

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

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

### **19) Ensaio imunogênico *Western Blotting*:**

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

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

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

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

## **20) Ensaio imunogênico *Dot blot*:**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **25) Preparação de células para microscopia eletrônica:**

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

## **26) Preparação de poliedros para microscopia eletrônica:**

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

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

## **27) Processamento de amostras para análise em microscópio eletrônico:**

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

## **Métodos específicos para a construção dos baculovírus recombinantes**

### **1) Purificação do gene da pré-pró-renina**

#### **1.1) Confirmação do plasmídeo pRHR1100:**

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

#### **1.2) Amplificação e purificação do plasmídeo pRHR1100:**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **2.2) Amplificação, purificação e seqüenciamento do plasmídeo pBSRen:**

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

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

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

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

### **3.2) Clonagem da pré-pró-renina no plasmídeo pSynXIV VI<sup>+</sup>X3:**

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

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

### **3.3) Amplificação e purificação do plasmídeo pSynRen:**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **5) Análise e seleção dos vírus recombinantes**

### **5.1) Eletroforese de Proteínas (SDS-PAGE):**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# Resultados

## 1. Confirmação do plasmídeo pRHR1100

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

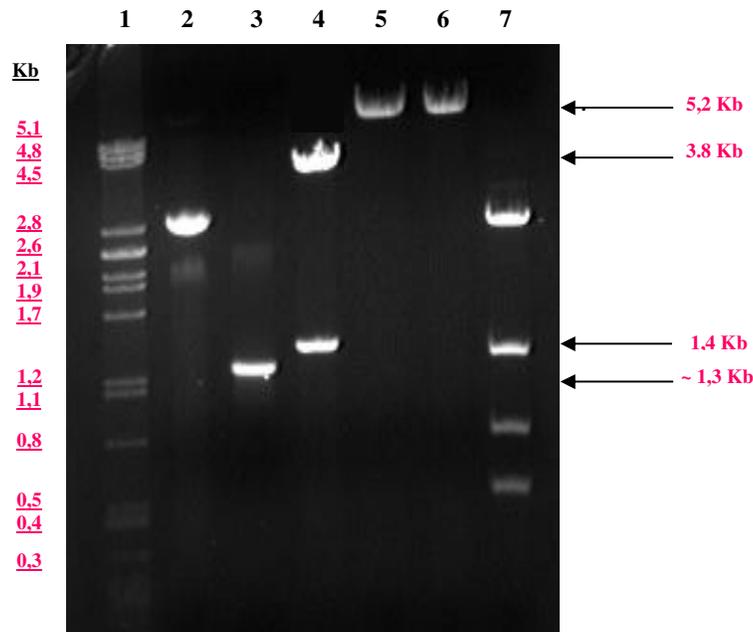


Figura 17 - Confirmação do plasmídeo pRHR1100 por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador  $\lambda$ Pst I (Invitrogen); amostra 2: pRHR1100 intacto; amostra 3: PCR do pRHR1100 com primers *Ren forward e reverse*; amostra 4: pRHR1100 digerido com *Bam* HI e *Hind* III; amostra 5: pRHR1100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

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

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

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

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

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

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

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

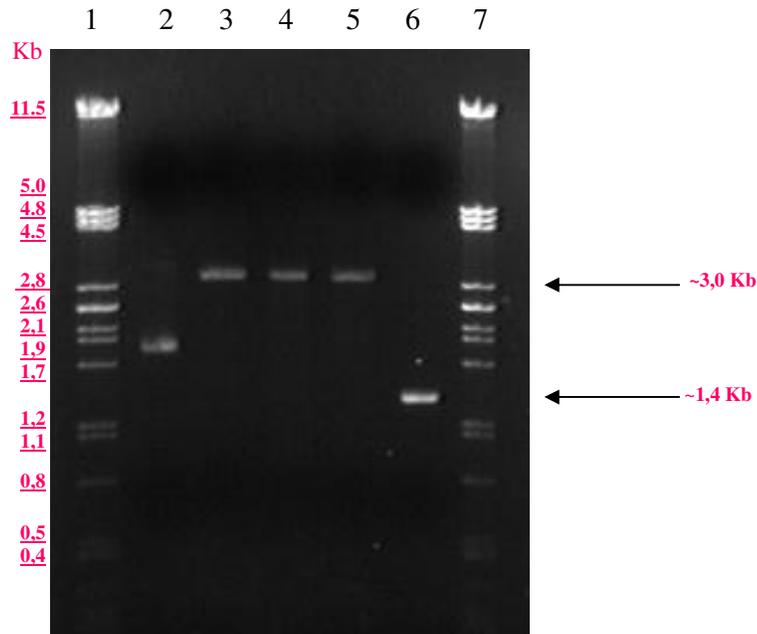


Figura 18 - Confirmação da linearização do pBS e do isolamento da pré-pró-renina do plasmídeo pRHR1100 por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador  $\lambda$ Pst I (Invitrogen); amostra 2: pBS intacto; amostra 3: pBS digerido com *Bam* HI; amostra 4: pBS digerido com *Hind* III; amostra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

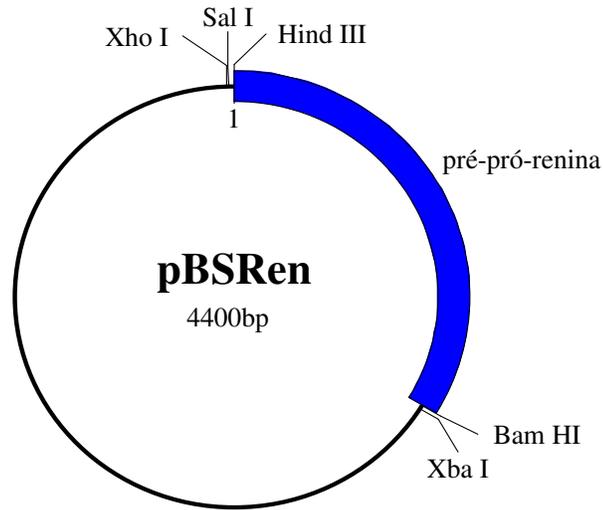


Figura 19 - Plasmídeo recombinante pBSRen. Desenho esquemático do plasmídeo pBSRen mostrando o inserto do gene da pré-pró-renina no vetor pBS.

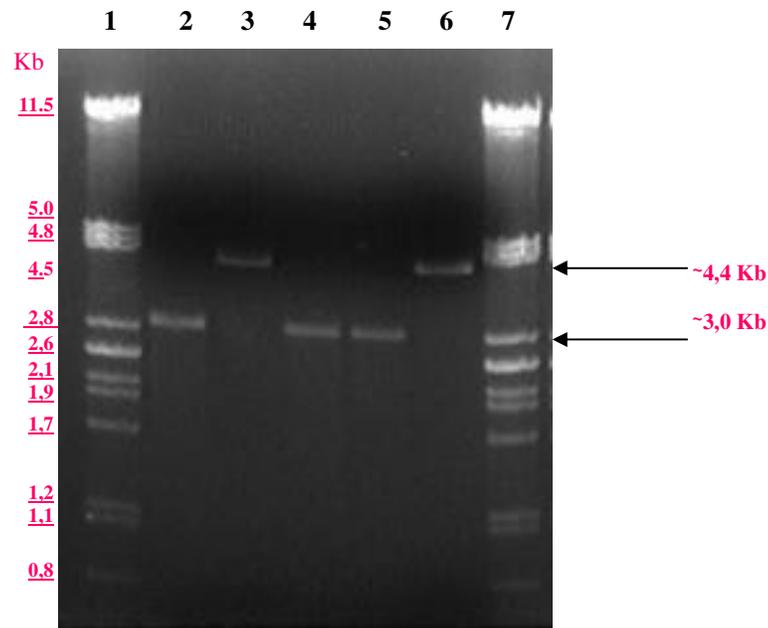


Figura 20 - Clonagem do gene da pré-pró-renina no plasmídeo pBS. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador  $\lambda Pst$  I (Invitrogen); amostra 2: DNA do clone #1 digerido com a enzima de restrição *Bam* HI; amostra 3: DNA do clone #2 digerido com a enzima de restrição *Bam* HI; amostra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

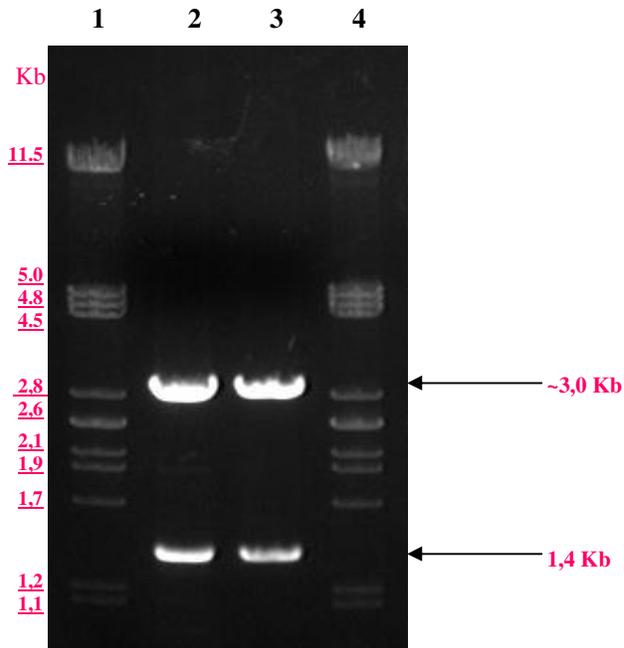


Figura 21 - Confirmação da clonagem da pré-pró-renina no plasmídeo pBS. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador  $\lambda$ Pst I (Invitrogen); amostra 2: DNA do pBSRen #2 digerido com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Hind* III; amostra 3: DNA do pBSRen #5 digerido com as enzimas de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

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

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

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

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

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

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

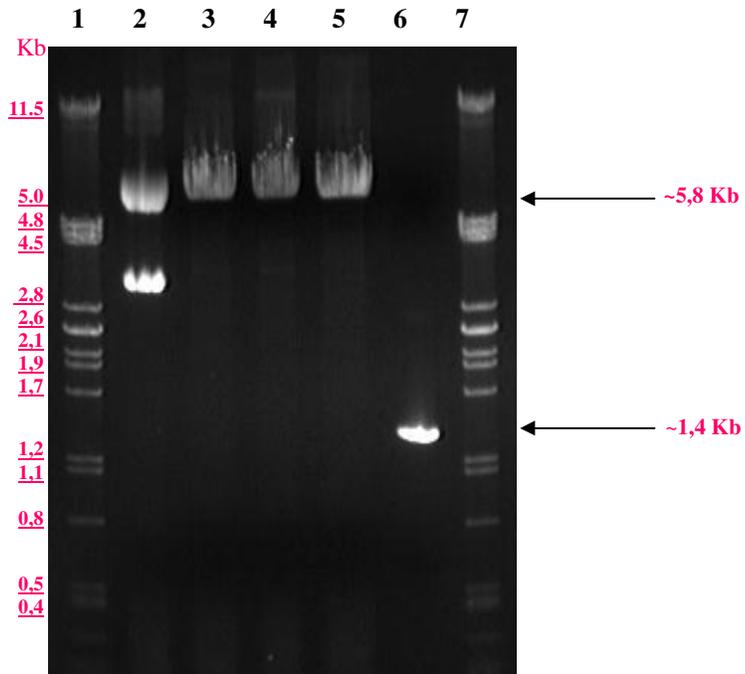


Figura 22 - Confirmação da abertura do pSyn e do isolamento da pré-pró-renina do plasmídeo pBSRen através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador  $\lambda$ Pst I (Invitrogen); amostra 2: pSyn intacto; amostra 3: pSyn digerido com *Bgl* II; amostra 4: pSyn digerido com *Xho* I; amostra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

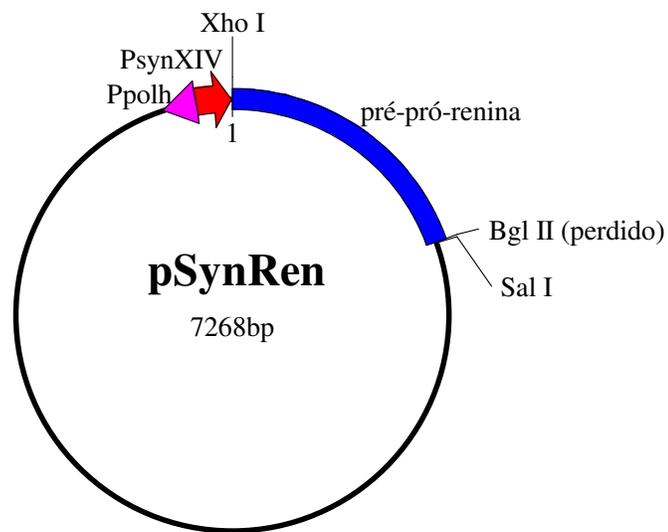


Figura 23 - Plasmídeo recombinante pSynRen. Desenho esquemático do plasmídeo pSynRen mostrando o inserto do gene da pré-pró-renina no vetor pSyn.

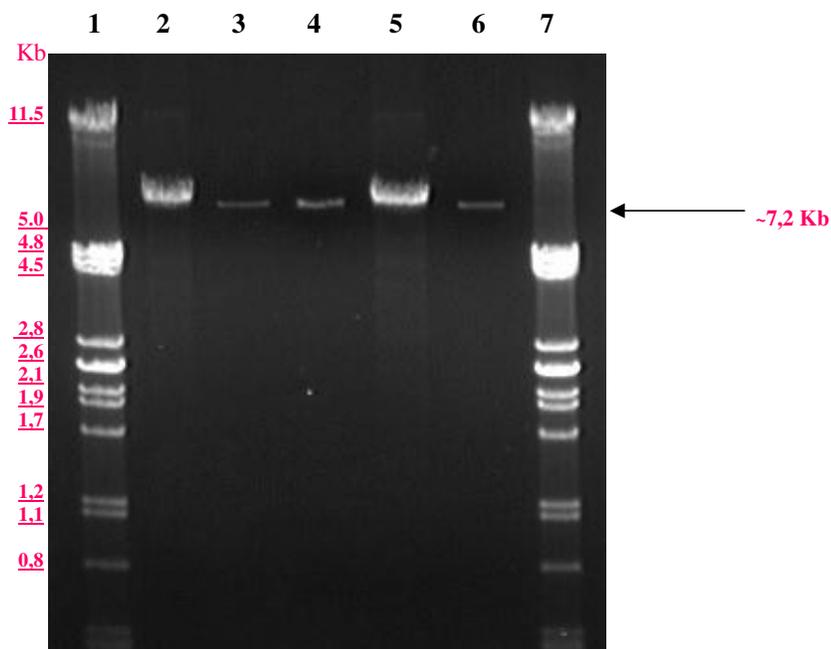


Figura 24 - Clonagem do gene da pré-pró-renina no plasmídeo pSyn através da eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador  $\lambda Pst$  I (Invitrogen); amostra 2: DNA do pSynRen #1 digerido com a enzima de restrição *Xho* I; amostra 3: DNA do pSynRen #2 digerido com a enzima de restrição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

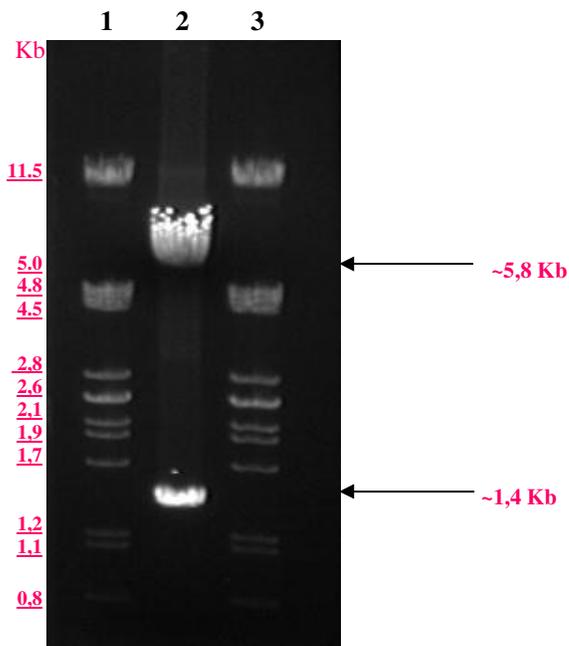


Figura 25 - Confirmação da clonagem da pré-pró-renina no plasmídeo pSyn através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador  $\lambda Pst$  I (Invitrogen); amostra 2: DNA do pSynRen #1 digerido com as enzimas de restrição *Sal* I e *Xho* I; amostra 3: marcador  $\lambda Pst$  I (Invitrogen).

#### **4. Construção do plasmídeo recombinante HTcRen**

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

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

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

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