

## **17. Clonagem de vírus por ensaio de placa**

1. Preparar células em placas de 6 cavidades em quantidade suficiente para formar um tapete confluyente em 16-18h, nunca infectar células preparadas no mesmo dia.
2. Remover o sobrenadante e inocular o vírus 250µL/poço.
3. Adsorver o inóculo durante 1-2h em estufa de CO<sub>2</sub>. Agitar a placa levemente a cada 15 minutos durante o período de adsorção.
4. Preparar a solução de ágar à 1% (ver Reagente e Soluções). Utilize 2mL da solução de ágar por poço, total de 12 mL por placa.
5. Aquecer o MEM 2x + soro no banho-maria à 37°C, e a solução de ágar à 2% no microondas até estar completamente solubilizado, resfriar no banho-maria à 37°C ou a temperatura ambiente.
6. Agitar para misturar e incubar no banho-maria à 37°C. Com auxílio de termômetro limpo com álcool, monitorar a temperatura da solução até atingir 38°C ou 37°C.
7. Remover o inóculo, pode-se pipetar ou simplesmente desprezar em uma placa com álcool, cuidando com a contaminação entre placas e poços.
8. Adicionar 2mL da solução de gel à 1% por poço.
9. Incubar as placas em temperatura ambiente até o gel solidificar.
10. Transferir a placa para a estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C e monitorar o aparecimento de efeito citopático.
11. Pela visualização direta das placas ou com auxílio do microscópio selecionar as placas desejadas.
12. Com auxílio de uma ponteira estéril, pipetar o ágar e o tapete ao redor da placa. Desprezar o conteúdo aspirado em um microtubo contendo 100µL de MEM + 5% soro.
13. Utilizar esta solução como inóculo em placas de 6 ou 24 cavidades ou garrafas T-25 com uma monocamada celular pré-formada.
14. Monitorar o aparecimento de efeito citopático.

**Reagentes e Soluções:**

1. Solução de Ágar 2%

Reagentes	Quantidades
Ágar Noble*	2g
Água Bi-destilada, ultrapura	100mL

\*Caso seja utilizado o **agar de baixo ponto de fusão**, a solução pode ser preparada previamente, sendo que para manter o agar dissolvido é importante colocar o frasco em banho-maria a 37 °C. Depois de adicionar a solução de agar + meio + soro na placa, colocar a placa por 10min a 4°C para solidificar e, em seguida, colocar a placa na estufa.

2. MEM 2X (ver “Meios de Cultivo Celular”)  
(Não confundir com o meio 2X antibiótico)

3. Solução de Ágar 1%

Reagentes	Quantidades
Ágar 2% (resfriado à 42°C)*	6mL
MEM (2x)	5,4mL
Soro	600µL

\*Se usar agar de baixo ponto de fusão, ele pode estar a 37 °C.

**OBS.:**

- Ágar 2%: utilizar Água Bi-destilada ou Miliq, aquecer em microondas até completa solubilização, agitando algumas vezes sem deixar ferver.
- Armazenar na geladeira em um frasco identificado e bem fechado.