

## **49. Extração de DNA viral**

1. Prepare três garrafas T-150 (garrafas grandes de plástico), inocule com o vírus desejado, monitore o CPE até atingir 80-90%,
2. Coletar o sobrenadante, não utilizar as células para evitar contaminação do DNA com proteínas celulares,
3. Centrifugar à 3.000 rpm durante 10 minutos à 4°C para remover os restos celulares,
4. Prepare uma solução de sacarose 25% em TEN, esterilize por filtração e mantenha estéril,
5. Adicionar 9mL do sobrenadante contendo vírus. Com auxílio de uma agulha comprida e seringa adicione no fundo do tubo 1mL da solução de 25% sacarose. Sempre mantenha a quantidade 10% do volume total de sacarose.
6. Equilibrar os tubos na balança digital, ajuste para o peso ficar próxima na segunda casa decimal. Caso necessário adicione ou retire MEM.
7. Centrifugar à 70.000xg durante 2 horas à 4°C. Na ultracentrífuga do Depto. Química/UFSM é mais ou menos 35.000 rpm.
8. Usar pipeta para descartar o sobrenadante, cuidando para não desfazer o pellet.
9. Drenar o excesso de meio com auxílio de uma ponteira,
10. Ressuspender o pellet dos tubos em 400µL de TEN. Utilizar 200µL no primeiro tubo, passar para o segundo e assim por diante. Novamente adicionar 200µL no primeiro tubo e passar adiante. A idéia é ressuspender o pellet e lavar o tubo para obter uma maior quantidade de partícula/DNA. Cuidado na ressuspensão, não agitar muito, pois isso poderá produzir um DNA de baixa qualidade.
11. Coletar o volume usado para ressuspensão em um microtubo (limpo e esterilizado e livre de DNase e RNase).
12. Adicionar 20µL de 10% SDS e 2µL de Proteinase K (20mg/mL), misturar levemente e incubar durante 1h à 37°C sob constante agitação.
13. Adicionar 25µL de NaCl 2.5M e 400µL de fenol/clorofórmio, realizar um rápido vórtex para misturar e agitar levemente à temperatura ambiente durante 5 minutos.

14. Centrifugar na velocidade máxima (14.000 rpm) durante 5 minutos em temperatura ambiente.
15. Transferir o sobrenadante para um tubo novo, cuidando para não contaminar com fenol. A fração próxima da interface é onde se encontra o DNA de maior peso molecular. Cuidado para não pipetar a interface, camada mais clara. Usar pipetador e aspirar 50µL de cada vez, isso evita a contaminação com fenol e “quebra” do DNA.
16. Geralmente o sobrenadante fica turvo/leitoso, para reverter isto aquecer o tubo com a mão.
17. Adicionar 1000µL de etanol 100% (resfriado à -20°C) e precipitar o DNA 30 minutos à -20°C ou -70°C. Opcionalmente, pode-se adicionar 1:10 do volume de 3M de acetato de potássio (3M KAc).
18. Centrifugar à 14.000 rpm durante 45 minutos à 4°C.
19. Remover etanol com auxílio de pipeta, centrifugar rapidamente e retirar excesso de etanol com auxílio de pipeta.
20. Ressuspender o pellet com 50µL de TE + RNase (10mg/mL) estéril (previamente aquecido à 37°C).
21. Avaliar presença do DNA e pureza com auxílio de espectrofotômetro e eletroforese em gel de 0.6%.

**OBS.:**

- Podem-se realizar três extrações com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, e duas extrações com éter.

**Reagentes e Soluções:**

1. TEN (Tris/EDTA/NaCl)

Reagente	Concentração final (mmol)
Tris-HCl (pH 8.0)	10mM

EDTA (pH 8.0)	1mM
NaCl	100mM

2. NaCl à 2.5M

3. Etanol:

- Etanol 100%
- Etanol 95%
- Etanol 70%

4. TE (TRIS/EDTA):

Reagente	Concentração final (mmol)
Tris-HCl (pH 7.4)	100mM
EDTA (pH 8.0)	10mM

\*Pode ser esterilizada na autoclave durante 15 minutos.

5. EDTA ( 200mM)

Pesar EDTA; adicionar H<sub>2</sub>O, o pó somente se dissolverá quando o pH ~ 8,0, para isso adicione NaOH. Não utilize a solução de NaOH e sim o NaOH puro.

6. Proteinase K (solução estoque - 20mg/mL):

- Dissolva o pó, que está na concentração de 100mg, em 5mL da solução contendo 50mM Tris-HCl (pH8,0) e 1.5mM acetato de cálcio;
- Prepare alíquotas e estoque à -20°C;

\*Congelamento e descongelamento pode afetar a atividade.

7. Sacarose 25% (estéril):

<b>Reagentes</b>	<b>Quantidades</b>
TEN	50mL
Sacarose	12,5g

\*Após a dissolução da sacarose, esterilize a solução por filtração.