'Contig'

- Neste passo serão alinhadas as duas sequências. Deve-se primeiro seleccionar as duas sequências, depois clicar em 'ClustlW' e seleccionar a opção 'Alinhar DNA'. Por fim, seleccionar a opção 'OK', sem alterar os parâmetros sugeridos pelo software. Nesta fase as duas sequências serão alinhadas (Figura 16).

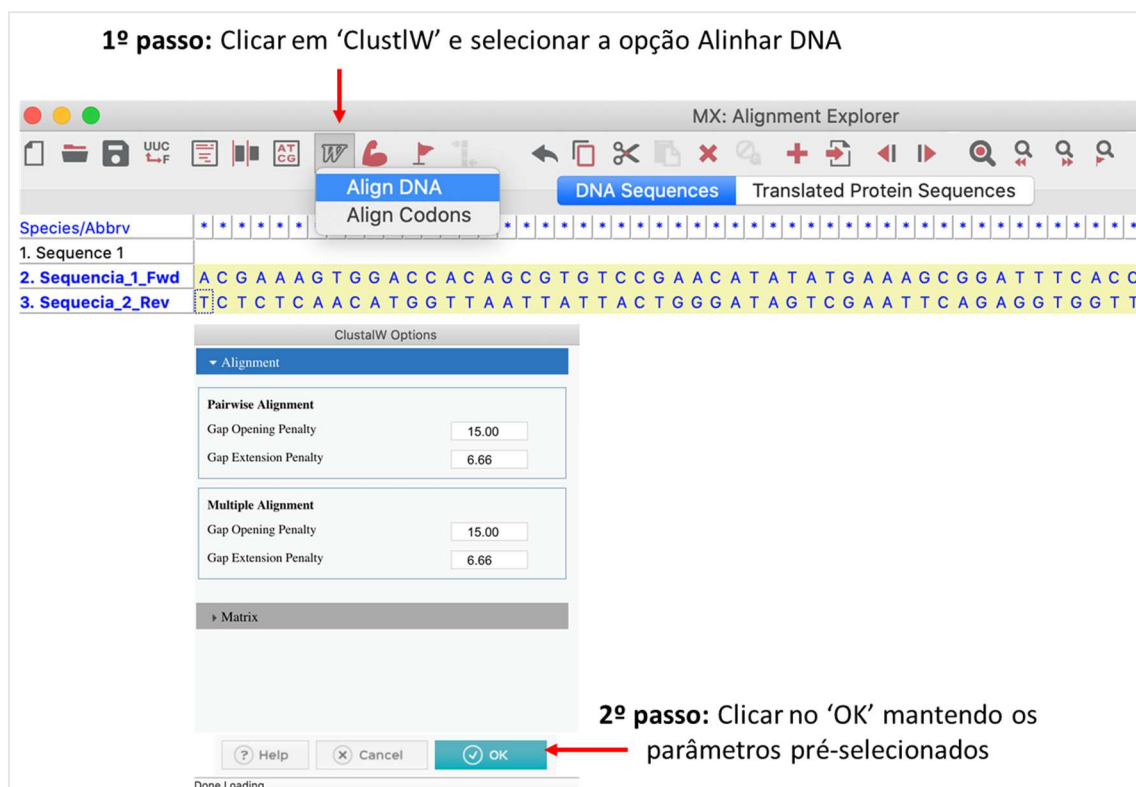


Figura 16. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação das sequências selecionadas bem como a indicação de alinhamento das sequências.

2. Antes de iniciar a procura de sequências homólogas no 'GenBank', deve ser criada uma sequência única 'Contig', que é a junção das sequências 'forward' e 'reverse'. Assim, e após o alinhamento das duas sequências, deve-se:
 - Selecionar na sequência 'reverse' parte da sequência que não está presente na sequência 'forward' (no fim da região 3'), em seguida copiar e colar na sequência 3 (Figura 17 e 18).

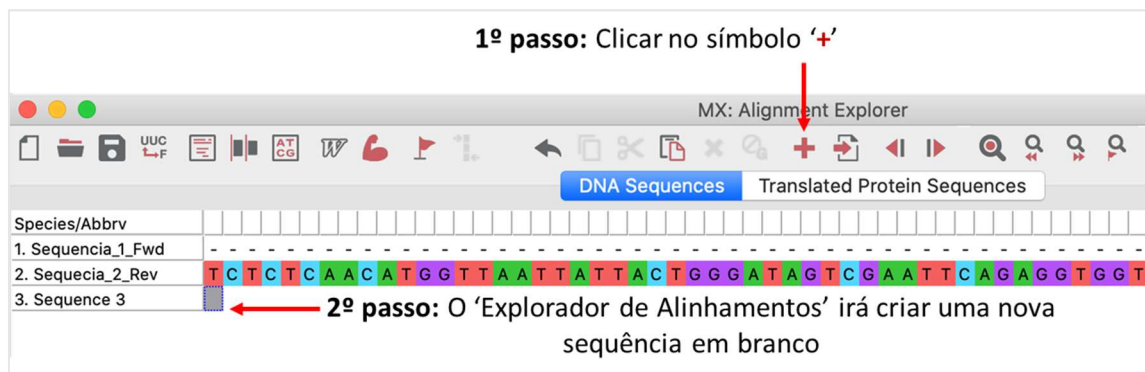


Figura 17. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação da criação da sequência 'contig'.

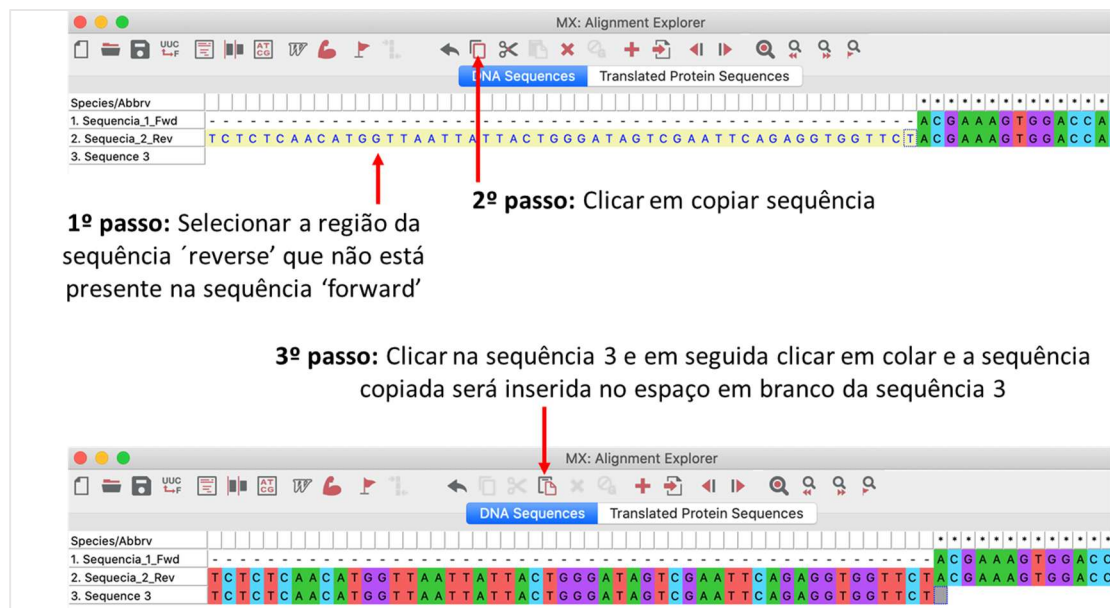


Figura 18. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação da criação da sequência 'contig' na região 3'.

- Montar o restante da sequência 'contig', à semelhança do passo anterior, no entanto deve-se selecionar e copiar toda a sequência 'forward'. Para colar deve-se clicar no primeiro espaço em branco logo após o último nucleótido da sequência 3 e em seguida clicar no botão colar (Figura 19).

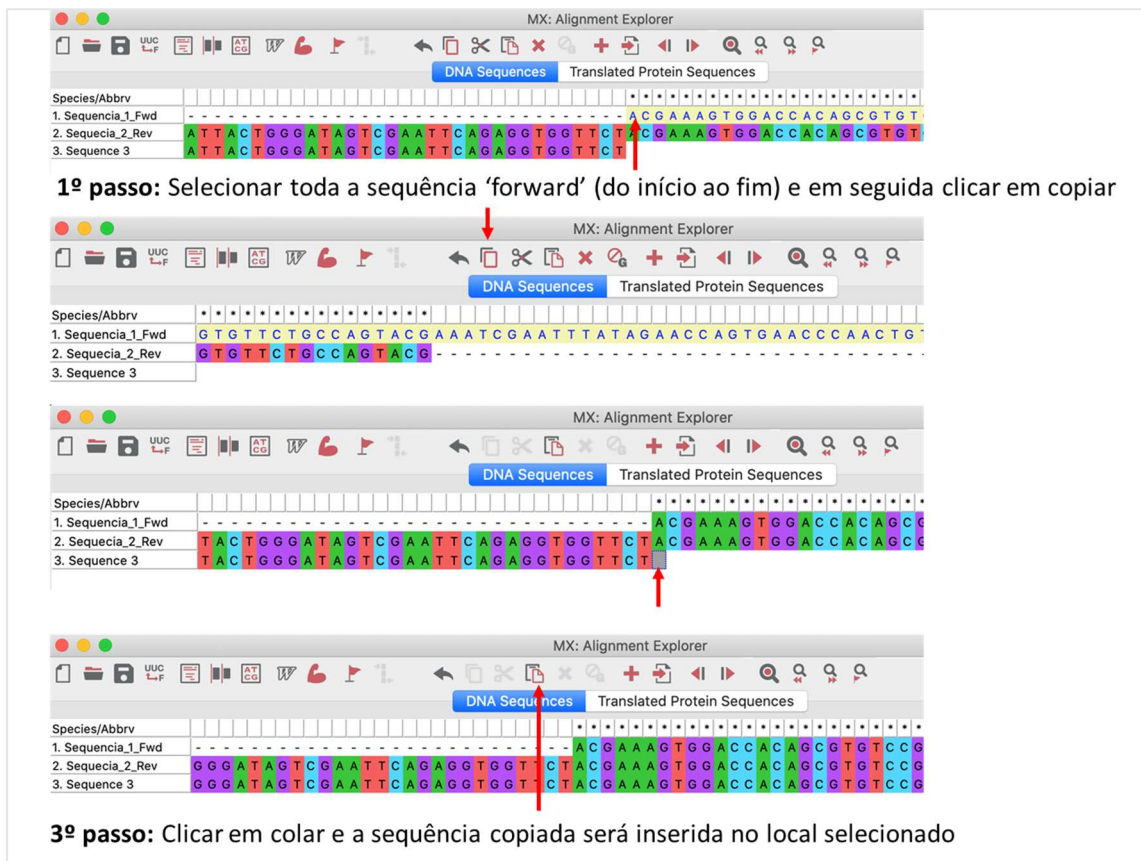


Figura 19. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação da criação da sequência 'contig' na região 5'.

V – Procura de alinhamento na base de dados 'GenBank'

1. Com a sequência 'contig' pronta (junção das sequencia 'forward' e 'reverse'), selecionar e copiar o 'contig' para o site BLAST da NCBI e clicar em 'Nucleotide BLAST' (Figura 20).

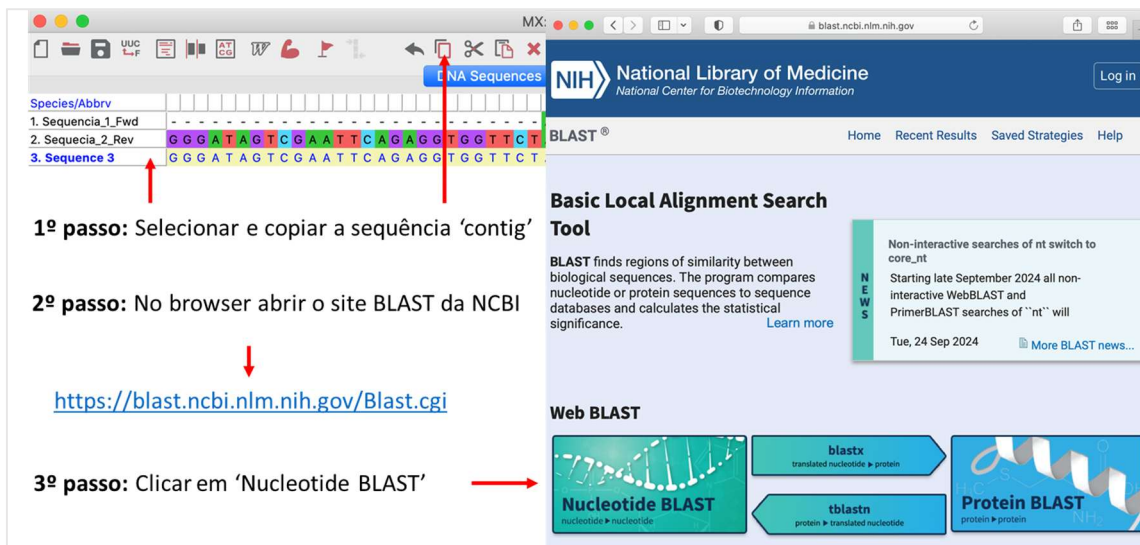


Figura 20. Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação para a procura de sequências homólogas na base de dados GenBank através da ferramenta básica de alinhamento local, BLAST, do 'National Center for Biotechnology Information (NCBI)'.

2. A sequência 'contig', que foi copiada no passo anterior, deve ser copiada para o campo específico.

- Apagar toda a informação que não são nucleótidos,
- Manter todos os parâmetros pré-selecionados,
- Clicar em BLAST.

Neste momento o software irá procurar por sequência homólogas ao contig na base de dados 'GenBank'.

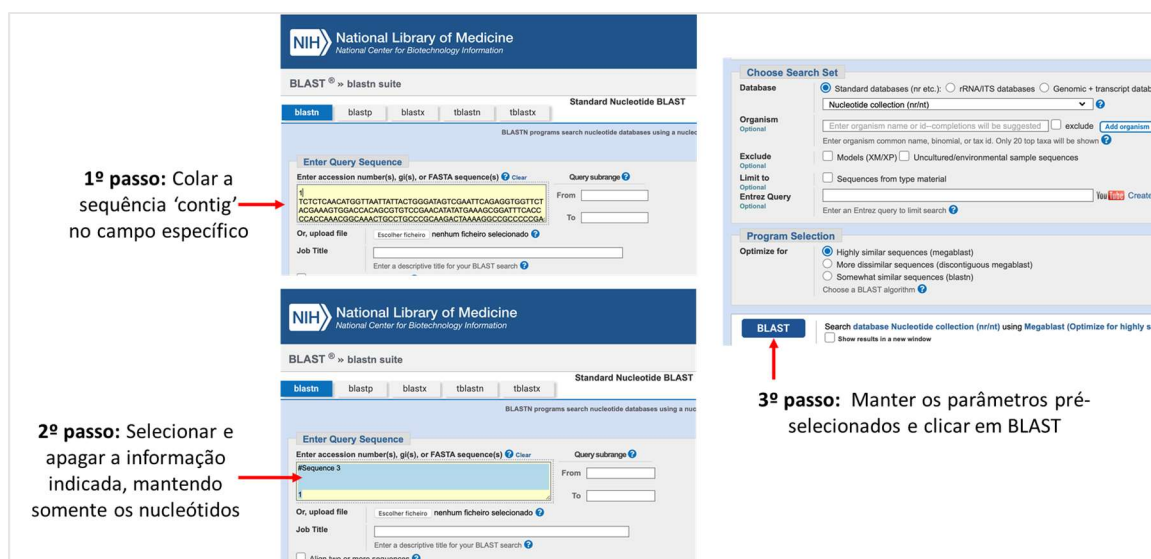


Figura 21. Interface da ferramenta básica de alinhamento local, BLAST, do 'National Center for Biotechnology Information (NCBI)' com a indicação dos parâmetros para a procura de sequências homólogas na base de dados 'GenBank'.

3. O resultado será apresentado com as espécies com maiores homologias com o nosso vírus, seguido de toda a informação necessária, incluindo o nome científico e o número de acesso.

Descriptions									
Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100 ?									
select all 32 sequences selected									
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	O resultado da procura vai listar em 'Description' as maiores homologias encontradas na base de dados	O resultado da procura vai listar o Nome científico dos "organismos" com maior homologia	1485	1485	98%	0.0	99.63%	813	
☒			1483	1483	100%	0.0	98.80%	3702	
☒			1480	1480	98%	0.0	99.38%	813	
☒			1480	1480	98%	0.0	99.51%	813	
☒			1480	1480	98%	0.0	99.51%	813	
☒			1469	1469	98%	0.0	99.26%	813	
☒			1463	1463	98%	0.0	99.14%	813	
☒			1461	1461	98%	0.0	98.89%	813	

Figura 22. Interface da ferramenta básica de alinhamento local, BLAST, do 'National Center for Biotechnology Information (NCBI)' com os resultados obtidos após procura de seqüências homólogas na base de dados 'GenBank'.



Dicas

- ✓ Quando abrimos o 'Explorador de Sequências', este cria automaticamente uma seqüência em branco (sem nucleótidos), neste caso podemos apagar esta seqüência (Sequence 1 na figura anterior). Para isso, clicar na 'Sequence 1' e em seguida na opção **X**, e a seqüência será apagada.

REFERÊNCIAS:

Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol. Biol. Evol. 2018, 35, 1547–1549.

Benson, D.A.; Cavanaugh, M.; Clark, K.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D.J.; Ostell, J.; Sayers, E.W. GenBank, Nucleic Acids Research. 2013, 41, (D1), D36–D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>

PROTOCOLO 6 – 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 realizar 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
- Espectrofotômetro
- 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*

PROTOCOLO EXPERIMENTAL:

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

1. Marcar as colunas com a numeração das amostras e marcar os tubos de 1,5 mL que correspondem 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 *g*.
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 *g*. 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 suavemente.
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 *g*.
3. Colocar a coluna num novo tubo coletor.
4. Adicionar 600 µL de *wash buffer* II.
5. Centrifugar 30 seg a 11000 *g*.

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 *g*.
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 *g*.
10. Centrifugar 1 min a 11000 *g*.

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

1. Aplicar os reagentes em cada poço da placa de reação do qPCR.

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

2. Após a aplicação de todos os reagentes e amostras nos respectivos poços, selar a placa, centrifugar a 7000 rpm durante 1 min e colocar no equipamento de PCR em tempo real para o início da reação.

VI - Programa de amplificação

Programar previamente no equipamento de PCR em tempo real com 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 diminuí 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.