

16. Ultracentrifugação de vírus

*****Lembrete:** a ultracentrífuga é um equipamento muito caro e com custo de manutenção elevado. Não deixe de pedir auxílio para alguém que tenha experiência na utilização do equipamento;

16.1 Ultracentrifugação com colchão de sacarose

1. Ligar a centrífuga com antecedência para que alcance a temperatura a 4 °C;
2. Preparação dos tubos: acondicionar os tubos próprios da ultracentrífuga em um Becker tampando o mesmo com folha de alumínio sem vedar totalmente. Autoclavar e guardar até a utilização (menor tempo possível);
3. Adicionar aproximadamente 20 mL da suspensão viral por tubo;
4. Com agulha longa, adicionar cuidadosamente no fundo cada tubo 8 mL de solução de sacarose 36% (sacarose autoclavada);
5. Igualar o peso dos tubos na balança de precisão (a diferença entre o peso dos tubos deve ser menor que 0,01 g). De preferência, deixar o peso entre os tubos exatamente iguais;
6. Configurar a centrífuga com o protocolo desejado, por exemplo: 25.000 RPM por 2 h 30 min.
7. Ao final da centrifugação, abrir os tubos dentro da capela de fluxo laminar, desprezar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em MEM ou PBS;