

Inicialmente, o gel a ser transferido foi imerso em tampão de transferência 1X por 15 min.

Para a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose Hybond C (Amersham), através do sistema de transferência semi-seca com eletrodos de grafite, um conjunto de papéis de filtro (geralmente cinco) embebidos em tampão de transferência 1X foi colocado sobre o eletrodo inferior do aparelho. Sobre este último foi colocada a membrana de nitrocelulose (cortada nas mesmas dimensões do gel) molhada no tampão de transferência 1X, e sobre ela o gel sobreposto de outro conjunto de papéis filtro úmidos. O sistema foi então coberto com o eletrodo superior e uma corrente elétrica de $0,9 \text{ mA/cm}^2$ aplicada por 1 h e 30 min. Para controle da transferência, utilizamos o marcador *Multimark*[®] ou *BlendMark*[™] (Invitrogen) no gel, já que as suas bandas coloridas na membrana indicam que a transferência foi feita.

19) Ensaio imunogênico *Western Blotting*:

Foram seguidos dois protocolos diferentes para a realização deste ensaio. Nos dois métodos foi utilizado para o ensaio de detecção um anticorpo primário policlonal contra a renina produzido em coelho e um secundário de cabra anti-imunoglobulina de coelho conjugado à peroxidase.

No primeiro método, a membrana de nitrocelulose contendo as proteínas foi incubada por 12 h com solução bloqueadora a 4°C para bloquear sítios de ligação não específicos, sob agitação lenta, lavada em PBS T 1X e a seguir, imersa em solução de PBS 1X contendo uma diluição de 1:5.000 do anticorpo primário. A incubação foi feita a 4°C por 4 h, sob agitação. Após esta etapa, a membrana foi lavada três vezes em PBS T 1X e imersa em solução PBS 1X contendo uma diluição 1:5.000 do anticorpo secundário, sendo mantida sob agitação a 4°C por 2 h. Uma última lavagem da membrana foi feita com PBS T 1X para retirar anticorpos não ligados e a reação do complexo foi detectada através da imersão da membrana em solução reveladora para *western blotting*. A membrana foi incubada na solução reveladora preparada até que as bandas desejadas obtivessem a coloração necessária. A reação foi parada lavando a membrana várias vezes com água destilada.

No segundo método, a membrana de nitrocelulose contendo as proteínas, foi incubada por 12 h em solução bloqueadora a 4°C para bloquear sítios de ligação não específicos. A solução bloqueadora foi descartada e a membrana submersa em solução 1:1.000 do anticorpo primário (5 µL do anticorpo primário em 5 mL de solução bloqueadora 5%). A incubação foi feita a 4°C *overnight*. Após esta etapa, a solução contendo o anticorpo primário foi descartada

e a membrana foi lavada três vezes em TBS T 1X por 5 min. a temperatura ambiente sob agitação. A membrana foi imersa em solução TBS T 1X contendo uma diluição 1:3.000 do anticorpo secundário, sendo mantida sob agitação a temperatura ambiente por 2 h. A solução contendo o anticorpo secundário foi descartada. A membrana foi novamente lavada três vezes com TBS T 1X por 5 min. a temperatura ambiente para retirar anticorpos não ligados e uma última lavagem com PBS 1X por 10 min. foi feita para remover o Tween-20 da superfície da membrana. Os complexos foram visualizados utilizando-se o substrato do kit de revelação por quimioluminescência da Biorad. A membrana foi colocada sobre filme plástico (papel filme de PVC) e sobre ela foi colocado 1 mL de substrato (Immun-Star Substrate da Biorad). O papel filme foi fechado envolvendo a membrana e a reação do complexo foi detectada através de filme de raio X. A membrana foi colocada em contato com filme apropriado de raio X (Filme X-OMAT Kodak) no cassete (cassete com tela amplificadora) a temperatura ambiente. Após a exposição de 1, 10 e 20 min., o filme foi revelado (Revelador Dektol da Kodak), fixado (Fixador Kodak) e analisado.

20) Ensaio imunogênico *Dot blot*:

Foi feita a aplicação direta de 2 µL de cada amostra a ser analisada por esta técnica em membrana de nitrocelulose. Após a secagem das amostras na membrana, ela foi incubada com solução bloqueadora a temperatura ambiente *overnight* sob agitação lenta para bloquear sítios de ligação não específicos. Foram feitas duas lavagens na membrana de 20 min. com PBS T 1X e uma lavagem por 20 min. com PBS 1X. A seguir, a membrana foi imersa em solução de PBS 1X contendo uma diluição de 1:200 do anticorpo primário anti-renina. A incubação foi feita a temperatura ambiente por 2 h, sob agitação. Após esta etapa, a membrana foi novamente lavada duas vezes em PBS T 1X por 20 min. e uma vez por 20 min. com PBS 1X. A membrana foi imersa em solução PBS 1X contendo uma diluição 1:2.000 do anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho conjugada à peroxidase, sendo mantida sob agitação a temperatura ambiente por 1 h. Uma última lavagem da membrana foi feita com PBS T 1X para retirar anticorpos não ligados e a reação do complexo foi detectada através da imersão da membrana em solução reveladora para *western blotting*. A membrana foi incubada na solução reveladora preparada até que as bandas desejadas obtivessem a coloração necessária. A reação foi parada lavando a membrana com água destilada.

21) Isolamento de clones virais por *plaque assay*:

Para obtenção de um único clone viral, foi feita a infecção de cultura de células e a imobilização delas por meio sólido. Assim, cada placa de infecção formada seria proveniente de uma única partícula viral, não se difundindo para as outras células.

Foi utilizado o procedimento descrito por Lee & Miller (1978) com algumas modificações. Células foram sedimentadas numa concentração de 2×10^6 células/placa de 60 mm seguida de incubação por 1 h a 27°C. Cinco diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) do estoque viral foram preparadas em meio TNMFH completo. O meio foi aspirado das placas com monocamada de células, as quais, em seguida, foram infectadas com 1 mL de cada diluição viral e incubadas por 1 h com agitação a cada 10 min. A solução de agarose para *plaque assay* foi preparada e resfriada até atingir 37°C. O inóculo viral foi retirado e 4 mL da solução de agarose foram colocados sobre as células. Após solidificação do meio, as células foram incubadas a 27°C por 4 dias, quando foram coletadas as placas de vírus com o auxílio de ponteiros cortadas. Cada placa coletada foi então suspensa em 1 mL de meio TNMFH com soro para posteriormente ser utilizada como inóculo em nova placa de 60 mm, ou seja, para novo ensaio de *plaque assay*. Um total de três ensaios de *plaque assay* consecutivos foram feitos para purificar o vírus recombinante.

22) Amplificação viral (segundo O'Reilly *et al.*, 1992):

O vírus parental (vSyn VIgal) e os recombinantes vRen e vRenbac, foram amplificados em cultura de células de inseto Sf21 e High five.

Para o vírus vSyn e o vRen, inicialmente um clone do vírus foi purificado através de três experimentos de *plaque assay* consecutivos, a partir de um estoque viral. Para o vírus parental este procedimento tinha por finalidade selecionar o vírus diminuindo, portanto, o risco de possíveis mutações do vírus decorrente de passagem serial em cultura de células. Para o vírus recombinante vRen o objetivo era a seleção de placas ocluso positivas eliminando, portanto, vírus sem o inserto desejado.

As células foram então semeadas em placas de 35 mm, numa concentração de 1×10^6 células/placa. Após período de aderência das células à placa, o meio das células foi retirado e elas foram incubadas por 1 h com o inóculo viral. Em seguida, o inóculo foi removido, foi adicionado 1 mL de TNMFH com soro por placa e as células foram mantidas em incubadora a 27°C por 3 dias. O sobrenadante foi coletado, centrifugado e mantido a 4°C. Outro método de amplificação utilizado foi a inoculação de 1 mL do inóculo viral em células semeadas em

frascos T-25 (concentração de 1×10^6 células/frasco), com manutenção a 27°C pelo mesmo período.

23) Infecção de lagartas com os vírus recombinantes através de injeção intrahemocélica:

Para infecção de lagartas através de injeção do vírus com microseringa foram utilizadas lagartas de *Spodoptera frugiperda* e de *Anticarsia gemmatalis*.

Foram utilizados 5 copinhos com lagartas controles que receberam a injeção de água destilada (controle negativo), 10 copinhos com lagartas infectadas com o vírus selvagem AcMNPV-L1 (controle positivo), 30 copinhos com lagartas infectadas com o vRen e 30 copinhos com lagartas infectadas com vRenbac para cada linhagem. Primeiramente, copinhos plásticos de 50 mL a serem utilizados no ensaio para separar as lagartas foram esterilizados no fluxo laminar sob luz UV. Em cada copo foi colocado um pedaço de dieta artificial (Greene *et al.*, 1976 modificada por Hoffmann *et al.*, 1985), cerca de 1 cm^3 , para alimentação das larvas. As lagartas a serem infectadas foram então colocados sobre gelo até ficarem imóveis. As lagartas foram infectadas com aproximadamente 10 μL do vírus por meio de injeção direta com agulha de insulina (microseringa) na hemocele. As lagartas após a injeção foram alojadas nos copinhos contendo dieta artificial (duas ou três lagartas/copo). As lagartas foram mantidas em estufa incubadora B.O.D., com temperatura de 27°C e fotoperíodo de 14 h até sua morte. Após a morte das lagartas elas foram armazenadas a -20°C.

24) Infecção de lagartas com o vírus recombinante vRen através de ingestão oral:

Para infecção de lagartas através de ingestão oral com o vírus recombinante vRen foram utilizadas lagartas de *Spodoptera frugiperda* e de *Anticarsia gemmatalis*.

Foram utilizados 4 copinhos com lagartas controle negativo (não tiveram sua dieta inoculada), 10 copinhos com dietas inoculadas com o vírus selvagem AcMNPV-L1 (controle positivo) e 26 copinhos com dietas inoculadas com o vRen para cada linhagem.

Primeiramente, copinhos plásticos de 50 mL a serem utilizados no ensaio para separar as lagartas foram esterilizados em fluxo laminar sob luz UV. Em cada copo foi colocado um pedaço pequeno de dieta artificial (cerca de 1 cm^3) para alimentação das larvas. Sobre cada dieta foram aplicados 100 μL do vírus. As lagartas foram alojadas nos copinhos contendo dieta artificial (duas ou três lagartas/copo). As lagartas foram mantidas em estufa incubadora B.O.D., com temperatura de 27°C e fotoperíodo de 14 h até sua morte. Após a morte das lagartas elas foram armazenadas a -20°C.

25) Preparação de células para microscopia eletrônica:

Para a visualização de alterações estruturais após a infecção com os vírus recombinantes, as células foram tratadas para microscopia eletrônica. Para isso, as células em frascos T-25 (1×10^6 células) foram infectadas com 100 μ L do vírus recombinante e 3 dias após a infecção elas foram removidas e transferidas para tubo Falcon de 15 mL. O tubo foi centrifugado a 2.000 rpm por 3 min. em centrífuga clínica de bancada (Centra MP4R da International Equipment Company). O *pellet* celular foi ressuspenso em 1 mL de PBS (pH 6,8) e transferido para *ependorf*. Foi feita a centrifugação a 3.000 rpm por 1 min. e o *pellet* então ressuspenso em 1 mL de fixador para microscopia eletrônica.

26) Preparação de poliedros para microscopia eletrônica:

Para visualizar com maior detalhamento a presença de vírions nos corpos de oclusão presentes nas células infectadas com o vírus vRen, foi feito o isolamento dos poliedros segundo método descrito por O'Reilly *et al.* (1994) com algumas modificações.

Frascos T-75 contendo $1,5 \times 10^7$ células (High five e Sf21) foram incubados com o vRen e após três dias as células foram coletadas em tubo Falcon de 50 mL. As células foram sedimentadas por centrifugação a $1.000 \times g$ por 5 min. a temperatura ambiente (Centra MP4R da International Equipment Company). O sobrenadante foi coletado e armazenado a 4°C para posteriormente ser utilizado em infecções e o *pellet* celular foi ressuspenso em 5 mL de SDS 0,5%. O tubo foi centrifugado a $5.000 \times g$ e o precipitado ressuspenso no mesmo volume de NaCl 0,5 M. Os poliedros foram sedimentados e ressuspendidos em 1 mL de fixador para microscopia eletrônica.

27) Processamento de amostras para análise em microscópio eletrônico:

A amostras foram processadas conforme Haddad *et al.*, 1998. As amostras foram fixadas em fixador para microscopia eletrônica por 2 h, ou mantidas no fixador a 4°C, e pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferricianeto de potássio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,3) e 5 mM de cloreto de cálcio durante 1 h. Em seguida, foi realizada a contrastação *in block* com acetato de uranila 0,5% *overnight*. A desidratação foi realizada em gradiente crescente de acetona (30 a 100%) e a inclusão em resina *Spurr*. Após a ultramicrotomia, as seções ultrafinas foram contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo. O material foi analisado e fotografado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia do Departamento de Biologia Celular da UnB em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011.

Métodos específicos para a construção dos baculovírus recombinantes

1) Purificação do gene da pré-pró-renina

1.1) Confirmação do plasmídeo pRHR1100:

Para confirmar que o pRHR1100 contém realmente o gene da pré-pró-renina, foi feita a PCR do plasmídeo utilizando os *primers* internos da pré-pró-renina Ren *forward* e Ren *reverse*.

1.2) Amplificação e purificação do plasmídeo pRHR1100:

Como o pRHR1100 foi necessário para várias confirmações e para a retirada do gene da pré-pró-renina, este plasmídeo foi amplificado crescendo o inóculo em 500 mL de meio LB Amp⁺ e para sua purificação foi utilizado o método de maxiprep por lise alcalina.

1.3) Retirada do gene da pré-pró-renina do pRHR1100:

O plasmídeo pRHR1100, inicialmente cedido, apenas oferece uma forma de retirar o gene da pré-pró-renina, utilizando os sítios de restrição *Bam* HI e *Hind* III. Este fato dificulta a inserção da renina nos plasmídeos disponíveis para a expressão em baculovírus, já que os mesmos não possuem estes sítios na seqüência adequada e, por isso, foi decidido inserí-lo no plasmídeo pBS que oferece várias opções de sítios para a retirada do gene. Para retirar o gene da pré-pró-renina do pRHR1100, foi feita uma dupla digestão do plasmídeo com as enzimas *Bam* HI e *Hind* III.

1.4) Purificação do gene da pré-pró-renina:

Para purificar o gene da pré-pró-renina liberado foi utilizada a recuperação da banda do tamanho esperado por eletroforese em gel de agarose *low melting point*.

2) Amplificação do gene da pré-pró-renina após clonagem em pBluescript

2.1) Clonagem da pré-pró-renina em pBluescript:

Cerca de 500 ng do plasmídeo pBS foram linearizados com as enzimas *Bam* HI e *Hind* III. Após confirmada a pureza do vetor (pBS) linearizado e do inserto (pré-pró-renina), a ligação dos dois foi feita utilizando-se uma proporção 3:1 de fragmento amplificado (inserto) para pBluescript (vetor), com a concentração de DNA abaixo de 300 ng, em um volume de 10 µL. A incubação foi feita com 2 U de enzima T4 ligase (BRL), a 14°C por 16 h.

Após transformação em células competentes XL-1 blue e plaqueamento em meio seletivo (ampicilina, na presença de x-gal e IPTG), várias colônias brancas foram obtidas. Através de “mini-preps” as colônias foram purificadas e o perfil do DNA plasmideal (pBSRen) foi analisado por digestão com as enzimas *Bam* HI e *Hind* III (10 U/µL).

2.2) Amplificação, purificação e seqüenciamento do plasmídeo pBSRen:

Para a retirada do gene da pré-pró-renina foi necessária uma grande quantidade deste plasmídeo, portanto, após a confirmação dos clones obtidos, o pBSRen foi amplificado através do crescimento da colônia em meio LB e purificado através de maxiprep por lise alcalina. Além disso, uma alíquota do plasmídeo foi enviada para seqüenciamento na plataforma genômica do CENARGEN – Embrapa. O seqüenciamento foi feito utilizando os *primers* T7 *promoter* e T3.

3) Construção de vírus recombinantes por recombinação homóloga com vírus vSyn VI gal

3.1) Purificação da pré-pró-renina para inserção no sistema de expressão vSyn VI gal:

Cerca de 500 ng do plasmídeo pBSRen foram digeridos com as enzimas *Bam* HI (G↓GATCC) e *Xho* I para a liberação da pré-pró-renina. Para purificar o gene foi feita a eluição da banda após eletroforese em gel de agarose *low melting point* do pBSRen digerido com *Bam* HI e *Xho* I.

3.2) Clonagem da pré-pró-renina no plasmídeo pSynXIV VI⁺X3:

Cerca de 500 ng do plasmídeo pSynXIV VI⁺X3 foram digeridos com *Bgl* II (A↓GATCT) e *Xho* I para linearizá-lo e receber a pré-pró-renina. Após confirmada a linearização do vetor (pSyn) com as duas enzimas e a pureza do inserto retirado do gel (pré-pró-renina), a ligação dos dois foi feita. As ligações foram feitas usando-se uma proporção 3:1 de fragmento amplificado da pré-pró-renina para pSyn, com a concentração de DNA abaixo de 300 ng, em um volume de 20 µL. A incubação foi feita com 1 U de enzima T4 ligase (BRL), a temperatura ambiente por 2 h.

O produto da ligação foi utilizada na transformação de células competentes XL-1 blue e foi feito o plaqueamento em meio seletivo (ampicilina, na presença de x-gal e IPTG), onde várias colônias brancas foram obtidas. Através de “mini-preps”, o perfil do DNA plasmideal foi analisado por digestão com a enzima *Xho* I, para linearização do plasmídeo de cerca de 7,2 Kb. Um clone foi escolhido constituindo-se no novo plasmídeo pSynRen.

3.3) Amplificação e purificação do plasmídeo pSynRen:

Para os ensaios de transfecção e co-transfecção, uma grande quantidade do plasmídeo pSynRen foi necessária, portanto o plasmídeo foi amplificado e purificado através de maxiprep por lise alcalina.

3.4) Co-transfecção do plasmídeo pSynRen com o DNA do vSyn VI gal para produção do vírus recombinante em células de insetos:

A co-transfecção do plasmídeo pSynRen com o DNA do vírus vSyn VI gal, linearizado com *Bsu* 36I, foi feita em células de insetos (Sf21 e High five) em placas de 6-well (corning). A inserção do gene da pré-pró-renina ocorre como resultado de recombinação homóloga desse gene no locus do gene da poliedrina do genoma do baculovírus vSyn VI gal. A confirmação dessa recombinação se dá através da presença de poliedros nos poços co-transfectados. Como controles do ensaio foi feita a transfecção apenas com o DNA do vírus vSyn VI gal, a transfecção apenas com o plasmídeo pSynRen e a infecção com o vírus vSyn VI gal. Para a visualização de formas ocluso positivas (controle positivo) foram feitas infecções com os vírus AgMNPV-2D e AcMNPV-L1. Como controle negativo foram utilizadas as células de insetos sem tratamento (*mock transfected*).

3.5) Infecção celular com o vírus recombinante vRen (P0) em placa de 6 poços:

Os vírus recombinantes obtidos da co-transfecção, então nomeados como vRen (P0), foram coletados e utilizados para infecção de células High five e Sf21 em placas de 6-well (6×10^5 células/mL). Para as duas linhagens foi feita a seguinte seqüência de poços: controle negativo (com células apenas), infecção com AgMNPV-2D (controle positivo) e infecção com o vRen (P0). Para as infecções, o meio de cultura TNMFH foi retirado das células e adicionado 1 mL do vírus correspondente e 1 mL de meio TNMFH com soro. A placa foi acondicionada na incubadora a 27°C. Três dias após a infecção o conteúdo dos poços foram fotografados e coletados em *ependorfs* de 2 mL. Parte das células infectadas (*pellet*) foi enviada para análise em microscopia eletrônica. Outra parte das células infectadas foi utilizada para a purificação de poliedros que também foram enviados para análise em microscópio eletrônico.

3.6) Amplificação do vírus recombinante vRen (P1) em frasco T-25:

Cinco frascos T-25 (Corning) contendo células High five ou Sf21 foram sedimentadas (1×10^6 células) para a amplificação do vírus recombinante vRen (P1). Ao meio de cultura (5 mL) que já havia nas células acondicionadas em cada T-25 foram adicionados 200 µL do sobrenadante com vírus recombinante vRen (P1) coletado da placa de 6-well em que foi feita a infecção com o vírus recombinante. As células foram acondicionadas por 3 dias na incubadora a 27°C, quando foi então coletado todo o conteúdo das T-25 em um tubo falcon de 50 mL.

4) Construção de vírus recombinantes utilizando sistema baculovírus Bac-to-Bac

4.1) Purificação da pré-pró-renina para inserção no pFastBac HTc:

Cerca de 500 ng do plasmídeo pBSRen foram digeridos com as enzimas *Xba* I e *Sal* I para a liberação da pré-pró-renina. Para purificar o gene da pré-pró-renina foi utilizada a recuperação da banda isolada por eletroforese em gel de agarose *low melting point* (eluição da banda) proveniente do pBSRen digerido com *Xba* I e *Sal* I.

4.2) Clonagem da pré-pró-renina no plasmídeo pFastBac HTc:

Cerca de 500 ng do plasmídeo HTc foram digeridos com *Xba* I e *Sal* I para linearizá-lo e receber a pré-pró-renina. Após confirmada a linearização do vetor (HTc) com as duas enzimas e a pureza do inserto retirado do gel (pré-pró-renina), a ligação dos dois foi feita. As ligações foram feitas usando-se uma proporção 3:1 de fragmento amplificado da pré-pró-renina para HTc, com a concentração de DNA abaixo de 300 ng, em um volume de 20 µL. A incubação foi feita com 1 U de enzima T4 ligase (BRL), a temperatura ambiente por 2 h.

O sistema de ligação foi utilizado na transformação de células competentes XL-1 blue e foi feito o plaqueamento em meio seletivo (ampicilina, na presença de x-gal e IPTG), onde várias colônias brancas foram obtidas. Através de “mini-preps”, foram purificados os DNAs plasmideais e seu perfil analisado por digestão com a enzima *Xba* I, para linearização do plasmídeo de cerca de 6,2 Kb. Um clone foi escolhido constituindo-se no novo plasmídeo denominado HTcRen.

Para os ensaios de transfecção e co-transfecção, foi necessária uma grande quantidade do plasmídeo HTcRen, portanto o plasmídeo foi amplificado e purificado através do método de maxiprep por lise alcalina.

4.3) Transformação do HTcRen em células DH10Bac e purificação do bacmídeo recombinante - BacRen:

A transformação do novo plasmídeo HTcRen foi feita em células DH10Bac para que houvesse a transposição da pré-pró-renina com o bacmídeo, que possui DNA de vírus, presente nestas células. Foi feito o plaqueamento das células transformadas em meio LB seletivo (x-gal, IPTG, genta, kan e tetra), onde algumas colônias brancas foram obtidas. Também foi feita a transformação em células DH10Bac do plasmídeo HTc, devendo obter apenas colônias azuis no meio LB sólido seletivo (x-gal, IPTG, genta, kan e tetra) e do pUC19, devendo obter apenas colônias brancas no meio LB sólido seletivo (amp⁺), como controles.

Para garantir a pureza dos clones obtidos por transposição com o bacmídeo, das placas inoculadas com o HTcRen transformado em células DH10Bac, as colônias brancas presentes

na placa, obtida da transformação, foram replaqueadas, assim, dez colônias brancas foram coletadas e replaqueadas em novas placas de meio LB sólido contendo kan, tetra, genta, IPTG e x-gal. As placas foram incubadas *overnight* a 37°C. Uma única colônia que foi confirmada ter um fenótipo branco na segunda placa, foi inoculada em meio LB líquido contendo kan, genta e tetra para amplificar e este material (BacRen) foi purificado utilizando-se o isolamento de DNA do bacmídeo recombinante. Assim, o BacRen foi gerado para ser utilizado em transfecções em células de insetos. A confirmação do bacmídeo recombinante, BacRen, foi feita através da PCR com os *primers* Ren *forward* e *reverse* e dos *primers* M13 *forward* e *reverse*.

4.4) Transfecção do BacRen em células de insetos para produção do vírus recombinante (vRenbac):

A transfecção do bacmídeo BacRen foi feita em células de insetos (Sf21 e High five) sedimentadas em placas de *6-well* (corning). A confirmação da presença do vírus recombinante foi feita através da observação das mudanças nas características morfológicas das células após 4 dias, levando a formação do fenótipo ocluso negativo. Como controle de oclusão positiva foram utilizadas infecções com os vírus AgMNPV-2D e AcMNPV-L1. Como controle negativo foram utilizadas apenas as células de insetos sem tratamento (*mock transfected*).

4.5) Infecção celular com o vírus recombinante vRenbac (P0) em placa de 6 poços:

Os vírus recombinantes obtidos da transfecção do BacRen nas células, então nomeados como vRenbac (P0), foram coletados e utilizados para infecção de células High five e Sf21 em placas de 6 poços (6×10^5 células/mL). Para as duas linhagens foi feita a seqüência de poços: controle negativo (com células apenas), infecção com AgMNPV-2D (controle positivo) e infecção com o vRenbac (P0). Para as infecções o meio de cultura TNMFH foi retirado das células e adicionado 1mL do vírus correspondente e 1 mL de meio TNMFH com soro. A placa foi acondicionada em incubadora a 27°C. Três dias após a infecção o conteúdo dos poços foram fotografados e coletados em *eppendorfs* de 2 mL. Parte das células infectadas (*pellet*) foi enviada para análise em microscopia eletrônica.

4.6) Amplificação do vírus recombinante vRenbac (P1) em frasco T-25:

Cinco frascos T-25 contendo células High five foram sedimentadas (1×10^6 células) para a amplificação do vírus recombinante vRenbac (P1). Ao meio de cultura (5 mL) que já havia nas células acondicionadas em cada frasco T-25 foram adicionados 200 µL do sobrenadante com vírus recombinante vRenbac (P1) coletado da placa de 6 poços em que foi

feita infecção com o vírus recombinante. As células foram acondicionadas por três dias na incubadora a 27°C, quando foram então coletadas em um tubo falcon de 50 mL.

5) Análise e seleção dos vírus recombinantes

5.1) Eletroforese de Proteínas (SDS-PAGE):

As amostras de células sadias, infectadas com os vírus selvagens (AgMNPV-2D e AcMNPV-L1), e os vírus recombinantes vRen (P2) e vRenbac (P2) e seus sobrenadantes foram analisados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS) para detecção de produto de expressão da seqüência inserida no vírus.

5.2) Purificação do DNA dos vírus recombinantes (P2) por micro extração rápida:

O *pellet* celular obtido de uma T-25 infectada com o vírus recombinante (P2) foi utilizado para fazer a purificação deste vírus utilizando-se o método de micro extração rápida.

5.3) Confirmação da presença do gene da pré-pró-renina por PCR do DNA dos vírus:

Foi utilizada a técnica de PCR, tendo como molde o DNA dos vírus recombinantes e os *primers* internos da pré-pró-renina, para confirmar a presença da renina no vírus através da amplificação da banda de ~1,4 Kb. No vírus recombinante obtido no sistema Bac-to-Bac também foi feita a amplificação por PCR com os *primers* M13 *forward* e *reverse*.

5.4) Seleção do vírus recombinante vRen por *plaque assay*:

Após a amplificação do vRen foi feita sua seleção por ensaios de *plaque assay*. O sobrenadante da amplificação foi utilizado para as infecções nestes ensaios, em cinco diluições (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}), para detecção de placas que apresentassem poliedros (recombinantes).

Foram coletadas cinco placas com as características desejadas e, cada uma, foi individualmente diluída em 1 mL de meio TNMFH e novamente submetida a ensaio de *plaque assay*, com as cinco diluições. Novas placas foram coletadas e repassadas por mais duas purificações por *plaque assay*, para obtenção de um isolado puro de vírus recombinante.

Este ensaio não foi feito para o vRenbac pois ele não foi obtido por recombinação homóloga, e sim por transposição em que há apenas uma possibilidade de DNA a ser inserido no genoma do vírus, levando a formação do fenótipo ocluso negativo.

Resultados

1. Confirmação do plasmídeo pRHR1100

Foi confirmado que o plasmídeo cedido realmente era o pRHR1100, já que foi feita amplificação da renina por PCR do DNA do pRHR1100 com os *primers* internos específicos da pré-pró-renina (*Ren forward e reverse*) (Figura 17, amostra 3). Na Figura 17 foi assinalada a banda correspondente ao produto de PCR do pRHR1100 como tendo 1,3 Kb. Outro método também utilizado para a confirmação foi por meio de dupla digestão enzimática do pRHR1100 com *Bam* HI e *Hind* III e de digestões simples com cada uma das enzimas e com *Eco* RI (Figura 17). Na dupla digestão (amostra 4) foi liberada a banda referente a pré-pró-renina (1,4 Kb) e outra referente ao vetor onde ela estava inserida (~3,8 Kb). Nas digestões simples com *Bam* HI (amostra 5) e *Hind* III (amostra 6) foi obtida apenas uma banda, correspondente a linearização do plasmídeo, de 5,2 Kb, como esperado. Na digestão simples com *Eco* RI, foram esperados e liberados 4 fragmentos de DNA (amostra 7).

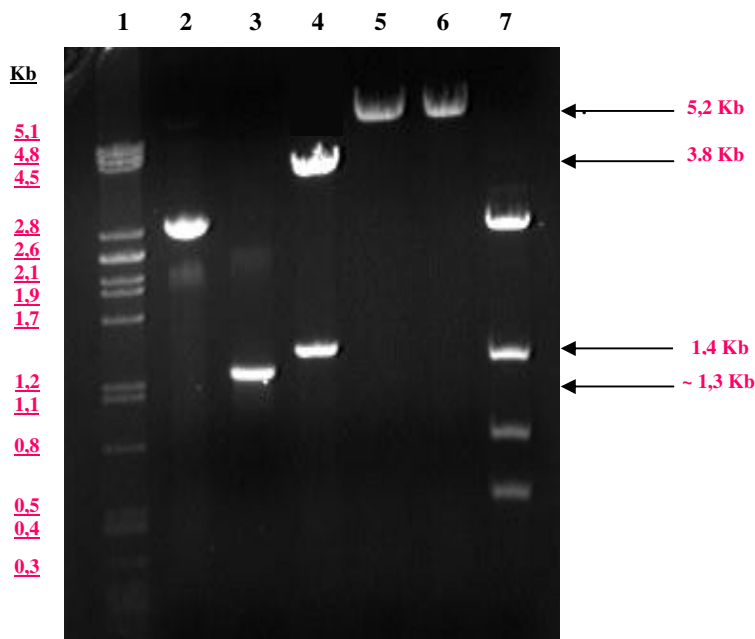


Figura 17 - Confirmação do plasmídeo pRHR1100 por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador λ Pst I (Invitrogen); amostra 2: pRHR1100 intacto; amostra 3: PCR do pRHR1100 com primers *Ren forward e reverse*; amostra 4: pRHR1100 digerido com *Bam* HI e *Hind* III; amostra 5: pRHR1100 digerido com *Bam* HI; amostra 6: pRHR1100 digerido com *Hind* III; amostra 7: pRHR1100 digerido com *Eco* RI.

2.Construção do plasmídeo recombinante pBSRen (Clonagem da pré-pró-renina no pBluescript)

As dificuldades para inserir a pré-pró-renina nos vetores de expressão só foram superadas com a subclonagem do fragmento em pBluescript, por este fornecer um maior número de opções de sítios de enzimas. O plasmídeo pBluescript foi ainda preferencialmente escolhido por apresentar um alto número de cópias quando crescido em células XL-1 blue. A inserção da pré-pró-renina no pBS permitiria também, uma vez que o sítio dos *primers* universais conhecidos T3 e T7 estavam presentes no PBS, que os *primers* se anelassem a ele para que o seqüenciamento fosse feito.

O plasmídeo pBS foi clivado para a inserção da pré-pró-renina por dupla digestão com as enzimas *Bam* HI e *Hind* III, sendo gerada uma banda correspondente a linearização do pBS de ~3,0 Kb (Figura 18, amostra 5), já que os sítios de *Bam* HI e *Hind* III são muito próximos no pBS, e justamente por isso foi feita a digestão simples dele com estas enzimas para garantir que as duas enzimas estavam funcionando bem e que cortariam o pBS (Figura 18). O plasmídeo pBS digerido com as enzimas *Bam* HI (amostra 3) e *Hind* III (amostra 4) separadamente, gerou no gel de agarose uma banda correspondente a linearização do pBS de 3,0 Kb, indicando que as duas enzimas funcionavam bem e que abririam o pBS para receber a pré-pró-renina.

Foi confirmada a purificação da pré-pró-renina, extraída do pRHR1100 através da digestão enzimática com *Bam* HI e *Hind* III, pela visualização de apenas uma banda de 1,4 Kb referente a ela no gel de agarose (Figura 18, amostra 6). O processo utilizado na purificação através de eluição da banda isolada em gel de agarose *low melting point* do fragmento da pré-pró-renina obtido em perfil de restrição, para posterior clonagem, demonstrou ser altamente eficiente no que se refere à taxa de recuperação do mesmo. Além disso, o fragmento mostrou ter alta pureza e estar livre de contaminação com outras bandas.

O gene da pré-pró-renina, produto da digestão enzimática dupla com *Bam* HI e *Hind* III e da recuperação em gel *low melting point*, foi clonado no plasmídeo pBS, clivado com as mesmas enzimas, resultando no plasmídeo recombinante pBSRen (Figura 19). Um total de cinco colônias foi isolado e seu DNA extraído por miniprep. A confirmação da clonagem da pré-pró-renina no plasmídeo pBS foi feita pela digestão das amostras obtidas do “pBSRen” com a enzima *Bam* HI (Figura 20), o que corresponderia a linearização do pBSRen, onde foi gerada uma banda de ~4,4 Kb correspondente a ~3,0 Kb do pBS e 1,4 Kb da pré-pró-renina apenas para o clone #2 e para o clone #5 (amostras 3 e 6), nos clones #1, #3 e #4 (amostras 2, 4 e 5) não houve a inserção da pré-pró-renina, aparecendo no gel banda de ~3,0 Kb

correspondente a linearização apenas do pBS. Para confirmar que realmente houve a inserção da pré-pró-renina no pBS as amostras que obtiveram o resultado esperado, no caso o clone #2 e o clone #5, foram digeridas com as enzimas *Bam* HI e *Hind* III para a liberação da pré-pró-renina do vetor, onde foram obtidas duas bandas, de 3,0 Kb do pBS e 1,4 Kb da pré-pró-renina (Figura 21, amostras 2 e 3). Sendo, assim, confirmado que realmente houve a inserção da pré-pró-renina no vetor pBS.

O pBSRen foi enviado para o seqüenciamento com os *primers* T3 e T7 (Plataforma genômica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) utilizando o método de terminação em cadeia (*dye terminator chemistry*) em equipamento ABI 377. Foi confirmada a inserção do gene da pré-pró-renina no plasmídeo pBS com base na análise das seqüências da pré-renina (cedida pelo prof. Francisco Neves - UnB) e do próprio pBS.

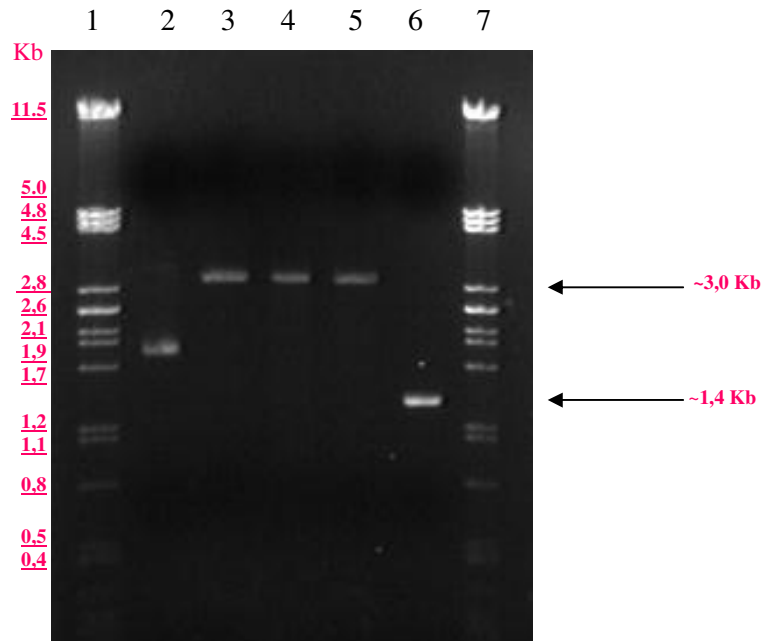


Figura 18 - Confirmação da linearização do pBS e do isolamento da pré-pró-renina do plasmídeo pRHR1100 por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador λ Pst I (Invitrogen); amostra 2: pBS intacto; amostra 3: pBS digerido com *Bam* HI; amostra 4: pBS digerido com *Hind* III; amostra 5: pBS digerido com *Bam* HI e *Hind* III; amostra 6: pré-pró-renina (*Bam* HI/*Hind* III); amostra 7: marcador λ Pst I (Invitrogen).

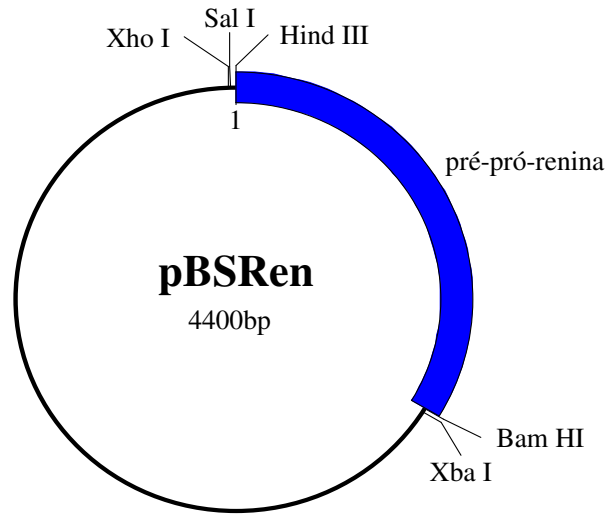


Figura 19 - Plasmídeo recombinante pBSRen. Desenho esquemático do plasmídeo pBSRen mostrando o inserto do gene da pré-pró-renina no vetor pBS.

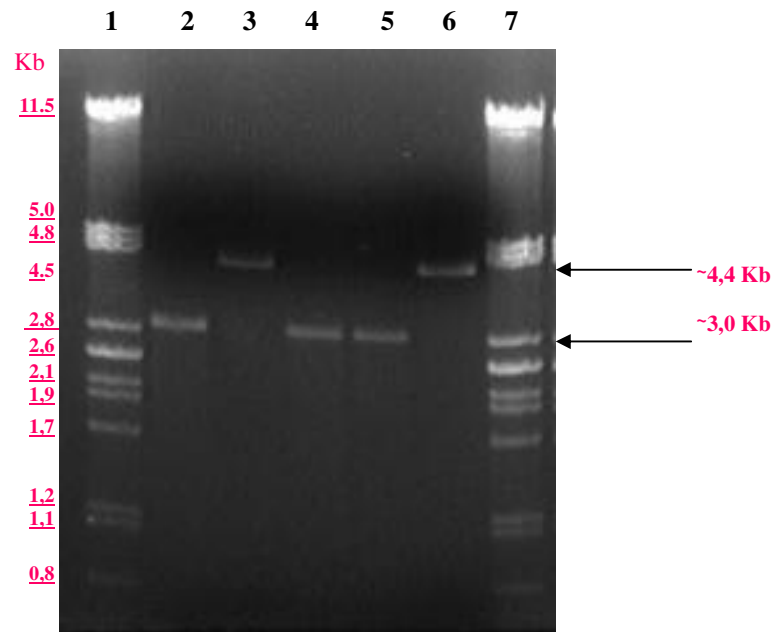


Figura 20 - Clonagem do gene da pré-pró-renina no plasmídeo pBS. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador λPst I (Invitrogen); amostra 2: DNA do clone #1 digerido com a enzima de restrição *Bam* HI; amostra 3: DNA do clone #2 digerido com a enzima de restrição *Bam* HI; amostra 4: DNA do clone #3 digerido com a enzima de restrição *Bam* HI; amostra 5: DNA do clone #4 digerido com a enzima de restrição *Bam* HI; amostra 6: DNA do clone #5 digerido com a enzima de restrição *Bam* HI; amostra 7: marcador λPst I (Invitrogen).

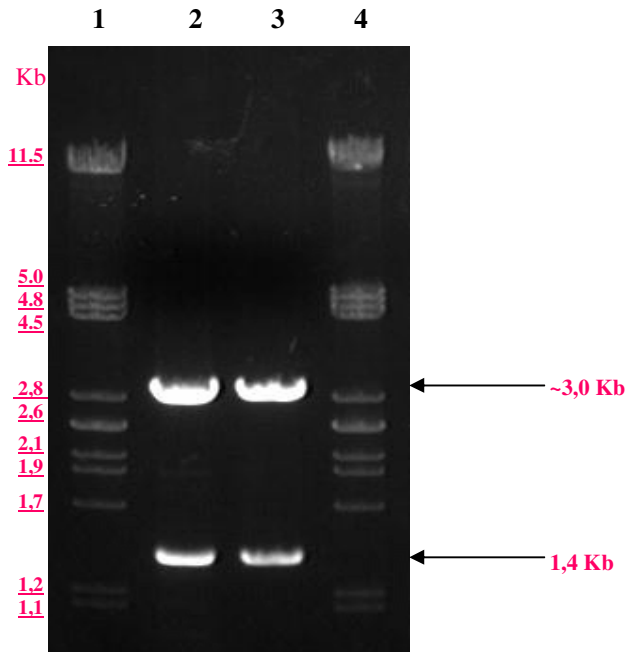


Figura 21 - Confirmação da clonagem da pré-pró-renina no plasmídeo pBS. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador λ Pst I (Invitrogen); amostra 2: DNA do pBSRen #2 digerido com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Hind* III; amostra 3: DNA do pBSRen #5 digerido com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Hind* III; amostra 4: marcador λ Pst I (Invitrogen).

3. Construção do plasmídeo recombinante pSynRen (Clonagem da pré-pró-renina no pSyn)

Para a construção do plasmídeo de transferência pSynRen, necessário para a recombinação homóloga com o DNA do vírus vSyn VIgal, a estratégia utilizada foi a recuperação da sequência da pré-pró-renina de 1,4 Kb do vetor pBSRen e sua inserção no plasmídeo pSynXIV VI⁺X3. O vetor pBSRen funcionou como um gerador de inserto para uma clonagem efetiva do fragmento da pré-pró-renina no plasmídeo de transferência (pSynXIV VI⁺X3).

O plasmídeo pSyn foi linearizado para a inserção da pré-pró-renina através da dupla digestão com as enzimas *Bgl* II e *Xho* I, sendo gerada no gel de agarose uma banda correspondente a linearização do pSyn de ~5,85 Kb (Figura 22, amostra 5). Como os sítios de *Bgl* II e *Xho* I são muito próximos no pSyn, foi feita a digestão simples dele com estas enzimas para garantir que as duas enzimas estavam funcionando bem e que cortariam o pSyn (Figura 22). Assim, o plasmídeo pSyn digerido com as enzimas *Bgl* II (amostra 3) e *Xho* I (amostra 4) separadamente, gerou no gel de agarose uma banda correspondente a linearização

do pSyn de 5,85 Kb, indicando que as duas enzimas funcionavam bem e que abririam o pSyn para receber a pré-pró-renina.

Foi confirmado que a pré-pró-renina, extraída do pBSRen através da digestão enzimática com *Bam* HI e *Xho* I e purificada através de recuperação da banda isolada em gel de agarose *low melting point*, foi recuperada e estava pura, já que foi visto no gel de agarose apenas uma banda de ~1,4 Kb referente a pré-pró-renina (Figura 22, amostra 6).

O gene da pré-pró-renina, produto da digestão enzimática dupla com *Bam* HI e *Xho* I e da eluição de banda em gel de agarose *low melting point*, foi clonado no plasmídeo pSyn, aberto com as enzimas *Bgl* II e *Xho* I, resultando no plasmídeo recombinante pSynRen (Figura 23). A identificação dos clones recombinantes, entre 5 clones, foi realizada através da análise do perfil eletroforético do DNA plasmídeo submetido à digestão com *Xho* I, o que corresponderia a linearização do pSynRen, onde foi gerada uma banda de ~7,2 Kb (Figura 24) correspondente a 5,85 Kb do pSyn e 1,4 Kb da pré-pró-renina para todos eles. Como o sítio de *Bgl* II do pSyn e o sítio de *Bam* HI da pré-pró-renina foram perdidos após a ligação deles, utilizamos o sítio de *Sal* I do pSyn (enzima com sítio localizado logo após o sítio da *Bgl* II) para fazermos a confirmação da inserção através da liberação da pré-pró-renina, assim, digerimos o pSynRen #1 com as enzimas *Sal* I e *Xho* I, onde obtivemos a confirmação da inserção da pré-pró-renina no vetor através da liberação da banda de ~1,4 Kb referente a pré-pró-renina e de outra banda de ~5,85 Kb referente ao pSyn (Figura 25, amostra 2).

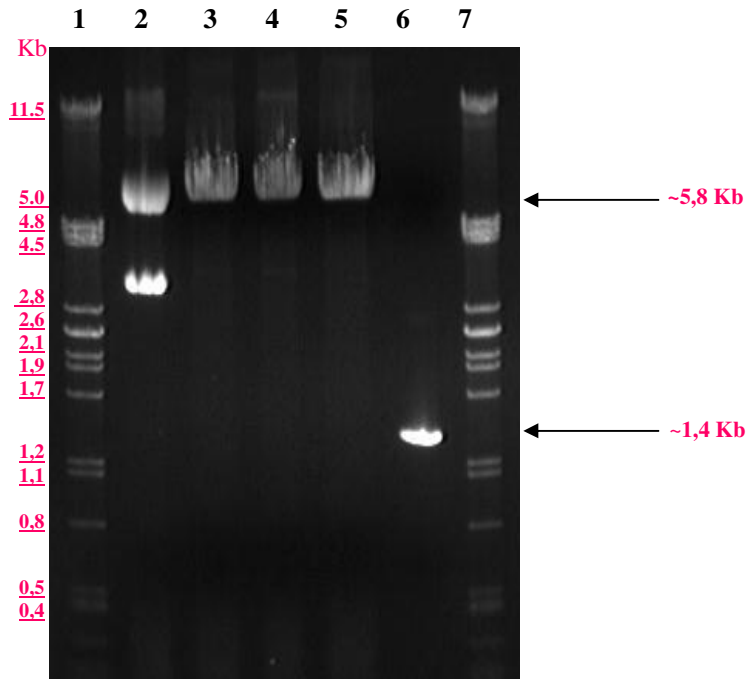


Figura 22 - Confirmação da abertura do pSyn e do isolamento da pré-pró-renina do plasmídeo pBSRen através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador λ Pst I (Invitrogen); amostra 2: pSyn intacto; amostra 3: pSyn digerido com *Bgl* II; amostra 4: pSyn digerido com *Xho* I; amostra 5: pSyn digerido com *Bgl* II e *Xho* I; amostra 6: pré-pró-renina (*Bam* HI/*Xho* I); amostra 7: marcador λ Pst I (Invitrogen).

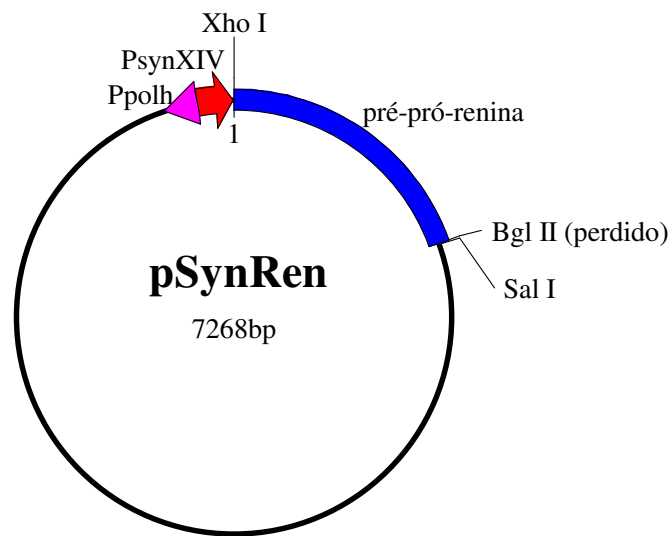


Figura 23 - Plasmídeo recombinante pSynRen. Desenho esquemático do plasmídeo pSynRen mostrando o inserto do gene da pré-pró-renina no vetor pSyn.

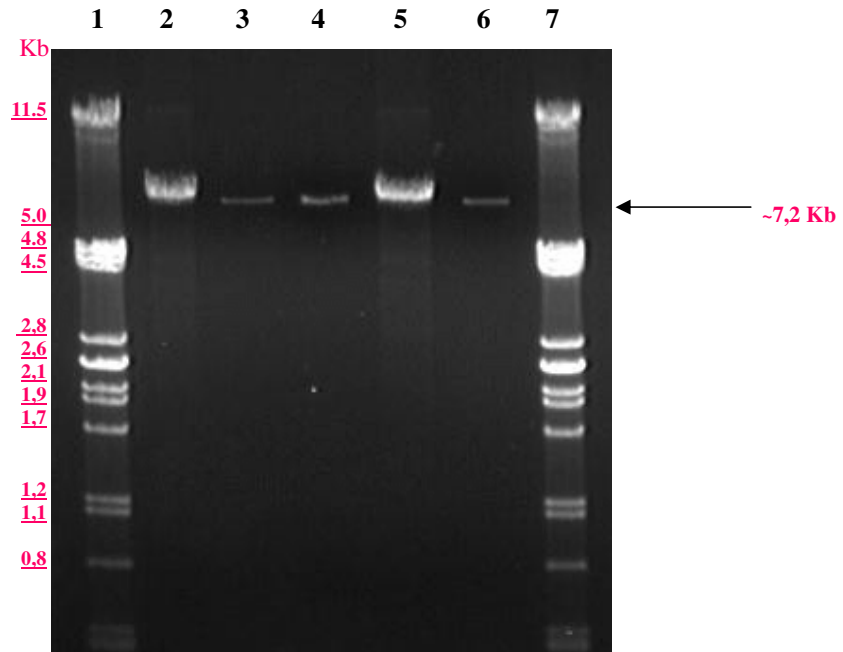


Figura 24 - Clonagem do gene da pré-pró-renina no plasmídeo pSyn através da eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador λPst I (Invitrogen); amostra 2: DNA do pSynRen #1 digerido com a enzima de restrição *Xho* I; amostra 3: DNA do pSynRen #2 digerido com a enzima de restrição *Xho* I; amostra 4: DNA do pSynRen #3 digerido com a enzima de restrição *Xho* I; amostra 5: DNA do pSynRen #4 digerido com a enzima de restrição *Xho* I; amostra 6: DNA do pSynRen #5 digerido com a enzima de restrição *Xho* I; amostra 7: marcador λPst I (Invitrogen).

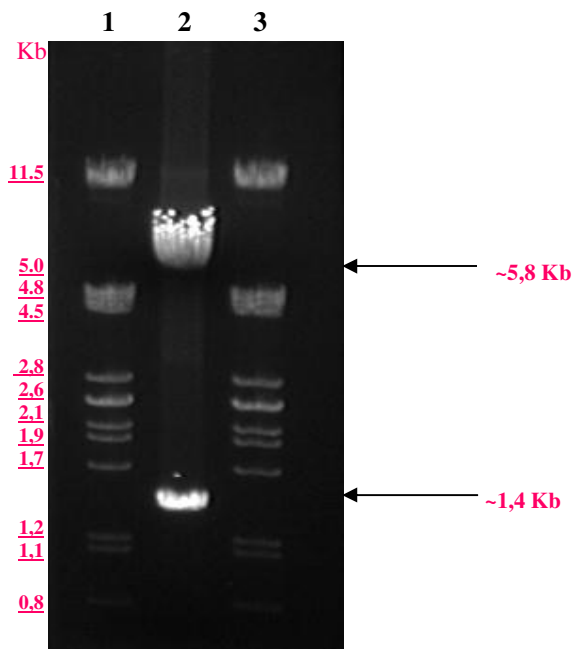


Figura 25 - Confirmação da clonagem da pré-pró-renina no plasmídeo pSyn através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador λPst I (Invitrogen); amostra 2: DNA do pSynRen #1 digerido com as enzimas de restrição *Sal* I e *Xho* I; amostra 3: marcador λPst I (Invitrogen).

4. Construção do plasmídeo recombinante HTcRen

Para a construção do plasmídeo de transferência HTcRen, necessário para a recombinação sítio-específica com o bacmídeo, a estratégia utilizada foi a recuperação da seqüência da pré-pró-renina de 1,4 Kb do vetor pBSRen e sua inserção no plasmídeo HTc. O vetor pBSRen funcionou como um provedor de inserto para uma clonagem efetiva do fragmento da pré-pró-renina no plasmídeo de transferência (pFastBac HTc).

O plasmídeo pFastBac HTc foi aberto para a inserção da renina através da dupla digestão com as enzimas *Sal* I e *Xba* I, gerando no gel de agarose banda correspondente a linearização do HTc de ~4,86 Kb (Figura 26, amostra 5). Como os sítios de *Sal* I e *Xba* I são muito próximos no HTc, foi feita a digestão simples dele com estas enzimas para garantir que as duas enzimas estavam funcionando bem e que o cortariam (Figura 26). Assim, o plasmídeo HTc digerido com as enzimas *Sal* I (amostra 3) e *Xba* I (amostra 4) separadamente, gerou no gel de agarose uma banda correspondente a linearização do HTc de 4,86 Kb.

O gene da pré-pró-renina de ~1,4 Kb (Figura 26, amostra 6), produto da digestão enzimática dupla com *Sal* I e *Xba* I, foi clonado no plasmídeo HTc, aberto com as enzimas *Sal* I e *Xba* I, resultando no plasmídeo recombinante HTcRen (Figura 27).

A confirmação da clonagem do gene da pré-pró-renina no plasmídeo HTc foi feita pela digestão, de uma das colônias branca do HTcRen purificada, com as enzimas *Xba* I e *Sal* I, o que corresponderia a liberação da pré-pró-renina do HTc e assim o aparecimento de bandas de ~4,86 Kb referente ao HTc e de ~1,4 Kb referente à pré-pró-renina no gel (Figura 28, amostra 2). Como foi visualizado no gel, o plasmídeo possui a inserção da pré-pró-renina no HTc.