



PCR para amplificação de genes de ranavírus

- Amplificações com a Xpert Fast Hotstart Mastermix with dye 2X (Grisp) de 4 amostras de DNA viral + 1 amostra de controlo negativo da reação de PCR (**Total de 5 amostras**).
- Misturas de reação de **8 µL: 6 µL de master mix + 2 µL de DNA molde**.

Master mix de **40 µL (5 x 8 µL)**:

Xpert Fast Hotstart Mastermix 2X	20 µL
Primer Forward (F)	2 µL
Primer Reverse (R)	2 µL 4 µL F+R
(DNA molde)	5 µL
H ₂ O	11 µL (até 40 µL)

Distribuir **7 µL/tubo** e adicionar **1 µL** de DNA

Condições de amplificação:

95°C, ∞

95°C, 3 min.

35 cycles:

- 95°C, 15 sec.
- 45°C, 15 sec,
- 72°C, 30 sec

72°C, 3 min

12°C, ∞

Regiões a amplificar	Primers	Amplicação (bp)	TM (°C)
<i>Ranavirus Major capsid protein gene</i> ¹	OLT1/OLT2R	500	45
<i>Ranavirus Putative virulence factor</i> ¹	Vif 2aF/Vif2aR	247 ou 1050	45
<i>Ranavirus DNA polimerase</i> ¹	DNApol-F/DNApol-R	560	47

¹ – Stöhr A.C., López-Bueno A., Blahak S., Caeiro M.F., Rosa G.M., Alves de Matos A.P., Martel A., Alejo A., Marschang R.E. (2015). Phylogeny and Differentiation of Reptilian and Amphibian Ranaviruses Detected in Europe. *PLoS ONE*, 10 (2): e0118633. DOI:10.1371/journal.pone.0118633. (<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0118633>)