



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

Construção de vetor baculoviral modificado capaz de produzir proteínas fusionadas à poliedrina

MARCIO HEDIL OLIVEIRA DA COSTA

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular

Orientador: Dr. Renato de Oliveira Resende

Co-Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Brasília – DF

2008

“You are playing.
And you think everything is going fine.
And then one thing goes wrong...
and then another.
And you try to fight back...
but the harder you fight,
the deeper you sink.
Until you can't move...
you can't breathe...
because you are in over your head...
like quicksand.”

Shane Falco

(The Replacements)

Agradecimentos

A minha mãe Dilsa de Almeida Oliveira, a meu pai Hélio Silva da Costa, a minha irmã Juliane Cristina Oliveira da Costa e a minha cachorrinha Lady...

Aos meus orientadores Dr. Renato Resende e Dr. Bergmann Ribeiro...

Ao pessoal do Laboratório de Microscopia Eletrônica...

A Universidade de Brasília...

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, com este projeto...

A minha amiga Elaine...

A meu amigo Fabiano...

A tudo e a todos aos quais eu ache que deva agradecer.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	4
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
BACULOVÍRUS	14
<i>Allium sativum</i> e complexo viral	19
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
Vírus e células utilizados.....	29
Vetores plasmidiais.....	30
Meios para cultivo de bactérias.....	34
Infecção em cultura de células de inseto	34
Purificação de DNA viral	35
Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose (Sambrook <i>et al.</i> , 1989).....	36
Eluição de fragmentos de DNA imobilizados em gel de agarose	38
Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).....	38
Preparação de células de <i>Escherichia coli</i> DH5 α competentes pelo método de cloreto de rubídio (Hanahan <i>et al.</i> , 1995).....	40
Transformação de <i>Escherichia coli</i> DH5 α competentes via choque térmico	41
Extração de DNA plasmidial	41
Digestões com endonucleases de restrição	42
Reações de defosforilação.....	42
Reações de ligação de fragmentos de DNA.....	42
Reações de seqüenciamento.....	43

Análise da expressão de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	44
Análise da expressão de proteínas por Western Blot.....	45
Obtenção dos genes para capa protéica (CP)	47
Obtenção dos genes CP ^N (genes da capa protéica flanqueados por sítios de <i>Nco</i> I)....	47
Obtenção dos vetores pGemCP ^N	51
Construção de vetores de transferência pFastPCP ^{NH} e pSynPCP ^{NH}	54
Construção e purificação de baculovírus recombinantes utilizando Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System” (Invitrogen)	62
Construção e purificação de baculovírus recombinantes por meio de recombinação homóloga	66
3. RESULTADOS.....	72
Obtenção dos fragmentos CP ^N (flanqueados por sítios de <i>Nco</i> I)	72
Obtenção do fragmento PH1.....	76
Construção dos vetores de transferência pFastPH1 e pSynPH1	78
Construção dos vetores de transferência pFastPCP ^{NH1} e pSynPCP ^{NH1}	82
Construção e purificação de baculovírus recombinantes PH1 utilizando Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System” (Invitrogen)	91
Construção e purificação de baculovírus recombinantes construídos por meio de recombinação homóloga	94
Análise de expressão das proteínas: SDS-PAGE e Western Blot	95
Seqüenciamento do fragmento PH1	100
Obtenção do vetor pGemPH2.....	103
Construção do vetor de transferência pFastPH2.....	103
Construção do vetor de transferência pFastP(GarCLV) ^{NH2}	108
Construção e purificação de baculovírus recombinantes vAcPH2 e vAcP(GarCLV) ^{NH2} utilizando Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System” (Invitrogen)	110
Seqüenciamento do fragmento PH2 (Figura 3.22)	113
Obtenção do vetor pGemPH3.....	116
Construção do vetor de transferência pFastPH3.....	119
Construção e purificação de baculovírus recombinante vAcPH3 utilizando Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System” (Invitrogen)	121

Análise de expressão das proteínas em células infectadas por vAcPH3: SDS-PAGE e Western Blot.....	124
4. DISCUSSÃO	127
5. PERSPECTIVAS FUTURAS	132
6. BIBLIOGRAFIA	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema do ciclo de infecção de <i>Nucleopolyhedrovirus</i>	17
Figura 2.1. Mapa do vetor pGem-T Easy.....	31
Figura 2.2. Mapa do vetor pFastBac1.....	32
Figura 2.3. Esquema do vetor pSynXIVVI ⁺ X3.....	33
Figura 2.4. Marcadores de DNA utilizados para géis de agarose.....	37
Figura 2.5. Esquema representativo dos fragmentos CP ^N	53
Figura 2.6. Esquema representativo do fragmento PH.....	57
Figura 2.7. Esquema da construção de baculovírus recombinante utilizando o sistema Bac-to-Bac (Invitrogen).....	63
Figura 2.8. Construção de baculovírus recombinantes por recombinação homóloga.....	69
Figura 3.1. Amplificação dos fragmentos CP ^N	73
Figura 3.2. Confirmação da eluição dos fragmentos CP ^N	75
Figura 3.3. Confirmação do pGemPH1 por análise do padrão de restrição.....	77
Figura 3.4. Confirmação do pFastPH1 por análise do padrão de restrição.....	79
Figura 3.5. Confirmação do pSynPH1 por análise do padrão de restrição.....	81
Figura 3.6. Confirmação do pFastP(Mb) ^N H1 por análise do padrão de restrição.....	83
Figura 3.7. Confirmação do pFastP(C) ^N H1 por análise do padrão de restrição.....	84
Figura 3.8. Confirmação dos vetores pFastP(D) ^N H1 e pSynP(C) ^N H1 por análise do padrão de restrição.....	85
Figura 3.9. Confirmação do pFastP(GarCLV) ^N H1 por análise do padrão de restrição.....	86
Figura 3.10. Confirmação do pFastP(LYSV) ^N H1 por análise do padrão de restrição.....	87

Figura 3.11. Confirmação dos vetores pSynP(Mb) ^N H1 e pSynP(D) ^N H1 por análise do padrão de restrição.....	88
Figura 3.12. Confirmação do pSynP(LYSV) ^N H1 por análise do padrão de restrição.....	89
Figura 3.13. Confirmação do pSynP(GarCLV) ^N H1 por análise do padrão de restrição.	90
Figura 3.14. Comprovação dos bacmídeos recombinantes PH1 por meio de PCR.	93
Figura 3.15. Análise da expressão de proteínas em células Tn5B infectadas por vírus recombinantes P(CP) ^N H1.	99
Figura 3.16. Resultado da execução de BLAST (database: nucleotide collection) da seqüência do fragmento PH1.....	102
Figura 3.17. Amplificação do fragmento PH2.	105
Figura 3.18. Confirmação do pGemPH2 por análise do padrão de restrição.	106
Figura 3.19. Confirmação do pFastPH2 por análise do padrão de restrição.	107
Figura 3.20. Confirmação do pFastP(GarCLV) ^N H2 por análise do padrão de restrição. .	109
Figura 3.21. Comprovação dos bacmídeos recombinantes PH2 por meio de PCR.	112
Figura 3.22. Alinhamento da seqüência do fragmento PH2 (seqüência inferior: PH2) com a seqüência do gene da poliedrina do AgMNPV (seqüência superior: polh).....	115
Figura 3.23. Amplificação do fragmento PH3.	117
Figura 3.24. Confirmação do vetor pGemPH3 por análise do padrão de restrição.....	118
Figura 3.25. Confirmação do vetor pFastPH3 por análise do padrão de restrição.....	120
Figura 3.26. Comprovação do recombinante vAcPH3 por meio de PCR.....	122
Figura 3.27. Identificação do vírus recombinante vAcPH3 por microscopia de luz.....	123
Figura 3.28. Análise da expressão de proteínas em células Tn5B infectadas por vírus recombinantes vAcPH3.	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Algumas espécies de vírus encontradas associadas a plantas de alho	22
Tabela 2.1. Reagentes utilizados nas reações de PCR.....	39
Tabela 2.2. Primers para amplificar o gene da capa protéica de diversos vírus de alho e adicionar sítios de <i>NcoI</i> às extremidades do produto amplificado	49
Tabela 2.3. Número de acesso (genbank) para seqüência nucleotídica dos genes de capa protéica – de vírus de alho – utilizados neste projeto.....	50
Tabela 2.4. Programa de PCR utilizado para amplificação dos genes da capa protéica de diferentes vírus de alho.....	50
Tabela 2.5. Programa de PCR utilizado para amplificação do gene da poliedrina dos baculovírus AcMNPV e AgMNPV.....	55
Tabela 2.6. “Primers” utilizados para acrescentar cauda de histidina à poliedrina	56
Tabela 2.7. Relação dos “primers” 5’ utilizados nas reações de PCR para comprovar construção dos bacmídeos recombinantes.....	65
Tabela 2.8. Programa de PCR utilizado para comprovar construção dos bacmídeos recombinantes.....	65
Tabela 3.1. Tamanho esperado dos fragmentos de PCR CP ^N para os diversos vírus utilizados.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina bovina sérica
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
°C	Grau <i>Celsius</i>
CP	Gene viral da capa protéica
CP ^N	Gene da capa protéica flanqueado por sítios de <i>NcoI</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
g	Gramma
<i>g</i>	Força gravitacional
GarCLV	Garlic common latent virus
GarMbFV	Garlic mite-borne filamentous virus
GarV-C	Garlic virus C
GarV-D	Garlic virus D
h	Hora
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
kb	Quilobases
kDa	Quilodaltons
LYSV	Leek yellow stripe virus
M	Molar
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar

MW	Peso molecular
NBT	<i>Nitro blue tetrazolium chloride</i>
ηg	Nanograma
ηl	Nanolitro
ηm	Nanômetro
OYDV	Onion yellow dwarf virus
pb	Pares de bases
P(CP ^N)H	<i>orf</i> de fusão contendo gene da poliedrina + gene viral da capa protéica + cauda de hexahistidina
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
pH	Potencial hidrogeniônico
PH	Gene da poliedrina fusionado a cauda de hexa-histidina
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
SDS	Sódio dodecil sulfato
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
Tris	Tris-hidroximetil-amino-metano
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar

RESUMO

Este trabalho objetivou construir um vetor baculoviral modificado capaz de expressar proteínas heterólogas fusionadas à poliedrina e à cauda de hexa-histidina e utilizar esse vetor para expressão e purificação da proteína capsidial de vírus do complexo viral do alho. Via PCR, foi sintetizado o fragmento PH (gene da poliedrina fusionado a uma cauda de hexa-histidina). Entre a poliedrina e a cauda de histidina foi inserido um sítio de *Nco*I. Na primeira tentativa de obtenção do fragmento PH, em vez do gene da poliedrina, a reação de PCR amplificou uma parte do genoma de *Escherichia coli*. Na segunda tentativa de obtenção do fragmento PH, o gene da poliedrina foi amplificado, contudo foi verificado que havia um erro no “primer” 5’ utilizado, que gerou alteração da fase do fragmento PH. Somente na terceira tentativa (reação de PCR) o fragmento PH correto foi obtido. O fragmento PH foi clonado no vetor pFastBac1 (Invitrogen), gerando o vetor pFastPH. Um baculovírus recombinante vAcPH expressando a proteína PH foi construído via transposição sítio-específica utilizando o kit “Bac-to-Bac” (Invitrogen). Foi realizada análise da expressão de proteínas de células Tn5B infectadas com vAcPH (72 hpi). SDS-PAGE mostrou presença de uma proteína de peso molecular superior ao da poliedrina nativa e compatível com o esperado para a proteína PH. Western Blot mostrou que essa proteína é reconhecida tanto por anticorpo contra a poliedrina quanto por anticorpo contra a cauda de hexa-histidina. Além da obtenção do fragmento PH correto, também foram sintetizados, via PCR, genes da capa protéica (de vírus presentes no complexo viral do alho: GarMbFV, GarV-C, GarV-D, LYSV, OYDV, GarCLV) flanqueados por sítios de *Nco*I. Esses genes foram comprovados por análise do padrão de restrição. Futuramente, tais genes poderão ser clonados no pFastPH para gerar baculovírus recombinantes expressando uma proteína de fusão “poliedrina + proteína capsidial + cauda de hexa-histidina” que poderá ser utilizada para produção de anticorpos.

Palavras-chave: *Allium sativum*, baculovírus, anticorpo, poliedrina, complexo viral do alho.

ABSTRACT

The present work goal was the production of a modified baculovirus vector capable of expressing an heterologous protein fused to the polyhedrin and to an hexahistidin tag. The PH fragment (polyhedrin gene with an *NcoI* site and a histidin tag at its 3' end) was synthesized through PCR reaction. In the first attempt to obtain the PH fragment, instead of the polyhedrin gene, PCR reaction amplified a fragment of *Escherichia coli* genome. In the second attempt, the problem was the 5' "primer", which had an extra nucleotide and disrupted the PH fragment reading frame. In the third attempt, the correct PH fragment was obtained and cloned into pFastBac1 vector (Invitrogen), generating pFastPH. A recombinant baculovirus (vAcPH) expressing the PH protein was obtained through site-specific transposition ("Bac-to-Bac" kit, Invitrogen). SDS-PAGE showed the presence of a protein with molecular weight (MW) superior to the native polyhedrin MW (28,6 KDa). In Western Blot experiment, PH protein was recognized by antibody against polyhedrin and by antibody against hexahistidin tag, proving that the PH protein was being expressed. Also, this work attempted to use the modified baculovirus vector to express and purify the capsid protein of viruses present in the garlic virus complex (GarMbFV, GarV-C, GarV-D, LYSV, OYDV, GarCLV). *NcoI* sites were added, through PCR, to both ends of these genes. In the future, these genes these genes may be cloned in pFastPH vector to generate baculovirus expressing these virus coat proteins fused to the PH gene. The purified fusion proteins may then be used in experiments to obtain antibodies against them.

Keywords: *Allium sativum*, baculovirus, antibody, polyhedrin, garlic viral complex.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

BACULOVÍRUS

Os baculovírus pertencem à família *Baculoviridae*. Eles pertencem a um grupo diverso de vírus de insetos que infectam organismos das ordens Lepidoptera, Diptera, Himenoptera e Crustacea (Volkman *et al.*, 1995). O capsídeo dos baculovírus varia entre 30 – 60 nm de diâmetro e 250 – 300 nm em comprimento (Harrap, 1972; Jehle *et al.*, 2006).

Os baculovírus são vírus de DNA dupla-fita, circular, covalentemente fechado (Summers and Anderson, 1972). O tamanho do genoma dos vírus dessa família pode variar entre 80 – 200 pares de quilobases (Kb) (Burgess, 1977).

A família *Baculoviridae* está dividida em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV). O gênero NPV está subdividido em SNPV (Single Nucleopolyhedrovirus) e MNPV (Multiple Nucleopolyhedrovirus). A principal diferença entre os SNPVs e os MNPVs diz respeito ao modo como os nucleocapsídeos estão envelopados nos corpos de oclusão (aqui chamados de poliedros). Nos SNPVs, cada nucleocapsídeo está envelopado individualmente, enquanto que nos MNPVs, nucleocapsídeos estão envelopados em grupos. Mas seja qual for o caso, cada corpo de oclusão dos NPVs possui vários nucleocapsídeos.

O outro gênero da família *Baculoviridae* é o gênero *Granulovirus*. Diferentemente dos NPVs, que formam grandes corpos de oclusão onde muitos vírions estão ocluídos, os GVs possuem corpos de oclusão menores, chamados de grânulos, onde normalmente apenas um único vírion se encontra ocluído (Funk *et al.*, 1997; Jehle *et al.*, 2006).

Ciclo de Infecção de um NPV

Os baculovírus possuem um ciclo de replicação bifásico (**Figura 1.1**), resultando na produção de dois fenótipos virais (Haines *et al.*, 2006):

- BV (do inglês “budded virus” ou vírus extracelulares ou vírus não-ocluídos): são responsáveis pela transmissão célula-a-célula do vírus, tanto *in vivo* quanto *in vitro*;
- ODV (do inglês “occluded-derived virus” ou vírus ocluídos): são responsáveis pela transmissão do vírus de um hospedeiro para outro. Os ODVs são assim chamados por estarem ocluídos em uma matriz protéica cristalina, formando corpos de oclusão (OB, do inglês “occlusion bodies”) cuja principal proteína constituinte é a poliedrina (no gênero *Nucleopolyhedrovirus*) ou a granulina (no gênero *Granulovirus*) (Federici, 1997; Jehle *et al.*, 2006).

A seguir, será descrito o ciclo de um NPV, por esse gênero ser o mais estudado. Contudo, a maior parte do que aqui for dito também ocorre no ciclo de infecção dos GVs.

No processo natural de infecção, corpos de oclusão são ingeridos, como contaminantes da comida, por larvas permissivas. No intestino médio dessas

larvas, devido ao pH alcalino e a proteinases presentes, a matriz de poliedrina é solubilizada, liberando os ODVs (Harrap & Longworth, 1974), responsáveis pela infecção primária. Esses ODVs entram nas células do intestino médio via fusão do envelope viral com a membrana de células das microvilosidades (Granados & Williams, 1986; Horton & Burand, 1993). Essa etapa é chamada de infecção primária. A infecção dessas células pelos ODVs resulta na produção de BVs e sua liberação pelo lado da membrana basal, dando início à infecção secundária. Esses BVs são transportados a outros tecidos do inseto via hemolinfa e sistema traqueal (Keddie *et al.*, 1989). Alternativamente, os ODVs podem atravessar as células colunares e infectar diretamente as células da hemolinfa ou sistema traqueal (Engelhard *et al.*, 1994).

A larva continua se alimentando durante a maior parte do processo de infecção, que leva aproximadamente 5 a 7 dias. No final, o inseto torna-se letárgico e pára de se alimentar. Ocorre melanização da cutícula. A musculatura é desintegrada e a larva torna-se um saco cuticular de PIBs (do inglês “polyhedral inclusion bodies”). Cerca de 25% do peso seco são poliedros. A cutícula eventualmente rompe, liberando os PIBs no meio ambiente, que então podem ser consumidos por outra larva permissiva, reiniciando o ciclo (O’Reilly *et al.*, 1994).

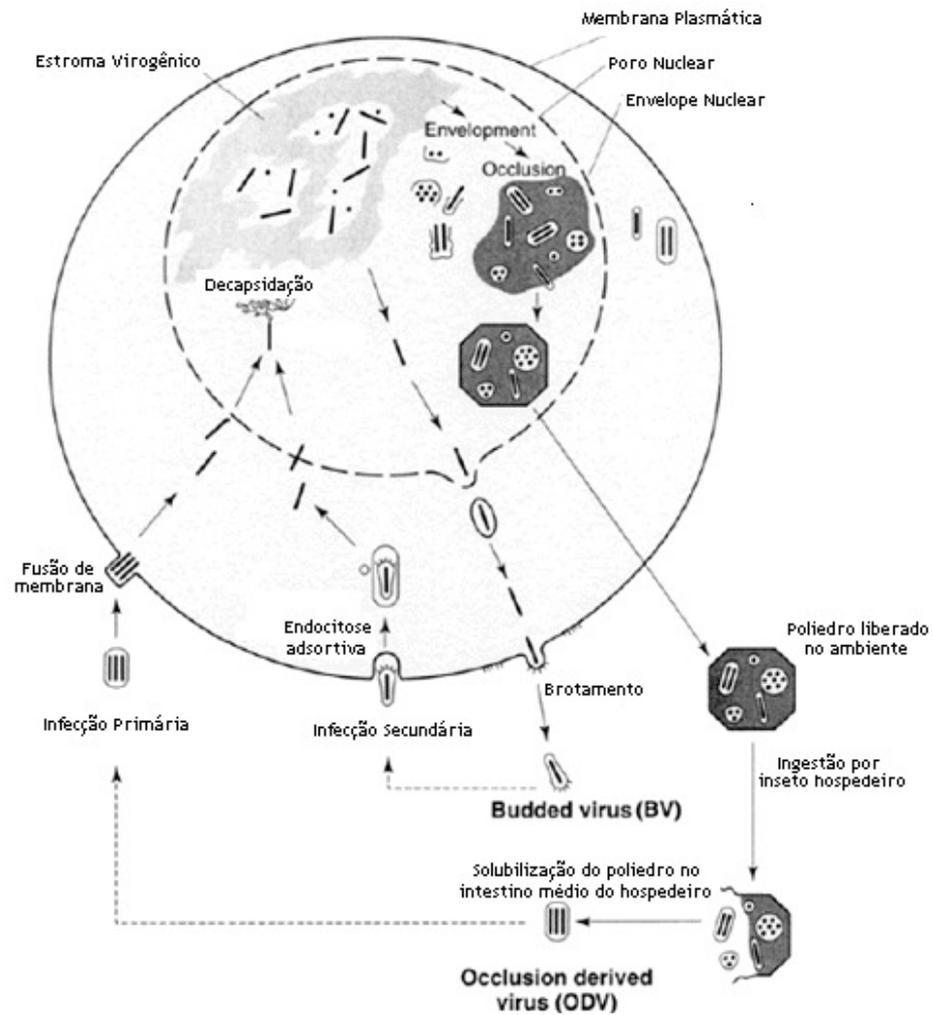


Figura 1.1. Esquema do ciclo de infecção de *Nucleopolyhedrovirus*. Foto adaptada a partir do site http://www.chegue.uq.edu.au/research/bioengineering/research/Baculovirus/Baculo_picturebook.html.

Baculovirus como vetor de expressão

Sistemas de expressão de proteínas heterólogas baseados em baculovirus são bastante eficazes. Os primeiros vetores envolviam a substituição do gene da poliedrina pelo gene de interesse (Smith *et al.*, 1983; citado por Miller, 1997). Isso é possível devido ao fato de o gene da poliedrina não ser essencial para a replicação do baculovirus em cultura de células e é desejável por o gene da poliedrina estar sob comando de um promotor forte e poder ser deletado do genoma viral sem afetar a produção de BVs (Possee, 1997). Algumas das características que fazem dos baculovirus um sistema de expressão tão interessante são:

- a. Produção da proteína heteróloga em ambiente eucarioto (células de inseto).
Isso é importante principalmente quando se está buscando expressar proteínas de eucariotos que, para se tornarem biologicamente ativas, necessitem de modificações pós-traducionais exclusivas de sistemas eucariotos - por exemplo, N-glicosilação, O-glicosilação, clivagens proteolíticas, entre outras (O'Reilly *et al.*, 1994; Luckow, 1991);
- b. Capacidade de produção de elevadas quantidades da proteína heteróloga.
Isso tem sido alcançado expressando o gene de interesse sob comando do promotor do gene da poliedrina ou do promotor do gene da p10, ambos promotores muito fortes de genes não essenciais para replicação baculoviral em cultura de células (O'Reilly *et al.*, 1994). Mas outros promotores também já foram usados com sucesso, inclusive para obter expressão constitutiva em células estavelmente transformadas (Jarvis *et al.*, 1990);

- c. Capacidade para acomodar grandes inserções de DNA. Isso é possível porque o nucleocapsídeo do baculovírus é capaz de acomodar genomas virais maiores que o genoma selvagem. Acredita-se que um vetor baculoviral consiga acomodar até 100 Kb adicionais (O'Reilly *et al.*, 1994). Isso torna possível criar vetores baculovirais para transferência de múltiplos genes de uma só vez (Belyaev & Roy, 1993).

Incorporando a proteína heteróloga ao corpo de oclusão

Mais recentemente, foram construídos vetores baculovirais capazes de incorporar uma proteína heteróloga ao corpo de oclusão (Je *et al.*, 2003). Esses vetores possuem o gene heterólogo fusionado ao gene da poliedrina, além de possuírem o gene selvagem da poliedrina. A utilidade de tais vetores diz respeito à produção de bioinseticidas (a construção de baculovírus com corpos de oclusão possuindo uma toxina contra o inseto-praga aumenta a letalidade do vírus) (Chang *et al.*, 2003) e também para apresentação de antígenos, visando a produção de anticorpos.

Allium sativum e complexo viral

Allium sativum é uma monocotiledônea da família *Alliaceae* originária da Ásia Central (Filgueira, 2000). É uma planta perene cujo bulbo é comestível e usado tanto como tempero quanto para fins medicinais (Balbach & Boarim, 1992). Possui

propriedades estimulante, diurética, expectorante, antisséptica, anti-microbiana, hipotensiva (<http://www.herbnet.com/garlic2003.pdf>).

Sua composição química inclui alicinas, sulforetos, riboflavina, vitaminas (A, B1, B2, C), minerais (magnésio, fósforo, potássio, manganês, enxofre) (Barrera & Camargo, 1985; http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Allium_sativum.htm; <http://www.herbnet.com/garlic2003.pdf>). Seu aroma desagradável é conferido por derivados do tiofeno e diversos derivados sulfurados voláteis (Barbosa *et al.*, 2007).

O alho é cultivado em vários países. A principal região mundial produtora de alho é a região asiática (CEPA/SC, 1996). Merece destaque a produção da República Popular da China, cuja participação na oferta mundial é superior a 70% (FAO, 2006).

No que diz respeito ao Mercosul, Brasil e Argentina contribuem com mais de 70% da área cultivada (Tanabe, 1999). No Brasil, a cultura destaca-se como uma das cinco hortaliças de maior relevância (Resende, 1997), sendo que as maiores safras estão concentradas nos Estados da região Sul, Minas Gerais e Bahia. (Souza, 2004). Segundo o IBGE, em 2004 o Brasil produziu 85.987 toneladas de alho, numa área de 10.517 hectares. Essa produção rendeu ao país R\$ 265.752.000 (<http://www.agricultura.mg.gov.br/dados/alho.pdf>).

Viroses do alho

A propagação do alho ocorre exclusivamente por estruturas vegetativas denominadas bulbilhos (dentes). Essa multiplicação assexuada é um dos grandes entraves da cultura do alho, pois permite que patógenos e pragas se disseminem

com facilidade de uma geração para a seguinte, causando degenerescência dos clones comerciais. Dentre as principais doenças do alho, destacam-se as viroses, em função de os vírus terem grande potencial de reprodução, facilidade de transmissão e perpetuação na cultura (Resende *et al.*, 2000).

A acumulação de vírus no alho comercial causa perdas em produtividade e em qualidade (Davis, 1995). As infecções virais em alho geralmente são causadas por um complexo viral com vários vírus pertencendo a grupos taxonômicos diferentes (Van Dijk,1993a; Van Dijk,1993b). Na espécie *Allium sativum* são detectados mais de 8 vírus pertencentes aos gêneros *Potyvirus* (transmitido por afídeos), *Carlavirus* (transmitido por afídeos) e *Allexivirus* (transmitido por ácaros) (Conci *et al.*,1999; Torres *et al.*, 2001; Lunello *et al.*, 2007b) (**Tabela 1.1**), gêneros esses de vírus com genoma de RNA fita simples. Esses vírus se apresentam em infecções mistas em forma de um complexo viral causando uma enfermidade denominada “mosaico do alho” (Lunello *et al.*, 2007b). Essa enfermidade é responsável por uma redução de até 88% no peso do bulbo do alho (Canavelli *et al.*, 1998; Lot *et al.*, 1998; Conci *et al.*, 2003; Lunello *et al.*, 2007a).

Tabela 1.1. Algumas espécies de vírus encontradas associadas a plantas de alho (retirado de Melo Filho, 2003).

Espécie	Acrônimo	Gênero	Referência bibliográfica
<i>Garlic common latent virus</i>	GarCLV	<i>Carlavirus</i>	van Dijk, 1993a
<i>Garlic latent virus</i>	GarLV	<i>Carlavirus</i>	Brunt <i>et al.</i>, 1996
<i>Garlic mite-borne filamentous virus</i>	GarMbFV	<i>Allexivirus</i>	van Regenmortel <i>et al.</i>, 2000
<i>Garlic virus A</i>	GarV-A	<i>Allexivirus</i>	Sumi <i>et al.</i>, 1993
<i>Garlic virus B</i>	GarV-B	<i>Allexivirus</i>	Sumi <i>et al.</i>, 1993
<i>Garlic virus C</i>	GarV-C	<i>Allexivirus</i>	Sumi <i>et al.</i>, 1993
<i>Garlic virus D</i>	GarV-D	<i>Allexivirus</i>	Sumi <i>et al.</i>, 1993
<i>Garlic virus X</i>	GarV-X	<i>Allexivirus</i>	van Regenmortel <i>et al.</i>, 2000
<i>Leek yellow stripe virus</i>	LYSV	<i>Potyvirus</i>	Bos, 1981
<i>Onion yellow dwarf virus</i>	OYDV	<i>Potyvirus</i>	Melhus <i>et al.</i>, 1929; Bos, 1976
<i>Shallot latent virus</i>	SLV	<i>Carlavirus</i>	van Dijk, 1993a
<i>Shallot virus X</i>	ShV-X	<i>Allexivirus</i>	van Regenmortel <i>et al.</i>, 2000

O gênero *Carlavirus* é composto por vírus com genomas constituídos por RNA fita simples, linear, senso positivo, com cauda poli-A na extremidade 3'. O genoma é monopartido, com tamanho total que varia entre 6,4 quilobases (kb) e 8,5 kb. A espécie tipo é o *Carnation latent virus* (ICTVdB, 2006a).

Um vírus do gênero *Carlavirus* que é encontrado no complexo viral do alho é o *Garlic common latent virus* (GarCLV). A partícula viral do GarCLV é filamentosa, com aproximadamente 650 nm de comprimento e levemente flexuosa. Infecções com o GarCLV sozinho têm pouca importância, sendo que podem nem mesmo causar sintomas; mas quando combinado com outros vírus, GarCLV pode causar sérios danos à cultura do alho (Diekmann, 1997). Por exemplo, os sintomas da infecção por *Potyvirus* (como OYDV e LYSV) são agravados se o GarCLV também estiver presente. Esse vírus tem grande incidência em cultura de alho na Europa, América do Sul, América Central, China e Índia (Diekmann, 1997). Tem uma larga gama de hospedeiros dentro da família *Alliaceae*, sendo que já foi encontrado em mais de 50 espécies do gênero *Allium* (van Dijk, 1993a). O principal modo de transmissão do GarCLV em *Allium spp.* é via propagação vegetativa (Diekmann, 1997).

O gênero *Potyvirus* abriga o maior e mais importante grupo de fitovírus (citado por Zerbini & Maciel-Zambolim, 1999), contendo pelo menos 180 espécies, que causam prejuízos significativos na agricultura, em culturas hortícolas e ornamentais (Ward & Shukla, 1991). Esse gênero é composto por vírus com genomas constituídos por RNA fita simples, linear, senso positivo, com cauda poli-

A na extremidade 3'. O genoma é monopartido, com tamanho total que varia entre 9 kb e 12 kb. A espécie tipo é o *Potato virus Y* (ICTVdB, 2006b).

Leek yellow stripe virus (LYSV) é um *Potyvirus* que pode ser encontrado no complexo viral do alho. Possui partícula viral filamentosa e flexuosa, com aproximadamente 820 nm de comprimento (Diekmann, 1997). A transmissão se dá por meio de afídeos ou por inoculação mecânica (Bos *et al.* 1978). Infecção com o LYSV é agravada se ele estiver combinado com outros vírus. Por exemplo, a porcentagem de brotamento em alho não infectado não difere estatisticamente da porcentagem de brotamento de alho infectado por LYSV. Contudo, se o alho estiver infectado por um complexo viral, a porcentagem de brotamento é até duas vezes menor (Lunello *et al.*, 2007a). Apesar de não afetar estatisticamente a porcentagem de brotamento, a infecção por LYSV (mesmo sozinho) causa danos à cultura do alho. Segundo Lunello *et al.* (2007a), o peso do bulbo de plantas infectadas com LYSV sozinho é até 28% menor do que o peso do bulbo de plantas não infectadas. Essa redução no peso do bulbo é agravada se houver co-infecção com outros vírus do complexo viral do alho, podendo alcançar redução de peso de até 74% (Lunello *et al.*, 2007a). LYSV pode causar redução de até 50% na produção de uma planta de alho infectada, além de ocasionar danos qualitativos (Diekmann, 1997). No alho, sintomas incluem o aparecimento de listras verde-claras e verde-escuras nas folhas jovens. Apesar de o vírus não afetar significativamente a altura da planta, ele causa redução no diâmetro do bulbo. Esses sintomas são acentuados se houver co-infecção com OYDV (Diekmann, 1997).

Onion yellow dwarf virus (OYDV) é outro vírus pertencente ao gênero *Potyvirus* que também é encontrado no complexo viral do alho. As partículas virais são filamentosas e flexuosas, com comprimento de 700 – 800 nm (Diekmann, 1997). Sintomas incluem: aparecimento de estrias cloróticas irregulares e amareladas; brotamento prematuro de bulbos; redução do crescimento e do tamanho dos bulbos. Sintomas são agravados quando em combinação com outros vírus (Diekmann, 1997).

Outro gênero de vírus com espécies presentes no complexo viral do alho é o gênero *Allexivirus*. Vírus desse gênero possuem partículas virais flexuosas com comprimento entre 700 e 800 nm. Membros desse gênero possuem RNA fita simples, senso positivo, com cauda poli-A na extremidade 3'. O genoma é monopartido, com cerca de 10 kb. A espécie tipo é o *Shallot virus X*. São transmitidos por ácaros *Aceria tulipae*. (ICTVdB, 2006b; Yamashita *et al.*, 1996). Detecção de espécies desse gênero é feita via sorologia ou RT-PCR (Sumi *et al.*, 1993; Yamashita *et al.*, 1996; Lunello *et al.*, 2000). No Brasil, sondas não-radioativas foram desenvolvidas para detectar GarMbFV, GarV-C e GarV-D (Melo Filho *et al.*, 2003b). Melo Filho *et al.* (2004) detectaram a presença de 3 allexivirus infectando alho no Brasil: *Garlic virus C* (GarV-C), *Garlic virus D* (GarV-D) e *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV). GarMbFV está presente no Brasil e Argentina, e provavelmente se originou a partir do allexivirus *Garlic virus A* (GarV-A), devido à proximidade filogenética entre ambas espécies (Sumi, *et al.*, 1993).

Tanto no Brasil quanto em outras partes do mundo têm sido reportadas infecções virais em grande parte das cultivares comerciais de alho (Conci *et al.*,

1992; van Dijk, 1993a). Dusi *et al.* (1994), mediante ISEM – Immuno Sorbent Electron Microscopy -, avaliou amostras de alho de diversas regiões produtoras do Brasil. Foi demonstrado que todas as amostras analisadas estavam infectadas por pelo menos duas espécies virais.

No Brasil, já foram identificados vírus de alho dos gêneros *Carlavirus*, *Potyvirus* e *Allexivirus* infectando plantas de alho: Dusi (1994) identificou as espécies de *Potyvirus* OYDV e LYSV; Pavan (1998) identificou as espécies de *Carlavirus* GarCLV, *Shallot latent virus* e *Carnation latent virus*; Melo Filho *et al.* (2004) identificaram as espécies de *Allexivirus* GarV-C, GarV-D e GarMbFV.

Alho livre de vírus

No Brasil, o consumo interno anual de alho é superior à produção anual (Nakamae & Pastrello, 2002). A produção nacional poderia ser aumentada por meio de programas de produção de alho livre de vírus, pois, nessa condição, qualidade e produtividade são muito superiores (Fajardo, 1998; Melo Filho, 2003). Isso pode ser feito via cultura de ápices caulinares (Conci *et al.*, 1986; Conci & Nome, 1991).

Técnicas de cultura de tecidos vegetais têm sido utilizadas com sucesso na erradicação das viroses do alho (Daniels *et al.*, 1978; Conci & Nome, 1991). Com essas técnicas, é possível obter alho livre de vírus obtendo-se plantas altamente produtivas em relação ao material infectado (Walkey & Antill, 1989; Garcia *et al.*, 1989; Resende *et al.*, 1995).

Contudo, para o estabelecimento de um programa eficaz, é preciso que o Brasil possua tecnologias de indexação para detecção de cada um dos vírus que fazem parte do complexo viral do alho.

Diversas técnicas podem ser utilizadas para detecção de fitopatógenos. Essas técnicas podem ser divididas em dois grandes grupos: métodos sorológicos e métodos moleculares.

Nos métodos moleculares, é feita a detecção do ácido nucléico do patógeno utilizando-se sondas moleculares. Dentre as vantagens dessas técnicas, destacam-se a boa sensibilidade, especificidade e rapidez na obtenção dos resultados. Com a produção de sondas moleculares desenvolvidas por Fajardo (1998), o Brasil passou a dispor de ferramentas para detecção de OYDV, LYSV e GarCLV. Contudo, ainda existem outras espécies para as quais, o Brasil não desenvolveu metodologia adequada para detecção. Além disso, as técnicas moleculares apresentam restrições, principalmente no que se refere à necessidade de equipamentos especiais e tecnologia, além de serem técnicas relativamente recentes e, por isso, ainda não assimiladas por muitos laboratórios.

Uma alternativa é o desenvolvimento de tecnologias de detecção via sorologia, utilizando anticorpos contra uma determinada proteína do patógeno (no caso dos vírus, geralmente utilizam-se anticorpos contra a proteína da capa protéica). As técnicas sorológicas trazem algumas vantagens em relação às técnicas moleculares. Essas vantagens incluem o menor custo, a maior praticidade e aplicação em larga escala. Diversos sistemas podem ser utilizados para produção da proteína da capa protéica, como sistemas baseados em *E. coli*

(Helguera *et al.*, 1997) e sistemas baseados em baculovírus (Alves-Júnior *et al.*, 2008), por exemplo.

Diversos fatores podem influenciar a resposta imune: a dose de antígeno utilizada na eliciação do sistema imune; o uso de adjuvantes (Almeida & Lima, 2001); o peso molecular da proteína (Uyemoto *et al.*, 1972).

No Brasil, já foi tentado obter anticorpos policlonais contra proteínas da capa protéica de vírus GarV-C e GarMbFV expressas – na forma solúvel - em baculovírus, mas o título do anti-soro obtido foi muito baixo para que pudesse ser utilizado em sistemas de indexação em larga escala (Alves Júnior, 2006).

Diante da necessidade de desenvolvimento de um sistema de indexação eficiente para vírus de alho, o projeto em questão baseia-se na produção de anti-soros via expressão em vetor baculovirus modificado. A proteína da capa protéica será expressa fusionada entre a proteína baculoviral poliedrina e uma cauda de hexa-histidina. Com esse vetor baculoviral modificado, espera-se obter maior facilidade para purificar a proteína de fusão contendo a proteína da capa protéica, que poderá ser purificada utilizando-se a cauda de hexa-histidina ou por purificação dos poliedros contendo a proteína de fusão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos, procedimentos e soluções utilizados no presente trabalho, em sua maioria, seguem instruções descritas em Sambrook *et al.*, 1989.

Vírus e células utilizados

Foram utilizados os vírus:

- baculovírus selvagem *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV);
- baculovírus selvagem *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV);
- baculovírus recombinante vSynVI⁺Gal (Wang *et al.*, 1991; O'Reilly *et al.*, 1994);
- baculovírus derivados de bacmídeo bMON14272 (Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System”, Invitrogen).

Os vírus foram propagados em cultura de células *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4 ou Tn5B) (Granados *et al.*, 1994). Essas células foram mantidas em meio TC-100 (Gibco-BRL) com 10% de soro fetal bovino a 27°C.

Células de *Escherichia coli* DH5 α foram utilizadas como hospedeiras para a maior parte dos plasmídeos utilizados no presente trabalho. No caso de experimentos envolvendo Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System”

(Invitrogen), também foram utilizadas células *Escherichia coli* DH10Bac (Invitrogen).

Vetores plasmidiais

Para clonagem de produtos de PCR, será utilizado o vetor pGem-T Easy (Promega) (**Figura 2.1**);

Para inserção de genes no genoma do baculovírus, serão utilizados 2 vetores de transferência pFastBac1 (Invitrogen) (**Figura 2.2**) e pSynXIVVI⁺X3 (Wang *et al.*, 1991; O'Reilly *et al.*, 1994) (**Figura 2.3**).

Baculovírus recombinantes construídos com vetores de transferência baseados em pFastBac1 não possuirão o gene da poliedrina selvagem. Já os baculovírus recombinantes construídos com vetores de transferência baseados em pSynXIVVI⁺X3 possuirão o gene da poliedrina selvagem. Esses dois vetores de transferência serão utilizados visando avaliar se a proteína poliedrina selvagem é ou não necessária para que haja formação de poliedros contendo a poliedrina fusionada à proteína da capa protéica de vírus do complexo viral do alho.

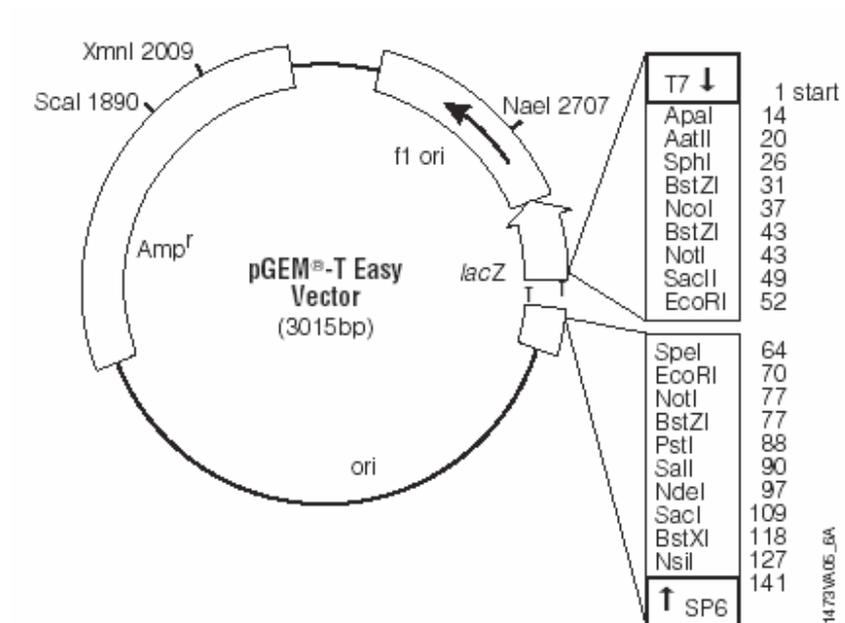


Figura 2.1. Mapa do vetor pGem-T Easy. (Retirado do manual “pGem-T and pGem-T Easy Vector Systems”, Promega). O produto de PCR é clonado entre as timinas protusivas. Os insertos podem ser seqüenciados utilizando-se os “primers” SP6 e T7 (Promega).

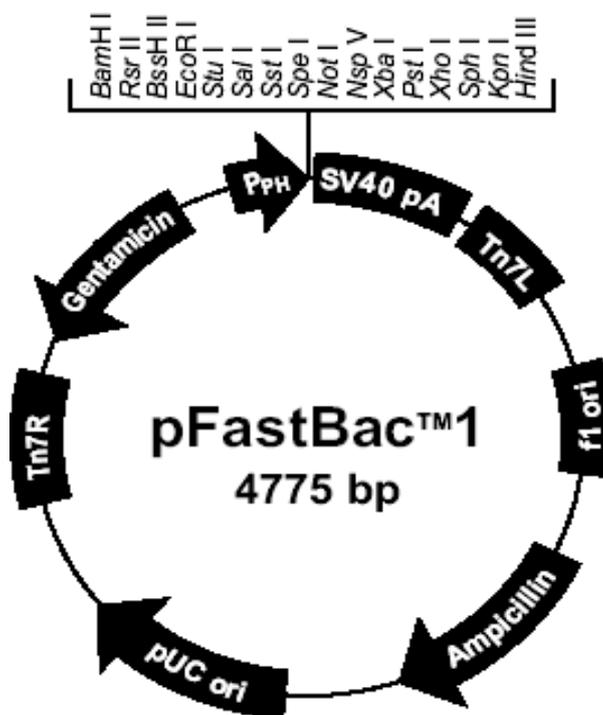


Figura 2.2. Mapa do vetor pFastBac1. (Retirado do manual do Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System”, Invitrogen). O gene de interesse é clonado sob comando do promotor da poliedrina (P_{PH}) utilizando o sítio de multiclonagem. Toda a região localizada entre os elementos mini Tn7 (Tn7R e Tn7L) é transferida, por transposição sítio-específica, para o genoma do bacmídeo bMON14272 (Luckow *et al.*, 1993).

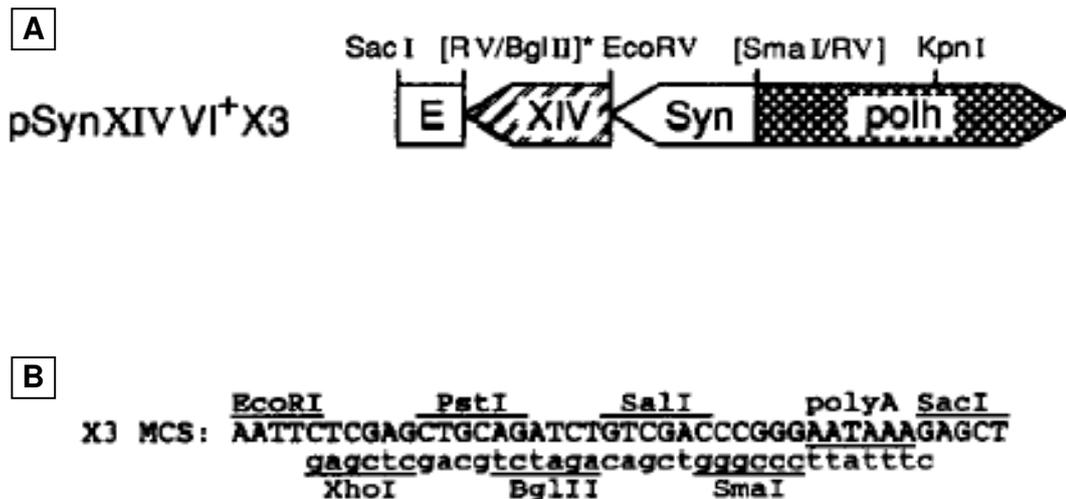


Figura 2.3. Esquema do vetor pSynXIVVI⁺X3. (Retirado de Wang *et al.*, 1991) O gene de interesse é clonado sob comando do promotor P_{synXIV} utilizando o sítio de multiclonagem. **A)** Esquema linear do plasmídeo pSynXIVVI⁺X3, plasmídeo para co-expressão do gene heterólogo e do gene da poliedrina. “E” representa o sítio de multiclonagem X3. **B)** Sítio de multiclonagem X3.

Meios para cultivo de bactérias

Os meios foram autoclavados a 121°C por 20 min. Quando necessário, foram acrescentados antibióticos: ampicilina para concentração final de 100 µg/ml; canamicina para concentração final de 50 µg/ml; gentamicina para concentração final de 7 µg/ml; tetraciclina para concentração final de 10 µg/ml.

Quando necessário, foram acrescentados: X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) para concentração final de 100 µg/ml; IPTG (Isopropylthio-β-galactoside) para concentração final de 40 µg/ml.

Infecção em cultura de células de inseto

Vírus extracelulares (BV) são diluídos em meio de cultura e este adicionado a uma monocamada de células de inseto durante 1 h. Após esse período de adsorção, o inóculo é retirado e as células são mantidas a 27°C, em meio TC-100 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após 48 h, novos BV podem ser coletados no sobrenadante e utilizados para infectar outras células ou para extração de DNA viral.

Purificação de DNA viral

Em uma placa de petri descartável de 100 mm, células Tn5B foram semeadas e infectadas com um baculovírus de interesse. Setenta e duas horas pós-infecção (h.p.i), o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 12000g (centrífuga Beckman J2-MI) por 15 min. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuscitado em tampão “virus disruption buffer” (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,25% SDS). Adicionou-se proteinase K para uma concentração final de 500 µg/ml e incubou-se por 16 h a 37°C. O DNA viral foi extraído com solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). Para precipitar o DNA viral, adicionou-se 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,3. Incubou-se a 20°C por 1 h. Centrifugou-se a 14000 rpm (microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415C) por 10 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 100 µl de etanol 70%. Centrifugou-se a 14000 rpm (microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415C) por 5 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ficou secando a temperatura ambiente por cerca de 20 min. Ressuscitou-se o precipitado de DNA em 50 µl de TE com RNase A (20 µg/ml). O DNA foi estocado a -20°C.

Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose

(Sambrook *et al.*, 1989)

A concentração de agarose utilizada para cada gel foi de 0,8% em TAE 1X (40mM Tris, 20mM acetic acid, 1mM EDTA). Foi utilizado tampão de amostra 6X (Invitrogen). Os géis foram corados em solução com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e os fragmentos de DNA imobilizados foram visualizados via incidência de luz ultravioleta por meio de transiluminador Eagle Eye (Stratagene).

Os marcadores de massa molecular utilizados foram 1 kb DNA ladder (Promega) (**Figura 2.4.A**) ou 1 kb DNA ladder (Fermentas) (**Figura 2.4.B**).

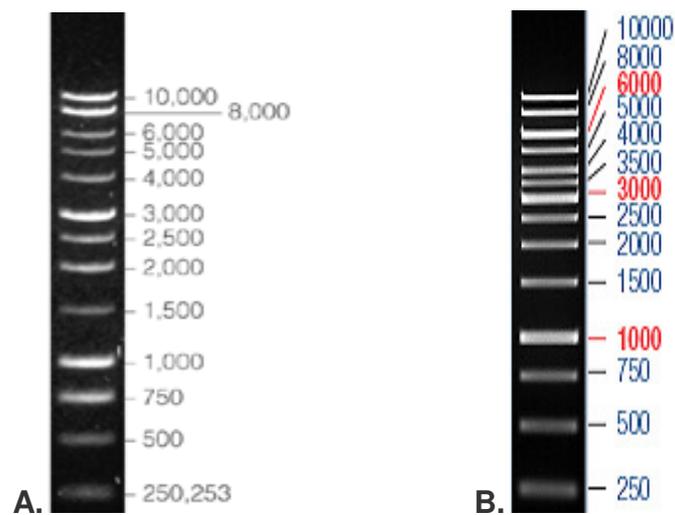


Figura 2.4. Marcadores de DNA utilizados para géis de agarose. A numeração à direita corresponde à quantidade de pares de base (pb). **A)** 1 kb DNA ladder (Promega). Foto retirada de www.promega.com. **B)** 1 kb DNA ladder (Fermentas). Foto retirada de www.fermentas.com.

Eluição de fragmentos de DNA imobilizados em gel de agarose

Para eluição de fragmentos de DNA imobilizados em gel de agarose foi utilizado o kit PureLink Quick Gel Extraction (Invitrogen) ou o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences). Seguiram-se os procedimentos descritos pelo fabricante.

Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

Todas as reações de PCR realizadas neste projeto seguiram o protocolo descrito na **Tabela 2.1** para um volume final de 50 μ l de reação. O ciclo de reação variou de acordo com o fragmento a ser amplificado.

Tabela 2.1. Reagentes utilizados nas reações de PCR.

Reagentes	Volume
dNTP 10 mM	1 μ l
Tampão 10 x	5 μ l
MgCl ₂ 50 mM	0,75 μ l
Taq DNA Polimerase Platinum (10 U/ μ l)	0,5 μ l
“Primer” 5’ (10 μ M)	1 μ l
“Primer” 3’ (10 μ M)	1 μ l
“Template” (10 a 20 η g/ μ l)	1 μ l
Água destilada	q.s.p. 50 μ l

Preparação de células de *Escherichia coli* DH5 α competentes pelo método de cloreto de rubídio (Hanahan *et al.*, 1995)

Colônias isoladas de *E. coli* DH5 α foram crescidas em 5 ml de meio LB líquido durante 16 h, a 37°C sob agitação (agitador orbital Lab-Line, Environ-Shaker) de 120 rpm (pré-inóculo). O pré-inóculo foi então inoculado em 300 ml de LB líquido a 37°C sob agitação (agitador orbital Lab-Line, Environ-Shaker) de 120 rpm até atingir uma absorbância a 600 nm entre 0,5 e 0,7. Foi realizada centrifugação a 3800 rpm (rotor 14, centrífuga Beckman J2-MI) por 12 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Ressuspendeu-se o precipitado de células delicadamente em 20 ml de solução RF1 (pH 5,8) (100 mM RbCl; 50mM MnCl₂ 4H₂O; 30 mM acetato de potássio; 10 mM CaCl₂ 2H₂O; 15% glicerol (p/v)) a 4°C e incubou-se em gelo por 15 min. Centrifugou-se novamente a 3800 rpm (rotor 14, centrífuga Beckman J2-MI) por 12 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspendido em 5 ml de solução RF2 (pH 6,8) (10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl₂ 2H₂O; 15% glicerol (p/v)) a 4°C e incubou-se em gelo por 15 min. As células competentes foram estocadas a -80°C em alíquotas de 100 μ l por no máximo 2 meses.

Transformação de *Escherichia coli* DH5 α competentes via choque térmico

Seguiu-se procedimento descrito em Hanahan *et al.*, 1995.

Para semeadura das bactérias transformadas, foi utilizado meio LB sólido (ágar) contendo antibiótico apropriado (de acordo com o gene de resistência marcador do plasmídeo utilizado). Ao meio LB sólido também foram adicionados X-Gal e IPTG, caso o plasmídeo utilizado possuísse o gene da enzima β -galactosidase.

Extração de DNA plasmidial

Para extração em pequena e média escala, o DNA plasmidial foi extraído via procedimento de lise alcalina, seguindo instruções descritas em Sambrook *et al.*, 1989.

Alternativamente, também foram utilizados o kit *PureLink Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen) para extração em pequena escala e o kit *Concert Rapid Plasmid Purification System* (GibcoBRL) para extração em média escala. Em ambos os casos foram seguidas instruções descritas no manual do fabricante.

Digestões com endonucleases de restrição

Foram utilizadas enzimas de restrição das companhias Invitrogen e Promega.

Quando necessário, as enzimas foram inativadas por calor.

Todos procedimentos foram realizados seguindo instruções do manual do fabricante.

Reações de defosforilação

Para prevenir religação de vetores linearizados contendo extremidades coesivas, foi utilizada a enzima CIAP (*calf intestinal alkaline phosphatase*) para catalisar a hidrólise de grupos 5'-fosfato terminais.

Foi utilizada enzima CIAP da companhia Promega.

Todas as reações foram realizadas seguindo instruções do manual do fabricante.

Reações de ligação de fragmentos de DNA

Aqui foi utilizada a enzima T4 DNA Ligase (*Invitrogen*).

Proporção de DNA vetor:DNA inserto utilizado foi de aproximadamente 1:3.

Reações foram realizadas seguindo instruções do manual do fabricante.

Reações de seqüenciamento

Foi feito seqüenciamento automático de fragmentos clonados em pGem T Easy (*Promega*). Para cada seqüenciamento, foi utilizado aproximadamente 100 ng de DNA plasmidial em 5 µl de TE ou água destilada. Os “primers” utilizados foram SP6 (*Promega*) e T7 (*Promega*).

Os seqüenciadores automáticos das plataformas de seqüenciamento da Universidade Católica de Brasília ou da Embrapa Cenargen foram:

MEGA BACE 1000 (*Amershan Bioscience*);

ABI-modelo 377 (*Perkin Elmer*);

As seqüências foram analisadas utilizando o programa Chromas versão 2.33 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

Em alguns casos, após análise no programa Chromas, também foi utilizado o programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990; McGinnis *et al.*, 2004) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) para analisar a identidade por comparação com seqüências encontradas no GenBank.

Análise da expressão de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As análises de proteína foram feitas utilizando o sistema Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (*BIO-RAD*) e o sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (*BIO-RAD*), seguindo-se as instruções e utilizando as soluções descritas em seus respectivos manuais de instruções. A preparação do gel de poliacrilamida foi feita seguindo o manual do fabricante, sendo que o gel separador foi feito com 12% de bis/acrilamida, enquanto que o gel concentrador foi feito com 4% de bis/acrilamida.

Preparação do extrato protéico: células BTI-Tn5B1-4 foram semeadas em placas de 100 mm. As células foram crescidas em 15 ml de meio TC-100 com 10% de soro fetal bovino. Em seguida, foram infectadas (10 unidades formadoras de placa por célula) com o vírus apropriado. A 72 h.p.i., o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 3 ml de tampão PBS 1X (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g K₂HPO₄; H₂O qsp 1 L; pH 7,4 – ajustar com HCl). Centrifugou-se por 5 min a 3000 rpm (rotor 14, centrífuga Beckman J2-MI) a 4°C. Descartou-se o sobrenadante. As células foram novamente ressuspensas em PBS 1X e centrifugadas como no passo anterior. O precipitado de células foi então ressuspensado em 200 µl de tampão PBS 1X. Foram postos 5 µl dessa amostra em um tubo de microcentrífuga e o restante foi estocado a -80°C. Aos 5 µl foi adicionado tampão de amostra de proteínas. Em seguida, incubou-se em água fervente por 5 min e a amostra foi então aplicada no gel de poliacrilamida e foi

realizada eletroforese. O gel foi então corado com solução corante para gel SDS-PAGE (40% metanol; 10% ácido acético glacial; 0,1% comassie blue) por 40 min. Em seguida, o gel foi posto em solução descorante (40% metanol; 10% ácido acético glacial) por 1 h. O padrão protéico resultante da infecção por determinado vírus foi avaliado visualmente.

Análise da expressão de proteínas por Western Blot

As análises por Western Blot foram feitas utilizando o sistema descontínuo de tampões descrito em US/EG Bulletin 2134 (*BIO-RAD*).

Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida, mas dessa vez o gel não foi corado. Em vez disso, as proteínas imobilizadas foram transferidas eletroforéticamente para membrana de nitrocelulose (Hybond – C pure) (*Amershan*) utilizando o sistema Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (*BIO-RAD*), seguindo instruções descritas no protocolo do fabricante. O sistema de tampões utilizado para transferência foi sistema descontínuo, descrito em US/EG Bulletin 2134 (*BIO-RAD*):

- Tampão Tris-CAPS 5X (60 mM Tris-base, 40 mM CAPS, pH 9,6);
- Tampão do ânodo (botton buffer) 1X: 20 ml de Tris-CAPS 5X; 15 ml de metanol; 65 ml de água destilada;
- Tampão do cátodo (top buffer) 1X: 20 ml de Tris-CAPS 5X; 1 ml de SDS 10%; 79 ml de água destilada.

Após as proteínas terem sido transferidas eletroforéticamente para a membrana de nitrocelulose, esta foi incubada em solução de bloqueio (PBS + 3% de BSA ou leite em pó desnatado) durante 5 min. Repetiu-se esse procedimento mais duas vezes. Após isso, a membrana foi incubada sob agitação por 1 h em solução contendo o anticorpo primário:

- para detecção da poliedrina, utilizou-se anticorpo policlonal contra poliedrina (produzido em coelho) diluído 1:2000 em tampão PBS + 0,5% de BSA;
- para detecção da cauda de hexa-histidina, utilizou-se anticorpo monoclonal contra cauda de hexa-histidina (produzido em camundongo) (Roche) diluído (para concentração final de 200 ng/ml) em tampão PBS + 0,5% de BSA:

Em seguida, a solução contendo o anticorpo primário foi descartada e incubou-se a membrana sob agitação por 5 min em solução PBST (PBS 1X; 0,05% Tween-20). Repetiu-se esse passo mais duas vezes. Após isso, a membrana foi incubada sob agitação por 1 h em solução contendo o anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (anticorpo anti-coelho feito em cabra ou anticorpo anti-rato feito em cabra) diluído 1:10000 em PBS com 0,5% de BSA. Descartou-se a solução contendo o anticorpo secundário e incubou-se a membrana sob agitação por 5 min em solução PBST. Repetiu-se esse passo mais duas vezes. Lavou-se a membrana com tampão de fosfatase alcalina (NaCl 5M; Tris-HCL 1M, pH 7,5), sob agitação por 5

min. Em ambiente escuro, a membrana foi incubada em solução reveladora contendo os reveladores NBT e BCIP (Promega) diluídos em tampão de fosfatase alcalina por cerca de 5 min. A reação foi interrompida por sucessivas lavagens com água destilada.

Obtenção dos genes para capa protéica (CP)

GarMbFV, GarV-C, GarV-D: foram utilizados plasmídeos resultantes da clonagem, em vetor pGem-T Easy (Promega), de produtos de PCR equivalentes aos genes da capa protéica desses vírus (Melo Filho *et al.*, 2004);

GarCLV, LYSV, OYDV: foram utilizados plasmídeos resultantes da clonagem, no vetor pGem-T (Promega), de produtos de PCR equivalentes aos genes da capa protéica desses vírus (Fajardo *et al.*, 2001).

Obtenção dos genes CP^N (genes da capa protéica flanqueados por sítios de NcoI) (Figura 2.5.A)

Por meio de reações de PCR, sítios de *NcoI* foram inseridos em ambas extremidades dos genes de capa protéica dos vírus de alho utilizados neste projeto (GarMbFV, GarV-C, GarV-D, LYSV, OYDV, GarCLV). Os “primers” (**Tabela 2.2**) utilizados nessas reações de PCR foram desenhados com base nas seqüências nucleotídicas – obtidas no GenBank - desses

genes (**Tabela 2.3**). Os “primers” 5’ são responsáveis pela inserção do sítio de *NcoI* (5’ ccatgg 3’) na extremidade 5’ do gene. Os “primers” 3’ são responsáveis por: inserir sítio de *NcoI* (5’ ccatgg 3’) na extremidade 3’ do gene e causar mutação de forma a desfazer o códon de terminação. **Tabela 2.4** descreve o programa utilizado para amplificação dos genes de capa protéica utilizados no presente projeto.

Tabela 2.2. Primers para amplificar o gene da capa protéica de diversos vírus de alho e adicionar sítios de *Nco*I às extremidades do produto amplificado.

Destacado encontra-se a seqüência para o sítio de *Nco*I.

Vírus	“Primer”	Seqüência (5’ → 3’)
GarV-C	FcpGarV-C- <i>Nco</i> I	<u>ccatgg</u> gtggagacagcctatctg
	RcpGarV-C- <i>Nco</i> I	<u>ccatgg</u> aaaacgtaaacatgagaggc
GarV-D	FcpGarV-D- <i>Nco</i> I	<u>ccatgg</u> atgaacaaggaacacg
	RcpGarV-D- <i>Nco</i> I	<u>ccatgg</u> agaatgtgatcattggagg
GarMbFV	FcpGMBFV- <i>Nco</i> I	<u>ccatgg</u> acgaccctgttgacccaagc
	RcpGMBFV- <i>Nco</i> I	<u>ccatgg</u> agaacgtaatcatgggagg
GarCLV	FcpGCLV- <i>Nco</i> I	<u>ccatgg</u> cagtgagtgaaacagagg
	RcpGCLV- <i>Nco</i> I	<u>ccatgg</u> agtctgcattgttgatcc
LYSV	FcpLYSV- <i>Nco</i> I	<u>ccatgg</u> ccggcgacgaactagatgc
	RcpLYSV- <i>Nco</i> I	<u>ccatgg</u> actgcatatgcgaccatc
OYDV	FcpOYDV- <i>Nco</i> I	<u>ccatgg</u> caggagatggggaggacgc
	RcpOYDV- <i>Nco</i> I	<u>ccatgg</u> acattctaataccaagcaacg

Tabela 2.3. Número de acesso (genbank) para seqüência nucleotídica dos genes de capa protéica – de vírus de alho – utilizados neste projeto.

Vírus	Número de acesso (genbank) para seqüência do gene da capa protéica	Referência
GarMbFV	X98991	Helguera <i>et al.</i>
GarV-C	AB010302	Sumi <i>et al.</i> , 1999
GarV-D	AF519572	Kang <i>et al.</i>
GarCLV	AF228416	Fajardo <i>et al.</i> , 2001
LYSV	AF228415	Fajardo <i>et al.</i> , 2001
OYDV	AF228414	Fajardo <i>et al.</i> , 2001

Tabela 2.4. Programa de PCR utilizado para amplificação dos genes da capa protéica de diferentes vírus de alho.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
Desnaturação	94	2
Desnaturação	94	1
Anelamento	51	1,5
Extensão	72	1
Extensão Final	72	5
Final	4	∞

30 ciclos

Obtenção dos vetores pGemCP^N

Os fragmentos de PCR CP^N (genes da capa protéica flanqueados por sítios de *Nco*I) foram clonados no vetor pGem-T Easy (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Bactérias competentes DH5 α foram transformadas com o produto dessa ligação (pGemCP^N). Os plasmídeos pGemCP^N foram purificados seguindo um dos protocolos de purificação de plasmídeos descritos acima. Plasmídeos pGemCP^N purificados foram digeridos com a enzima de restrição *Nco*I. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose e o fragmento correspondente ao gene da capa protéica com as extremidades digeridas por *Nco*I foi eluído do gel e clonado em um vetor de transferência (pFastPH e pSynPH) digerido por *Nco*I.

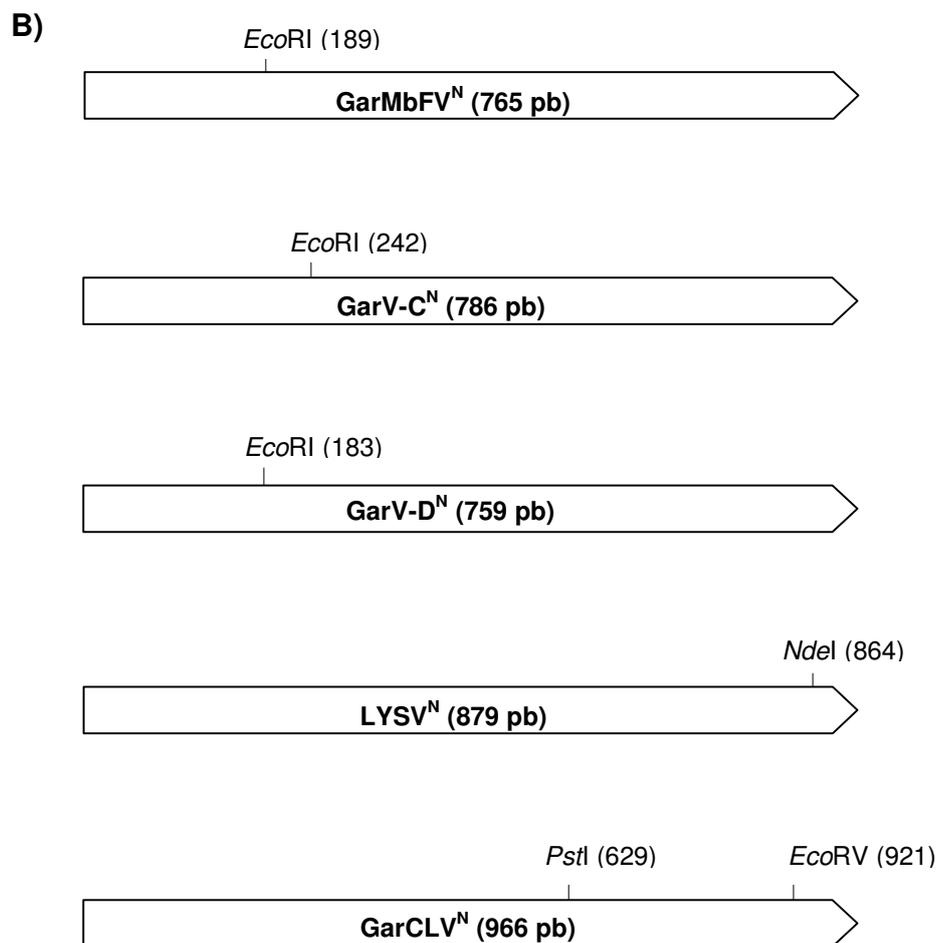


Figura 2.5. Esquema representativo dos fragmentos CP^N. **A)** Esquema geral do gene CP^N (representado em vermelho). Os “primers” (**Tabela 2.2**) utilizados para acrescentar os sítios de *Nco*I estão representados em azul. Sítios de *Nco*I foram acrescentados em ambas extremidades. **B)** Esquema linear dos produtos de PCR GarMbFV^N, GarV-C^N, GarV-D^N, LYSV^N e GarCLV^N, mostrando as endonucleases de restrição (nome e posição) utilizadas para comprovar cada um dos genes CP^N indicados.

Construção de vetores de transferência pFastPCP^{NH} e pSynPCP^{NH}

Obtenção do fragmento PH

O fragmento PH (**Figura 2.6**) possui um sítio de *NcoI* (5' ccatgg 3') entre a seqüência do gene da poliedrina e a seqüência da cauda de histidina. Esse sítio de *NcoI* foi inserido para ser utilizado para clonagem do gene da capa protéica de vírus de alho entre o gene da poliedrina e a seqüência da cauda de histidina, formando uma *orf* de fusão. O “primer” 3' é responsável por: inserir na extremidade 3' do gene da poliedrina um sítio de *NcoI*, causar mutação de forma a desfazer o códon de terminação original da poliedrina e acrescentar seqüência para um cauda de hexa-histidina seguida por um códon de terminação. O fragmento PH foi obtido por meio de reação de polimerase em cadeia (PCR). O ciclo de reação utilizado para a reação de PCR está descrito na **Tabela 2.5**.

Tabela 2.5. Programa de PCR utilizado para amplificação do gene da poliedrina dos baculovírus AcMNPV e AgMNPV.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
Desnaturação	94	5
Desnaturação	94	1,5
Anelamento	49	1,5
Extensão	72	1,5
Extensão Final	72	7
Final	4	∞

30 ciclos

Três estratégias foram utilizadas para obter o fragmento PH via PCR:

a) Estratégia PH1 e PH2

“primer” 5’: polFBgIII (**Tabela 2.6**);

“primer” 3’: polAcAghistag (**Tabela 2.6**);

“template” PH1: plasmídeo p2100 (contém o gene da poliedrina de AgMNPV);

“template” PH2: DNA purificado de vírus AgMNPV.

b) Estratégia PH3

“primer” 5’: polFBgIIINEW (**Tabela 2.6**);

“primer” 3’: polAcAghistag (**Tabela 2.6**);

“template”: DNA purificado de vírus AcMNPV .

Tabela 2.6. “Primers” utilizados para acrescentar cauda de histidina à poliedrina. Destacado encontra-se a seqüência para o sítio de *Nco*I. Em maiúsculas, a seqüência para a cauda de histidina.

“Primer” 5'	polFBgIII	5` - ccgagatctatgccagattatagc – 3`
“Primer” 5'	polFBgIIINEW	5' – ccgagatctatgccagattatagctataggcc - 3'
“Primer” 3'	polAcAghistag	5'-ttaGTGATGATGATGATGATGt ccatqga ataatacgcggggccggtaaacagaggtgc-3'

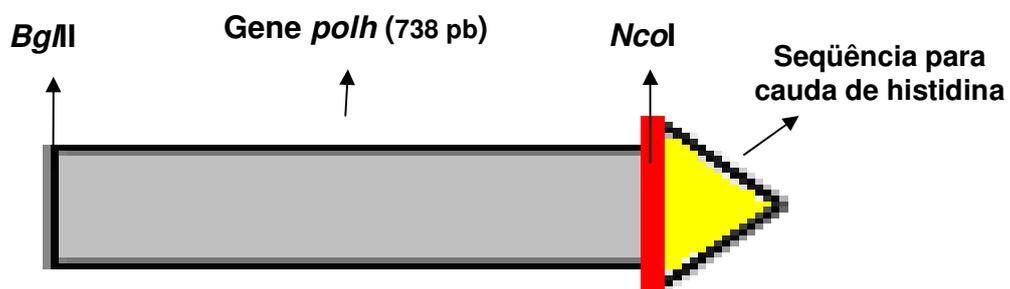


Figura 2.6. Esquema representativo do fragmento PH. O gene da poliedrina está representado em cinza. O sítio de *Nco*I está representado em vermelho. A cauda de hexa-histidina está representada em amarelo.

Estratégia PH1

Fragmento PH1 obtido por PCR foi clonado no vetor pGem-T Easy, gerando pGemPH1. O plasmídeo pGemPH1 foi digerido com *EcoRI* e as bandas foram separadas por eletroforese em gel de agarose. A banda do fragmento PH1 (777 pb) foi eluída do gel e clonada em:

- vetor pFastBac1 digerido por *EcoRI* e defosforilado, obtendo-se assim o plasmídeo pFastPH1;
- vetor pSynXIVVI⁺X3 (Wang *et al.*, 1991; O'Reilly *et al.*, 1994) digerido por *EcoRI* e defosforilado, obtendo-se assim o plasmídeo pSynPH1.

Para confirmar que o fragmento PH1 havia sido inserido na orientação correta, os plasmídeos pFastPH1 e pSynPH1 foram digeridos com a endonuclease de restrição *BglII*.

Uma vez confirmados, pFastPH1 e pSynPH1 foram digeridos por *NcoI* e defosforilados. Nesses vetores, foram então clonados os fragmentos CP^N (dos vírus GarMbFV, GarV-C, GarV-D, GarCLV, LYSV) que haviam sido eluídos a partir de eletroforese em gel de agarose dos respectivos plasmídeos pGemCP^N digeridos por *NcoI*. Os plasmídeos resultantes foram respectivos pFastPCP^NH1 e pSynPCP^NH1. Para confirmar que os fragmentos CP^N foram inseridos em orientação correta, plasmídeos pFastPCP^NH1 e pSynPCP^NH1 foram digeridos com enzimas de restrição apropriadas (**Figura 2.5.B**):

- pFastP(Mb)^NH1 foi digerido por *EcoRI*;

- pFastP(C)^NH1 foi digerido por *EcoRI*;
- pFastP(D)^NH1 foi digerido por *EcoRI*;
- pFastP(LYSV)^NH1 foi digerido por *NdeI* e *BglII*;
- pFastP(GarCLV)^NH1 foi digerido por *EcoRV*;
- pSynP(Mb)^NH1 foi digerido por *EcoRI*;
- pSynP(C)^NH1 foi digerido por *EcoRI*;
- pSynP(D)^NH1 foi digerido por *EcoRI*;
- pSynP(LYSV)^NH1 foi digerido por *NdeI*;
- pSynP(GarCLV)^NH1 foi digerido por *PstI*;

Estratégia PH2

Fragmento PH2 obtido por PCR foi clonado no vetor pGem-T Easy, gerando pGemPH2. Para confirmar a identidade do fragmento PH2, o plasmídeo pGemPH2 foi digerido com a enzima de restrição *ApaI*. Após ter a identidade confirmada, pGemPH2 foi submetido a uma digestão dupla (com enzimas *BglII* e *NcoI*). O produto da digestão foi separado em gel de agarose e o fragmento P (banda menor, correspondente ao gene da poliedrina do fragmento PH2 sem a cauda de histidina) foi eluído.

O plasmídeo pFastPH1 foi digerido duplamente com as endonucleases de restrição *BamHI* e *NcoI*. O produto dessa digestão foi separado por eletroforese em gel de agarose e o fragmento pFastH (banda maior, correspondente ao plasmídeo pFastPH1 linearizado e sem o suposto gene da poliedrina) foi eluído.

Em seguida, o fragmento P foi então clonado no fragmento pFastH. Bactérias competentes DH5 α foram transformadas com o produto dessa ligação: pFastPH2. O plasmídeo foi purificado seguindo um dos protocolos de purificação de plasmídeos descritos acima. Para confirmar que o fragmento P havia sido inserido na orientação correta, o plasmídeo pFastPH2 foi digerido com a endonuclease de restrição *Bgl*II.

Uma vez confirmado, pFastPH2 foi digerido por *Nco*I e defosforilado. Nesse vetor, foi então clonado o fragmento CP^N (do vírus GarCLV) que havia sido eluído de eletroforese em gel de agarose do plasmídeo pGemGarCLV^N digerido por *Nco*I. O plasmídeo resultante foi pFastP(GarCLV)^NH2. Para confirmar que o fragmento GarCLV^N fora inserido em orientação correta, plasmídeo pFastP(GarCLV)^NH2 foi digerido com a endonuclease de restrição *Eco*RV (**Figura 2.5.B**).

Estratégia PH3

Fragmento PH3 obtido por PCR foi clonado em vetor pGem-T Easy, gerando pGemPH3. Para confirmar a identidade do fragmento PH3, o plasmídeo pGemPH3 foi digerido com a enzima de restrição *Apa*I. Após ter a identidade confirmada, pGemPH3 foi submetido a digestão dupla (com enzimas *Bgl*II e *Nco*I). O produto da digestão foi separado em gel de agarose e o fragmento P (banda menor, correspondente ao gene da poliedrina do fragmento PH3 sem a cauda de histidina) foi eluído.

O plasmídeo pFastPH1 foi digerido duplamente com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Nco*I. O produto dessa digestão foi separado por eletroforese em gel de agarose e o fragmento pFastH (banda maior, correspondente ao plasmídeo pFastPH1 linearizado e sem o suposto gene da poliedrina) foi eluído.

Em seguida, o fragmento P foi então clonado no fragmento pFastH. Bactérias competentes DH5 α foram transformadas com o produto dessa ligação: pFastPH3. O plasmídeo foi purificado seguindo um dos protocolos de purificação de plasmídeos descritos acima. Para confirmar que o fragmento P havia sido inserido na orientação correta, o plasmídeo pFastPH3 foi digerido com a endonuclease de restrição *Bgl*II.

Uma vez confirmado, pFastPH3 foi digerido por *Nco*I e defosforilado. Nesse vetor, foram então clonados os fragmentos CP^N (dos vírus GarMbFV, GarV-C e LYSV) que haviam sido eluídos de eletroforese em gel de agarose dos respectivos plasmídeos pGemCP^N digeridos por *Nco*I.

Construção e purificação de baculovírus recombinantes utilizando Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System”

(Invitrogen)

Vírus recombinantes foram construídos utilizando o sistema Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System” (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante (**Figura 2.7**).

Construção e purificação de bacmídeos recombinantes

Plasmídeos pFastPH1, pFastPH2, pFastPH3, pFastP(Mb)^{NH1}, pFastP(C)^{NH1}, pFastP(D)^{NH1}, pFastP(LYSV)^{NH1}, pFastP(GarCLV)^{NH1}, pFastP(GarCLV)^{NH2}, pFastP(Mb)^{NH3}, pFastP(C)^{NH3}, pFastP(LYSV)^{NH3} foram transformados em células DH10Bac (Invitrogen) (que contêm o genoma viral do AcMNPV modificado na forma de um plasmídeo denominado bacmídeo) através choque térmico, onde ocorre, via transposição sítio-específica, a recombinação dos mesmos com o DNA do bacmídeo, resultando em um bacmídeo recombinante.

Foi feita seleção de um clone branco em meio sólido LB-ágar com canamicina, tetraciclina, gentamicina, X-Gal e IPTG. O clone selecionado foi amplificado e o DNA viral purificado seguindo instruções descritas no manual do kit Bac-to-Bac (Invitrogen).

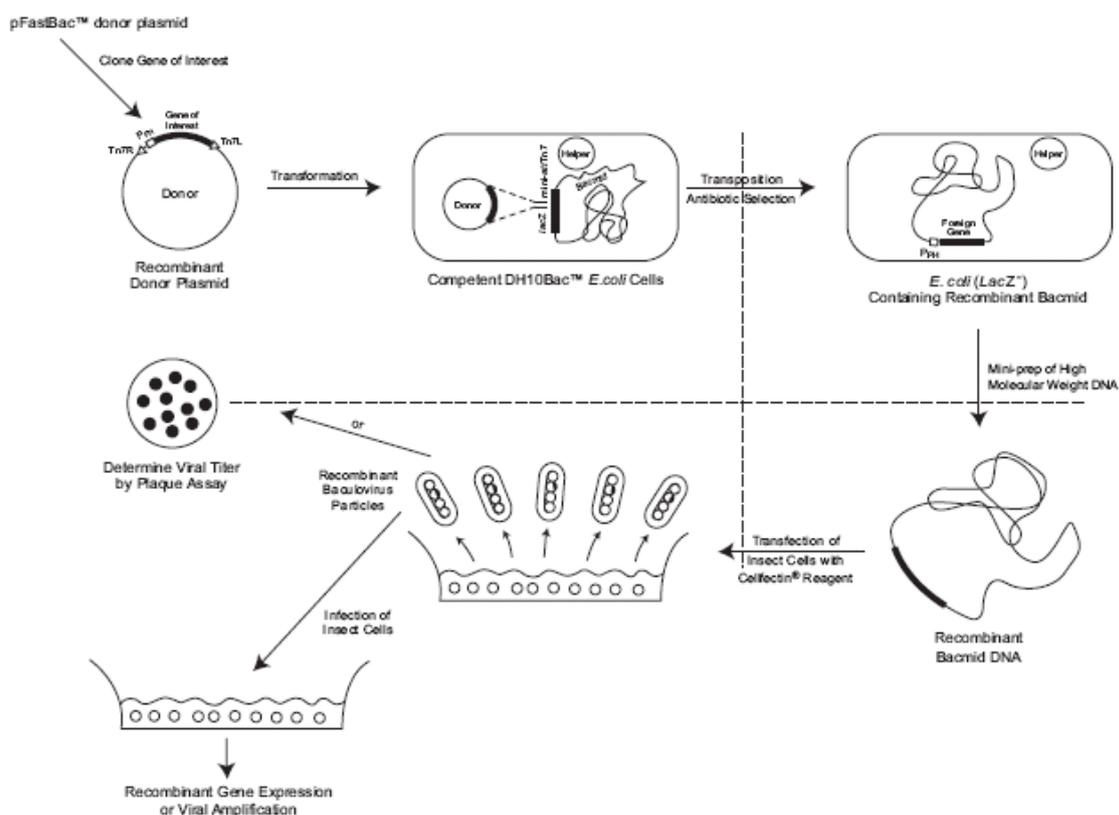


Figura 2.7. Esquema da construção de baculovírus recombinante utilizando o sistema Bac-to-Bac (Invitrogen). Primeiramente, o gene de interesse é clonado no plasmídeo doador pFastBac1, gerando o plasmídeo recombinante, o qual então é transformado em células DH10Bac. Nessas células, o gene de interesse é transferido – por transposição sítio-específica – para o genoma do bacmídeo. As colônias contendo o bacmídeo recombinante são selecionadas em meio contendo antibióticos (canamicina, tetraciclina e gentamicina) e o DNA do bacmídeo recombinante é purificado. Esse DNA é utilizado para transfectar células de inseto, produzindo finalmente os vírus recombinantes. Figura retirada do manual do kit Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen).

A construção do bacmídeo recombinante foi confirmada via reação de PCR (**Figura 3.14.A**). O “primer” 3’ utilizado foi: “primer” M13R (5’ CAGGAAACAGCTATGAC 3’) (Invitrogen), que se anela a porção do DNA do bacmídeo. Foram utilizados “primers” 5’ diferentes (**Tabela 2.7**), dependendo do fragmento inserido. O ciclo de reação utilizado para a reação de PCR está descrito na **Tabela 2.8**.

Tabela 2.7. Relação dos “primers” 5’ utilizados nas reações de PCR para comprovar construção dos bacmídeos recombinantes.

Fragmento inserido	“Primer” 5’
PH1, PH2	polFBgIII
PH3	polFBgIIIINEW
P(C) ^N H	FcpGarV-C-NcoI
P(D) ^N H	FcpGarV-D-NcoI
P(Mb) ^N H	FcpGarMbFV-NcoI
P(GarCLV) ^N H	FcpGarCLV-NcoI
P(LYSV) ^N H	FcpLYSV-NcoI

Tabela 2.8. Programa de PCR utilizado para comprovar construção dos bacmídeos recombinantes.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
Desnaturação	94	3
Desnaturação	94	1
Anelamento	53	1
Extensão	72	3
Extensão Final	72	7
Final	4	∞

30 ciclos

Transfecção de bacmídeos recombinantes

Para realizar a transfecção de células Tn5B, utilizou-se DNA de bacmídeos recombinantes purificados e lipossomos (Cellfectin, Invitrogen) seguindo instruções descritas no manual do kit Bac-to-Bac (Invitrogen).

As células transfectadas foram incubadas a 27°C por 5 dias. As células foram visualizadas em microscópio de luz para observação do aparecimento de efeitos citopáticos resultantes de infecção.

Construção e purificação de baculovírus recombinantes por meio de recombinação homóloga (Figura 2.8)

Células Tn5B foram co-transfectadas com 1 µg de DNA de construções plasmidiais (foram utilizados pSynPH1, pSynP(Mb)^{NH1}, pSynP(C)^{NH1}, pSynP(D)^{NH1}, pSynP(GarCLV)^{NH}, pSynP(LYSV)^{NH} e 0,5 µg de DNA do vírus vSynVI⁻Gal, previamente linearizado com a enzima de restrição *Bsu36I*.

A linearização do DNA do vSynVI⁻Gal foi realizada para aumentar a probabilidade de se obter vírus recombinantes. O vírus vSynVI⁻Gal possui um sítio único de *Bsu36I* localizado no gene da β-galactosidase. Quando linearizado, o DNA do baculovírus deixa de ser infectivo (Kitts *et al.*, 1990). Quando se realiza co-transfecção com o DNA baculoviral circular, de toda a população viral obtida, apenas entre 0,1 % e 1 % são vírus recombinantes. Quando se utiliza o DNA baculoviral linearizado, essa porcentagem pode

chegar a até 30 %, facilitando portanto não só a construção do vírus recombinante, como também a sua purificação.

O vírus vSynVI⁻Gal possui o gene da β -galactosidase e não possui o gene da poliedrina. Células infectadas pelo vSynVI⁻Gal possuem fenótipo oclusão negativo (occ^-); além disso, na presença de X-Gal (substrato da enzima β -galactosidase), essas células infectadas adquirem coloração azulada. Porém, os plasmídeos vetores de transferência pSynXIVVI⁺X3 e derivados possuem regiões flanqueadoras homólogas (às regiões flanqueadoras do gene da poliedrina no genoma viral selvagem) flanqueando: gene da poliedrina e fragmento de interesse (PH ou PCP^{NH}). Quando a co-transfecção é feita, dentro das células ocorre recombinação homóloga entre o DNA dos plasmídeos (pSynPH; pSynPCP^{NH}) e o DNA viral. Com isso, os vírus recombinantes que resultam desse procedimento possuem fenótipo occ^- , não possuem o gene da β -galactosidase e possuem as regiões de interesse (no caso do presente projeto, os fragmentos PH ou PCP^{NH}). A construção do vírus recombinante se torna clara pela observação de corpos de oclusão, o que evidencia a expressão da poliedrina. Para observar a presença ou não dos corpos de oclusão, células co-transfectadas foram observadas em um microscópio de luz invertido (Axiovert 100, Zeiss).

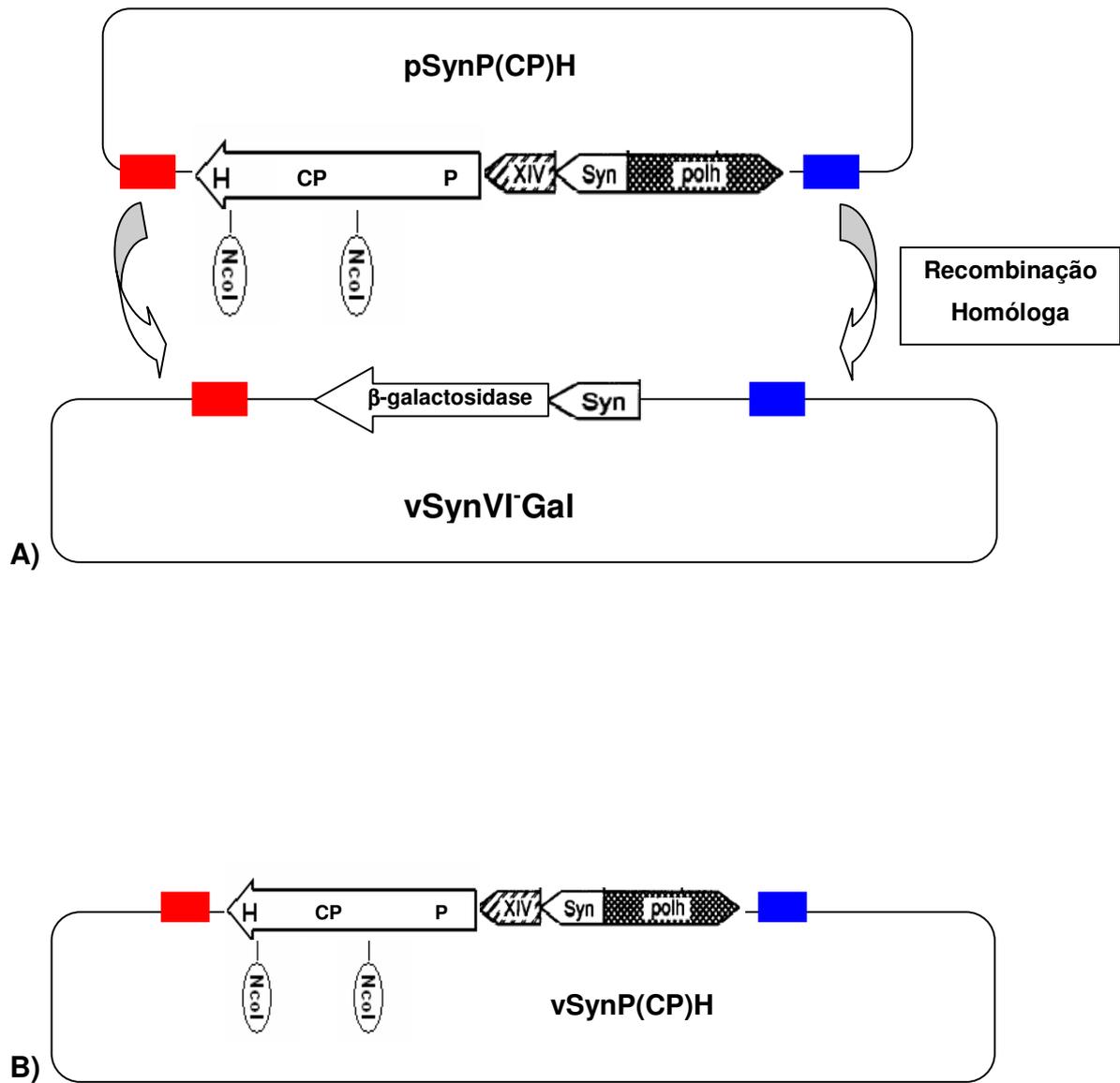


Figura 2.8. Construção de baculovírus recombinantes por recombinação

homóloga. A) O vetor de transferência pSynP(CP)^{NH} contém uma região promotora (promotores P_{syn} e P_{XIV}) comandando a *orf* P(CP)^{NH}, um locus com gene da poliedrina (*polh*) sob comando de seu próprio promotor, e as regiões flangeadoras (retângulos vermelho e azul) para a recombinação homóloga com o genoma do baculovirus vSynVI⁻Gal (no lugar do gene da poliedrina, possui o gene da β-galactosidase sob comando do promotor P_{syn}). Após a co-transfecção, toda a região entre as regiões flangeadoras é introduzida no genoma viral, gerando vSynP(CP)^{NH}. **B)** Esquema do vírus vSynP(CP)^{NH}. A presença do gene da poliedrina nativo facilita a purificação do vírus recombinante. Isso porque vSynVI⁻Gal possui fenótipo oclusão negativo (*occ*⁻), enquanto que vSynP(CP)^{NH} possui fenótipo oclusão positivo (*occ*⁺). Em placas contendo células de inseto infectadas com o sobrenadante da co-transfecção é possível verificar a presença do vírus recombinante pela presença de corpos de oclusão.

Co-transfecção

Placas de Petri descartáveis foram semeadas com células Tn5B em meio TC-100 sem soro e incubadas a 27°C por 1 h para permitir a aderência das células. Em um tubo de microcentrífuga, foram adicionados 10 µl do reagente Cellfectin (Invitrogen) e 1 ml de meio TC-100 sem soro. Em outro tubo de microcentrífuga, foram adicionados aproximadamente 1 µg de DNA plasmidial e 0,5 µg de DNA do vírus vSynVI⁻Gal (previamente linearizado com a enzima de restrição *Bsu36I*) e 1 ml de meio TC-100 sem soro. Após 10 min, as duas soluções (DNA e Cellfectin) foram misturadas e incubadas a temperatura ambiente por 10 min. Substituiu-se o meio das células pela mistura cellfectina/DNA e incubou-se por 4 h a 27°C. Após este período, a mistura de co-transfecção foi substituída por meio TC-100 com 10 % de soro fetal bovino. Incubou-se as células co-transfectadas a 27°C por 5 dias. As células foram visualizadas em microscópio de luz invertido (Axiovert 100, Zeiss) para observação do aparecimento de efeitos citopáticos resultantes de infecção, principalmente a presença de corpos de oclusão (fenótipo occ+).

Purificação do vírus recombinante por diluição seriada

Uma vez verificada a presença de corpos de oclusão, o sobrenadante das células infectadas foi coletado e utilizado para purificar os vírus recombinantes vSynPH1, vSynP(Mb)^NH1, vSynP(C)^NH1, vSynP(D)^NH1 pelo método de diluição seriada em placa de 96 poços (O'Reilly *et al.*, 1994).

Foram realizados 4 ciclos de diluição seriada para a obtenção dos vírus recombinantes puros.

3. RESULTADOS

Obtenção dos fragmentos CP^N (genes da capa protéica flanqueados por sítios de NcoI)

Análise eletroforética dos PCRs realizados para construção dos fragmentos Mb^N, C^N, D^N, GarCLV^N, LYSV^N (**Figura 3.1**) e OYDV^N (dado não mostrado) mostrou que os fragmentos amplificados possuíam os tamanhos esperados (**Tabela 3.1**).

Tabela 3.1. Tamanho esperado dos fragmentos de PCR CP^N para os diversos vírus utilizados.

Vírus	Fragmento de PCR CP ^N (pb)
GarMbFV	765
GarV-C	786
GarV-D	759
GarCLV	966
LYSV	879
OYDV	783

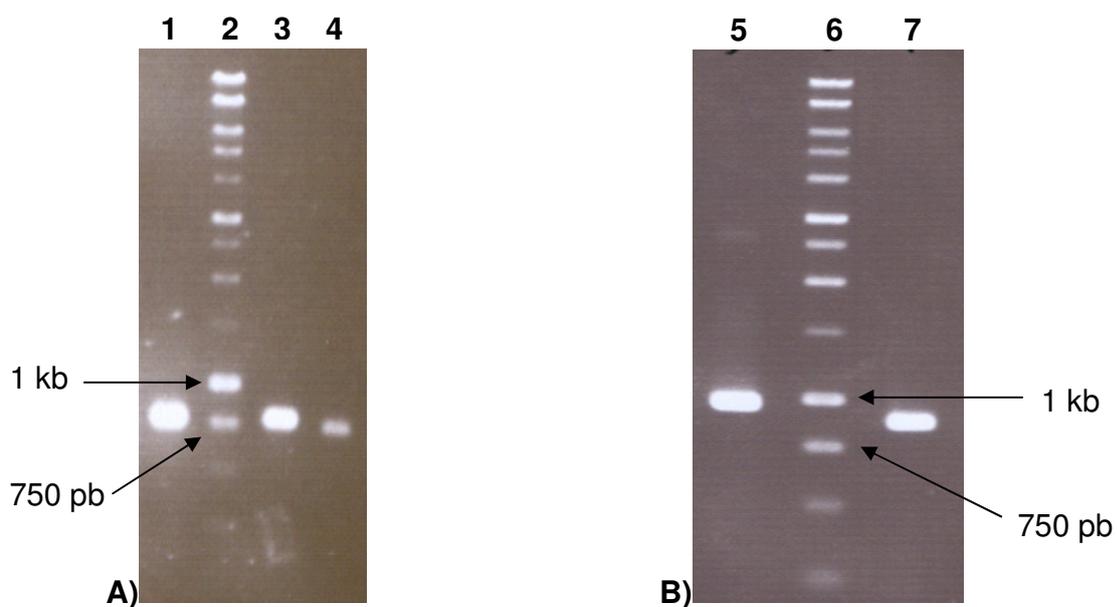


Figura 3.1. Amplificação dos fragmentos CP^N. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de reação de PCR para obter fragmentos de capa protéica flanqueados por sítios de *Nco*I. **A)** 1- PCR Mb^N (765 pb); 2- marcador 1 kb DNA ladder (Promega); 3- PCR C^N (786 pb); 4- PCR D^N (759 pb). **B)** 5- PCR GarCLV^N (966 pb); 6- marcador 1 kb DNA ladder (Promega); 7- PCR LYSV^N (879 pb).

Contudo, os sítios de *Nco*I inseridos pelos primers (**Tabela 2.2**) estão localizados próximos demais às extremidades dos produtos de PCR CP^N. Sabe-se que enzimas de restrição têm eficiência reduzida quando o sítio alvo está localizado na extremidade de um fragmento de DNA. Para contornar essa dificuldade, esses fragmentos de PCR foram clonados em vetor pGem-T Easy (Promega) visando obter os diversos plasmídeos pGemCP^N. A construção dos diversos vetores pGemCP^N foi confirmada por meio de PCRs (dados não mostrados) realizados nas mesmas condições dos feitos para a obtenção dos fragmentos de PCR CP^N.

Devido a esses resultados, foi considerado que os plasmídeos pGemMb^N, pGemC^N, pGemD^N, pGemGarCLV^N, pGemLYSV^N e pGemOYDV^N haviam sido construídos.

Os diversos plasmídeos pGemCP^N foram digeridos com endonuclease de restrição *Nco*I. Os fragmentos de DNA foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose e as bandas correspondentes aos fragmentos CP^N (com extremidades coesivas de *Nco*I) foram eluídos. 10 % do volume de cada eluição foi analisado eletroforeticamente (**Figura 3.2**), comprovando que a eluição foi bem sucedida.

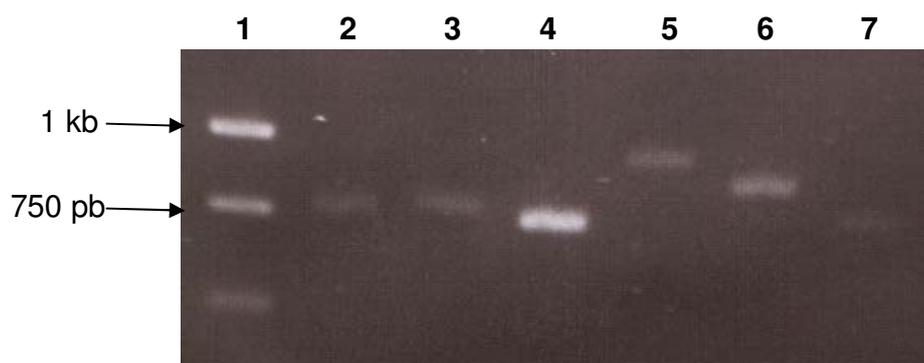


Figura 3.2. Confirmação da eluição dos fragmentos CP^N. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de fragmentos CP^N eluídos a partir de digestão dos respectivos pGemCP^N com *Nco*I. 1- marcador 1 kb DNA ladder (Promega); 2- eluição Mb^N (763 pb); 3- eluição C^N (784 pb); 4- eluição D^N (757 pb); 5- eluição GarCLV^N (964 pb); 6- eluição LYSV^N (877 pb); 7- eluição OYDV^N (781 pb).

Obtenção do fragmento PH1

Análise eletroforética do PCR realizado para construção do fragmento PH1 mostrou que o fragmento amplificado possuía o tamanho esperado (777 pb) (dado não mostrado). Esse fragmento foi clonado no vetor intermediário pGem-T Easy para a adição de sítios de restrição compatíveis com os existentes nos sítios de multiclonagem dos vetores de transferência pFastBac1 e pSynXIVVI⁺X3. Análise eletroforética da digestão do plasmídeo pGemPH1 com *NcoI* comprovou que o sítio dessa enzima havia sido inserido no fragmento PH1, já que a análise apresentou o padrão esperado (2 fragmentos: 3021 pb e 773 pb) (**Figura 3.3.A**). Devido a esse resultado, foi considerado que o plasmídeo pGemPH1 havia sido construído.

Plasmídeo pGemPH1 foi digerido com *EcoRI* e os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose (**Figura 3.3.B**). A banda de 797 pb correspondente ao fragmento PH1 (com extremidades coesivas de *EcoRI*) foi eluída e 10 % do volume da eluição foi analisado eletroforeticamente (dado não mostrado), comprovando que a eluição foi bem sucedida.

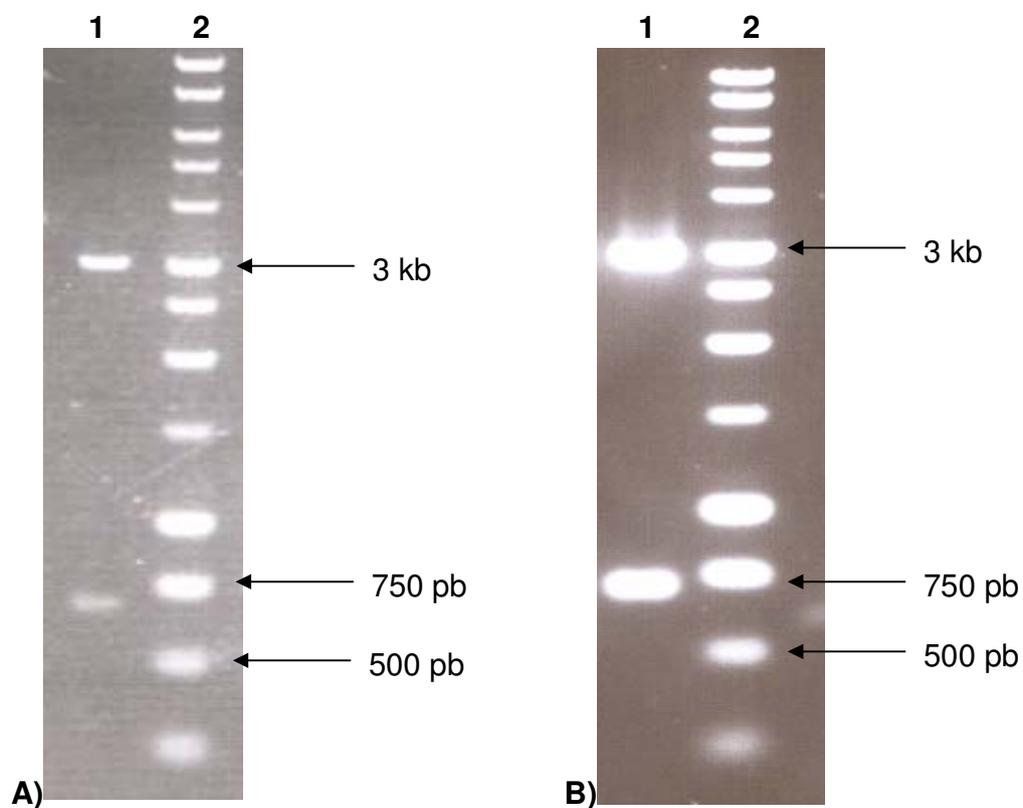


Figura 3.3. Confirmação do pGemPH1 por análise do padrão de restrição.

Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de digestões para comprovar clonagem do fragmento PH1 no vetor pGem-T Easy (Promega). **A)** 1- pGemPH1 digerido com *Nco*I (padrão esperado: 3021 pb; 773 pb); 2- marcador 1 kb DNA ladder (Promega). **B)** 1- pGemPH1 digerido com *Eco*RI (padrão esperado: 2997 pb; 797 pb); 2- marcador 1 kb DNA ladder (Promega).

Construção dos vetores de transferência pFastPH1 e pSynPH1

O fragmento PH1 eluído (com bordas coesivas para *EcoRI*) foi clonado nos vetores pFastBac1 e pSynXIVVI⁺X3, ambos digeridos por *EcoRI* e defosforilados, gerando pFastPH1 e pSynPH1.

pFastPH1

Para comprovar que o fragmento PH1 havia sido inserido na orientação correta, pFastPH1 foi digerido por *BglII*. Os padrões de digestão com essa enzima diferem se o fragmento PH1 tiver sido clonado na orientação correta (4053 pb; 1050 pb; 470 pb) ou orientação invertida (3282 pb; 1821 pb; 470 pb).

Análise eletroforética dessa digestão (**Figura 3.4**) apresentou o padrão esperado para pFastPH1 com fragmento PH1 inserido na orientação correta. Devido a esse resultado, foi considerado que o plasmídeo pFastPH1 havia sido construído.

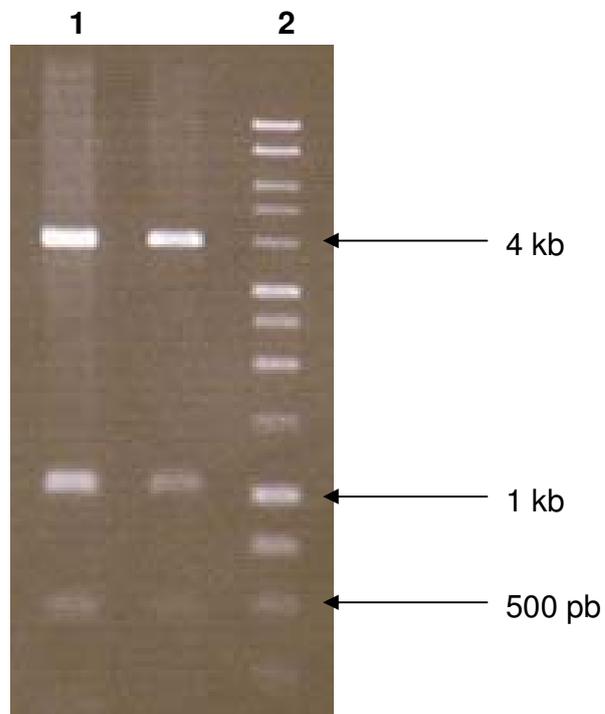


Figura 3.4. Confirmação do pFastPH1 por análise do padrão de restrição.

Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de digestão do vetor pFastPH1 com *Bgl*II para confirmar que o fragmento PH1 foi clonado na orientação correta. Padrão de restrição esperado: 4053 pb; 1050 pb; 470 pb. 1- pFastPH1 digerido com *Bgl*II; 2- marcador 1 kb DNA ladder (Promega).

pSynPH1

Para comprovar que o fragmento PH1 havia sido inserido na orientação correta, pSynPH1 foi digerido por *Bgl*II. Os padrões de digestão com essa enzima diferem se o fragmento PH1 tiver sido clonado na orientação correta (5829 pb; 799 pb) ou orientação invertida (6600 pb; 28 pb).

Análise eletroforética dessa digestão (**Figura 3.5**) apresentou o padrão esperado para pSynPH1 com fragmento PH1 inserido na orientação correta. Devido a esse resultado, foi considerado que o plasmídeo pSynPH1 havia sido construído.

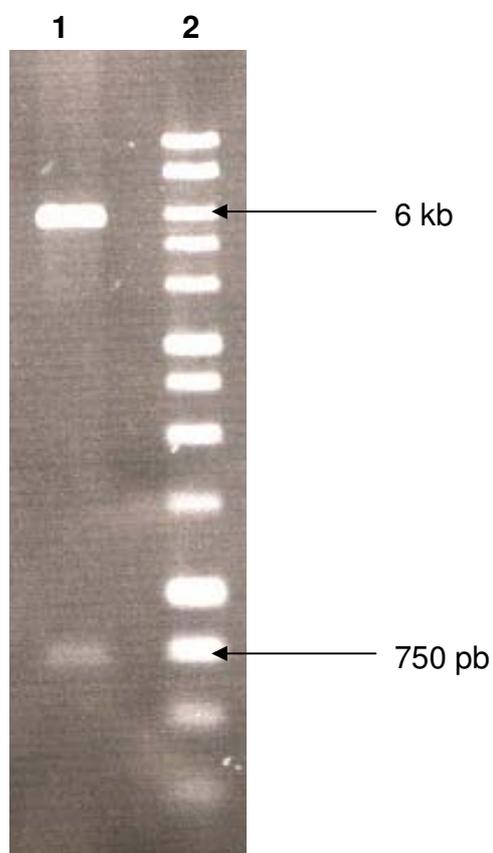


Figura 3.5. Confirmação do pSynPH1 por análise do padrão de restrição.

Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de digestão do vetor pSynPH1 com *Bgl*II para confirmar que o fragmento PH1 foi clonado na orientação correta. Padrão de restrição esperado: 5829 pb; 799 pb. 1- pSynPH1 digerido com *Bgl*II; 2- marcador 1 kb DNA ladder (Promega).

Construção dos vetores de transferência pFastPCP^NH1 e pSynPCP^NH1

Os plasmídeos pFastPH1 e pSynPH1 foram digeridos com *Nco*I e defosforilados. Neles, foram clonados os fragmentos CP^N eluídos (com extremidades coesivas de *Nco*I) Mb^N, C^N, D^N, GarCLV^N, LYSV^N.

Os plasmídeos resultantes foram confirmados por digestões com enzimas de restrição apropriadas. Os padrões de digestão com essas enzimas diferem se o gene CP^N tiver sido clonado na orientação correta ou orientação invertida. Portanto, essas digestões também funcionaram para certificar que o gene CP^N havia sido inserido em fase dentro da ORF PH1, já que tanto a extremidade 5' quanto a 3' dos diversos fragmentos CP^N eluídos apresentam extremidades coesivas para *Nco*I.

Análise do padrão de restrição das digestões realizadas confirmou que os vetores pFastPCP^NH1 (Mb^N, C^N, D^N, GarCLV^N, LYSV^N) e pSynPCP^NH1 (Mb^N, C^N, D^N, GarCLV^N, LYSV^N) haviam sido construídos (**Figuras 3.6 a 3.13**).

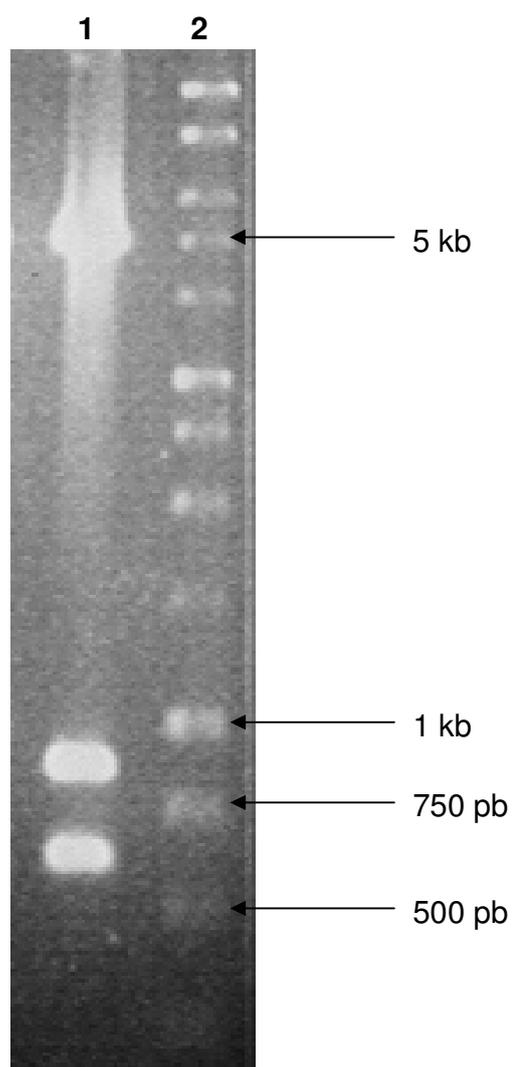


Figura 3.6. Confirmação do pFastP(Mb)^NH1 por análise do padrão de restrição. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de digestão do vetor pFastP(Mb)H1 com *EcoRI* para confirmar que o fragmento Mb^N foi clonado na orientação correta dentro da ORF PH1. Padrão de restrição esperado: 4776 pb, 946 pb, 610 pb. 1- pFastP(Mb)^NH1 digerido com a enzima de restrição *EcoRI*; 2- marcador 1 kb DNA ladder (Promega).

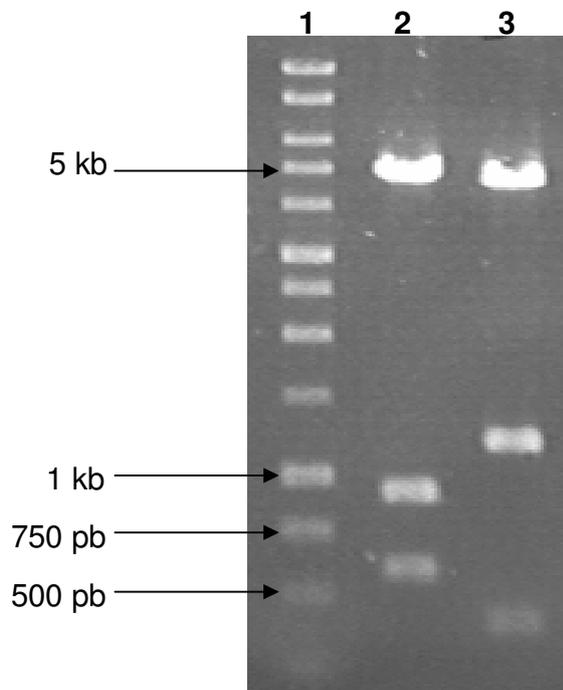


Figura 3.7. Confirmação do pFastP(C)^NH1 por análise do padrão de restrição.

Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de digestão do vetor pFastP(C)H1 com *EcoRI* para confirmar que o fragmento C^N foi clonado na orientação correta dentro da ORF PH1. Padrão de restrição esperado: 4776 pb; 999 pb; 578 pb. 1- marcador 1 kb DNA ladder (Promega); 2- pFastP(C)^NH1 digerido com a enzima de restrição *EcoRI*; 3- plasmídeo (com gene da capa protéica de GarV-C clonado invertido na ORF PH do pFastPH1) digerido com *EcoRI*.

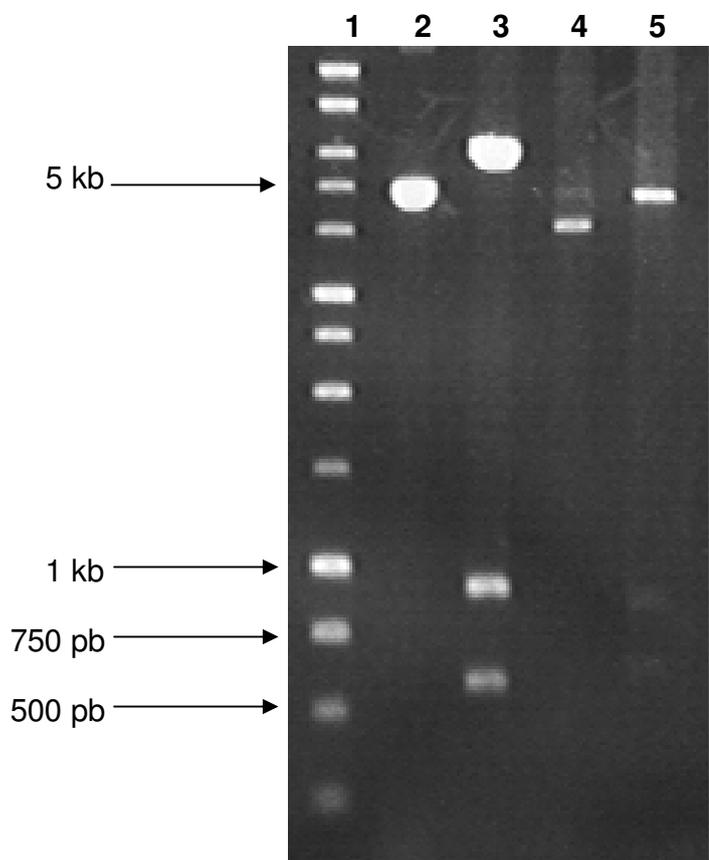


Figura 3.8. Confirmação dos vetores pFastP(D)^NH1 e pSynP(C)^NH1 por análise do padrão de restrição. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de digestões para comprovar que fragmentos C^N e D^N foram clonados na orientação correta. 1- marcador 1 Kb DNA ladder (Promega); 2- pSynP(C)^NH1 intacto (7424 pb); 3- pSynP(C)^NH1 digerido por *Eco*RI (padrão esperado: 5847 pb; 999 pb; 578 pb); 4- pFastP(D)^NH1 intacto (6326 pb); 5- pFastP(D)^NH1 digerido por *Eco*RI (padrão esperado: 4776 pb; 940 pb; 610 pb).

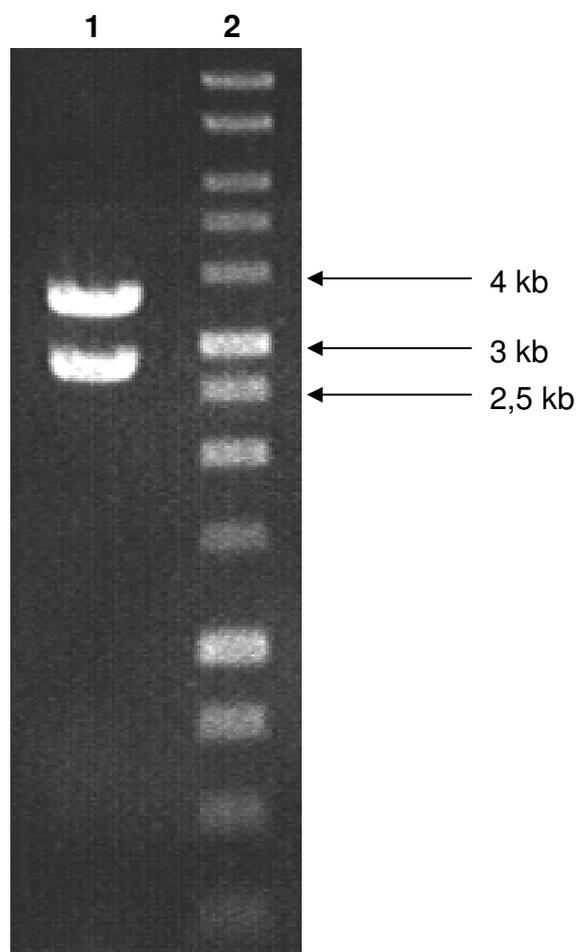


Figura 3.9. Confirmação do pFastP(GarCLV)^NH1 por análise do padrão de restrição. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de digestão do vetor pFastP(GarCLV)^NH1 com *EcoRV* para confirmar que o fragmento GarCLV^N foi clonado na orientação correta dentro da ORF PH1. Padrão de restrição esperado: 3624 pb; 2909 pb. 1- pFastP(GarCLV)^NH1 digerido com a enzima de restrição *EcoRV*; 2- marcador 1 kb DNA ladder (Promega).

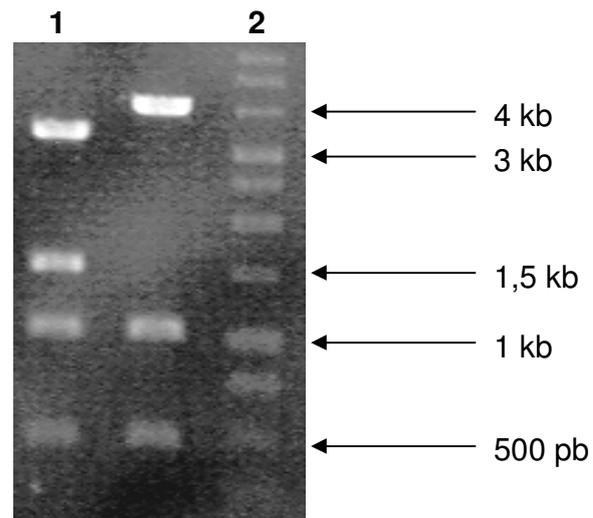


Figura 3.10. Confirmação do pFastP(LYSV)^NH1 por análise do padrão de restrição. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de digestão dupla do vetor pFastP(LYSV)^NH1 com *NdeI* e *BglII* para confirmar que o fragmento LYSV^N foi clonado na orientação correta dentro da ORF PH1. Padrão de restrição esperado: 3318 pb; 1608 pb; 1050 pb; 470 pb. 1- pFastP(LYSV)^NH1 digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *BglII*; 2- marcador 1 kb DNA ladder (Promega).

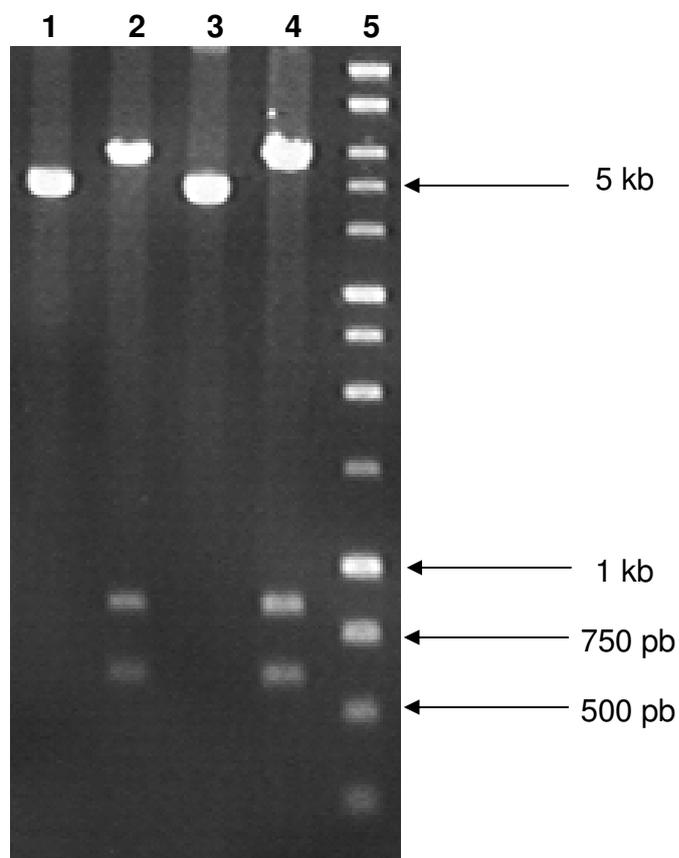


Figura 3.11. Confirmação dos vetores pSynP(Mb)^NH1 e pSynP(D)^NH1 por análise do padrão de restrição. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de digestões para comprovar que fragmentos Mb^N e D^N foram clonados na orientação correta. 1- pSynP(Mb)^NH1 intacto (7403 pb); 2- pSynP(Mb)^NH1 digerido por *EcoRI* (padrão esperado: 5847 pb; 946 pb; 610 pb); 3- pSynP(D)^NH1 intacto (7397 pb); 4- pSynP(D)^NH1 digerido por *EcoRI* (5847 pb; 940 pb; 610 pb); 5- marcador 1 Kb DNA ladder (Promega);

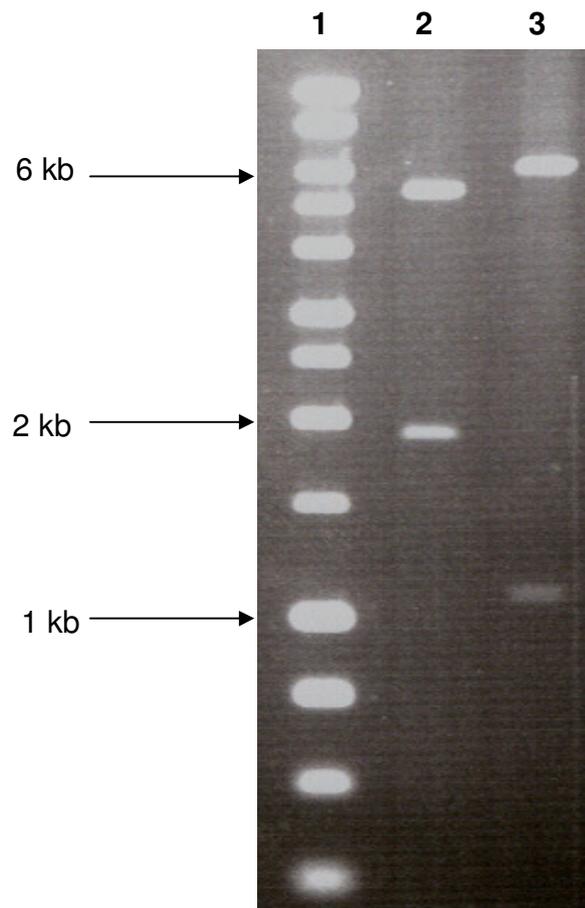


Figura 3.12. Confirmação do pSynP(LYSV)^NH1 por análise do padrão de restrição. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de digestão do vetor pSynP(LYSV)^NH1 com *NdeI* para confirmar que o fragmento LYSV^N foi clonado na orientação correta dentro da ORF PH1. Padrão de restrição esperado: 6449 pb; 1052 pb. 1- marcador 1 Kb DNA ladder (Promega); 2- plasmídeo (com gene da capa protéica de LYSV clonado invertido na ORF PH do pSynPH1) digerido com *NdeI*; 3- pSynP(LYSV)^NH1 digerido com a enzima de restrição *NdeI*.



Figura 3.13. Confirmação do pSynP(GarCLV)^NH1 por análise do padrão de restrição. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de digestão do vetor pSynP(GarCLV)^NH1 com *Pst*I para confirmar que o fragmento GarCLV^N foi clonado na orientação correta dentro da ORF PH1. Padrão de restrição esperado: 7206 pb; 382 pb. 1- marcador 1 kb DNA ladder (Promega); 2- pSynP(GarCLV)^NH1 digerido com *Pst*I.

Construção e purificação de baculovírus recombinantes

PH1 utilizando Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System” (Invitrogen)

Utilizando o kit Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System” (Invitrogen), os baculovírus recombinantes foram construídos por meio de transposição sítio-específica.

Os vetores de transposição utilizados aqui foram os plasmídeos pFastPH1, pFastP(Mb)^NH1, pFastP(C)^NH1, pFastP(D)^NH1, pFastP(LYSV)^NH1 e pFastP(GarCLV)^NH1.

Após células DH10Bac terem sido transformadas com os vetores de transposição, elas foram semeadas e colônias brancas foram escolhidas. Essas foram amplificadas e o DNA bacmídial foi purificado.

PCRs foram feitos para comprovar a construção do bacmídeos recombinantes. Análise eletroforética dos PCRs mostrou que os fragmentos amplificados possuíam os tamanhos esperados (**Figura 3.14.B**) para os bacmídeos:

bAcPH1 (dado não mostrado)

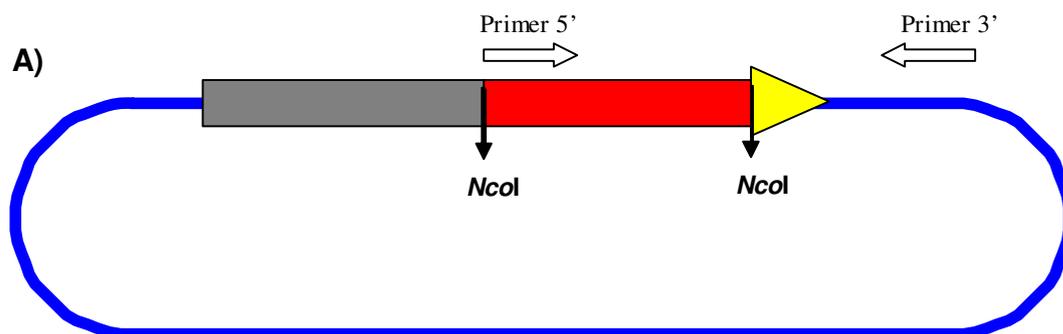
bAcP(Mb)^NH1 (**Figura 3.14.C**)

bAcP(C)^NH1 (**Figura 3.14.D**)

bAcP(D)^NH1 (**Figura 3.14.E**)

bAcP(GarCLV)^NH1 (**Figura 3.14.F**)

bAcP(LYSV)^NH1 (**Figura 3.14.G**)



B)

Tamanho da banda amplificada em PCR dos bacmídeos bAcP(CP) ^{NH1}				
P(Mb) ^{NH1}	P(C) ^{NH1}	P(D) ^{NH1}	P(GarCLV) ^{NH1}	P(LYSV) ^{NH1}
1484 pb	1499 pb	1472 pb	1685 pb	1598 pb

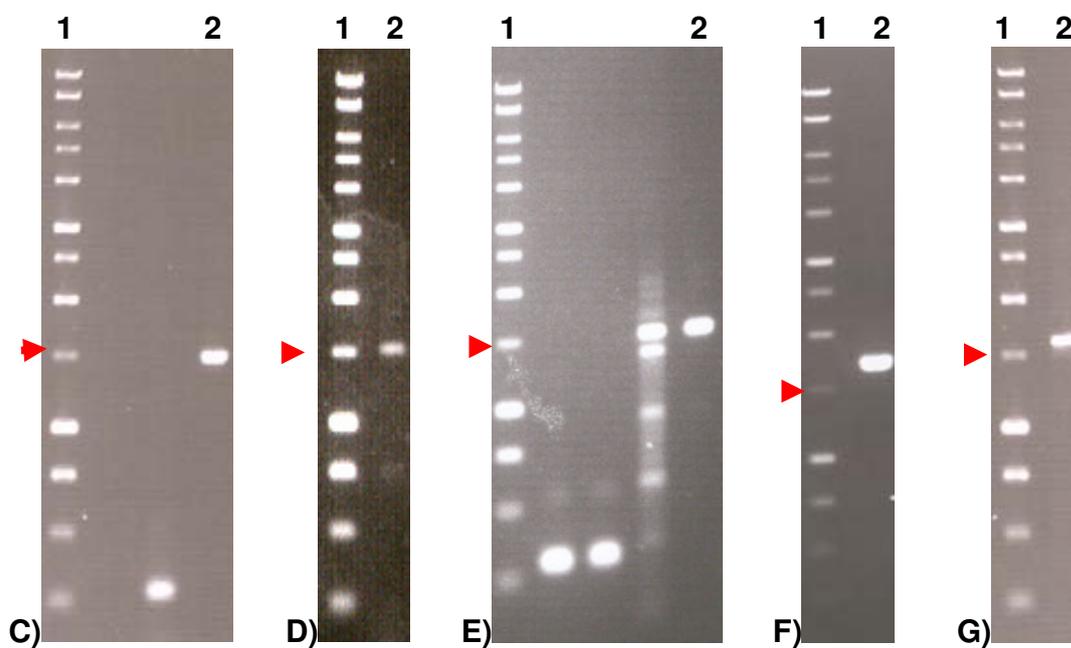


Figura 3.14. Comprovação dos bacmídeos recombinantes PH1 por meio de

PCR. A) Esquema representativo das reações de PCR realizadas para comprovar vírus recombinantes construídos usando sistema Bac-to-Bac (Invitrogen). Foram usados “primers” 5’ diferentes, dependendo do gene da capa protéica (**Tabela 2.7**). O “primer” 3’ utilizado foi o M13R (Invitrogen). Em cinza, gene da poliedrina; em vermelho, gene da capa protéica; em amarelo, seqüência para cauda de histidina; em azul, genoma do bacmídeo bMON14272 (sistema Bac-to-Bac). **B)** Tamanhos esperados das bandas amplificadas nas reações de PCRs para cada vírus. **C a G)** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de reações de PCR para comprovar construção de bacmídeos recombinantes P(CP)^{NH1}. A seta vermelha indica a banda de 1500 pb do marcador 1 kb DNA ladder (Promega). **C)** 1- marcador 1 kb DNA ladder (Promega); 2- PCR comprovando bacmídeo bAcP(Mb)^{NH1} **D)** 1- marcador 1 kb DNA ladder (Promega); 2- PCR comprovando bacmídeo bAcP(C)^{NH1} **E)** 1- marcador 1 kb DNA ladder (Promega); 2- PCR comprovando bacmídeo bAcP(D)^{NH1} **F)** 1- marcador 1 kb DNA ladder (Promega); 2- PCR comprovando bacmídeo bAcP(GarCLV)^{NH1} **G)** 1- marcador 1 kb DNA ladder (Promega); 2- PCR comprovando bacmídeo bAcP(LYSV)^{NH1}.

Os bacmídeos comprovados via PCR (**Figura 3.14**) foram transfectados em células Tn5B, levando a produção dos respectivos vírus recombinantes vAcPH1 e vAcP(CP)^NH1. Esses vírus foram amplificados e seu DNA purificado. Foi feito PCR (nas mesmas condições dos realizados para comprovação dos bacmídeos). Análise eletroforética desses PCRs (dados não mostrados) mostrou que os fragmentos amplificados possuíam os tamanhos esperados (**Figura 3.14.B**), comprovando a construção dos vírus recombinantes vAcP(Mb)^NH1, vAcP(C)^NH1, vAcP(D)^NH1, vAcP(GarCLV)^NH1, vAcP(LYSV)^NH1.

Contudo, não foi observada presença de corpos de oclusão nas células infectadas por vAcPH1 nem nas infectadas por nenhum dos vAcP(CP)^NH1 produzidos (dados não mostrados).

Para confirmar a presença das proteínas de fusão PH ou P(CP)^NH foi feita análise da expressão das proteínas (via SDS-PAGE e Western Blot) expressas pelos vírus recombinantes.

Construção e purificação de baculovírus recombinantes construídos por meio de recombinação homóloga

Plasmídeos pSynPH1, pSynP(Mb)^NH1, pSynP(C)^NH1, pSynP(D)^NH1, pSynP(GarCLV)^NH1, pSynP(LYSV)^NH1 foram co-transfectados, em reações separadas, com DNA linearizado do vírus vSynVI⁻Gal em cultura de células Tn5B.

A presença de vírus recombinantes se tornou evidente pela observação de células apresentando corpos de oclusão (dados não mostrados). Os vírus foram purificados por diluição seriada em placa de 96 poços.

Os resultados até o momento parecem mostrar que os vírus vSynPH1, vSynP(Mb)^NH1, vSynP(C)^NH1, vSynP(D)^NH1, vSynP(GarCLV)^NH1, vSynP(LYSV)^NH1 foram obtidos. Para confirmar isso, foi feita análise da expressão das proteínas (via SDS-PAGE e Western Blot) expressas pelos vírus recombinantes.

Análise de expressão das proteínas: SDS-PAGE e Western Blot

Foram preparados extratos protéicos de células Tn5B infectadas pelos baculovírus recombinantes vAcPH1, vAcP(Mb)^NH1, vSynP(Mb)^NH1, vSynP(C)^NH1, vSynP(D)^NH1. Como controle, foi utilizado extrato protéico de lagartas *Spodoptera frugiperda* infectadas por AcMNPV selvagem.

Esperava-se que infecções por esses vírus evidenciassem a presença de um polipeptídeo ausente na infecção pelo baculovírus selvagem. Contudo, análise eletroforética em gel de SDS-PAGE (**Figura 3.15.A**) não revelou a presença de proteínas com peso molecular esperado (**Figura 3.15.C**).

Foi realizado western blot com anticorpos contra a poliedrina (**Figura 3.15.B**). Como a poliedrina deveria estar presente em todas as proteínas de fusão produzidas, esperava-se que essas proteínas fossem reconhecidas pelo anticorpo anti-poliedrina. Porém o resultado novamente foi negativo:

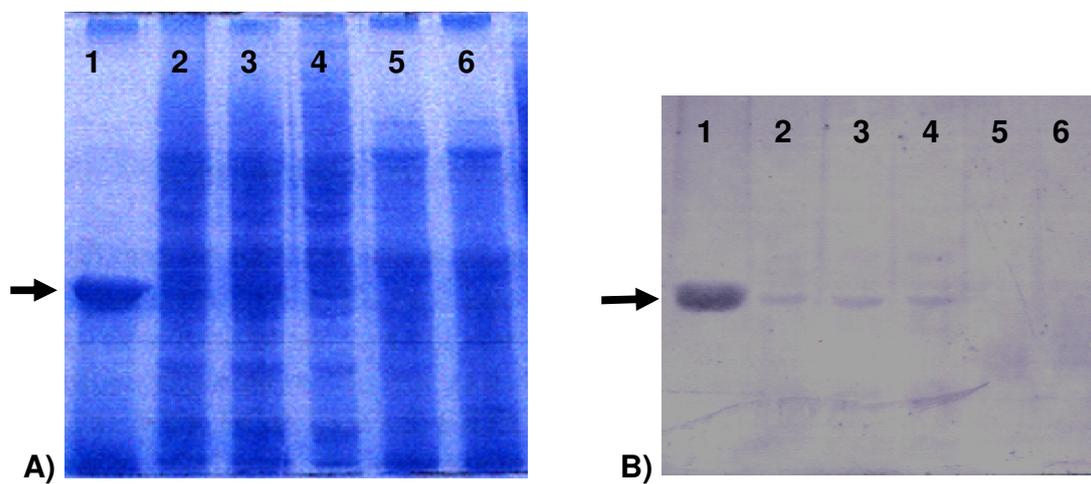
vSynP(Mb)^NH1, vSynP(C)^NH1, vSynP(D)^NH1

Western blot acusou presença de poliedrina selvagem em células infectadas por vSynP(Mb)^NH1, vSynP(C)^NH1, vSynP(D)^NH1. Isso era esperado, pois como o plasmídeo pSynXIVVI⁺X3 possui o gene da poliedrina selvagem, todos os vírus recombinantes produzidos por recombinação homóloga com esse plasmídeo vão ter o gene da poliedrina selvagem. Contudo, para os vírus vSynP(Mb)^NH1, vSynP(C)^NH1, vSynP(D)^NH1 esperava-se que também houvesse os peptídeos de fusão contendo a poliedrina (respectivamente P(Mb)^NH1, P(C)^NH1, P(D)^NH1). Porém, em nenhum caso foram reconhecidos peptídeos de fusão P(CP)^NH1.

vAcPH1, vAcP(Mb)^NH1

Esses vírus foram construídos utilizando o sistema Bac-to-Bac e, portanto, não possuem o gene da poliedrina selvagem. Esperava-se que o western blot acusasse presença dos polipeptídeos de fusão PH1 e P(Mb)^NH1 que contêm poliedrina. Porém, em nenhum caso foi acusada presença da poliedrina em peptídeos de fusão P(CP)^NH1.

Uma possibilidade que poderia explicar isso é que durante o PCR para obtenção do fragmento PH1, pudesse ter ocorrido alguma mutação que interrompesse a ORF da poliedrina. Para verificar se a seqüência nucleotídica do fragmento PH1 estava correta, foi realizado seqüenciamento do fragmento PH1.



C)

Proteína	MW (KDa)
PH1	30,04
P(Mb) ^N H1	57,98
P(C) ^N H1	57,98
P(D) ^N H1	57,52
poliedrina (AgMNPV)	28,70
poliedrina (AcMNPV)	28,64

Figura 3.15. Análise da expressão de proteínas em células Tn5B infectadas por vírus recombinantes P(CP)^NH1. **A)** Análise eletroforética em gel de SDS-PAGE. 1- marcador: poliedros purificados de lagartas infectadas por AcMNPV (peso molecular aproximado: 28,6 KDa). A seta indica a proteína poliedrina selvagem. 2- extrato protéico de células Tn5B infectadas por vSynP(D)^NH1 (72 h.p.i); 3- extrato protéico de células Tn5B infectadas por vSynP(C)^NH1 (72 h.p.i); 4- extrato protéico de células Tn5B infectadas por vSynP(Mb)^NH1 (72 h.p.i); 5- extrato protéico de células Tn5B infectadas por vAcP(Mb)^NH1 (72 h.p.i); 6- extrato protéico de células Tn5B infectadas por vAcPH1 (72 h.p.i). **B)** Western blot realizado utilizando anticorpo policlonal contra a poliedrina produzido em coelho. 1- marcador: poliedros purificados de lagartas infectadas por AcMNPV. A seta indica a proteína poliedrina selvagem. 2- extrato protéico de células Tn5B infectadas por vSynP(D)^NH1 (72 h.p.i); 3- extrato protéico de células Tn5B infectadas por vSynP(C)^NH1 (72 h.p.i); 4- extrato protéico de células Tn5B infectadas por vSynP(Mb)^NH1 (72 h.p.i); 5- extrato protéico de células Tn5B infectadas por vAcP(Mb)^NH1 (72 h.p.i); 6- extrato protéico de células Tn5B infectadas por vAcPH1 (72 h.p.i). **C)** Peso molecular esperado para as proteínas poliedrina (AgMNPV), poliedrina (AcMNPV), PH1, P(Mb)^NH1, P(C)^NH1, P(D)^NH1.

Seqüenciamento do fragmento PH1

Foi feito seqüenciamento do fragmento PH1 presente no plasmídeo pGemPH1. O seqüenciamento mostrou que o fragmento PH1 estava incorreto. Comparação da seqüência do fragmento PH1 com a seqüência da poliedrina de AgMNPV não demonstrou nenhuma identidade entre as duas seqüências. BLAST da seqüência do fragmento PH1 acusou semelhança com algumas seqüências conhecidas, várias delas seqüências encontradas no genoma de *Escherichia coli*. O mais elevado “score” de alinhamento (**Figura 3.16**) foi com uma região do genoma de *E. coli* W3110 (número de acesso no GenBank: [AP009048.1](#)) contendo parte dos genes *yaiW* (codifica uma proteína DNA-ligante envolvida na regulação transcricional) e *yaiY* (codifica uma proteína de membrana interna).

Dessa forma, todos os resultados obtidos envolvendo o fragmento PH1 estão incorretos. Até este ponto, acreditava-se que haviam sido obtidas as construções plasmidiais pGemPH1, pFastPH1, pFastP(Mb)^NH1, pFastP(C)^NH1, pFastP(D)^NH1, pFastP(LYSV)^NH1, pFastP(GarCLV)^NH1, pSynP(Mb)^NH1, pSynP(C)^NH1, pSynP(D)^NH1, pSynP(LYSV)^NH1, pSynP(GarCLV)^NH1, e os vírus recombinantes vAcPH1, vAcP(Mb)^NH1, vAcP(C)^NH1, vAcP(D)^NH1, vAcP(GarCLV)^NH1, vAcP(LYSV)^NH1, vSynPH1, vSynP(Mb)^NH1, vSynP(C)^NH1, vSynP(D)^NH1, vSynP(GarCLV)^NH1, vSynP(LYSV)^NH1. Contudo, como o fragmento PH1 está errado, todos os resultados acima mencionados também o estão. Devido a isso, foi necessário refazer todos os passos envolvendo o fragmento PH.

PH1	1	tcttttgaggagacggcgctgtacaggaaagtttatcaac	40
Bct	398005	tcttttgaggagacggcgctgtacaagaaagtttatcaac	398044
PH1	41	ttgccgaaacgaaaacgggtaaatcactccccgcgaaat	80
Bct	398045	ttgccgaaacgaaaacgggtaaatcactccccgcgaaat	398084
PH1	81	gttgcctggcattcaactggaaagcccgaaaatcaccgc	120
Bct	398085	gttgcctggcattcaactggaaagcccgaaaatcaccgc	398124
PH1	121	aacctgactacggcctggtttgcaagcgcgtagacgaac	160
Bct	398125	aacctgactacggcctggtttgcaagcgcgtagacgaac	398164
PH1	161	ggcgggcgcggttgatgaaacagtgatcaaacaggaatgt	200
Bct	398165	ggcgggcgcggttgatgaaacagtgatcaaacaggaatgt	398204
PH1	201	caggccagataaggcggtttcaggccgcatctgacaatgta	240
Bct	398205	caggccagataaggcggtttcaggccgcatctgacaatgta	398244
PH1	241	aaacttactggcggcgatgtcgccagtgcagccatagcgc	280
Bct	398245	aaacttactggcggcgatgtcgccagtgcagccatagcgc	398284
PH1	281	caccactgcaaaaatgaggcagcctactaaaaacgggatc	320
Bct	398285	caccactgcaaaaatgaggcagcctactaaaaacgggatc	398324
PH1	321	agcccgaaaatggtgccgacacctaaccaatttccacc	360
Bct	398325	agcccgaaaatggtgccgacacctaaccaatttccacc	398364
PH1	361	gtgggcgac <u>ctggttaccggccccgc</u>	386
Bct	398365	gtgggcgacCTGTTTcCtGgACtGC	398390

Figura 3.16. Resultado da execução de BLAST (database: nucleotide collection) da seqüência do fragmento PH1. Seqüência superior (PH1) foi obtida por seqüenciamento do fragmento PH1. Em negrito sublinhado, início do “primer” polAcAghistag. Seqüência inferior (Bct) representa parte do genoma de *Escherichia coli* (estirpe K12, subestirpe W3110). Em verde, parte da seqüência do gene *yaiW*. Em vermelho, parte da seqüência do gene *yaiY*. Em azul, região intergênica. Em letras maiúsculas, parte da seqüência do gene *yaiY* que parecia com o “primer” polAcAghistag.

Obtenção do vetor pGemPH2

Análise eletroforética do PCR realizado para construção do fragmento PH2 mostrou que o fragmento amplificado possuía o tamanho esperado (777 pb) (**Figura 3.17**). Esse fragmento foi clonado no vetor intermediário pGem-T Easy., gerando o pGemPH2. Digestão com *ApaI* confirmou a identidade de pGemPH2 (**Figura 3.18.A**). *ApaI* foi utilizada por haver um sítio dessa enzima no pGem-T Easy e outro no gene da poliedrina de AgMNPV. Perceba que a digestão do pGemPH1 com *ApaI* (**Figura 3.18.A**) apenas linearizou o plasmídeo, demonstrando novamente que tal plasmídeo não possui o gene da poliedrina.

Construção do vetor de transferência pFastPH2

Plasmídeo pGemPH2 foi submetido a uma digestão dupla (com enzimas *BglII* e *NcoI*). O produto da digestão foi separado em gel de agarose (**Figura 3.18.B**) e o fragmento P (745 pb) (banda menor, correspondente ao gene da poliedrina do fragmento PH2 sem a cauda de histidina) foi eluído. Esse fragmento possui extremidade 5' coesiva para *BglII* e extremidade 3' coesiva para *NcoI*. 10% do volume da eluição foi analisado eletroforéticamente (dado não mostrado), comprovando que a eluição foi bem sucedida.

O fragmento P foi clonado no fragmento pFastH, gerando pFastPH2 (5538 pb). Para comprovar construção do vetor pFastPH2, foram realizadas

digestões simples com *Apal* (padrão esperado: uma banda de 5538 pb), e com *NcoI* (padrão esperado: uma banda de 5538 pb) e digestão dupla com *BglII* e *NcoI* (padrão esperado: 3308 pb; 1760 pb; 470 pb).

Análise eletroforética de cada uma das digestões acima apresentou o padrão esperado (**Figura 3.19**). Devido a esse resultado, foi considerado que o plasmídeo pFastPH2 havia sido construído.

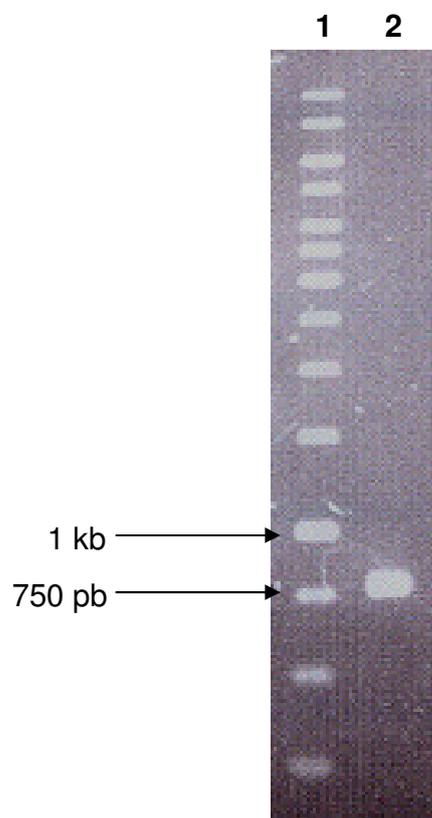


Figura 3.17. Amplificação do fragmento PH2. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% da reação de PCR para construção do fragmento PH2 (tamanho esperado: 777 pb). 1- marcador 1 kb DNA ladder (Promega); 2- PCR PH2

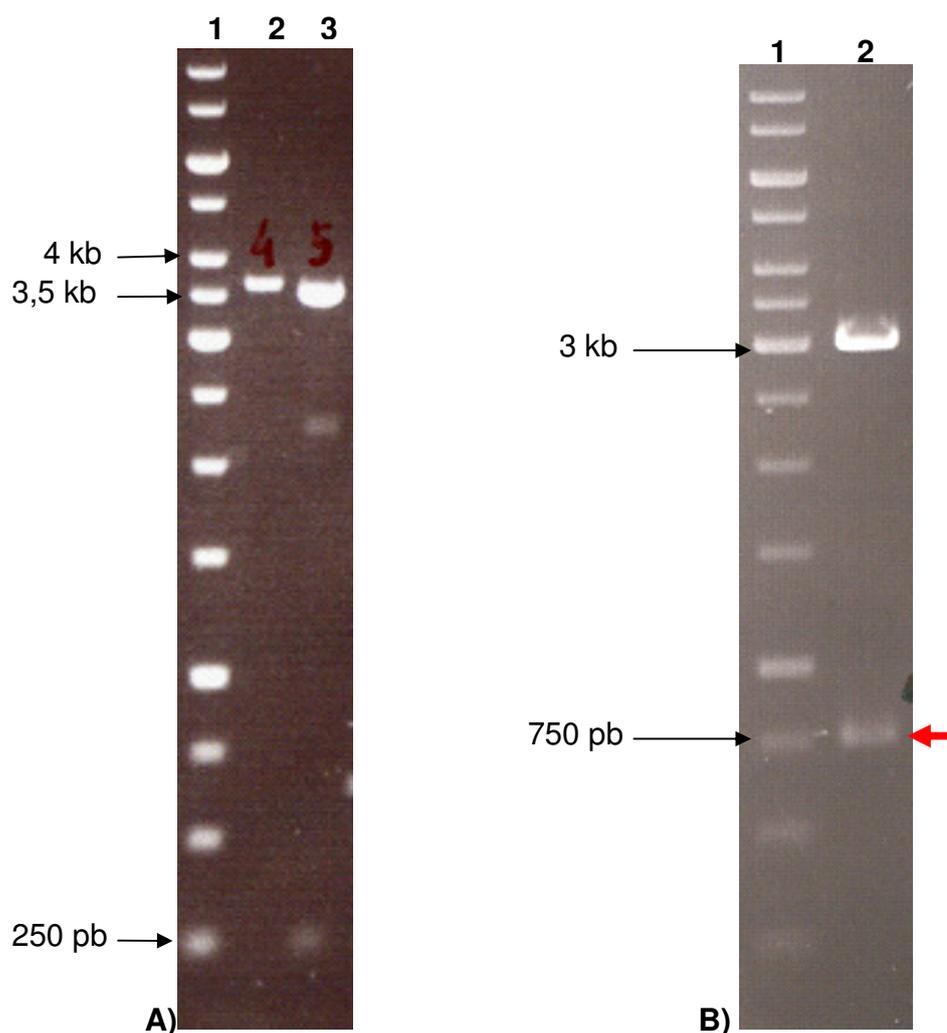


Figura 3.18. Confirmação do pGemPH2 por análise do padrão de restrição.

Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de digestões para comprovar clonagem do fragmento PH2 no vetor pGem-T Easy (Promega). **A)** 1- marcador 1 kb DNA ladder (Fermentas); 2- pGemPH1 digerido com *ApaI*; 3- pGemPH2 digerido com *ApaI* (padrão esperado: 3550 pb; 244 pb). **B)** 1- marcador 1 kb DNA ladder (Fermentas); 2- pGemPH2 digerido com *BglII* e *NcoI* (padrão esperado: 3021 pb; 745 pb; 28 pb). Seta vermelha indica o fragmento P.

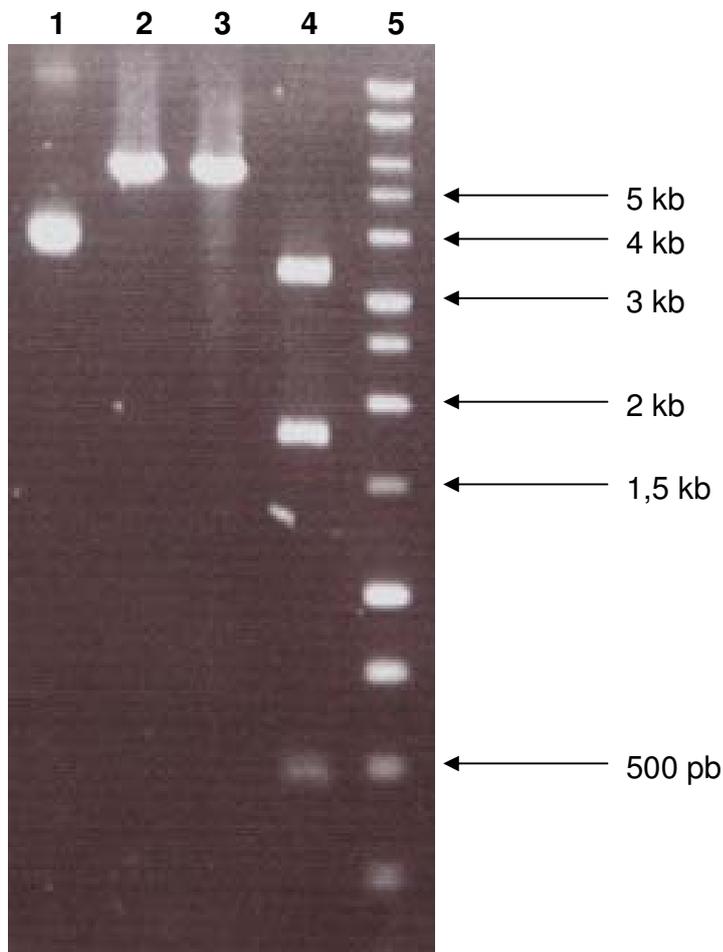


Figura 3.19. Confirmação do pFastPH2 por análise do padrão de restrição.

Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% dos produtos de digestão do vetor pFastPH2 com diferentes enzimas de restrição. 1- pFastPH2 intacto (5538 pb); 2- pFastPH2 digerido com *ApaI* (padrão esperado: uma banda de 5538 pb); 3- pFastPH2 digerido com *NcoI* (padrão esperado: uma banda de 5538 pb); 4- pFastPH2 digerido com *BglII* e *NcoI* (padrão esperado: 3308 pb; 1760 pb; 470 pb); 5- marcador 1 kb DNA ladder (Promega).

Construção do vetor de transferência pFastP(GarCLV)^NH2

O plasmídeo pFastPH2 foi linearizado por *Nco*I, defosforilado e nele foi clonado o fragmento CP^N do vírus GarCLV. O plasmídeo resultante pFastP(GarCLV)^NH2 (6498 pb) foi confirmado por digestão com a endonuclease de restrição *Eco*RV. Essa digestão também objetivou certificar que o gene GarCLV^N havia sido inserido em fase dentro da ORF PH2, já que tanto a extremidade 5' quanto a 3' do fragmento GarCLV^N eluído apresentam extremidades coesivas para *Nco*I. Os padrões de digestão com *Eco*RV diferem se o gene GarCLV^N tiver sido clonado na orientação correta (3624 pb; 2874 pb) ou orientação invertida (4504 pb; 1994 pb).

Análise eletroforética dessa digestão (**Figura 3.20**) apresentou o padrão esperado para plasmídeo com fragmento inserido na orientação correta. Devido a esse resultado, foi considerado que o plasmídeo pFastP(GarCLV)^NH2 havia sido construído.

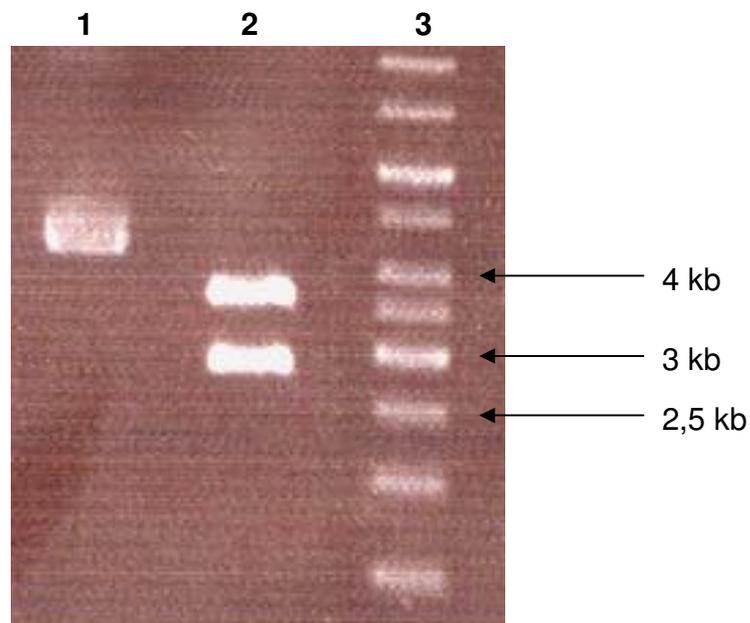


Figura 3.20. Confirmação do pFastP(GarCLV)^NH2 por análise do padrão de restrição. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de digestão do vetor pFastP(GarCLV)^NH2 com *EcoRV* para confirmar que o fragmento GarCLV^N foi clonado na orientação correta dentro da ORF PH2. Padrão de restrição esperado: 3624 pb; 2874 pb. 1- pFastP(GarCLV)^NH2 intacto (6498 pb); 2- pFastP(GarCLV)^NH2 digerido com *EcoRV*; 3- marcador 1 kb DNA ladder (Fermentas).

Construção e purificação de baculovírus recombinantes vAcPH2 e vAcP(GarCLV)^NH2 utilizando Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System” (Invitrogen)

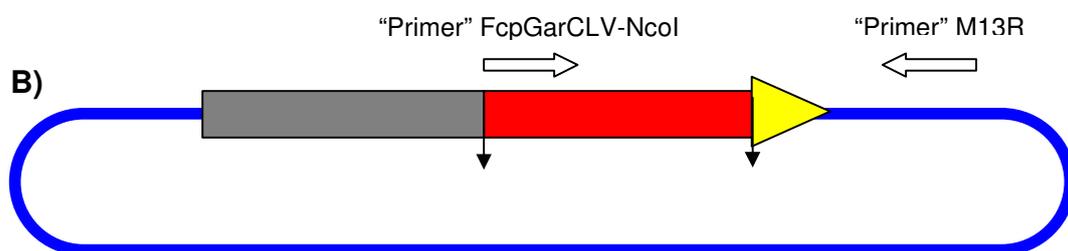
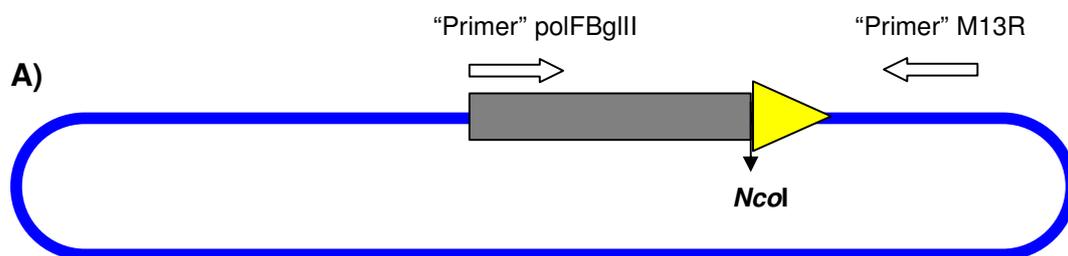
Células DH10Bac transformadas com vetores de transposição pFastPH2 e pFastP(GarCLV)^NH2 foram semeadas e colônias brancas foram escolhidas. Essas foram amplificadas e o DNA bacmídial foi purificado.

PCRs foram feitos para comprovar a construção dos bacmídeos recombinantes. Análise eletroforética dos PCRs mostrou que os fragmentos amplificados possuíam os tamanhos esperados (**Figura 3.21.C**) para os bacmídeos:

- bAcPH2 (**Figura 3.21**)
- bAcP(GarCLV)^NH2 (**Figura 3.21**)

Bacmídeos foram transfectados com sucesso em células Tn5B. As células infectadas apresentaram efeitos citopáticos, como arredondamento celular e hipertrofia nuclear, mas não houve formação de poliedros. A ausência de poliedros poderia ser explicada pelo fato de a poliedrina estar fusionada a um outro peptídeo, visto que existem dados na literatura (Je *et al.*, 2003) mostrando que a poliedrina quando fusionada a outra proteína não consegue formar poliedros.

Os vírus vAcPH2 e vAcP(GarCLV)^NH2 teriam sido amplificados e comprovados via PCRs. Contudo, o resultado do seqüenciamento do fragmento PH2 mostrou que esse fragmento continha erros.



C)

Tamanho da banda amplificada	
bAcPH2	bAcP(GarCLV) ^{NH1}
1473 pb	1685 pb

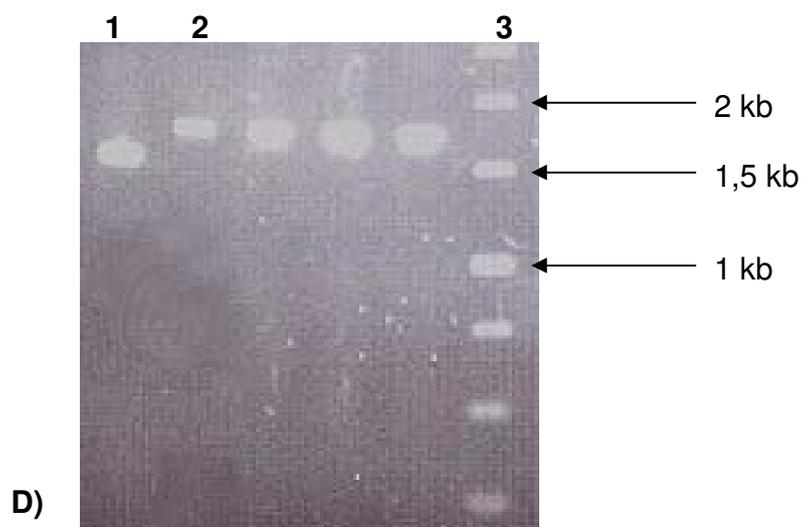


Figura 3.21. Comprovação dos bacmídeos recombinantes PH2 por meio de

PCR. A) Esquema representativo da reação de PCR realizada para comprovar vírus recombinante vAcPH2 construído usando sistema Bac-to-Bac (Invitrogen). Foram usados “primer” 5’ polFBgIII (**Tabela 2.6**) e “primer” 3’ M13R (Invitrogen). Em cinza, gene da poliedrina; em amarelo, seqüência para cauda de histidina; em azul, genoma do bacmídeo bMON14272 (sistema Bac-to-Bac). **B)** Esquema representativo da reação de PCR realizada para comprovar vírus recombinante vAcP(GarCLV)^NH2 construído usando sistema Bac-to-Bac (Invitrogen). Foram usados “primer” 5’ FcpGarCLV-NcoI (**Tabela 2.2**) e “primer” 3’ M13R (Invitrogen). Em cinza, gene da poliedrina; em vermelho, gene da capa protéica GarCLV^N; em amarelo, seqüência para cauda de histidina; em azul, genoma do bacmídeo bMON14272 (sistema Bac-to-Bac). **C)** Tamanhos esperados das bandas amplificadas nas reações de PCRs para cada vírus. **D)** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de reações de PCR para comprovar construção dos bacmídeos recombinantes. 1- PCR comprovando bacmídeo bAcPH2; 2- PCR comprovando bacmídeo bAcP(GarCLV)^NH2; 3- marcador 1 kb DNA ladder (Fermentas).

Seqüenciamento do fragmento PH2 (Figura 3.22)

Foi feito seqüenciamento do fragmento PH2 presente no plasmídeo pGemPH2. O seqüenciamento mostrou que o fragmento PH2 estava incorreto. No caso do fragmento PH2, ocorreu algo diferente do que ocorreu com o fragmento PH1. O seqüenciamento demonstrou que no fragmento PH2 foi a poliedrina que foi amplificada. Contudo, uma análise da seqüência demonstrou que o “primer” 5' polFBgIII (utilizado para construção do fragmento PH2) possuía um erro: em vez da seqüência 5'-ccgagatctatgccagattatagc – 3', o seqüenciamento demonstrou ter o “primer” a seqüência 5'-ccgagatctatgccagattatagcG – 3'. Ou seja, o “primer” possuía uma guanina extra em sua extremidade 3'. Essa guanina extra não anela com a poliedrina. Devido a isso, foi inserido um nucleotídeo extra no início da seqüência do gene da poliedrina presente no fragmento PH2, o que alterou a fase da *orf* PH2.

Além disso, o seqüenciamento mostrou terem ocorrido duas mutações na seqüência do gene da poliedrina que geraram códons de terminação internos. Porém, mesmo que tais mutações não tivessem ocorrido, ainda assim o fragmento PH2 seria inútil, pois ele já estava com a fase alterada devido a inserção de uma guanina extra pelo “primer” 5' polFBgIII. Portanto, as construções baseadas no fragmento PH2 (pGemPH2, pFastPH2, pFastP(GarCLV)^NH2, bAcPH2, bAcP(GarCLV)^NH2) estão incorretas.

Devido a isso, foi necessário refazer todos os passos envolvendo fragmento PH.

```

pol 1 atgccagattatagc-tataggccgaccattgggtcgcacgtatgtgtatgataacaagta 59
    |
ph2 80 ATGCCAGATTATAGCctatagccgaccattgggtcgcacgtatgtgtatgataacaagta 139

pol 60 ttacaaaaacttgggttctgtgattaagaacgccaagcgcaagaagcaccttcttgaaca 119
    |
ph2 140 ttacaaaaacttgggttctgtgattaagaacgccaagcgcaagaagcaccttcttgaaca 199

pol 120 tcaggaggaagaaaaagcctagatgggctagatcattacatcgtggccgaagaccatt 179
    |
ph2 200 tcaggaggaagaaaaagcctagatgggctagatcattacatcgtggccgaagaccatt 259

pol 180 tttagggcccgcaaaaaacaaaaattgacactttttaagaaatccgcaatgtaaaacc 239
    |
ph2 260 tttagggcccgcaaaaaacaaaaattgacactttttaagaaatccgcaatgtaaaacc 319

pol 240 cgacacgatgaagctcattgttaactggagcggtaaagagtttctgcgcaaacttggac 299
    |
ph2 320 cgacacgatgaagctcattgttaactggagcggtaaagagtttctgcgcaaacttggac 379

pol 300 tcgttttggtgaagacagcttcccattgtaaaccgaccaagaagtgatggattgtgtttt 359
    |
ph2 380 tcgttttggtgaagacagcttcccattgtaaaccgaccaagaagtgatggattgtgtttt 439

pol 360 agtcattaacctccgccaactcgccctaaccggttgctacaaattcctggcgcaacacgc 419
    |
ph2 440 agtcattaacctccgccaactcgccctaaccggttgctacaaattcctggcgcaacacgc 499

pol 420 tctccgttgggactgcgattacgtgccccacgaggtaatccgcattgtggagccttcta 479
    |
ph2 500 tctccgttgggactgcgattacgtgccccacgaggtaatccgcattgtggagccttcta 559

pol 480 cgtgggcatgaacaacgagtagtacagaattagcctagccaagaaagggggtggtgccaat 539
    |
ph2 560 cgtgggcatgaacaacgagtagtacagaattagcctagccaagaaaggcggtggtgccaat 619

pol 540 catgaacatccacagcgagtataccaactcgtttgagtcctttgtcaaccgctaactctg 599
    |
ph2 620 catgaacatccacagcgagtataccaactcgtttgagtcctttgtcaaccgctaactctg 679

pol 600 ggaaaacttttacaac 616
    |
ph2 680 ggaaaacttttacaac 696

```

Figura 3.22. Alinhamento da seqüência do fragmento PH2 (seqüência inferior: PH2) com a seqüência do gene da poliedrina do AgMNPV (seqüência superior: polh). Em maiúsculo, seqüência pertencente ao “primer” polFBgIII. Em verde, o nucleotídeo guanina do “primer” polFBgIII responsável por alterar a fase do fragmento PH2. Em vermelho, códons de parada que surgiram no interior do fragmento PH2. Em amarelo, nucleotídeos da poliedrina que foram alterados (substituição nucleotídicas) durante a reação de PCR.

Obtenção do vetor pGemPH3

Análise eletroforética do PCR realizado para construção do fragmento PH3 mostrou que o fragmento amplificado possuía o tamanho esperado (777 pb) (**Figura 3.23**). Fragmento PH3 foi clonado no vetor intermediário pGem-T Easy, gerando pGemPH3. Para comprovar construção desse vetor, foram realizadas digestões simples com *Bam*HI (padrão esperado: um fragmento de 3794 pb), e com *Nco*I (padrão esperado: 3021 pb; 773 pb) e digestão dupla com *Bgl*I e *Nco*I (padrão esperado: 1493 pb; 1318 pb; 773 pb; 206 pb; 4 pb).

Análise eletroforética de cada uma das digestões acima apresentou o padrão esperado (**Figura 3.24**). Devido a esse resultado, foi considerado que o plasmídeo pGemPH3 havia sido construído.

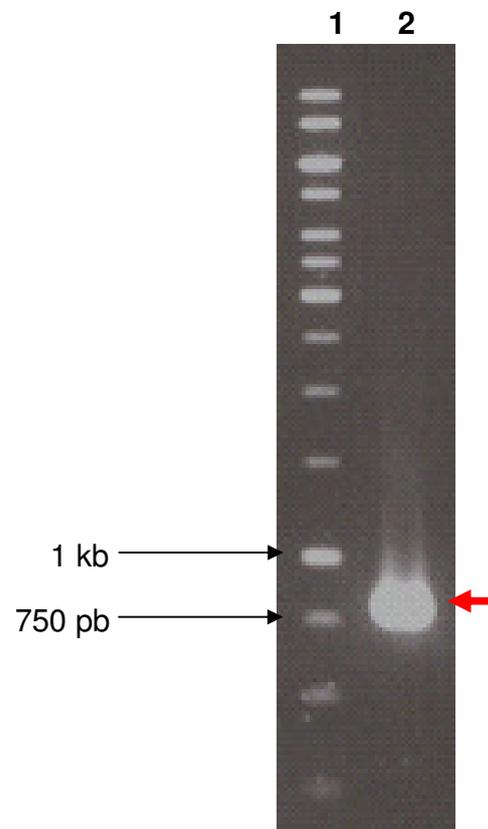


Figura 3.23. Amplificação do fragmento PH3. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% da reação de PCR para construção do fragmento PH3 (tamanho esperado: 777 pb). 1- marcador 1 kb DNA ladder (Fermentas); 2- PCR PH3. Seta vermelha indica banda correspondente ao fragmento PH3.

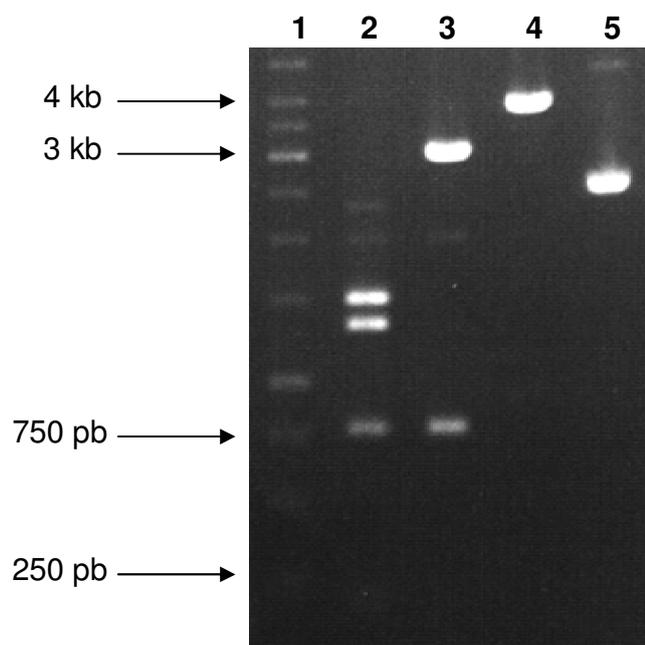


Figura 3.24. Confirmação do vetor pGemPH3 por análise do padrão de restrição. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% dos produtos de digestão do vetor pGemPH3 com diferentes enzimas de restrição. 1- marcador 1 kb DNA ladder (Fermentas); 2- pGemPH3 digerido com *BglI* e *NcoI* (padrão esperado: 1493 pb; 1318 pb; 773 pb; 206 pb; 4 pb); 3- pGemPH3 digerido com *NcoI* (padrão esperado: 3021 pb; 773 pb); 4- pGemPH3 digerido com *BamHI* (padrão esperado: uma banda de 3794 pb); 5 pGemPH3 intacto (3794 pb).

Construção do vetor de transferência pFastPH3

Plasmídeo pGemPH3 foi submetido a uma digestão dupla (com enzimas *Bgl*II e *Nco*I). O produto da digestão foi separado em gel de agarose (dado não mostrado) e o fragmento P (745 pb) (banda menor, correspondente ao gene da poliedrina do fragmento PH3 sem a cauda de histidina) foi eluído. Esse fragmento possui extremidade 5' coesiva para *Bgl*II e extremidade 3' coesiva para *Nco*I. 10% do volume da eluição foi analisado eletroforéticamente (dado não mostrado), comprovando que a eluição foi bem sucedida.

Fragmento P foi clonado no fragmento pFastH, gerando pFastPH3 (5538 pb). Para comprovar construção desse vetor, foram realizadas digestões simples com *Bam*HI (padrão esperado: um fragmento de 5538 pb), e com *Nco*I (padrão esperado: um fragmento de 5538 pb) e digestão dupla com *Bgl*II e *Nco*I (padrão esperado: 2508 pb; 1268 pb; 1017 pb; 745 pb).

Análise eletroforética das digestões acima apresentou o padrão esperado (**Figura 3.25**). Devido a esse resultado, foi considerado que o plasmídeo pFastPH3 havia sido construído.

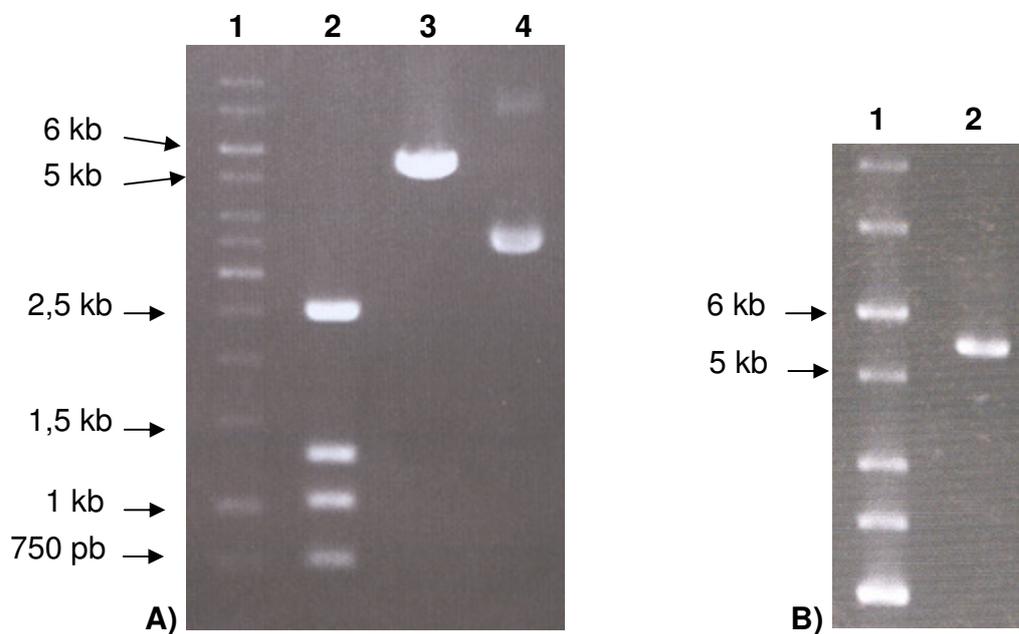


Figura 3.25. Confirmação do vetor pFastPH3 por análise do padrão de restrição. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% dos produtos de digestão do vetor pFastPH3 com diferentes enzimas de restrição. **A)** 1- marcador 1 kb DNA ladder (Fermentas); 2- pFastPH3 digerido com *BglI* e *NcoI* (padrão esperado: 2508 pb; 1268 pb; 1017 pb; 745 pb); 3- pFastPH3 digerido com *NcoI* (padrão esperado: uma banda de 5538 pb); 4- pFastPH3 intacto (5538 pb). **B)** 1- marcador 1 kb DNA ladder (Fermentas); 2- pFastPH3 digerido com *BamHI* (padrão esperado: uma banda de 5538 pb).

Construção e purificação de baculovírus recombinante vAcPH3 utilizando Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System” (Invitrogen)

Células DH10Bac transformadas com vetor de transposição pFastPH3 foram semeadas e colônias brancas foram escolhidas. Essas foram amplificadas e o DNA bacmídial foi purificado.

PCR foi feito para comprovar construção do bacmídeo recombinante bAcPH3 (**Figura 3.26**). Análise eletroforética do PCR mostrou que fragmento amplificado possui tamanho esperado (1473 pb) para o bacmídeo bAcPH3 (dado não mostrado).

Bacmídeo bAcPH3 foi transfectado com sucesso em células Tn5B, levando a produção do recombinante vAcPH3. As células infectadas apresentaram efeitos citopáticos, como arredondamento celular e hipertrofia nuclear e houve formação de poliedros (**Figura 3.27**). O fenótipo oclusão positivo (occ+) comprova que o vírus recombinante vAcPH3 possui o gene da poliedrina.

Para confirmar a presença das proteínas de fusão PH foi feita análise da expressão das proteínas (SDS-PAGE e Western Blot) expressas pelos vírus vAcPH3.

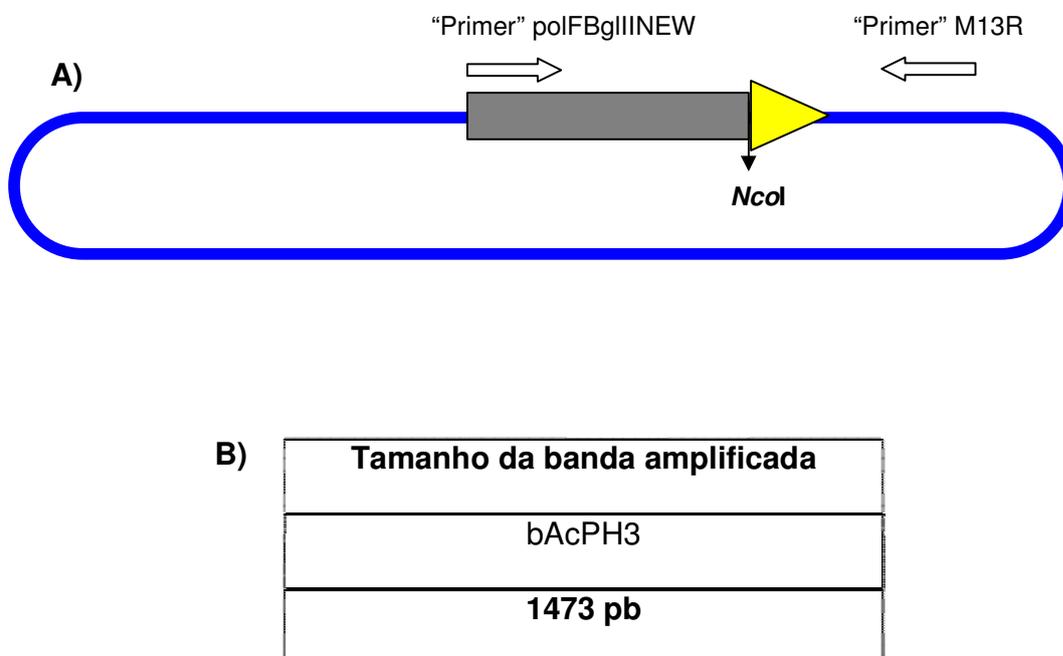


Figura 3.26. Comprovação do recombinante vAcPH3 por meio de PCR. A)

Esquema representativo da reação de PCR realizada para comprovar vírus recombinante vAcPH3 construído usando sistema Bac-to-Bac (Invitrogen). Foram usados “primer” 5’ polFBgIIINEW (**Tabela 2.6**) e “primer” 3’ M13R (Invitrogen). Em cinza, gene da poliedrina; em amarelo, seqüência para cauda de histidina; em azul, genoma do bacmídeo bMON14272 (sistema Bac-to-Bac). **B)** tamanho esperado do fragmento amplificado na reação de PCR para comprovar bacmídeo vAcPH3.

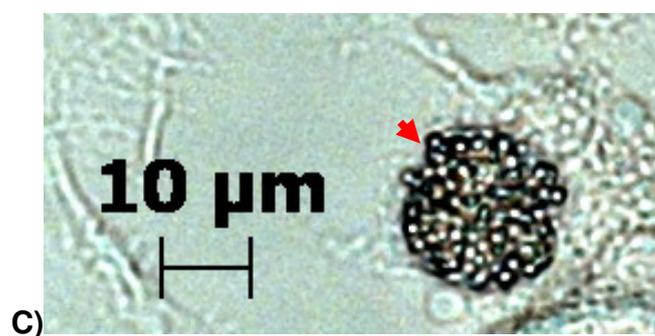


Figura 3.27. Identificação do vírus recombinante vAcPH3 por microscopia de luz. Foto mostra célula BTI-Tn5B1-4 infectada com o recombinante vAcPH3 (72 h p.i.). No núcleo da célula estão inúmeros poliedros.

Análise de expressão das proteínas em células infectadas por vAcPH3: SDS-PAGE e Western Blot

SDS-PAGE

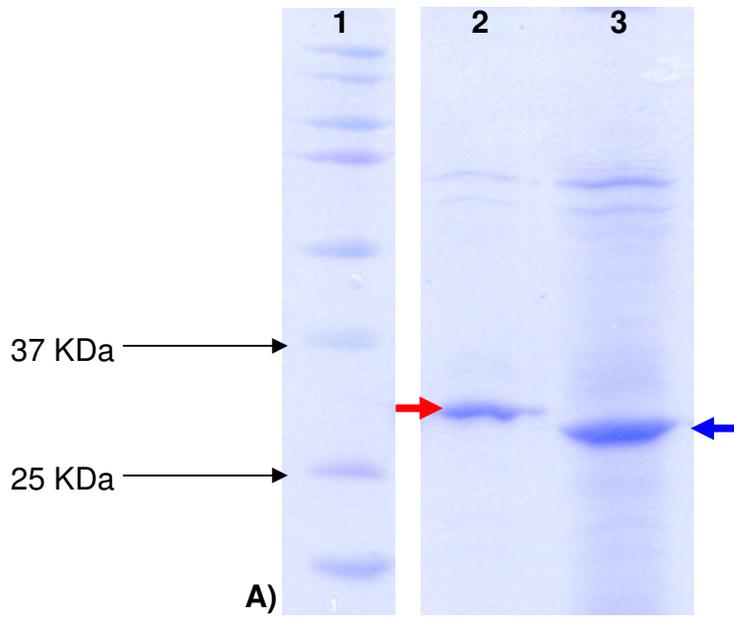
Foi preparado extrato protéico de células Tn5B infectadas pelo baculovírus recombinante vAcPH3 a 72 h.p.i. Como controle, foi utilizado: extrato protéico de lagartas *Spodoptera frugiperda* infectadas por AcMNPV selvagem a 120 h.p.i.; extrato protéico de células Tn5B infectadas pelo baculovírus vMON14272 (construído utilizando sistema Bac-to-Bac, Invitrogen) a 72 h.p.i.; extrato protéico de células Tn5B não infectadas.

Análise eletroforética em gel de SDS-PAGE (**Figura 3.28.A**) revelou presença de um polipeptídeo (ausente na infecção por AcMNPV) com peso molecular compatível com o esperado para o polipeptídeo PH3 (MW= 29,97 KDa) e superior ao da poliedrina selvagem do AcMNPV.

Western Blot (Figura 3.28.B e 3.28.C)

Foi realizado western blot com anticorpos contra a poliedrina (**Figura 3.28.B**) e com anticorpos contra a cauda de hexa-histidina (**Figura 3.28.C**). Apenas a proteína PH3 foi marcada tanto em reação com anti-soro contra a poliedrina como em reação com anti-soro contra cauda de histidina, comprovando ser a proteína PH3 um peptídeo de fusão da poliedrina com cauda de hexa-histidina.

SDS-PAGE



Western Blot

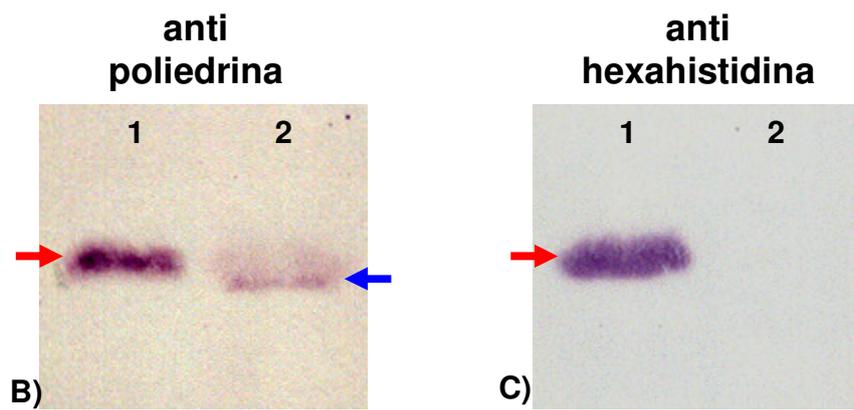


Figura 3.28. Análise da expressão de proteínas em células Tn5B infectadas por vírus recombinantes vAcPH3. Seta vermelha indica proteína PH3 (peso molecular aproximado: 29,9 KDa). Seta azul indica proteína poliedrina de AcMNPV (peso molecular aproximado: 28,6 KDa). **A)** Análise eletroforética em gel de SDS-PAGE. 1- marcador Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (Bio-Rad); 2- extrato protéico de células Tn5B infectadas por vAcPH3 (72 h.p.i.); 3- extrato protéico de células Tn5B infectadas por AcMNPV (72 h.p.i). **B)** Western blot realizado utilizando anticorpo policlonal contra a poliedrina, produzido em coelho. 1- extrato protéico de células Tn5B infectadas por vAcPH3 (72 h.p.i); 2- extrato protéico de células Tn5B infectadas por AcMNPV (72 h.p.i). **C)** Western blot realizado utilizando anticorpo monoclonal contra cauda de hexa-histidina (Roche). 1- extrato protéico de células Tn5B infectadas por vAcPH3 (72 h.p.i); 2- extrato protéico de células Tn5B infectadas por AcMNPV (72 h.p.i).

4. DISCUSSÃO

Diversos contra-tempos surgiram ao longo do presente projeto. Esses contra-tempos ocorreram na etapa de obtenção do fragmento PH (uma ORF de fusão contendo gene da poliedrina, sítio de *Nco*I, cauda de hexa-histidina).

Na primeira tentativa de obtenção do fragmento PH (estratégia PH1), o PCR realizado para obter o fragmento PH amplificou parte do genoma bacteriano em vez do gene da poliedrina. Como o “template” utilizado na reação de PCR da estratégia PH1 foi DNA plasmidial (plasmídeo p2100), acredita-se que o DNA plasmidial utilizado estivesse contaminado com DNA cromossomal bacteriano e que os “primers” tenham anelado em alguma região desse DNA cromossomal. De qualquer modo, o fragmento PH1 não está correto.

Já na segunda tentativa de obtenção do fragmento PH (estratégia PH2), o gene da poliedrina foi amplificado. Contudo, o “primer” 5’ utilizado (polFBgIII) havia sido sintetizado com uma guanina extra em sua extremidade 3’, alterando a fase ORF do fragmento PH2, tornando-o inútil.

Contudo, em ambos os casos, diversos fatores contribuíram para que se acreditasse que os fragmentos PH1 e PH2 estavam corretos:

- Os produtos de PCR PH1 e PH2 possuíam tamanhos similares ao esperado para o fragmento PH;

- Os padrões de digestão com diversas enzimas de restrição utilizadas foram compatíveis com o padrão esperado para o fragmento PH;
- Os vírus recombinantes PH1, PH2 e derivados construídos por transposição sítio-específica apresentaram fenótipo oclusão negativo (occ^-). Esse resultado era esperado, pois esses vírus recombinantes possuíam o gene da poliedrina presente na proteína de fusão, mas não possuíam o gene da poliedrina selvagem. De acordo com Je *et al.* (2003), vírus recombinantes expressando uma proteína de fusão contendo a poliedrina formam poliedros apenas se a poliedrina nativa também estiver sendo expressa;
- Os vírus recombinantes PH1 e derivados construídos por recombinação homóloga possuíam fenótipo oclusão positivo (occ^+). Como tais vírus também expressavam a poliedrina nativa, de acordo com Je *et al.* (2003) o fenótipo occ^+ era esperado.

Somente com os resultados dos seqüenciamentos dos fragmentos PH1 (**Figura 3.16**) e PH2 (**Figura 3.22**) e com o resultados dos experimentos de análise da expressão de proteínas (SDS-PAGE e Western Blot) (**Figura 3.15**) foi descoberto que os fragmentos de PCR PH1 e PH2 estavam incorretos. Contudo, isso foi descoberto somente após grande parte do trabalho ter sido feita baseada nesses fragmentos. Devido a esses enganos, muito tempo foi perdido.

Finalmente, na terceira tentativa, com um novo “primer” 5’ (polFBgIIINEW), foi obtido o fragmento PH correto, que foi chamado de fragmento PH3. E com esse fragmento fomos capazes de construir o baculovírus recombinante vAcPH3. Células infectadas com esse vírus apresentaram fenótipo *occ*⁺. Contudo, isso mostra apenas que estava ocorrendo expressão da proteína poliedrina, mas não esclarece se ela estava sendo expressa fusionada a uma cauda de hexa-histidina. A análise da expressão de proteínas em células infectadas com o vírus vAcPH3 (**Figura 3.28**) deixou claro que a proteína de fusão PH3 estava sendo expressa. Eletroforese em gel de SDS-PAGE (**Figura 3.28.A**) confirmou que em células infectadas com vAcPH3 era expressa uma proteína de peso molecular superior ao da poliedrina nativa e ausente em células infectadas pelo vírus AcMNPV selvagem. Western blot (**Figura 3.28.B e 3.28.C**) mostrou que essa proteína foi reconhecida tanto por anticorpos anti-poliedrina (**Figura 3.28.B**) como por anti-corpos contra a cauda de hexa-histidina (**Figura 3.28.C**), comprovando ser o polipeptídeo PH3 uma proteína de fusão contendo a poliedrina e cauda de hexa-histidina.

Infelizmente, não fomos capazes de atingir todos os objetivos propostos inicialmente. Contudo, a construção do fragmento PH3, do vetor de transferência pFastPH3 e do baculovírus recombinante vAcPH3 já representam em si um grande avanço.

Uma vez que neste projeto foram construídos fragmentos CP^N (Mb^N, C^N, D^N, GarCLV^N, LYSV^N, OYDV^N) e seus respectivos pGemCP^N, o próximo passo é a construção de baculovírus recombinantes PCP^NH3. Essa é uma

tarefa que agora está facilitada pelo fato de o vetor pFastPH3 ter sua construção comprovada.

Alves-Júnior *et al.* (2008) conseguiram expressar a proteína capsidial de GarV-C em baculovírus. Contudo, eles expressaram a proteína de forma solúvel, a proteína foi extraída de gel de poliacrilamida e injetada em coelho para produção de anticorpos. Os anticorpos obtidos por Alves-Júnior *et al.* (2008) se mostraram específicos contra a proteína capsidial de garv-C, contudo apresentaram baixo título. A expressão da proteína capsidial fusionada no fragmento PH seria um sistema mais eficiente de obtenção da proteína capsidial para eliciação da resposta imune utilizando o sistema de expressão baculoviral. A vantagem trazida pelo sistema PH é a facilitação de purificação da proteína (seja pela purificação dos poliedros - contendo a proteína de fusão - via centrifugação, seja pela purificação da proteína de fusão solubilizada via cromatografia de afinidade para a cauda de hexa-histidina).

Outro fato importante é que esse mesmo vetor (pFastPH3) pode agora ser utilizado em diversos projetos que visarem produzir uma proteína de fusão “poliedrina + proteína desejada + cauda de hexa-histidina”.

Além de serem utilizados em experimentos para a produção de anticorpos, vetores baculovirais expressando a poliedrina fusionada a uma proteína de interesse têm outros usos. Uma possível aplicação seria a utilização dessa tecnologia para engenheirar vetores baculovirais que incorporem uma toxina ao corpo de oclusão baculoviral visando obter-se um baculovírus com capacidade inseticida melhorada. Isso pode ser alcançado

pela construção de um baculovírus recombinante contendo o gene da poliedrina fusionado ao gene de uma proteína tóxica a determinada espécie alvo. Chang *et al.* (2003), utilizaram essa tecnologia para produzir um baculovírus recombinante (vColorBtrus) capaz de incorporar a toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* aos corpos de oclusão. Experimentos realizados por Chang *et al.* (2003) demonstraram que vColorBtrus possuía dose letal inferior a do AcMNPV selvagem e que o tempo de sobrevivência de larvas infectadas por vColorBtrus era reduzido quando comparado com o tempo de sobrevivência de larvas infectadas com AcMNPV selvagem. O mesmo princípio poderá ser usado para a construção de baculovírus recombinantes, baseados no vAcPH3, com capacidade inseticida aumentada.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Construir vetores pFastPCP^NH3 (Mb^N, C^N, D^N, GarCLV^N, LYSV^N, OYDV^N), para a obtenção de baculovírus recombinantes expressando as proteínas de fusão PCP^NH;
- Construir vírus recombinantes vAcPCP^NH3 (Mb^N, C^N, D^N, GarCLV^N, LYSV^N, OYDV^N);
- Produzir anticorpos contra a proteína da capa protéica dos vírus GarMbFV, GarV-C, GarV-D, OYDV, LYSV, GarCLV utilizando as respectivas proteínas PCP^NH3;
- Analisar eficiência do sistema de produção de anticorpos utilizando proteínas fusionadas a poliedrina.

6. BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, A.M.R.; LIMA, J.A.A. (2001) **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Fortaleza, Sociedade Brasileira de Fitopatologia.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. (1990) **Basic local alignment search tool**. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.

ALVES-JÚNIOR, M.; MARRACCINI, F.M.; MELO FILHO, P.A.; DUSI, A.N.; PIO-RIBEIRO, G.; RIBEIRO, B.M. (2008). **Recombinant expression of Garlic virus C (GarV-C) capsid protein in insect cells and its potential for the production of specific antibodies**. *Microbiological Research*, 163: 354-361.

Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System” – An efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins. *Invitrogen*, Catalog n. 10359-016, 10360-014, 10584-027, 10712-024.

BALBACH, A.; BOARIM, D. (1992). **As hortaliças na medicina natural**. 2^a ed. São Paulo, Editora Missionária. 288 p.

BARBOSA, A.S.; SOUSA, E.G.; SILVA, M.A.; OLIVEIRA, H.S.M.C.; MEDEIROS, M.B. (2007) **Plantas medicinais: aspectos do uso de fitoterápicos na melhoria**

da qualidade de vida humana. X Encontro de Iniciação à Docência, Universidade Federal da Paraíba.

BARRERA, P.; CAMARGO, C.D.O. (1985) **O alho: uma planta mágica com o futuro garantido no mercado nacional.** 2ª ed., São Paulo, Icone. 98 p.

BELYAEV, A.S. & ROY, P. (1993). **Development of baculovirus triple and quadruple expression vectors: co-expression of three or four bluetongue virus proteins and the synthesis of bluetongue virus-like particles in insect cells.** *Nucleic Acids Research*, 21: 1219-1223.

BOS, L. (1976) **Onion yellow dwarf virus.** In: Commonwealth Micological Institute (CMI) / Association of Applied Biologists (AAB). *Descriptions of plant viruses.* Wageningen. n.158.

BOS, L.; HUIJBERTS, N.; HUTTINGA, H.; & MAAT, D.Z. (1978) **Leek yellow stripe virus and its relationships to onion yellow dwarf virus: characterization, ecology and possible control.** *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 84: 185-204.

BOS, L. (1981) **Leek yellow stripe virus.** In: Commonwealth Micological Institute (CMI)/ Association of Applied Biologists (AAB). *Descriptions of plant viruses.* Wageningen. n. 240.

BRUNT, A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M.J.; GIBBS, A.J.; WATSON, L. (1996) **Viruses of Plants: descriptions and lists from the VIDE database.** CABI International, United Kingdom.

Bulletin 2134, BIO-RAD. **Increased transfer efficiency using a discontinuous buffer system with the Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell.** US/EG Bulletin 2134.

BURGESS, S. (1977). **Molecular weights of Lepidopteran baculovirus DNAs: derivation by electron microscopy.** *Journal of General Virology*, 37: 501-510.

CANAVELLI, A.; NOME, S.; CONCI, V. C. (1998) **Incidencia de las virosis en cultivos de ajo Rosado Paraguayo.** *Fitopatologia Brasileira*, 23: 354-358 p.

CEPA/SC (1996) **Alho (Estudo da economia e mercado de produtos agrícolas, 3).** Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina, Santa Catarina.

CHANG, J.H.; CHOI, J.Y.; JIN, B.R.; ROH, J.Y.; OLSZEWSKI, J.A.; SEO, S.J.; O'REILLY, D.R.; & JE, Y.H. (2003). **An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin.** *Journal of Invertebrate Pathology*, 84: 30-37.

CLARK, M.K. & ADAMS, A.N. (1977). **Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunoabsorbent assay for the detection of plant viruses.**

Journal General Virology, 34: 475-483.

CONCI, V.C.; MORICONI, D.N.; NOME, S.F. (1986). **Cultivo de meristemas apicales de seis tipos clonales de ajo (*Allium sativum* L.).** *Phyton*, 46: 187-194.

CONCI, V.C. & NOME, S.F. (1991). **Virus free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture.** *Journal of Phytopathology*, 132: 186-192.

CONCI, V.C.; NOME, S.F.; MILNE, R.G. (1992). **Filamentous viruses of garlic in Argentina.** *Plant Disease*, 76: 594-596.

CONCI, V.C., CANAVELLI, A.E., LUNELLO, P.A., CAFRUNE, E.E. (1999). **Mosaico del ajo.** In: Proyecto de Investigaciones en Fitovirología. Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal-IFFIVE y Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária-INTA. Argentina. 1-6 p.

CONCI, V. C.; CANAVELLI, A.; LUNELLO, P.; DI RIENZO, J.; NOME, S. F.; ZUMELZU, G.; ITALIA, R. (2003). **Yield Losses Associated with Virus-Infected Garlic Plants During Five Successive Years.** *Plant Disease*, 87: 1411-1415.

DANIELS, J.; CALDAS, L.S.; KITAJIMA, E.W. (1978). **Plantas de alho (*Allium sativum* L.) supostamente sadias obtidas por cultura de meristemas de bulbilhos infectados por vírus.** *Fitopatologia Brasileira*, 3: 82.

DAVIS, R.M. (1995). **Diseases caused by viruses and mycoplasma-like organisms.** In: Schwartz, H.F. & Mohan, S.K. (Eds.). *Compendium of onion and garlic diseases*. St. Paul. APS Press. p. 54

DIEKMANN, M. (1997). **FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. No. 18. *Allium* spp.** Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Rome.

DUSI, A.N.; FAJARDO, T.V.M.; CUPERTINO, F.P. (1994). **Serological identification of garlic (*Allium sativum*, L.) virus in Brazil.** *Fitopatologia Brasileira*, 19: 298.

ENGELHARD, E.K.; KAMMORGAN, L.N.W.; WASHBURN, J.O.; VOLKMAN, L.E. (1994). **The insect tracheal system - a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M. nuclear polyhedrosis.** *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 91: 3224-3227.

FAJARDO, T.V.M. (1998). **Estudo de degenerescência por viroses e caracterização molecular do complexo viral da cultura do alho**. 113 p. Tese (Doutorado). Universidade de Brasília, Brasília.

FAJARDO, T.V.M.; NISHIJIMA, M.; BUSO, J.A.; TORRES, A.C.; ÁVILA, A.C.; & RESENDE, R.O. (2001). **Garlic viral complex: Identification of *Potyvirus* and *Carlavirus* in Central Brazil**. *Fitopatologia Brasileira*, 26: 619-626.

FAO. Disponível em: <http://www.fao.org/>. Consultado em: 23/06/2006.

FEDERICI, B.A. (1997). **Baculovirus Pathogenesis**. Em: Lois K. Miller. *The Baculoviruses*. New York; Plenum Press. 447 p.

FILGUEIRA, F.A.R. (2000). **Novo manual de olericultura: agroecologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2ª ed., Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 412 p.

FUNK, C. J.; BRAUNAGEL, S. C.; & ROHRMANN, G. F. (1997). **Baculovirus Structure**. Em: Lois K. Miller. *The Baculoviruses*. New York; Plenum Press. 7 p.

GRANADOS, R.R.; & WILLIAMS, K. (1986). ***In vivo* infection and replication of baculoviruses**. Em: *The Biology of Baculoviruses*, vol. 1, eds R. Granados e B. Federici, 89-108 p. Boca Raton, Fla: CRC Press.

GRANADOS, R.R, GUOXUN, L., DERKSEN, C.G., MICKENNA, K.A.A. (1994). **An insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus.** *Journal of Invertebrate Pathology*, 64: 260-266.

HAINES, F.J.; POSSEE, R.D.P.; & KING, L.A. (2006). (TBP) **Baculovirus Expression Vectors.** Encyclopedia of Virology (Third Edition). By Elsevier; Editors in chief: Brian Mahy and Marc van Regenmortel.

HANAHAHAN, D. (1995). **Techniques for transformation of *E. coli*.** Em: Glover, D.M.; Hames, B.D. *DNA Cloning: A Practical Approach. Vol. 1 (Core Techniques)*. Oxford University Press, USA, 2ª edição (1995). 109-135 p.

HARRAP, K. (1972). **The structure of nuclear polyhedrosis viruses. II. The virus particle.** *Virology*, 50: 133-139.

HARRAP, K.; & LONGWORTH, J. (1974). **An evaluation of purification methods for baculoviruses.** *Journal of Invertebrate Pathology*, 24: 55-62.

HELGUERA, M.; BRAVO-ALMONACID, F.; KOBAYASHI, K.; RABINOWICZ, P.D.; CONCI, V.; & MENTABERRY, A. (1997). **Immunological detection of a GarV-type virus in Argentine garlic cultivars.** *Plant Disease*, 81, 1005-1010.

HELGUERA, M.; RABINOWICZ, P.D.; KOBAYASHI, K.; CONCI, V.C.;

MENTABERRY, A.N.; BRAVO-ALMONACID, F.F. **Identification and characterization of a coat protein gene from a garlic mite-borne filamentous virus present in Argentina.** *Plant Disease*. Article in press.

HORTON, M.H.; BURAND, J.P. (1993). **Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion.** *Journal of Virology*, 67: 1860-1868.

ICTVdB (International Committee on Taxonomy of Viruses – database) (2006a). 14.0.1. **Carlavirus**. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/14010000.htm>.

ICTVdB (International Committee on Taxonomy of Viruses – database) (2006b). 00.057.0.01. **Potyvirus**. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/57010000.htm>

ICTVdB (International Committee on Taxonomy of Viruses – database) (2006c). 00.056.0.03. **Allexivirus**. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.056.0.03.htm>

JARVIS, D.L.; FLEMING, J.G.W.; KOVACS, G.R.; SUMMERS, M.D.; & GUARINO, L.A. (1990). **Use of early baculovirus promoters for continuous expression**

and efficient processing of foreign gene products in stably transformed lepidopteran cells. *Biotechnology*, 8: 950-955.

JE, Y.H.; JIN, B.R.; PARK, H.W.; ROH, J.Y.; CHANG, J.H.; SEO, S.J.; OLSZEWSKI, J.A.; O'REILLY, D.R.; & KANG, S.K. (2003). **Baculovirus Expression Vectors that Incorporate the Foreign Protein into Viral Occlusion Bodies.** *BioTechniques*, 34: 81-87.

JEHLE, J.A.; BLISSARD, G.W.; BONNING, B.C.; CORY, J.S.; HERNIOU, E.A.; ROHRMANN, G.F.; THEILMANN, D.A.; THIEM, S.M.; & VLAK, J.M. (2006). **On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision.** *Archives of Virology*, 151: 1257-1266.

KANG, S.-G.; KOO, B.-J.; & CHANG, M.U. **Isolation and characterization of garlic mite-borne virus from garlic in Korea.** Não publicado.

KEDDIE, B.A.; APONTE, G.W.; & VOLKMAN, L.E. (1989). **The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host.** *Science*, 243: 1728-1730.

KITTS, P.A., AYRES, M.D., POSSEE, R.D. (1990). **Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors.** *Nucleic Acid Research*, 18: 5667-5672.

LOT, H.; CHOVELON, V.; SOUCHE, S.; DELECOLLE, B. (1998). **Effects of Onion yellow dwarf and Leek yellow stripe viruses on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars.** *Plant Disease*, 82: 1381-1385.

LUCKOW, V.A. (1991). **Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors.** Em: *Recombinant DNA Technology and Applications*, eds. A. Prokop, R. K. Bajpai, & C.H, pp. 97-152. New York: McGraw-Hill.

LUCKOW, V.A.; LEE, C.S.; BARRY, G.F.; & OLINS, P.O. (1993). **Efficient Generation of Infectious Recombinant Baculoviruses by Site-Specific Transposon-Mediated Insertion of Foreign Genes into a Baculovirus Genome Propagated in *Escherichia coli*.** *Journal of Virology*, 67: 4566-4579.

LUNELLO, P.; BRAVO-ALMONACID, F.; KOBAYASHI, K.; HELGUERA, M.; NOME, S.F.; MENTABERRY, A.; CONCI, V.C. (2000). **Distribution of garlic virus A in different garlic production regions of Argentina.** *Journal of Plant Pathology*, 82: 17-21.

LUNELLO, P.; DI RIENZO, J.; CONCI, V.C. (2007a). **Yield Loss in Garlic Caused by *Leek yellow stripe virus* Argentinean Isolate.** *Plant Disease*, 15: 153-158.

LUNELLO, P.; MUNOZ, R.; LERMA, M.L.; LÓPEZ FUSTER, P.; PONZ, F. (2007b). **Potyvirus, Allexivirus y Tospovirus de Alliáceas en Castilla La Mancha.** XI

Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas (SECH), Albacete.

McGINNIS, S. & MADDEN, T.L. (2004). **BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools.** *Nucleic Acids Research*, 32: W20-W25.

MELO FILHO, P.A. (2003a). **Detecção e caracterização molecular de *Allexivirus* e estudo de degenerescência em plantas de alho (*Allium sativum* L.) provocada por vírus.** 116 p. Tese (Doutorado). Universidade de Brasília, Brasília.

MELO FILHO, P.A.; IONE-NAGATA, A.K.; DUSI, A.N.; RESENDE, R.O. (2003b). **Detecção de *Allexivirus* pelo uso de sondas moleculares não-radioativas.** XXVI Congresso Paulista de Fitopatologia, Araras.

MELO FILHO, P.A.; NAGATA, T.; DUSI, A.N.; BUSO, J.A.; TORRES, A.C.; EIRAS, M.; RESENDE, R.O. (2004). **Detection of three *Allexivirus* species infecting garlic in Brazil.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 375-340.

MELHUS, J.E.; REDDY, C.S.; HENDERSON, W.J.; VESTAL, E. (1929). **A new virus disease epidemic on onion.** *Phytopathology*, 19: 73-77.

MENEZES SOBRINHO, J.A. (1997). **Cultivo do alho (*Allium sativum* L.).** 3ª ed., Embrapa Hortaliças, Brasília.

MILLER, L.K. (1997). **The Baculoviruses**. Plenum Press, New York.

NAKAMAE, I.J.; & PASTRELLO, C.P. (2002). *Agriannual 2002*. SãoPaulo: Argos Comunicação.

O'REILLY, D.R.; MILLER, L.K.; & LUCKOW, V.A. (1994). **Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual**, New York, Oxford University Press.

PAVAN, M.A. (1998). **Viroses em alho nobre: identificação, estabelecimento de métodos eficientes para obtenção de plantas livres de vírus, seleção de clones assintomáticos em campo e avaliação comparativa do desempenho em condições controladas**. Tese de livre docência; Gráfica UNESP; Botucatu - SP; Brasil.

POSSEE, R.D. (1997). **Baculoviruses as expression vectors**. *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 569-572.

RESENDE, F.V.; SOUZA, R.J.; PASQUAL, M. (1995). **Comportamento, em condições de campo, de clones de alho obtidos por cultura de meristema**. *Horticultura Brasileira*, 13: 44-46.

RESENDE, F.V.; GUALBERTO, R.; SOUZA, R.J. (2000). **Crescimento e produção de clones de alho provenientes de cultura de tecidos e de propagação convencional.** *Scientia Agricola*, 57: 61-66.

RESENDE, G.M. (1997). **Desempenho de cultivares de alho no norte de Minas Gerais.** *Horticultura Brasileira*, 15: 127-130.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; & MANIATIS, T. (1989). **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** New York. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SMITH, G.E.; SUMMERS, M.D.; FRASER, M.J. (1983). **Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector.** *Molecular and Cellular Biology*, 3: 2156-2165.

SOUZA, A.T. (2004). **Agro-indicadores: aspectos econômicos da cultura do alho.** Instituto CEPA, Santa Catarina. Disponível em http://www.icepa.com.br/agroindicadores/opiniaio/analise_alho.htm. Acesso em: 25 mar. 2004.

SUMI, S.; TSUNEYOSHI, T.; & FURUTANI, H. (1993). **Novel rod-shaped viruses isolated from garlic, *Allium sativum*, possessing a unique genome organization.** *Journal of General Virology*, 74: 1879-1885.

SUMI, S.; MATSUMI, T.; & TSUNEYOSHI, T. (1999). **Complete nucleotide**

sequences of garlic viruses A and C, members of the newly ratified genus *Allexivirus*. *Archives of Virology*, 144: 1819-1826.

SUMMERS, M.; & ANDERSON, D. (1972). **Granulosis virus deoxyribonucleic acid: a closed double-stranded molecule**. *Journal of Virology*, 9: 710-713.

TANABE, C. M. N. (1999). **Avaliação da desgenerescência em campo causada por fitoviroses na cultura de alho (*Allium sativum* L.)**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília. Brasília.

TORRES, A.C., DUSI, A.N., RESENDE, R.O., BUSO, J.A. (2001). **Produção de alho-semente com alta qualidade fitossanitária mediante cultura de ápices caulinares**. Embrapa Hortaliças, Brasília. Circular Técnica 27.

UYEMOTO, J.K.; PROVVIDENTI, R.; SCHROEDER, W.T. (1972). **Serological relationship and detection of bean common and bean yellow mosaic viruses in agar gel**. *Annals of Applied Biology*, 71: 235-242.

VAN DIJK, P. (1993a). ***Carlavirus* isolates from cultivated *Allium* species represent three viruses**. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 99: 233-257.

VAN DIJK, P. (1993b). **Survey and characterization of *Potyvirus*es and their strains of *Allium* species**. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 99: 1-48.

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; McGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. (2000). **Virus taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press, San Diego, 1162 p.

VOLKMAN, L. E.; BLISSARD, G. W.; FRIESEN, P.; KEDDIE, B. A.; POSSEE, R.; & THEILMANN, D. A. (1995). **Baculoviridae**. Em: Murphy *et al.* Virus Taxonomy. Springer-Verlag. New York. 104-111 p.

WALKEY, D.G.A. & ANTILL, D.N. (1989). **Agronomic evaluation of virus-free and virus-infected garlic (*Allium sativum* L.)**. *Journal of Horticultural Science*, 64: 53-60.

WANG, X.; OOI, B.G.; & MILLER, L.K. (1991). **Baculovirus vectors for multiple gene expression and for occluded virus production**. *Gene*, 100: 131-137.

WARD, C.W. & SHUKLA, D.D. (1991). **Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions**. *Intervirology*, 32: 269-296.

YAMASHITA, K.; SAKAI, J.; HANADA, K. (1996). **Characterization of a new virus from Garlic (*Allium sativum* L.), Garlic Mite-borne Mosaic Virus.** *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 62: 483-489.

ZERBINI, F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. (1999). **A Família Potyviridae – parte I.** *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 7: 1-66.