



Extração de DNA de Partículas Virais

Na câmara de fluxo laminar (já executado)

- A) Colocar em tubo de centrífuga 11,2 mL de suspensão viral (vírus extracelular clarificado) dos seguintes *Ranavirus*: **FV3, 2000, LMR, BoA**.
- B) Sedimentar durante 1,5 h a 40 000 *g* e ressuspender em 180 µL de PBS-A. No dia seguinte, reunir num único tubo, as duas amostras de cada vírus (80X concentrado em relação ao volume de vírus extracelular centrifugado).
(manter a 4°C até utilização para extração de DNA)
- C) Colocar em microtubos as de vírus concentrado.

Na câmara de fluxo laminar (Aulas)

180 µL de partículas virais + 20 µL Proteinase K a 20 mg/mL + 200 µL de tampão K1 (JETQUICK protocol for the purification of DNA).

Na bancada (Aulas)

Incubar durante 10 minutos a 58°C.

Proceder de acordo com os passos do protocolo do kit **JETQUICK protocol for the purification of DNA**, apresentados no final deste documento.

No passo 11, eluir o DNA em 100 µL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,5.

Manter as amostras de DNA a 4°C.

Após extração de DNA

- Aplicar 10 µL de DNA viral (adicionado a 2 µL de tampão de amostra 6X) em gel de agarose a 0,7% corado com EtBr. Submeter a 100 V durante 30 minutos e visualizar em transiluminador de U.V.
- Retirar amostras de 1 µL de cada amostra de DNA viral para quatro tubos de PCR, e proceder de acordo com o protocolo “Amplificação por PCR”.