

RÉGIA MARIA FELTRIN DAMBROS

**AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E EXPRESSÃO DE PROTEÍNA
RECOMBINANTE DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY
EM SISTEMA DE BACULOVÍRUS PARA UTILIZAÇÃO
EM PROGRAMA DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO**

LAGES – SC

2006

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
MESTRADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

RÉGIA MARIA FELTRIN DAMBROS

**AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E EXPRESSÃO DE PROTEÍNA
RECOMBINANTE DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY
EM SISTEMA DE BACULOVÍRUS PARA UTILIZAÇÃO
EM PROGRAMA DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Janice Reis Ciacci Zanella

LAGES – SC

2006

RÉGIA MARIA FELTRIN DAMBROS

**AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E EXPRESSÃO DE PROTEÍNA
RECOMBINANTE DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY
EM SISTEMA DE BACULOVÍRUS PARA UTILIZAÇÃO
EM PROGRAMA DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Banca Examinadora:

Orientadora:

Prof^a Dr^a Janice Reis Ciacci Zanella
EMBRAPA Suínos e Aves Concórdia SC

Co-orientadora:

Prof^a Dr^a Eliana Kanackfuss Vaz
CAV – UDESC Lages SC

Membro:

Prof^a Dr^a Vânia Helena Techio
UnC Concórdia SC

Lages (SC), 04 de Julho de 2006.

Dedicatória.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora.....

AGRADECIMENTOS p.2

.....

AGRADECIMENTOS P.3

.....

AGRADECIMENTOS P.4

.....

AGRADECIMENTOS P.5

.....
Obrigada por todo aprendizado, carinho, amor e amizade de todos.

“Se vi mais longe do que os outros, é porque
estava apoiado nos ombros de gigantes”.

ISAAC NEWTON

“Família, a chave de todo o conhecimento!”
Frase de uma criança aos nove anos de idade.

RESUMO

A doença de Aujeszky (DA) é uma enfermidade infecto-contagiosa que causa graves prejuízos econômicos ao produtor e à agroindústria suinícola. Com o objetivo de desenvolver insumos e aprimorar tecnologias que sejam mais rápidas, sensíveis e específicas de diagnóstico para uso em regiões livres ou em erradicação da DA, a glicoproteína E (gE) do vírus da doença de Aujeszky (VDA) foi amplificada, clonada e expressada. Através da engenharia genética, um definido pedaço de DNA, seqüência do gene da gE, foi propagado em um organismo hospedeiro. A gE foi amplificada pela técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase), clonado no vetor pGem®-T Easy e transformado em células competentes de *Escherichia coli*, DH-5 α TM. O clone obtido foi subclonado no plasmídeo de expressão pFastBacTM1, o qual possui o gene promotor da poliedrina. O subclone obtido foi analisado para certificação de sua orientação correta dentro do plasmídeo com as endonucleases de restrição BamH I e EcoR I. O clone com a orientação correta teve seu DNA extraído e usado para a transposição dentro do bacmid (baculovírus com célula competente e plasmídeo helper). As colônias com inserto gE foram selecionadas pelo fenótipo da colônia, a qual expressa cor branca quando clonada. As colônias brancas recombinantes tiveram seu DNA extraído e usado para a co-transfecção em células de inseto *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4). O baculovírus gE recombinante ao ser inoculado em cultivo celular, expressou a gE recombinante, comprovado pela técnica de Western blotting. O baculovírus gE-recombinante contendo apenas o gene da gE do VDA será utilizado para produção de antígeno e de anticorpos monoclonais, o que auxiliará no desenvolvimento de um teste de diagnóstico mais sensível, específico e mais seguro para o VDA, o que contribuirá para o controle desta doença. Este teste poderá ser usado em áreas livres do VDA pois empregará produtos/insumos que contêm apenas partes do agente infeccioso de interesse, sem por em risco a região ou país quanto à biossegurança.

PALAVRAS-CHAVE: doença de Aujeszky. glicoproteína E. clonagem. baculovírus. recombinante. antígeno.

ABSTRACT

Aujeszky's disease (AD) is an infect-contagious illness that causes serious economical damages to the producer and the swine industry. Aiming to develop mechanisms and to improve technologies that are faster, more sensitive and more specific for diagnosis and for use in free areas or in AD's eradication programs, the glycoprotein E (gE) of Aujeszky's disease virus (ADV) was amplified, cloned and expressed. Through genetic engineering, a defined piece of DNA, or sequence of the gE gene was propagated in an host organism. The gE was amplified by the technique of PCR (polimerase chain reaction), cloned in the vector pGem®-T Easy and transformed in competent cells of *Escherichia coli*, DH-5 α TM. The clone obtained was sub-cloned in the expression plasmid pFastBacTM1, which contains the promoter gene of the polyhedrin. The obtained subclone was analyzed inside for certification of its correct plasmid orientation with the restriction endonucleases *BamH* I and *EcoR* I. The clone with the correct orientation had its DNA extracted and used for transposition inside the bacmid (baculovirus with competent cell and helper plasmid). Colonies with inserted gE were selected by the phenotype of the colony, which expresses white color when cloned. White recombinant colonies had their DNA extracted and used for cotransfection in insect cells *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4). The recombinant-gE baculovirus was inoculated in cultured cells and expressed the recombinant gE by Western blotting. The recombinant-gE baculovirus containing only the gE gene of the VDA will be used for antigen and monoclonal antibodies production, which will aid in the development of a more sensitive, specific and safer diagnostic test for the VDA, helping in this disease control. This test might be used in VDA free regions by employing products and mechanisms which contain only pieces of the infectious agent of interest, without any risks to the region or country regarding their biosecurity.

Key-words: Aujeszky's disease. glycoprotein E. cloning. baculovirus. recombinant. antigen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Mapa da organização do genoma VDA.....	33
Figura 02 - Arranjo genômico na região U _{S9} da gE.VDA.....	33
Figura 03 - Nucleocapsídeo típico de herpesvírus.....	34
Figura 04 - Partícula de herpesvírus.....	35
Figura 05 - Representação esquemática do ciclo de replicação do VDA.....	37
Figura 06 - Representação esquemática de tipos genômicos do VDA (I, II e III) com base na migração dos três primeiros fragmentos obtidos com BamH I.....	41
Figura 07 - Fotografia de cultura de células BTI-Tn5B1-4 infectadas como vírus AcMNPV.....	44
Figura 08 - Fotografia da monocamada de cultura celular de inseto BTI-Tn-5B1-4 (Tn-5B1-4).....	47
Figura 09 - Fotografias de Trichoplusia ni.....	48
Figura 10 - Esquema da produção da glicoproteína gE do VDA.....	52
Figura 11 - DNA genômico do vírus da doença de Aujeszky.....	76
Figura 12 - DNA genômico do VDA clivado com BamH I.....	76
Figura 13 - Gel de agarose 0,7% de PCR gE.VDA.....	77
Figura 14 - Teste da qualidade e concentração do DNA gE.VDA precipitado, recuperado em gel LMP e purificado e do vetor pGem®-T Easy.....	78
Figura 15 - DNAs da minipreparação da clonagem pGem®-T Easy com a gE do VDA.....	79

Figura 16 - DNAs da minipreparação da clonagem pGem®-T Easy com a gE do VDA.....	79
Figura 17 - Digestão de DNAs plasmideal transformantes com EcoR I	80
Figura 18 - Gel de agarose LMP 1% de digestão com EcoR I para recuperar gE do clone pGem-gE.VDA.....	81
Figura 19 - Teste da qualidade e da quantidade de DNA gE.VDA recuperado do gel de agarose LMP e purificado.....	81
Figura 20 - Digestão de DNA com a enzima Bsr I em gel de agarose 2%.....	82
Figura 21 - Simulação mapa de restrição da glicoproteína ge com os dois “primers” com sítios de restrição EcoR I e BamH I.....	83
Figura 22 - Gel de agarose 0,8% de amostras do DNA da minipreparação dos subclones pFastBac-gE.VDA.....	84
Figura 23 - Gel de agarose 0,8% do DNA plasmideal, do recombinante vazio e do recombinante pfastBac-gE.VDA.....	85
Figura 24 - Teste da qualidade e concentração do DNA recombinante pFastBac -gE.VDA em gel de agarose 1%.....	85
Figura 25 - Placa agar LB com X-gal e IPTG: Transposição do subclone pFast-Bac-gE.VDA e do “bacmid” em células competentes <i>E. coli</i> DH10Bac™.....	87
Figura 26 - Análise em gel de agarose 0,5% da minipreparação de DNAs “bacmid” da transposição.....	88
Figura 27 - Gel de agarose das reações da PCR com amostras de DNAs de colônias da transposição pFastBac-gE.VDA com o “bacmid”	89
Figura 28 - Gel de agarose das reações da PCR com amostras de DNAs de colônias da transposição pFastBac-gE.VDA com o “bacmid”	89
Figura 29 - Fotografia ao microscópio invertido de células BTI-TN5B1-4 infectadas com vírus selvagem AcMNPV.....	90
Figura 30 - Fotografia ao microscópio invertido de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com vírus recombinante bacmid-pFastBac-gE.VDA.....	91
Figura 31 - Gel de agarose da PCR com DNAs dos vírus “bacmid” recombinantes da co- transfecção.....	92
Figura 32 - Gel SDS-PAGE da co-transfecção dos vírus recombinantes bacmid. pFastBac-gE.VDA.....	93

Figura 33 - “Western blotting” de recombinantes bacmid.pFastBac-gE.VDA da co-transfecção.....	93
Figura 34 - Gel SDS-PAGE de infecção transiente de vírus recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA.....	94
Figura 35 - “Western blotting” de recombinantes bacmid.pFastBac-gE.VDA da infecção em células de inseto.....	95
Figura 36 - “Western blotting” de recombinantes bacmid.pFastBac-gE.VDA da infecção em células de inseto.....	96
Figura 37 - Análise por “Western blotting” do extrato celular da produção de proteína recombinante gE.VDA em células de inseto BTI-Tn5B1-4	98

LISTA DE ABREVIATURAS

α Alfa

β Beta

λ Lâmbda

$^{\circ}$ Graus

% Porcentagem

v Volts

D Dálton

g Glicoproteína

M Molar ou molaridade (mol/l)

U unidades

m Mili (10^{-3})

μ Micro (10^{-6})

η Nano (10^{-9})

k Kilo (10^3)

$^{\circ}\text{C}$ Graus Celsius ou centígrados

gx Força da gravidade

μg Micrograma

μl Microlitro

ml Mililitro

mM Milimolar

nm Nanômetro

aa Aminoácido

pH Potencial hidrogeniônico

BV "Budded virus" (vírus brota extracelular)

OB "Occlusion body" (corpo de oclusão = poliedro)

OV "Occluded virus" (vírus ocluído: corpos de oclusão poliédricos)

gD Glicoproteína D

gE Glicoproteína E

gI Glicoproteína I

gM Glicoproteína M

I% Percentagem de inibição

IF Imunofluorescência

Ig Immunoglobulina

UV Ultravioleta

U_L "Unique Long" (região única longa do genoma viral)

U_S "Unique Short" (região única curta do genoma viral)

IR "Internal Repeat" (região repetida invertida interna do genoma viral)

TR "Terminal Repeat" (região repetida invertida terminal do genoma viral)

LB Meio de crescimento bacteriano "Luria – Bertani"

PF "Primer forward" (Iniciador sense)

PR "Primer reverso" (Iniciador reverso)

D.O. Densidade ótica

cm² Centímetro quadrado

kbp kilo pares de base

kDa kilo Dáltons

gP I Glicoproteína gP I (antigo nome da gE)

APS Persulfato de amônia

PBS Tampão salina com fosfatos

LMP “Low Melting Point” (gel de agarose de baixo ponto de aquecimento)

MOI Multiplicidade de infecção

pfu Unidade formadora de placa

PRV Vírus da pseudo-raiva

VDA Vírus da doença de Aujeszky

ECP Efeito citopático

DNA Ácido desoxirribonucléico

RNA Ácido ribonucléico

PCR “Polimerase Chain Reaction” (reação em cadeia da polimerase)

Taq “*Thermus aquaticus*”

IRS Seqüência Repetida Interna

TRS Seqüência Repetida Terminal

Tris Tris (hidroximetil) aminometano

pmol Picomoles

rpm Rotações por minuto

qsp Quantidade suficiente para

ORF “Open Reading Frame” (fase aberta de leitura)

occ corpos de oclusão do baculovírus

SFB Soro fetal bovino

VZV Vírus da varicella-zoster

SK-6 “Swine Kidney” (células de linhagem, fibroblastos de rim suíno)

X-gal 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside

HSV-1 Herpes simplex vírus tipo 1

BHV-1 Herpesvírus bovino tipo 2

EHV-1 e 4 Herpesvírus eqüino tipo 1 e 4

CIAP “Calf Intestinal Alkaline Phosphatase” (fosfatase alcalina)

DMSO Dimetil sulfóxido de sódio

EDTA Ácido etilediamino tetracético

IPTG Isopropiltio- β -D-Galactoside

HSPG “Heparan Sulfate Proteoglycan”

RFLP “Restriction Fragment Length Polimorfism” (Análise por polimorfismo de tamanho determinado por perfil de restrição enzimática)

MOPS 3-[N-N\orpholino] propanesulfonic acid

dNTP Deoxinucleotídeos trifosfatos

ELISA “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (Ensaio imunoenzimático)

TCID₅₀ Dose infectante para 50% dos cultivos celulares

AcMNPV Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (baculovírus)

SDS-PAGE Sódio Duodecil Sulfato – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

pGem-gE.VDA Recombinante plasmídeo de clonagem com a gE do VDA

pFastBac-gE.VDA Recombinante plasmídeo de expressão com a gE do VDA

bacmid.pFastBac-gE.VDA Recombinante vírus Bacmid-plasmídeo com a gE do VDA

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
1 REVISÃO DE LITERATURA	26
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	26
1.2 HERPESVÍRUS.....	30
1.3 HERPESVÍRUS SUÍNO TIPO 1 (VDA).....	31
1.3.1 Genoma.....	32
1.3.2 Capsídeo.....	34
1.3.3. Tegumento.....	34
...	
1.3.4 Envelope.....	34
1.3.5 Glicoproteínas.....	35
1.3.6 Ciclo de replicação do VDA.....	36
1.3.7 Latência.....	38
1.4 DETECÇÃO DO AGENTE INFECCIOSO OU DE ANTICORPOS ANTI VDA.....	39
1.5 CLONAGEM E EXPRESSÃO.....	42
1.5.1 Baculovírus.....	42
1.5.1.1 Infecção e replicação viral.....	45
1.5.1.2 Expressão gênica em baculovírus.....	45
1.5.1.3 Baculovírus como vetor de expressão.....	46
1.5.2 Cultura de células de inseto.....	47
1.5.3 Poliedrina, promotor e <i>lacZ</i>	49
1.5.4 Plasmídeos.....	49
1.5.5 Transposição.....	51
2 MATERIAIS E MÉTODOS	53
2.1 CÉLULAS.....	53

2.2 AMOSTRAS DE VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY.....	53
2.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO VIRAL.....	53
2.3.1 Teste da qualidade e quantidade do DNA genômico.....	55
2.4 REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	55
2.4.1 Desenho dos iniciadores da seqüência do gene gE do VDA.....	55
2.4.2 Padronização do protocolo da PCR que amplificou toda a gE do VDA.	56
2.4.2.1 Purificação das reações da PCR que amplificou a gE do VDA.....	56
2.5 PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES.....	57
2.5.1 Preparo de células competentes <i>Eschericia coli</i> com cloreto de cálcio (CaCl ₂).....	57
2.5.2 Preparo de células competentes <i>Eschericia coli</i> com cloreto de rubídio (RbCl ₂).....	58
2.6 TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES – CLONAGEM E SUBCLONAGEM.....	59
2.6.1 Clonagem do inserto gE.VDA e do vetor pGem®-T Easy.....	59
2.6.1.1 Isolamento do DNA plasmideal recombinante (minipreparação).....	60
2.6.1.2 Análise do DNA plasmideal recombinante pGem-gE.VDA com enzimas de restrição.....	61
2.6.1.2.1 Liberação do fragmento gE.VDA.....	62
2.6.1.2.2 Digestão do fragmento gE.VDA com a endonuclease de restrição Bsr I e análise eletroforética da gE digerida.....	62
2.6.2 Subclonagem do fragmento gE.VDA e do vetor doador pFastBac™1...	63
2.6.2.1 Digestão do plasmídeo doador pFastBac™1.....	63
2.6.2.2 Transformação da gE.VDA e do vetor pFastBac™1.....	63
2.6.2.2.1 Isolamento do DNA plasmideal recombinante pFastBac-gE.VDA.....	64
a) Análise do DNA plasmideal recombinante pFastBac-gE.VDA com enzimas de restrição.....	64
2.7 TRANSPOSIÇÃO DO DNA RECOMBINANTE pFASTBAC-gE.VDA ATRAVÉS DA TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES <i>E.</i> <i>coli</i> DH10BAC™.....	65
2.7.1 Seleção dos “bacmid” recombinantes pelo fenótipo das colônias bacte- rianas.....	66
2.7.1.1 Isolamento do DNA recombinante “bacmid” – Isolamento de plasmídeos grandes (>100 kb).....	66
2.7.1.2 Análise do DNA recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA.....	67
2.7.1.2.1 Análise do DNA por PCR.....	67
2.7.1.2.2 Análise do DNA por eletroforese em gel de agarose.....	67
2.8 CO-TRANSFECCÃO DE CÉLULAS DE INSETO COM O RECOMBI- NANTE BACMID.pFASTBAC-gE.VDA.....	68

2.8.1	Preparo de placas de 35 mm com células de inseto.....	68
2.8.2	Preparo do DNA recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA.....	68
2.8.3	Co-transfecção em células de inseto do DNA recombinante bacmid.pFast Bac-gE.VDA com lipofectina.....	69
2.8.3.1	Isolamento do DNA recombinante das co-transfecções.....	69
2.8.3.1.1	Análise do DNA do vírus recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA por PCR.....	70
2.8.4	Infecção de culturas celulares de inseto com vírus recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA para avaliação dos níveis de expressão e tempo de infecção.....	70
2.8.5	Preparo das amostras de células co-transfectadas e infectadas com recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA.....	71
2.9	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA E (gE) POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) EM CONDIÇÕES DESNATURANTES.....	71
2.9.1	Preparo dos géis de poliacrilamida.....	72
2.9.2	Condições de corrida dos géis de poliacrilamida.....	72
2.9.3	Revelação dos géis.....	72
2.10	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA gE POR “WESTERN BLOTTING”.....	73
2.10.1	Transferência do gel poliacrilamida para membrana de nitrocelulose...	73
2.10.2	“Western blotting”.....	73
2.11	PRODUÇÃO DE ESTOQUES VIRAIS.....	74
2.11.1	Produção de proteína heteróloga secretada em células de inseto.....	74
2.11.2	Produção de estoque do vírus recombinante.....	75
3	RESULTADOS	76
3.1	PRODUÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	76
3.2	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	77
3.2.1	Purificação e análise da gE.VDA amplificada pela PCR.....	77
3.3	CLONAGEM E SUBCLONAGEM DA GLICOPROTEÍNA E (gE) DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY (VDA).....	78
3.3.1	Clonagem do gene gE.VDA amplificado ao vetor pGem®-T Easy.....	78
3.3.1.1	Análise dos DNA da minipreparação da clonagem pGem-gE.VDA e digestão dos clones com enzimas de restrição.....	78
3.3.1.2	Análise dos clones com enzima de restrição EcoR I.....	79
3.3.1.2.1	Análise do DNA gE.VDA liberado com EcoR I, recuperado em LMP e purificado.....	81
3.3.1.2.2	Digestão do fragmento gE.VDA com a enzima de restrição Bsr I.....	82

a) Simulação do mapa de restrição com o programa NEBcutter V2.0 e digestão do fragmento gE.VDA com a endonuclease de restrição Bsr I.....	82
3.3.2. Subclonagem do gene gE.VDA ao vetor pFastBac™1.....	83
3.3.2.1 Análise do DNA do subclone pFastBac-gE.VDA.....	84
3.4 MONTAGEM DO BACULOVÍRUS RECOMBINANTE “BACMID” COM O SUBCLONE pFASTBAC-gE.VDA POR TRANSPOSIÇÃO.....	86
3.4.1 Resultado da seleção dos “bacmid” recombinantes pelo fenótipo das colônias bacterianas.....	87
3.4.1.1 Isolamento do DNA recombinante por minipreparação de plasmídeos grandes.....	88
3.4.1.1.1 Análise do DNA recombinante por eletroforese.....	88
3.4.1.1.2 Análise do DNA recombinante por PCR.....	89
3.5 CO-TRANSFEÇÃO – INTRODUÇÃO DO DNA RECOMBINANTE BACMID.pFASTBAC-gE.VDA DENTRO DE CÉLULAS DE INSETO E EXPRESSÃO DO GENE HETERÓLOGO.....	90
3.5.1 Análises dos vírus recombinantes expressos em células de inseto.....	91
3.5.1.1 Análises pela PCR.....	91
3.5.1.2 Análises eletroforéticas SDS-PAGE e ‘Western blotting’.....	92
3.7 Produção de estoque viral recombinante.....	97
3.8 Produção de proteína heteróloga secretada em células de inseto.....	97
4 DISCUSSÃO.....	99
CONCLUSÕES.....	102
REFERÊNCIAS.....	103
ANEXOS.....	112

INTRODUÇÃO

A região Sul do Brasil, em particular o Estado de Santa Catarina, é caracterizada por pequenas propriedades agrícolas. No ano de 2005, o Estado de SC, segundo o instituto ICEPA/SC, foi responsável por 24,3% da produção de carne suína no Brasil (ICEPA, 2006; www.icepa.com.br).

Entretanto, as importações de animais têm carreado para dentro do país diversas enfermidades, destacando-se aquelas de etiologia viral, que demandam grandes prejuízos econômicos e determinam a necessidade do desenvolvimento de metodologias de controle (DITTRICH, 2003). Coincidentemente com o incremento do uso da prática de confinamento na produção de suínos, a doença de Aujeszky (DA) tem sido uma das mais significativas enfermidades infecciosas, que freqüentemente afetam a produção mundial de suínos (OSÓRIO, 2001).

O crescimento mundial e a modernização da indústria suinícola nas últimas duas décadas evidenciam a necessidade de uma maior e mais detalhada atenção no que diz respeito à saúde dos plantéis (SESTI, 2003).

A DA é uma doença infecto-contagiosa causada por um herpesvírus que causa graves prejuízos econômicos ao produtor e a agroindústria. A significância econômica da DA baseia-se, sobretudo, nas perdas por transtornos reprodutivos; mortalidade, geralmente de 100%, de leitões recém-nascidos; transtornos respiratórios em animais da terminação, levando, geralmente a infecções secundárias; estabelecimento de latência em suínos, o que dificulta seu controle. As granjas registradas perdem a certificação para a venda de reprodutores e de material genético (sêmen e embriões) e a DA impõe restrições às exportações. A DA está classificada junto ao Código Zoonosológico da Oficina Internacional de Epizootias (O.I.E., 2006; www.oie.int/eng/maladies/en_classification.htm), e sua notificação é compulsória.

No Brasil, o primeiro relato da DA data de 1912 (CARINI e MACIEL, 1912) em gado bovino e, em Santa Catarina (SC) desde 1983 (ROMERO et al., 1984). Até o

ano de 2000, existiam oficialmente em SC, cerca de 110 propriedades suinícolas diagnosticadas infectadas e/ou que usavam vacina para controlar a DA. A vacina para DA aprovada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) desde 1995 para uso no Brasil, é uma vacina inativada com uma deleção de todo o gene da glicoproteína E (gE) do vírus da DA (VDA), o que permite identificar e diferenciar animais infectados com vírus de campo daqueles vacinados com esta vacina, através de um teste ELISA diferencial para a glicoproteína gE, ausente na vacina. A ausência de programas formais de erradicação aumenta a incidência da doença, gastos com vacinações por tempo indefinido e mortes de outras espécies domésticas que vem a se infectar. O impacto econômico anual da DA sobre a atividade suinícola estadual foi estimado, no ano de 2001, em R\$ 931.224,00 (ZANELLA, 2002). No início de 2001, sob a coordenação da Embrapa Suínos e Aves em parceria com a Secretaria Estadual da Agricultura e do Desenvolvimento Rural de SC, Cidasc (Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de SC), Sindicarnes-SC (Sindicato das Indústrias de Carnes e Derivados), ACCS (Associação Catarinense de Criadores de Suínos) e Secretaria Estadual de Defesa Agropecuária do MAPA, teve início um programa com o objetivo de erradicar a DA do rebanho suinícola catarinense (MORÉS et al., 2005).

Os testes sorológicos de ELISA são necessários para monitorar, controlar ou detectar infecções suínas (TOMA et al., 1979). A efetivação do diagnóstico laboratorial dessas viroses através da importação de reagentes tem se mostrado economicamente inviável (DITTRICH, 2003). Para tanto, é necessário dispor de testes para a detecção de anticorpos contra o VDA que sejam específicos, de rápida execução e realizados em série (TOMA et al., 1979) visando auxiliar os programas de controle e erradicação da DA em suínos.

Uma ferramenta que vem sendo atualmente empregada para se obter bons testes de diagnóstico é a biologia molecular. Uma vantagem destas técnicas é poder trabalhar com apenas partes não essenciais de microorganismos patógenos. A propagação de moléculas de ácidos nucléicos em um organismo hospedeiro diferente através da habilidade de atravessar as barreiras naturais da espécie e de inserir genes de qualquer organismo em um organismo hospedeiro diferente (não aparentado) é uma característica importante da manipulação genética (WOLD e PRINROSE, 1991).

Os baculovírus são atualmente as viroses de inseto mais estudadas devido a sua utilização como agente de controle biológico e como vetor para expressão de genes heterólogos (RIBEIRO, 2004). Através das técnicas de clonagem, é possível inserir partes de interesse de um DNA em um organismo hospedeiro e ligá-lo a um vetor de expressão. Um desses exemplos é o baculovírus recombinante, que ao ser inoculado em cultivo celular, expressará, o produto de interesse inserido no vírus (LUCKOW et al., 1993).

Espera-se amplificar, clonar e expressar proteína recombinante do vírus da DA utilizando o sistema de baculovírus recombinante para que possa ser utilizado em programas de controle e erradicação da DA em suínos. Ao utilizar somente uma porção do VDA, uma glicoproteína não essencial ao vírus da DA, obtêm-se um antígeno direcionado à anticorpos anti-VDA com grande especificidade e sensibilidade, uma vez que este antígeno será específico ao anticorpo anti-viral correspondente.

Através desta ferramenta, áreas livres de determinados agentes patógenos poderão usar produtos/insumos oriundos da engenharia genética, que contenham apenas partes do agente infeccioso de interesse, sem por em risco a região ou país quanto a biossegurança, uma vez que não se manipulará o agente infeccioso.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O vírus da doença de Aujeszky (VDA) ou vírus da pseudo-raiva (PRV) ou herpesvírus suíno 1 (POMERANZ et al., 2005) é o agente patogênico da doença de Aujeszky (DA), responsável por consideráveis perdas econômicas na suinocultura mundial. Enquanto esforços para erradicar o VDA nos Estados Unidos e na Europa mostram grande progresso, ainda é um problema endêmico em muitos países (POMERANZ, 2005).

A DA é uma doença de grande significado econômico em suínos por causar inúmeros sinais clínicos, incluindo transtornos reprodutivos, respiratórios e do sistema nervoso central (KLUGE et al., 1992), causando alta mortalidade de leitões, com estabelecimento de infecção latente em suínos e recorrência viral, levando à restrição na movimentação de animais destinados a reprodução (ROMERO et al., 1989).

O genoma dos alfa herpesvírus codifica vários produtos, entre os quais algumas glicoproteínas do envelope que não são essenciais para replicação do vírus em cultivo celular e *in vivo* (SPEAR, 1993). A base das vacinas diferenciais consiste na inativação ou deleção de um gene que codifica uma glicoproteína não essencial, e o uso desse vírus mutante como vacina (KIT e KIT, 1991).

Segundo van Oirschot e Oei (1989), a diferenciação entre suínos infectados e vacinados para a DA é muito importante para o controle da doença em países que praticam a vacinação. Métodos para detectar anticorpos para glicoproteínas específicas da DA podem ser comparados através da especificidade e sensibilidade. Para examinar especificidade, são testadas amostras de soro sanguíneo de suínos vacinados com vacina gE-negativa contra a DA, e para examinar a sensibilidade, são testados soro de suínos vacinados e posteriormente desafiados, porque deste

modo, a replicação viral em suínos ficaria reduzida comparada com a replicação em suínos não vacinados (van OIRSCHOT e OEI, 1989).

A diferenciação entre vacinação e infecção pelo vírus selvagem tem sido realizada através de métodos sorológicos (ELIOT et al., 1989), e a engenharia genética permitiu que um ou mais genes de glicoproteínas não essenciais fossem construídos e aplicados na produção de vacinas (PENSAERT et al., 1992). Um método simples, para uma rápida construção de um vírus DA gE deletado (gene-deletado), desenvolvido por Chang et al. (1996), pode ser usado para o preparo de vacinas.

A técnica de ELISA tem sido muito utilizada para a pesquisa de anticorpos para a DA. Entretanto, o uso maciço de vacinas para a DA em rebanhos suinícolas tem demandado a necessidade de ELISAs diferenciais. Atualmente, tem-se um número muito grande de referências documentadas sobre a técnica de ELISA “screening” e o diferencial para glicoproteínas gE. O desenvolvimento de testes ELISA diferencial com bons níveis de sensibilidade e especificidade tem sido relatados (DEA et al., 2000; ELIOT et al., 1989; GUT et al., 1999; KINKER et al., 1997; STEGEMAN et al., 1997).

Segundo Gut et al. (1999) o sucesso de um programa de controle e erradicação utilizando vacinas gene-deletadas para a glicoproteína gE do VDA com testes sorológicos diferenciais depende da habilidade do teste diferencial em detectar, com precisão, suínos infectados.

Antígenos recombinantes têm sido largamente utilizados no desenvolvimento de testes de ELISA. A engenharia genética permite manipular apenas partes antigênicas específicas, garantindo maior sensibilidade antígeno-anticorpo e inocuidade quanto a infectividade viral (WOLD e PRINROSE, 1991).

A técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) é o resultado da amplificação de uma região selecionada da molécula de interesse do DNA. Qualquer região da molécula pode ser selecionada, contanto que as seqüências das bordas da região sejam conhecidas (ALBERTS, et al., 1999; PASSAGLIA e ZAHA, 1996). Uma simples cópia de um gene-específico dentro de um genoma pode ser amplificada para alguns microgramas, partindo-se de quantidades mínimas do DNA total.

Uma técnica usada para visualizar e quantificar proteínas e DNAs é a eletroforese em gel. Moléculas de DNA têm carga negativa, e sob uma corrente

elétrica as moléculas de DNA migram através do gel a uma razão que dependerá do tamanho do DNA. Uma molécula pequena de DNA poderá atravessar/passar através do gel facilmente e, portanto migrar mais facilmente que as moléculas maiores (WOLD e PRINROSE, 1991). Aaij e Borst (1972) mostraram que as taxas de migração de moléculas de DNA são inversamente proporcionais ao logaritmo do peso molecular.

Ainda, segundo Wold e Prinrose (1991), a gel eletroforese não é somente usada como um método analítico, ela é rotineiramente usada para purificar fragmentos específicos de DNA. O gel é composto por acrilamida ou agarose. O uso da agarose é conveniente para separar fragmentos de DNA que podem variar de tamanho desde poucas centenas a 20 kb, enquanto que para fragmentos pequenos de DNA, seja preferível utilizar a acrilamida.

Zuckermann et al. (1988) e Whealy et al. (1993) relataram que a glicoproteína E (gE) do VDA forma uma ligação complexa não-covalente com a glicoproteína I (gI), e que este complexo é uma entidade funcional e é importante para a correta apresentação dos descontínuos epítomos imunodominantes na gE. O complexo antigênico gE/gI é mais bem reconhecido pelo AC monoclonal (MAb) que o antígeno gE sozinho (JACOBS et al, 1995 apud GUT et al, 1999).

Enzimas de restrição ou endonucleases de restrição reconhecem uma seqüência de bases específicas na dupla-hélice do DNA e cortam as duas fitas da hélice em lugares determinados. São enzimas indispensáveis na análise da estrutura dos cromossomos, no sequenciamento de moléculas longas de DNA, no isolamento de genes e na criação de moléculas novas de DNA que podem ser clonadas (PASSAGLIA e ZAHA, 1996).

Segundo Passaglia e Zaha (1996), a técnica principal na tecnologia do DNA recombinante é o isolamento e a propagação de moléculas idênticas de DNA em um organismo hospedeiro. Esta técnica, clonagem molecular, se baseia em dois estágios. Primeiro uma molécula de DNA recombinante é gerada pela ligação de um inserto de DNA, oriundo da clivagem (digestão) do DNA de interesse e de uma molécula de DNA, denominada de vetor de clonagem. O segundo passo, se dá quando a molécula recombinante (inserto e vetor ligados) será introduzida para dentro de uma célula hospedeira, onde poderá se replicar. O processo de introdução de DNA em células é chamado de transformação.

Plasmídeos são moléculas de DNA circular, de fita dupla, extracromossômicos, que existem naturalmente em bactérias e em alguns organismos eucariotos unicelulares, como as leveduras. Possuem capacidade de replicação autônoma e freqüentemente, transportam genes que conferem resistência a antibióticos (PASSAGLIA e ZAHA, 1996), o que permite distinguir células hospedeiras que receberam o inserto com o vetor plasmideal daquelas que não receberam.

Os gêneros Nucleopolyedrovirus (NPV) e o Granulovirus pertencem à família Baculoviridae, e esta família é muito estudada em entomologia, devido ao seu grande potencial como bioinseticida. Os Nucleopolyedrovirus (NPV) induzem a formação de poliedrose nuclear (poliedros). O baculovírus produtor de poliedros, é utilizado para co-transfecção de transformantes com inserto de interesse em células de inseto (RIBEIRO et al., 1998).

Quando se tem a confirmação da presença do inserto de interesse na célula hospedeira, o produto pode ser cultivado em células de inseto, através do processo denominado de co-transfecção. A co-transfecção ocorre quando dois ou mais produtos são inoculados conjuntamente para gerar um só produto final (PASSAGLIA e ZAHA, 1996; O'REILLY et al., 1992).

Segundo O'Reilly et al. (1992), após a co-transfecção, o produto é purificado por purificação em placa em cultivo celular, e a glicoproteína expressada (baculovírus em células de inserto) poderá ser identificada sob vários métodos, incluindo triagem visual, por DNA hibridização, amplificação por PCR, imunodeteção e teste da atividade enzimática (enzimas de restrição) do produto gene expressado. Após confirmar a identidade e pureza do produto obtido, este poderá ser utilizado como insumo para produzir outros produtos (O'REILLY et al., 1992) (anticorpos monoclonais, antígenos de interesse).

Esses produtos finais poderão ser, entre outros, kits para o diagnóstico da DA. A produção de um ensaio imunoenzimático do tipo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), que não usará o vírus da DA inteiro, e sim, somente a glicoproteína do VDA expressada em baculovírus. O teste de ELISA usará os monoclonais gE específicos que conferirá uma melhor sensibilidade do teste (GUT et al., 1999). Uma das vantagens do teste ELISA gE, é a não manipulação do vírus inteiro da VDA, o que permitirá maior biossegurança nas regiões livres e em fase de erradicação da DA.

1.2 HERPESVÍRUS

Os herpesvírus têm um genoma de fita dupla de DNA, o tamanho do vírion e a estrutura (capsídeo, tegumento e envelope) semelhantes e sofrem uma fase latente em seu ciclo de vida (ROIZMAN e SEARS, 1991).

Os herpesvírus são membros da família *Herpesviridae* e estão amplamente disseminados na natureza (FENNER et al., 1993). A família herpesviridae tem uma extraordinária diversidade biológica e com base em suas propriedades biológicas e na organização e conteúdo genômico a maioria dos herpesvírus pode ser subdividido em três principais subfamílias Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae e Gammaherpesvirinae (MINSON et al., 2000; ROIZMAN, 1991) e de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv>). Essas subfamílias diferem no tipo celular onde a latência é estabelecida e da duração do seu ciclo produtivo de replicação.

Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* têm uma maior extensão de hospedeiros, tendem a se reproduzir rapidamente com efeitos citopáticos e produzir partículas virais em poucas de horas e podem estabelecer latência no gânglio nervosos próximos à região infectada (ROIZMAN, 1991) e em neurônios (KLUGE, 1992; METTENLEITER, 2000). Os membros da subfamília *Betaherpesvirinae* estão restritos a um espectro menor de hospedeiros em relação aos da subfamília *Alfaherpesvirinae*. Possuem um ciclo longo de replicação que é acompanhada freqüentemente pelo aumento das células (citomegalia) (ROIZMAN, 1991). O vírus pode se manter sob forma latente em vários tecidos e células, inclusive glândulas secretórias, rins, células linfocitárias e outros tecidos. Os membros da subfamília *Gamaherpesvirinae* estão limitados à família ou ordem a que seus hospedeiros naturais pertencem. *In vitro*, infectam células linfoblastóides e causa, em alguns casos, infecção lítica em alguns tipos de células epitelióides e fibroblásticas. Os vírus desse grupo são específicos para células T ou linfócitos B, enquanto estabelecem latência em tecido linfóide ou podem promover a lise das células infectadas sem produção de progênie viral infecciosa. A latência viral é freqüentemente demonstrada em tecido linfóide (ROIZMAN, 1991).

Apesar da homologia significativa do VDA para os alfaherpesvírus humano e do grande número de hospedeiros, o VDA não é transmitido a humanos. Os raros

relatos de VDA humano não foram substanciais e refletem, provavelmente, uma baixa reação cruzada de anticorpos anti-gB do HSV-1 com anticorpos anti-gB do VDA (ROBBINS, et al., 1987).

1.3 HERPESVÍRUS SUÍNO TIPO 1 (VDA)

O vírus da doença de Aujeszky (VDA), também denominado de vírus da pseudo-raiva (PRV), ou herpesvírus suíno tipo 1 pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicelovirus*. Os Alfaherpesvírus se distinguem por seu rápido ciclo lítico em cultivos celulares, neurotropismo e pela capacidade de desenvolver latência em neurônios (KLUGE et al., 1992; METTENLEITER, 2000) cuja infecção clínica causa grandes prejuízos ao rebanho suinícola.

Dentro da subfamília alfaherpesvírus, quatro gêneros foram determinados com base na semelhança da seqüência do genoma (MINSON et al, 2000): o gênero *Varicellovirus* (tipo espécie *Varicella-zoster vírus* - VZV), o gênero *Simplexvirus* (tipo espécie *herpes simplex vírus tipo 1* - HSV-1), o gênero “*Virose infecciosa tipo laringotracheite*” (tipo espécie *vírus da laringotraqueíte infecciosa* - ILTV) e o gênero “*Virose tipo a doença de Marek*” (tipo espécie *vírus de doença de Marek* - MDV). Embasado em informações de seqüências disponíveis, o VDA é agrupado no gênero *Varicellovirus* junto com outros importantes patógenos de animais, como o herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) ou os herpesvírus eqüino tipo 1 e 4 (EHV-1 e EHV-4) (BEN-PORAT e KAPLAN, 1985).

Alfaherpesvírus são vírus DNA de cadeia dupla, com envelope, e que possuem várias propriedades biológicas em comum. Infectam várias espécies animais, replicam rápido e liticamente em células de cultivo e estabelecem infecções latentes em gânglios do sistema nervoso periférico (ROIZMAN, 1991). Uma vez que o VDA pode causar infecção latente em suínos adultos, o desenvolvimento de sorologias marcadas que possam ser usadas para diferenciar animais vacinados dos infectados com o vírus selvagem, é uma consideração importante no modelo de vacina para a DA (KIT e KIT, 1991; van OIRSCHOT et al., 1990).

1.3.1 Genoma

O genoma de VDA é constituído por uma molécula de DNA dupla-fita, com 143.461 nucleotídeos (143,461Kpb), 72 ORF (“Open Reading Frame”) homólogas com alfaherpesvírus relacionados (KLUPP et al., 2004).

As 72 ORFs (fase aberta de leitura) codificam 70 diferentes proteínas, pois os genes que codificam as proteínas IE180 e US1 são encontrados duas vezes. Uma vez na seqüência repetida interna (IRS) e uma vez na seqüência repetida terminal (TRS). Todo o genoma do VDA foi seqüenciado usando fragmentos de seqüências provenientes de seis diferentes cepas. As cepas foram sempre seqüenciadas e identificadas, tendo como base principal, a sua homologia com os genes encontrados em outros alfaherpesvírus (KLUPP et al., 2004).

O DNA viral possui uma alta taxa de nucleotídeos guanina (G) e de citosina (C) em torno de 73%. A estrutura genômica consiste de uma seqüência única curta (U_S), flanqueada por repetições complementares invertidas e uma seqüência única longa (U_L). As duas repetições invertidas são denominadas de repetição terminal (RT) e interna (RI) (FENNER, 1993; METTENLEITER, 2000).

O genoma do VDA é semelhante em arranjo genômico ao EHV-1, BHV-1 e VZV, formado por um único segmento longo (UL) e uma região única curta (US). A região US é flanqueada por duas seqüências repetidas invertidas, resultando na formação de dois possíveis isômeros do genoma VDA com orientação oposta a região US (KLUPP et al., 2004), conforme exemplificado na figura 1.

A seqüência e a disposição de gene inteiro do genoma do VDA são conhecidos e um mapa da provável organização da transcrição, bem apoiado por dados experimentais, está estabelecido (KLUPP et al., 2004).

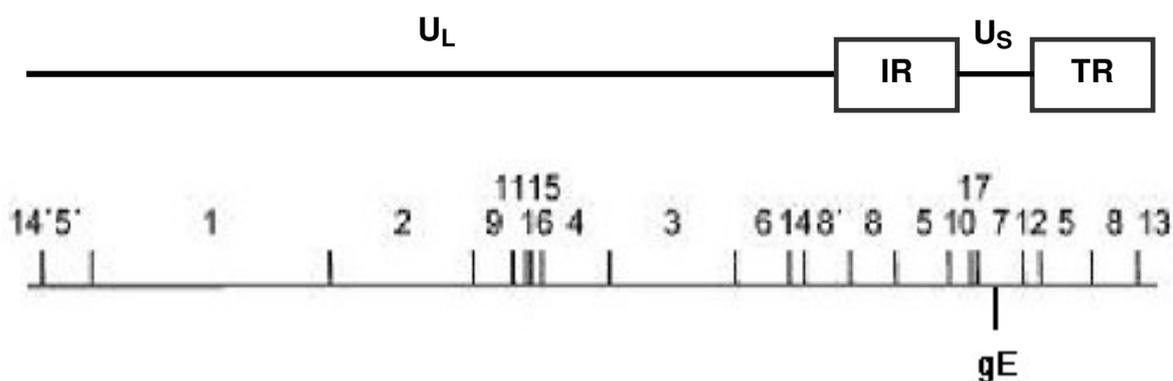


Figura 1 - Mapa da organização do genoma VDA. O esquema superior mostra a região única longa (U_L) e a região única curta (U_S), as regiões repetidas invertidas interna (IR) e terminal (TR) e o desenho inferior esquematiza as posições dos fragmentos de restrição para a enzima BamH I. A gE está localizada no fragmento 7 BamH I.

Fonte: Adaptado de Klupp et al. J Virol. V. 79, n. 3. 2005.

A figura 2 mostra esquema linear do DNA e a região da gE localizada na região U_S , no fragmento 7. Aproximadamente metade dos genes dos alfa herpesvírus são considerados como não essenciais, isso é, são dispensáveis para a replicação viral, pelo menos em cultura de células (METTENLEITER, 2000).

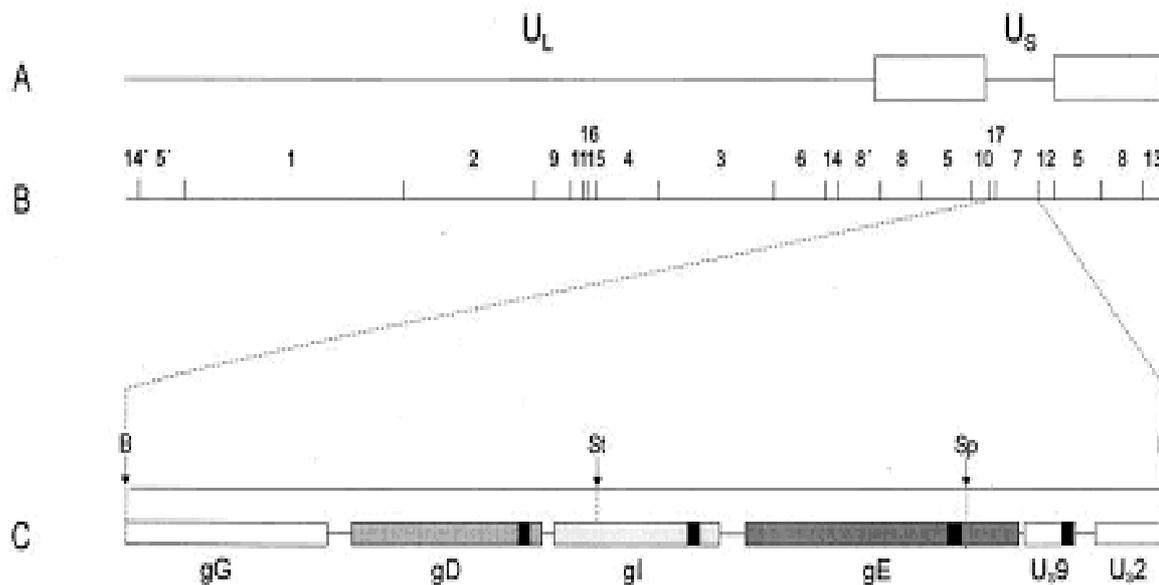


Figura 2 - Arranjo genômico na região U_S da gE.VDA. (A) Diagrama esquemático do genoma VDA. (B) Mapa dos fragmentos com enzima de restrição BamH I. U_L , região única longa; U_S , região única curta. Caixas abertas: seqüência invertida repetida que delimitam a região U_S . (C) Ampliação do fragmentos 7 BamH I localizado na região U_S , com sítios de clivagem importantes (B = BamH I; St = Stul; Sp = SphI).

Fonte: Brack, A. R. J Virol. V. 74, n. 9. 2000.

1.3.2 Capsídeo

O VDA possui um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 100 nm de diâmetro, composto de 162 capsômeros. O genoma do vírus no capsômero é de aproximadamente 75 nm de diâmetro e o capsídeo é circundado por um envelope “solto” com um diâmetro de aproximadamente 150-200 nm (LARSKI, 1980). Na figura 3 tem-se uma microfotografia de um nucleocapsídeo típico dos herpesvírus.

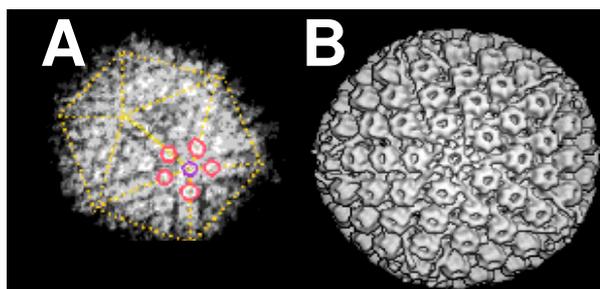


Figura 3 - Nucleocapsídeo típico de herpesvírus. A) microfotografia indicando a disposição dos peplômeros; B) detalhe digitalizado de um penta-peplômero axial, cercado por hexa-peplômeros.

Fonte: Linda Stannard, Department of Medical Microbiology, University of Cape Town.

1.3.3 Tegumento

A camada de tegumento (Figura 4) é uma estrutura eletrondensa amorfa que preenche o espaço entre o capsídeo e a membrana do envelope de partículas maduras de herpesvírus (ROIZMAN, 1991). Proteínas do tegumento têm papel importante durante a entrada e a morfogênese do vírion (METTENLEITER, 2002).

1.3.4 Envelope

Os vírus envelopados possuem uma capa protéica envolvida por uma camada dupla lipídica (Figura 4). O envelope contém proteínas que permitem que o vírus se ligue nas células e que auxilia a sua entrada na célula. A membrana lipídica é adquirida quando o vírus é liberado da célula por um processo de brotamento da membrana plasmática, levando um pouco desta membrana junto (ALBERTS et al., 1999). No curso da passagem através da membrana nuclear da célula hospedeira o

vírus recebe seu envelope primário. O envelope determina a virulência do vírus e o protege contra a ação de anticorpos específicos devido à relação antigênica em questão (LARSKI, 1980).

O envelope contém proteínas codificadas pelo vírus, mas são modificadas por adição de cadeias laterais de carboidrato e, então, denominadas de glicoproteínas (METTENLEITER, 2000). O envelope contém protusões ou espículas formadas por glicoproteínas, que nos herpesvírus são mais curtas e em maior número do que aquelas que aparecem nas superfícies de outros vírus envelopados (ROIZMAN, 1991). O envelope final inclui a aquisição de mais de 15 proteínas de tegumento e mais de 10 de envelope (glicoproteínas) que ocorre através do brotamento dentro de vesículas derivadas do trans Golgi (METTENLEITER, 2006).

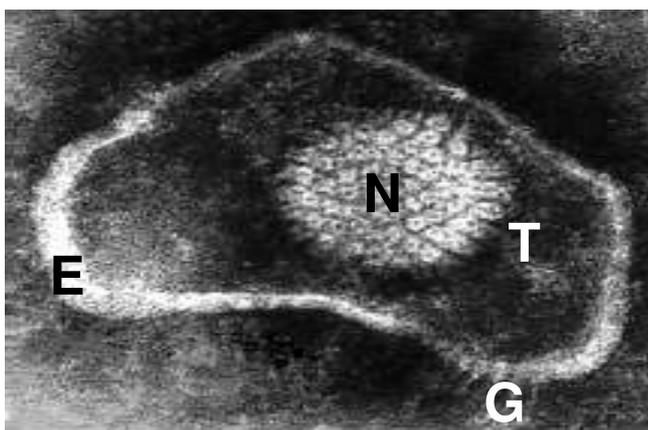


Figura 4 - Partícula de herpesvírus. N) nucleocapsídeo; T) tegumento; E) envelope; G) glicoproteínas.

Fonte: Linda Stannard, Department of Medical Microbiology, University of Cape Town.

1.3.5 Glicoproteínas

As glicoproteínas dos herpesvírus são encontradas em grande quantidade em todas as membranas de células infectadas assim como no envelope viral. Essas proteínas de membrana desempenham funções vitais no processo de infecção viral, mediando os processos de reconhecimento e adsorção das células do hospedeiro, penetração do vírion, fusão e disseminação do vírus célula a célula em cultivos celulares (POMERANZ, 2005). As proteínas também modulam a resposta imune e promovem a formação de sincício. Devido à sua localização na superfície do envelope viral e nas membranas das células infectadas, as glicoproteínas são o

principal alvo do sistema imune do hospedeiro em resposta à infecção (TODD et al., 1987).

O genoma do VDA codifica 16 proteínas de membrana. Onze proteínas de membrana são modificadas por glicosilação *N*- ou *O*-ligado por adição de cadeias laterais de açúcares e são denominadas como gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM e gN (METTENLEITER, 2000). Quatro adicionais proteínas trans-membrana que não são glicosiladas (UL20, UL43, US9 e provavelmente UL24) são encontradas no envelope viral (FUCHS et al., 2002; KLUPP et al., 2000). Durante a entrada, as glicoproteínas gC, gB, gD, gH e gL são responsáveis pela fixação à superfície da célula hospedeira e a subsequente fusão do envelope viral com a membrana plasmática (FAVOREEL et al., 1997; HAMPL, et al, 1984).

A nomenclatura padrão das glicoproteínas de envelope do VDA e do HSV foi adaptada no ano de 1993, durante o “18th International Herpesvirus Workshop”. Trabalhos publicados antes do ano de 1995, nominavam as glicoproteínas gB, gC, gD, gE, gG e gI do VDA como gII, gIII, gp50, gI, gX e gp63, respectivamente.

1.3.6 Ciclo de replicação do VDA

O ciclo de replicação viral do VDA inicia com a ligação entre a gC do envelope viral e receptores sulfato de heparina proteoglicans (HSPG) na superfície celular. Os próximos passos de entrada requerem as glicoproteínas de envelope gD, gB, gH, e gL. Depois da fusão do envelope do vírion com a membrana celular, as proteínas do capsídeo e de tegumento são liberadas dentro da célula. As proteínas virais de tegumento começam a tomar a síntese protéica da maquinaria celular hospedeira imediatamente após entrarem na célula (METTENLEITER, 2000; POMERANZ, 2005). O capsídeo e proteínas internas firmemente ligadas ao tegumento são transportados ao longo de microtubos para o núcleo da célula (SODEIK et al., 1997). A transcrição dos genes virais e a conseqüente parada na síntese celular, é regulada temporalmente, havendo três classes de RNA mensageiro (mRNA) denominados: “immediate early”, “early” e “late”, que são transcritos pela RNA polimerase II (RNAPol II) celular (FENNER et al., 1993). Na figura 5 podemos observar a esquematização do ciclo de replicação do VDA.

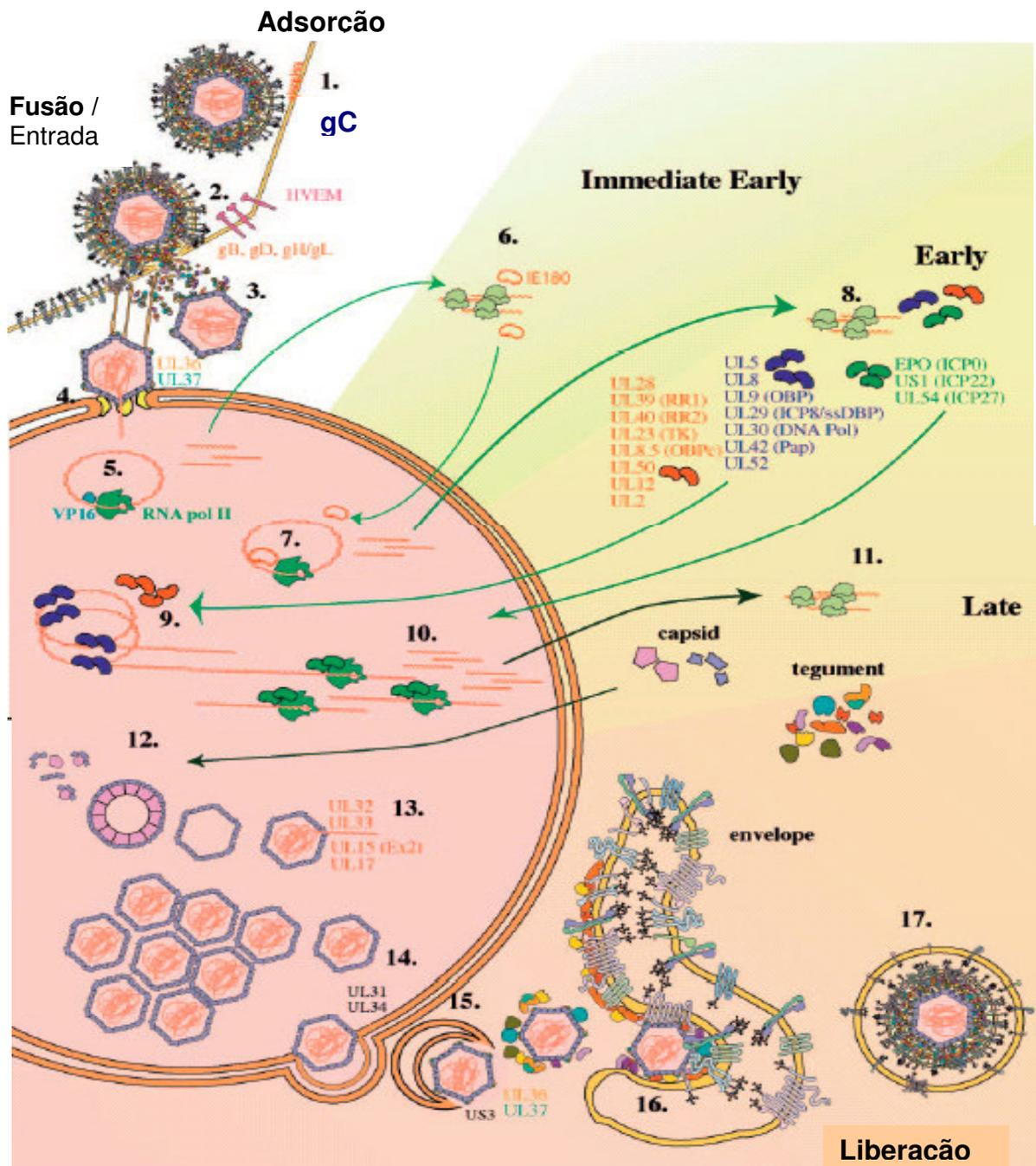


Figura 5 - Representação esquemática do ciclo de replicação do VDA.

Fonte: Adaptado de Pomeranz et al. MMBR. v. 69, n. 3. 2005

A proteína de tegumento VP16 localizada no núcleo, independentemente do capsídeo, transativa a RNA polimerase II celular transcrevendo a única proteína imediatamente-cedo do VDA, a IE180 homóloga a ICP4 do HSV. A proteína IE180 expressada no citoplasma é transportada de volta para o núcleo. No núcleo a proteína IE180 transativa a RNA polimerase II para a transcrição dos genes "early"

(cedo). As proteínas “early” estão envolvidas na síntese do DNA viral (METTENLEITER, 2000; POMERANZ, 2005) que ocorre por um mecanismo círculo rolante. O início da síntese de DNA sinaliza o começo da fase “late” (recente) do ciclo replicação do VDA e a síntese de proteínas “late”, responsáveis pela formação do capsídeo, inserção do DNA genômico no capsídeo, na divisão e empacotamento do DNA viral e envelopamento (METTENLEITER, 2000; POMERANZ, 2005).

1.3.7 Latência

Membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* podem estabelecer infecções latentes em gânglios nervosos, onde o DNA viral pode persistir em forma episomal nos núcleos das células infectadas. Portanto, animais com infecção latente servem de reservatório natural para o vírus durante toda a vida do animal e são um fator constante de risco de ocorrer uma reativação e liberação viral e a conseqüente disseminação do vírus para uma população susceptível. A latência é definida como um *status* no qual o DNA viral persiste, mas a infecção viral não é produzida (METTENLEITER, 2000).

Segundo Mettenleiter (2000) e Pomeranz (2005), durante a infecção aguda, partículas virais do VDA replicam primeiro nos tecidos epiteliais da mucosa orofaríngea e então entram diretamente nos terminais nervosos do nervo sensorial da região infectada. Após a primeira replicação no epitélio, a progênie viral é produzida abundantemente levando a um incremento da infecção primária dos neurônios. Os principais sítios de latência do VDA são o gânglio trigeminal, o bulbo olfatório e tonsila. Nesses órgãos, o DNA viral pode ser detectado mesmo na ausência de uma infecção viral produtiva, e transcritos LAT (“latency associated transcripts”) podem ser demonstrados por PCR (METTENLEITER, 2000). Durante a latência, a expressão do gene viral fica restrita a transcrição de uma parte distinta do genoma viral, denominada LAT.

O vírus pode ser reativado e liberado de animais com infecção latente após serem submetidos a fatores estressantes. Esses fatores incluem transporte de animais, outras enfermidades concomitantes, partos, condições precárias de criação, tratamento com agentes imunossupressivos (corticosteróides), sendo um dos fatores responsáveis pela perpetuação e transmissão do vírus no rebanho (KLUGE, 1992;

ROIZMAN, 1991). Ao final do processo de reativação, o vírion é transportado através dos axônios ao local onde ocorreu a infecção original.

1.4 DETECÇÃO DO AGENTE INFECCIOSO OU DE ANTICORPOS ANTI VDA

A identificação de antígenos virais para a DA pode ser realizado de secreções ou tecidos de animais infectados por imunofluorescência direta, imuno-histoquímica, isolamento do vírus em cultivos celulares ou através de métodos moleculares de diagnóstico. O isolamento viral é a técnica padrão para a detecção do VDA (ROMERO et al., 1986). Para sua execução, suspensões de tecidos ou secreções são colocadas sobre cultivos de células, as quais podem ser cultivos primários ou linhagens celulares contínuas. Após um período variável de incubação, a presença de vírus é detectada pelo efeito citopático (ECP) causado nas células do cultivo (ROMERO et al., 1986).

A PCR tem como objetivo a amplificação de uma região alvo no DNA viral. Apresenta como vantagem a possibilidade de alcançar altos índices de sensibilidade e especificidade, além da rapidez de execução (ALBERTS, et al., 1999; PASSAGLIA e ZAHA, 1996; WOLD e PRINROSE, 1991). Podem ser utilizados tanto tecidos como secreções para a extração do DNA viral.

A análise genômica com enzimas de restrição é um tipo de análise voltada para a caracterização genômica de amostras virais já isoladas. Após a multiplicação viral em cultivo celular, o DNA da amostra viral é extraído e posteriormente clivado com enzimas de restrição. A análise dos fragmentos do DNA digerido é feita por eletroforese em gel de agarose e revelado com brometo de etídeo (GIELKENS e BERNS, 1982).

Endonucleases de restrição geram fragmentos de DNA a posições distintas no genoma onde determinadas sucessões de reconhecimento de nucleotídeos acontecem (BEN-PORAT et al., 1984). O número e tamanho do fragmento gerado de populações diferentes de moléculas fornecem informação sobre a constituição genética delas. Assim, se a divisão do DNA de duas cepas diferentes de vírus por uma determinada enzima gerar fragmentos que diferem no seu número e tamanhos, heterogeneidade genética entre as duas cepas existe. Estas diferenças são úteis em estudos epidemiológicos.

Análises do genoma de vários isolados de VDA recuperados de diferentes casos epidemiológicos demonstraram que seus padrões de fragmentos de restrição são diferentes. As diferenças no padrão de migração dos fragmentos de restrição entre os diferentes isolados podem ser devidas a uma perda dos sítios de clivagem (gerando fusão de fragmentos), deleção ou inserção de seqüências de nucleotídeos (gerando assim fragmentos maiores ou menores) ou translocação de seqüências de uma região do genoma para outra (mudando, assim, também o tamanho do fragmento) (BEN-PORAT et al., 1984).

A localização genômica dos principais fragmentos de DNA gerados pelas enzimas de restrição BamH I e Kpn I foram descritas por Ben-Porat et al. (1979) e Rixon e Ben-Porat (1979) apud Gielkens e Berns (1982), os quais publicaram o mapa físico dos sítios de clivagem usando uma cepa VDA originalmente caracterizada por Kaplan (1969).

Herrmann et al. (1984), analisaram 150 isolados, obtidos de diferentes partes do mundo. As cepas dos vírus VDA usadas neste estudo podem ser claramente agrupadas em 4 tipos principais de genoma, usando como enzima discriminatória a BamH I. O DNA padrão de quatro cepas vacinais foram ligeiramente diferentes das cepas selvagens e baseado no mapa genômico do VDA, duas dessas cepas, as cepas *Bartha* e *Dessau*, indicam ter uma deleção na região única curta do genoma.

Os resultados obtidos por Herrmann et al. (1984) mostraram quatro tipos principais de genomas (grupos I a IV) e que os tipos de genoma são correlatos com certas áreas geográficas. Os vírus do grupo I são similares ou idênticos com o DNA padrão BamH I publicado (RIXON e BEN-PORAT, 1979). As cepas do grupo II não possuem o fragmento número 2 do grupo I, mas possuem dois novos fragmentos acima e abaixo do fragmento 4. Esses dois grupos representam vírus encontrados na Europa Central (Alemanha e Bélgica). A freqüência do genoma tipo II junto com seus variantes foi de aproximadamente 75% em todos os isolados. O Grupo III (genoma tipo III) e IV (genoma tipo IV) são estritamente limitados aos isolados originários do Norte Europeu (Dinamarca e Suécia) e Tailândia, respectivamente. O grupo III difere ligeiramente do grupo I, quando analisado com Bam HI, mas foi bem distinto no padrão de digestão com BstE II. O Grupo genômico IV, porém, diferiu amplamente na distribuição dos sítios de clivagem com ambas as enzimas (HERMANN et al., 1984).

Muitos outros estudos com endonucleases têm sido conduzidos ou para análise do DNA após várias passagens em cultura celular ou animais (MENGELING et al., 1983; WATHEN e PIRTLE, 1984) ou para comparar DNAs de diferentes regiões ou países (CHRISTENSEN et al., 1987; PIATTI et al., 2001; SCHAEFER et al., 2005; TODD e McFERRAN, 1985).

No Brasil, um trabalho que analisou o perfil de restrição com BamH I de 30 amostras isoladas do VDA, dentre os anos de 1982 a 1996, de diferentes regiões do país, encontrou somente duas amostras com perfil genômico do grupo I (PIATTI et al., 2001). Recentemente, Schaefer e colaboradores (2005) analisaram através da digestão com BamH I, 38 amostras de DNA genômico de isolados VDA dos últimos 20 anos (1983 a 2003) provenientes da região Sul do Brasil. Trinta e seis amostras de DNA apresentaram perfil grupo II e somente duas do grupo I.

O padrão de migração dos primeiros três fragmentos pode ser usado para tipificar o genoma das cepas de VDA (Figura 6). O tipo genômico II tem um sítio de clivagem extra no fragmento 2 qual leva ao aparecimento de dois novos fragmentos 2a e 2b, situado abaixo do fragmento 3 (não mostrado). O genoma tipo III não tem um sítio de restrição entre os fragmentos 2 e 9, com o aparecimento de um fragmento (2 + 9) exatamente abaixo do fragmento 1.

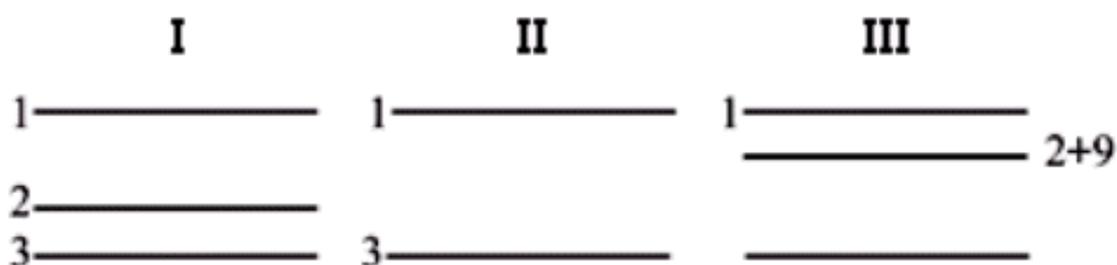


Figura 6 - Representação esquemática de tipos genômicos do VDA (I, II e III) com base na migração dos três primeiros fragmentos obtidos com BamH I.

Fonte: Piatti et al., 2001.

Inúmeros testes sorológicos laboratoriais podem ser conduzidos para detectar anticorpos anti-VDA. Este tipo de diagnóstico pode ser realizado através de técnicas como a imunoperoxidase, imunofluorescência, soroneutralização (SN) e ensaios imunoenzimáticos. A SN é considerada a técnica padrão para detecção de anticorpos neutralizantes contra VDA (ROMERO et al., 1996). Entretanto, é uma técnica trabalhosa dependente da existência de um estoque de vírus e de cultivos

celulares adequados. O resultado da prova é usualmente obtido em três a cinco dias e a SN não permite uma diferenciação precisa entre animais infectados com vírus de campo de animais vacinados contra o VDA.

O testes imunoenzimáticos do tipo ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) são muito utilizados presentemente, devido à sua alta sensibilidade, especificidade, capacidade de processamento de grande número de amostras, relativa facilidade e rapidez de execução. Os reagentes não possuem custo elevado, são estáveis, fáceis de preparar e, geralmente, os resultados de provas tipo ELISA, podem ser quantificados através do uso do espectrofotômetro (van OIRSCHOT, 1989).

Com o surgimento da cepa VDA Bartha, com uma deleção natural do gene gE, van Oirschot e Oei (1989) desenvolveram um teste sorológico que permitia distinguir animais vacinados (sem anticorpos anti-gE mas com anticorpos contra outras glicoproteínas do VDA) dos animais com anticorpos anti-gE (infectados com vírus selvagem). A partir de então, o conceito de “vacinas marcadas” surgiu e o sucesso de seu uso nos programas de erradicação contribuiu para reforçar este conceito (METTENLEITER, 2000).

Com o advento da engenharia genética, testes de diagnóstico podem ser melhorados sob o aspecto de sensibilidade e especificidade e quanto a não difusão de organismos patogênicos. Atualmente, vários trabalhos com organismos recombinantes expressando proteínas virais têm sido publicados (ESHAGHI et al., 2004; GUT et al, 1999; JARVIS et al., 2001; KIMMAN et al., 1996; MORENKOV et al., 2004).

1.5 CLONAGEM E EXPRESSÃO

1.5.1 Baculovírus

Os baculovírus representam um grupo de viroses patogênicas para invertebrados, principalmente insetos. Há relatos de infecções por baculovírus em mais de 600 espécies de inseto, entretanto nenhum relato em plantas, mamíferos ou outros vertebrados (WEIGHTMAN, 1999).

Os baculovírus pertencem a família *Baculoviridae* e são reconhecidos dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* e *Granulovirus* (van REGENMORTEL et al, 2000) que são diferenciados, quanto a sua estrutura, pelo tamanho de seus corpos de oclusão. Os Nucleopoliedrovírus (NPVs) produzem uma grande estrutura chamada de poliedro, que contém muitos vírions, enquanto que os Granulovírus (GVs) têm pequenos corpos de oclusão chamados de grânulos, que geralmente contém um único vírion (FUNK et al., 1997).

O tamanho do genoma para diferentes membros desta família de vírus pode variar de 80 a 180 kbp, composto por um DNA circular de fita dupla (van REGENMORTEL et al., 2000). Segundo Ribeiro et al. (1998), o que caracteriza a família *Baculoviridae* é o nucleocapsídeo helicoidal envolto por uma membrana. Esta família é muito importante em entomologia aplicada, pelo uso como bioinseticidas virais, vetores de expressão de proteínas heterólogas e de terapia gênica. O capsídeo em forma de bastonete, os nucleocapsídeos dos baculovírus podem acomodar, teoricamente, pode acomodar até 100.000 pares de base (pb) de DNA adicionais, de inserções montadas de material genético de outros organismos (POSSEE e ROHRMANN, 1997).

O gênero *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs) induz a formação de poliedrose nuclear (corpos de inclusão em forma poliédrica), que contém numerosas partículas virais no interior do poliedro (Figura 7).

A proteína principal que compõe o poliedro é denominada poliedrina (CASTRO et al., 1999; MARUNIAK, 1986), que corresponde à cerca de 95% do conteúdo protéico nos OB (“occlusion body” ou corpo de oclusão) do baculovírus. Os vírus deste gênero podem conter apenas um nucleocapsídeo por vírion (Vírus de Poliedrose Nuclear Simples – SNPV) ou vários nucleocapsídeos por vírion (Vírus de Poliedrose Nuclear Múltipla – MNPV). A espécie tipo do gênero *Nucleopolyhedrovirus* é a *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) com 133.894 pb (RIBEIRO et al., 1998; van REGENMORTEL et al., 2000).



Figura 7 - Fotografia de cultura de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas como vírus AcMNPV. A seta identifica núcleos celulares cheios de poliedros.

1.5.1.1 Infecção e replicação viral

Durante a replicação viral dos baculovírus, os vírions podem assumir duas formas bioquímica e morfologicamente distintas. Em uma delas o vírion brota da membrana citoplasmática da célula hospedeira para o meio extracelular de forma polarizada, sendo envelopado individualmente e é denominado “budded virus” (BV) ou de “extracelular vírus” (ECV). A outra forma é denominada “polyhedra-derived virus” (PDV) ou de “occluded virus” (OV) e o vírion adquire a membrana sintetizada de novo no núcleo da célula infectada, podendo ser encontrado mais de um nucleocapsídeo por vírion, oclusos em cristais protéicos denominados corpos de oclusão (GRANADOS e WILLIAMS, 1986).

1.5.1.2 Expressão gênica em baculovírus

A síntese de duas formas virais (BV - “budded virus” e OV - “occluded virus”) durante a infecção celular é temporalmente regulada. Essa e tantas outras transições durante o curso da infecção são provavelmente reguladas pela expressão de genes virais, onde os genes expressos em uma classe temporal regulam a

expressão gênica seguinte. Uma vez iniciado o processo de infecção, a expressão gênica ocorre ordenadamente em cascata (O'REILLY et al., 1992). Analogicamente à síntese de proteínas virais, os RNA mensageiros virais também são sintetizados de uma maneira temporal em células infectadas (FRIESEN, 1997).

A expressão de genes virais pode ser dividida em duas fases gerais: a primeira ("early"), que ocorre até 7 horas pós-infecção (hpi), antes da replicação do DNA viral, e a segunda ("late"), que ocorre a partir do começo ou após a replicação. Durante a fase inicial da infecção, dois grupos de genes podem ser diferenciados: os "immediate early" (IE) e os "delayed early" (DE). Os genes "late" também podem ser subdivididos em genes "late" (L) e "very late" (VL), que são expressos a partir ou após o começo da replicação do DNA viral (18 hpi em diante) quando ocorre a síntese de proteínas envolvidas na oclusão das partículas virais, como a poliedrina e a p10, expressas em alta quantidade (O'REILLY et al., 1992; RIBEIRO et al., 1998). A partir de 60 horas a lise celular já pode ser observada.

1.5.1.3 Baculovírus como vetor de expressão

Os baculovírus têm sido largamente usados como vetores de expressão gênica desde 1980. Os primeiros relatos do uso de baculovírus como vetores de expressão foram publicados por Smith et al. (1983) e Pennock et al. (1984), que usaram o AcMNPV (O'REILLY et al., 1992).

Ribeiro e Crook (1998), relatam algumas vantagens para a utilização do sistema de expressão de proteínas heterólogas, como por exemplo: a alta especificidade dos baculovírus, o que torna o sistema seguro de ser utilizado; existência de promotores fortemente ativos durante a fase tardia da infecção (não interferindo no ciclo viral); altos níveis de expressão das proteínas heterólogas; facilidade de purificação das proteínas heterólogas; capacidade para inserção de grandes quantidades de DNA e a coexpressão de dois ou mais genes.

A expressão do gene estrangeiro é geralmente dirigida através do promotor da poliedrina do vírus *Autographa californica nuclear polyhedrosis* (AcNPV), o qual é altamente transcrito durante o estágio tardio da infecção. O genoma circular de fita dupla do AcNPV tem mais de 130 kpb com múltiplos sítios de reconhecimento para muitas endonucleases de restrição. A proteína recombinante é freqüentemente

expressada em altos níveis em larvas ou cultura de células de inseto infectadas (LUCKOW e SUMMERS, 1988; MILLER, 1997; O'REILLY, 1992) e a proteína de interesse é detectada por meio de várias técnicas, como a eletroforese em gel de poliacrilamida, Western blotting, ensaios enzimáticos (RIBEIRO et al., 1998) e PCR.

A tecnologia para a construção de baculovírus é feita com base em plasmídeos de transferência (JARVIS, 1997), inserindo uma seqüência codificando uma proteína de interesse dentro de vetor de transferência. Após a inserção do gene de interesse no vetor plasmideal, esse é introduzido em células de inseto juntamente com o DNA viral, e através da recombinação homóloga entre seqüências virais no vetor e o DNA viral, ocorrerá troca do gene viral não-essencial e o gene de interesse presente no vetor. A freqüência de recombinantes é de 0,1%. A progênie é usualmente selecionada por testes de placa, o qual pode levar de 4 a 6 semanas. O clone recombinante é identificado por microscopia através do fenótipo distinto (corpos de oclusão / occ) nas células infectadas (LUCKOW et al., 1993). Segundo Kost et al. (2005) e Zhao et al. (2003), a seleção de vírus recombinantes por testes de placa é morosa e difícil de identificar quando se usa o fenótipo sem corpos oclusos (sem poliedros = occ⁻).

Outra vantagem do sistema de expressão, baseado em baculovírus, é que esses não são infecciosos a vertebrados (FEDERICI, 1997), assim, são considerados suficientemente seguros para manipulação e produção industrial de proteínas de importância biotecnológica. As aplicações dessas proteínas podem ser citadas para uso na produção de vacinas, montagem de testes de diagnóstico, análise tri-dimensional de estruturas protéicas, produção de bio-inseticidas (JARVIS, 1997; RIBEIRO et al., 1998), pesquisas bio-médicas entre outros.

Com o desenvolvimento de um método bacteriano de transposição *in vivo*, descrito pela primeira vez por Luckow et al. (1993) e mais tarde comercializado como sistema "Bac-to-Bac® Baculovirus Expression Systems" (Invitrogen™), eliminou a necessidade de fazer o isolamento de vírus recombinantes por testes de placa. Este método envolve transposição sítio-específica de um gene estrangeiro de um plasmídeo doador para um DNA baculovírus clonado, ou "bacmid" de tal forma que o gene estrangeiro é controlado pelo promotor da poliedrina (LUCKOW et al., 1993).

1.5.2 Cultura de células de inseto

Com os avanços da tecnologia de cultura de células com o estabelecimento de linhagens celulares de insetos e a análise ultraestrutural por microscopia eletrônica permitem estudos mais detalhados do processo de infecção *in vitro* e o desenvolvimento de várias investigações sobre os mecanismos moleculares envolvidos na replicação do baculovírus (CASTRO et al., 1999).

Uma linhagem celular de insetos foi desenvolvida por Granados et al. (1994), denominada BTI-Tn-5B1-4 (Tn-5B1-4) (Figura 8). As células Tn5B1-4 têm morfologia esférica e são preparadas de ovos do lepdóptero *Trichoplusia ni* pertencente a família de insetos Noctuidae da ordem Lepidoptera, conhecida popularmente como lagarta mede-palmo (Figura 9 A a D). Essas células têm como principal propriedade a alta densidade de expressão de proteínas de baculovírus.

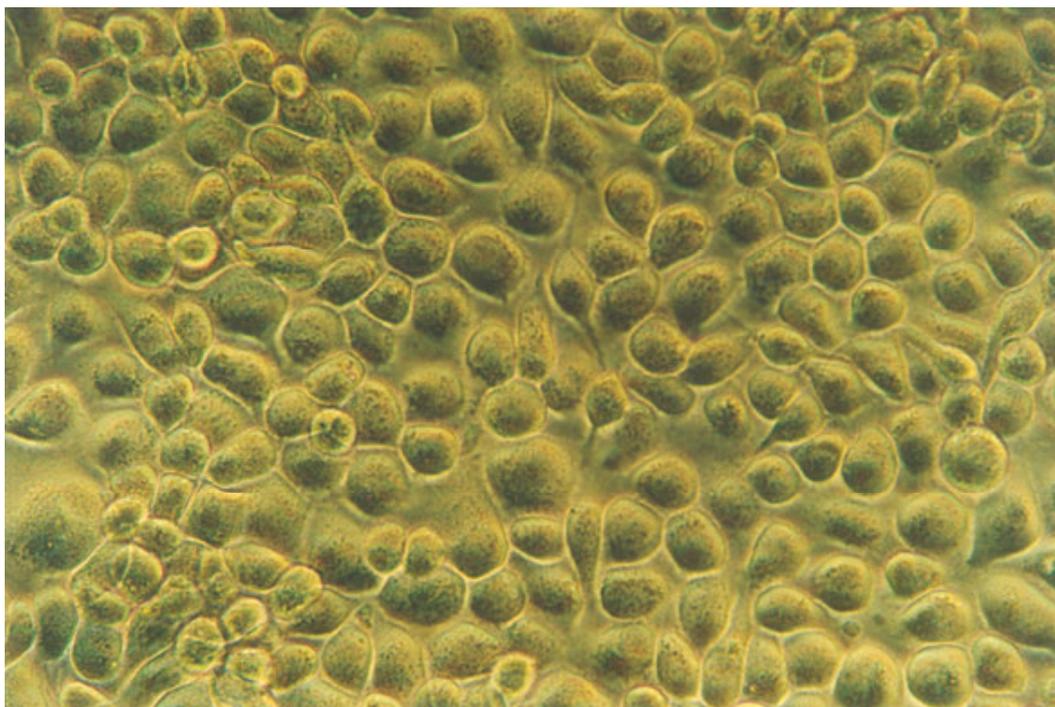


Figura 8 - Fotografia da monocamada de cultura celular de inseto BTI-Tn-5B1-4 (Tn-5B1-4).

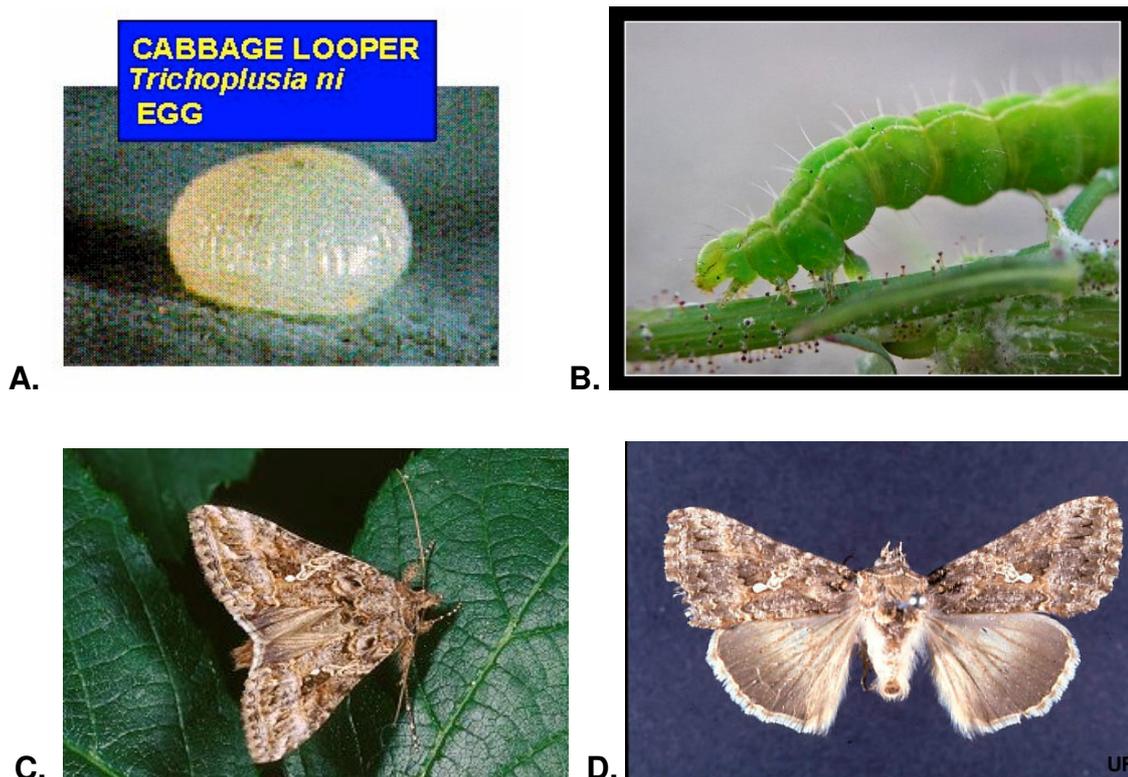


Figura 9 - Fotografias de *Trichoplusia ni*. a) ovo; b) larva; c) e d) adulto.

Fonte: Fotos A e C: Mau e Kessing (<http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/trichopl.htm>);
Foto B: Amaral, 2005 (http://www.olhares.com/218_trichoplusia_ni/foto340097.html);
Foto D: University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences
(http://creatures.ifas.ufl.edu/veg/leaf/cabbage_looper.htm)

1.5.3 Poliedrina, promotor e *lacZ*

Ao final do ciclo de replicação do baculovírus (JARVIS, 1997) o núcleo ocupa o maior volume da célula infetada do hospedeiro e está preenchido com poliedros. O principal componente dos poliedros é uma proteína denominada poliedrina (O'REILLY et al., 1992), que compreende pelo menos 25% da proteína total em células infectadas com baculovírus durante a fase "very late" da infecção (SMITH et al., 1983). O desenvolvimento dos baculovírus como vetores de expressão se fundamentou na propriedade de produzir grandes quantidades de poliedrina durante a infecção (JARVIS, 1997) sob o comando do promotor da poliedrina (*polh*), um promotor muito forte e de tamanho pequeno (50 pb) que pode ser removido para outros locais do genoma (O'REILLY et al., 1992).

A presença do gene *polh* resulta em um fenótipo *occ*⁺, que é caracterizado pela presença de múltiplos e grandes poliedros (corpos oclusos de poliedro) no

núcleo de células infectadas. Se um gene não é essencial para a replicação em cultivo celular, este gene pode ser funcionalmente inativado através da inserção de seqüências heterólogas dentro da região codificadora usando métodos de recombinação homóloga (JARVIS, 1997). Geralmente são usadas as seqüências heterólogas de um vetor de transporte carreando o gene *lacZ*, que se insere em uma outra localização no genoma viral durante a construção do vetor recombinante. O gene *lacZ* é então retido no recombinante, e placas occ^- serão distinguíveis visualmente na monocamada por sua cor azul (O'REILLY, 1992) quando incubadas na presença de um cromatógeno como indicador (POSSEE e ROHRMANN, 1997).

1.5.4 Plasmídeos

Em decorrência de sua simplicidade e curto tempo de gerar uma nova progênie, a bactéria e, em especial a *E. coli*, é um dos organismos mais estudados em nível celular. Genes bacterianos podem ser transferidos de uma bactéria para outra. As células bacterianas têm três mecanismos com os quais podem adquirir genes de outras células da população bacterianas: conjugação, transformação e, com a ajuda de vírus, a transdução. A habilidade para tal é conferida pelos genes contidos nos plasmídeos bacterianos (ALBERTS et al., 1999), os quais são moléculas pequenas, circulares e de dupla fita de DNA que estão separados do cromossomo bacteriano.

A transformação é a capacidade das bactérias de assimilarem pequenos fragmentos de DNA resultantes da morte e degradação de outras bactérias presentes nos arredores. O DNA entra na célula viável e se incorpora no DNA genômico por recombinação homóloga (ALBERTS et al., 1999).

Plasmídeos podem ser usados como transportadores (vetor) de um fragmento de DNA estrangeiro a ser clonado (DNA recombinante) para dentro de um outro organismo (transformação em células *E. coli* competentes). Cada vez que a célula se multiplica, o número de cópias da molécula de DNA recombinante também se duplica (ALBERTS et al., 1999; LEWIN, 2000).

Fragmento de DNA de interesse a ser clonado, pode ser isolado e amplificado pela PCR, e para facilitar a inserção deste DNA amplificado dentro de um vetor, foram desenvolvidos métodos de clonagem usando como estratégia um plasmídeo

linear que possui, acrescido em seus dois sítios terminais de uma timidina (T) (KNOCHE, 1999; KOBS, 1995). Existe comercialmente o vetor pGEM®-T (Promega), um sistema conveniente para clonagem de produtos da PCR.

O Vetor pGEM®-T foi preparado através da digestão do vetor pGEM®-5Zf(+) com EcoR V, acrescentando uma timidina (T) no 3' terminal em ambas extremidades do vetor. Essas terminações 3'-T melhoram em muito a eficiência de ligação de um produto de PCR no plasmídeo, evitando a recircularização do vetor e provendo uma ligação compatível de produtos de PCR gerado pela polimerase termoestável (taq DNA polimerase). Esta polimerase freqüentemente adiciona uma única deoxiadenosina (A), nas terminações 3' dos fragmentos amplificados (Manual Técnico pGem®-T and pGem® -T Easy Vector Systems, 2003; Promega). Esses vetores contêm vários sítios de restrição dentro da região múltipla de clonagem. Esses sítios de restrição liberam o inserto por digestão com uma única enzima de restrição. O vetor pGem®-T Easy é flanqueado por sítios de reconhecimento duplo para as enzimas de restrição EcoR I, BstZ I e Not I.

Após a clonagem dentro de vetor de transferência e de sua transformação em células de *E. coli*, o DNA recombinante é isolado por enzimas de restrição e subclonado em um vetor de expressão. Atualmente, existe disponível no mercado kits de clonagem que disponibilizam um plasmídeo doador e células competentes com o “bacmid” e um plasmídeo helper inseridos em seu genoma (KOST et al., 2005). Em 1993, Luckow e colaboradores desenvolveram um baculovírus recombinante com sítio-específico do transposon mediando a inserção de genes estranhos ao genoma do baculovírus através da propagação em *E. coli*. Esses conhecimentos levaram a produção do kit denominado “Bac-to-Bac® Baculovirus Expression Systems” (Invitrogen™) (Kost, 2005). A síntese deste protocolo, consiste em clonar o gene de interesse dentro do plasmídeo doador pFastBac™ (Invitrogen™) e depois transformá-lo dentro de células competentes *E. coli* DH10Bac™ (Invitrogen™), as quais contêm o “bacmid” com um sítio marcado para a mini-*attTn7* e o plasmídeo helper. O elemento mini-Tn7 do plasmídeo doador pode, por transposição, se ligar ao sítio mini-*attTn7* no “bacmid”, na presença da enzima transposase, fornecida pelo plasmídeo helper. Colônias bacterianas contendo o “bacmid” recombinante são identificadas pela ruptura do gene da *lacZ*. O DNA recombinante de alto peso molecular é preparado de clones de colônias *E. coli* selecionadas contendo o “bacmid” recombinante, e este DNA é usado para

transfectar células de inseto (Manual de Instrução “Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System”, 2002; Invitrogen™).

1.5.5 Transposição

Genomas bacterianos contêm trechos de DNA denominados elementos de transposição (transposons), que podem mover-se de um lugar para outro no genoma de seus hospedeiros através da enzima transposase. Alguns transposons possuem promotores de transcrição e quando se posicionam próximo de um gene podem interferir na expressão em diferentes níveis ou diferentes controles celulares. Esse movimento cria mudanças nos genomas hospedeiros e fornece outra fonte de variação genética (ALBERTS et al., 1999; LEWIN, 2000).

MATERIAIS E MÉTODOS

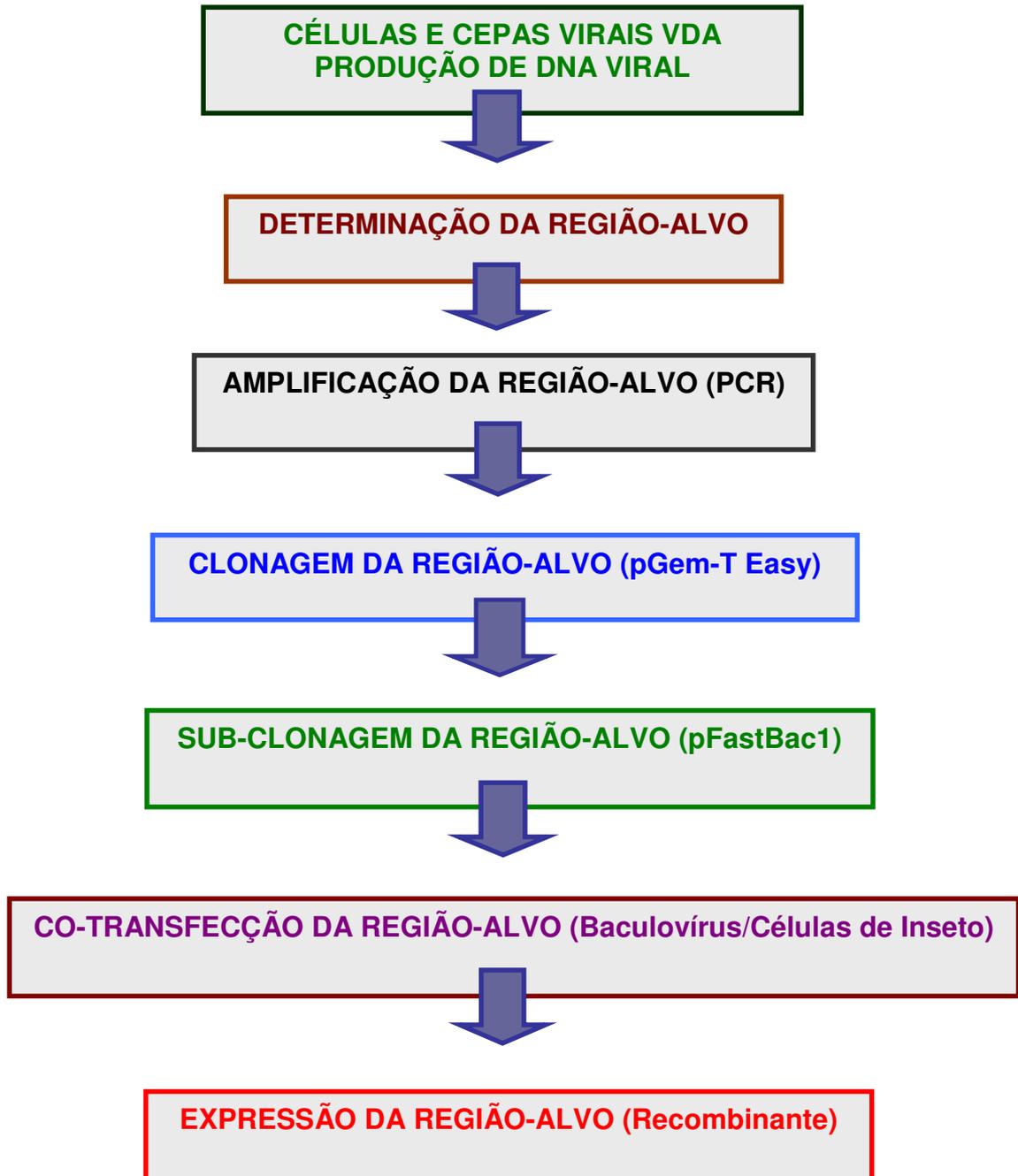


Figura 10 - Esquema da produção da glicoproteína gE do VDA.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CÉLULAS

Para propagar e titular o vírus da doença de Aujeszky (VDA) foram utilizadas células de linhagem Swine Kidney (SK-6 ou fibroblastos de rim de suíno), cultivadas com meio de cultura Ham F 10 (Cultilab) e meio 199 (Cultilab) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB; Cultilab), garamicina (sulfato de gentamicina; Schering-Plough) concentração final 50 µg/ml e anfotericina B (Fungizon®; Bristol-Myers Squibb) concentração final 3,5 µg/ml. As células foram multiplicadas a cada 72 horas segundo métodos usuais do laboratório de sanidade da Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia, SC.

2.2 AMOSTRAS DE VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY

Foram utilizadas amostras de herpesvírus suíno pertencente ao banco de microrganismos virais do setor de virologia do laboratório CEDISA e da Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia (SC), amostras estas representativas do vírus da doença de Aujeszky (VDA), isolados de campo em Santa Catarina, identificados sob os números de protocolo 0261/83 e 006/90 (Embrapa Suínos e Aves) e 1955/02 (CEDISA). Os estoques de vírus foram titulados seguindo métodos usados na rotina nesses laboratórios (ROWE e ROMERO, 1986), sendo os títulos calculados pelo método de Spearman e Karber (LORENZ e BÖGEL, 1973).

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO VIRAL

Cultivo celular infectado com VDA foi submetido à extração de DNA pelo método da proteinase K (SAMBROOK et al, 1989). As amostras virais utilizadas

neste estudo foram mantidas com poucas passagens *in vitro* (entre 5 e 10 passagens), com título não inferior a 10^6 TCID₅₀. O vírus foi multiplicado em células SK-6, cultivadas em garrafas de 150 cm² (30-40 x10⁶ células). Quando os cultivos celulares apresentavam cerca de 90% de efeito citopático (ECP), o conteúdo das garrafas foi colhido e clarificado por centrifugação a 2.000 x g por 20 minutos a 4 °C para separação das células. O sobrenadante foi, então, recuperado em um novo tubo e congelado a -70 °C ou imediatamente ultracentrifugado através de um colchão de sacarose. Para o preparo do DNA de cada uma das cepas virais, foram utilizados dois tubos de ultracentrífuga. Cada tubo recebeu um volume de 27 ml do sobrenadante viral e 3 ml da solução de sacarose 25%. Após equilibrar os tubos em balança, o material foi ultracentrifugado a 110.000 x g por 3 horas a 4 °C, para concentração dos vírus presentes no sobrenadante. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e para permitir que todo o excesso de líquido saísse do tubo, este foi posicionado invertido sobre papel toalha absorvente. O material de cada tubo, sedimento viral, foi, então, ressuscitado em 100 µl de tampão TNE (pH 7,4) (ANEXO F). Posteriormente foi feito um 'pool' dos dois tubos de cada cepa viral e transferido para um microtubo novo de 1,5 ml, totalizando 200 µl de TNE e sedimento viral. O material foi incubado com 1 µl de proteinase K (20 mg/ml; BioLabs) e 20 µl de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% por 1 hora a 37 °C, sob agitação leve constante. Após a incubação, o material foi submetido à extração com 200 µl de fenol ("UltraPure™ Phenol"; Invitrogen™) (pH 8,0), com a adição de NaCl até a concentração final de 0,3 M (~7 µl a 5 M). O material contido no tubo foi homogeneizado sob agitação leve em temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugado a 12.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos novos, os ácidos nucleicos precipitados com a adição de 550 µl de etanol absoluto gelado (-20 °C) e incubado durante uma hora a -20 °C. A amostra de DNA foi recuperada por centrifugação a 12.000 x g a 4 °C por 45 minutos. O etanol foi descartado, o "pellet" lavado com etanol 70% gelado e centrifugado a 12.000 x g por 5 minutos. O etanol 70% foi desprezado, e o "pellet" de DNA viral foi desidratado à temperatura ambiente e ressuscitado em 50 µl de tampão estéril TE-RNase (pH 8,0) (ANEXO F). O DNA foi mantido a 4 °C ou armazenado em ultracongelador a -70 °C.

2.3.1 Teste da qualidade e quantidade do DNA genômico

Para testar a qualidade das amostras de DNA genômico produzido, 5 µl de cada DNA VDA produzido foi digerido com enzima de restrição BamH I, para uma reação final de 15 µl. Uma alíquota de 8 µl da digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% a 90 volts por 1 hora em cuba horizontal com tampão TAE (ANEXO F). O gel foi corado com brometo de etídeo (5 µg/ml; Sigma) (ANEXO F) e visualizado sob luz ultravioleta (UV). Uma alíquota de 1,5 µl do DNA VDA não digerido também foi incluída na eletroforese como marcador e para avaliar a concentração da amostra de DNA. A medição da altura das bandas foi conferida com o uso de 3,5 µl do marcador de 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen™) diluído 1:5 (ANEXO F).

2.4 REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

2.4.1 Desenho dos iniciadores da seqüência do gene gE do VDA

Com o objetivo de amplificar toda região codificadora da glicoproteína E (gE) das amostras de VDA, foram desenhados dois jogos de iniciadores (“primer”). Uma seqüência da gE do vírus da doença de Aujeszky registrada no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) com número de acesso AY249861 (HYUN et al., 2003) (ANEXO A) foi utilizada para obter as seqüências de “primers”, que foram desenhados com o auxílio do professor Dr. Bergmann Morais Ribeiro, do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia, departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, DF (UnB). Depois de desenhados, as seqüências dos “primers” foram alinhadas e submetidas à análise por BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Foram desenhados duas seqüências de iniciadores, o “primer forward” (PF) com sítio de restrição EcoR I (GGATTC) (5'-cacaccggggttgaattccatgc-3') e um “primer reverso” (PR) com sítio de restrição BamH I (GGATCC) (5'-gaccggatcccccgttattaagc-3') correspondente à região do genoma do PRV 123483 a 125253, totalizando 1771 nucleotídeos, referente a todo o gene da gE adicionada de mais alguns oligonucleotídeos que antecedem e finalizam

a gE com a inserção dos sítios de restrição (ANEXO B). As seqüências dos “primers” foram preparadas pela XX IDT® Integrated DNA Technologies, Inc (Dialab Diagnostics, SA).

2.4.2 Padronização do protocolo da PCR que amplificou toda a gE do VDA

A PCR foi realizada em aparelhos termocicladores e com o volume final de 50 µl por tubo, que continha 10% de tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (50 mM KCL; 20 mM Tris-HCl, pH 8,4), 4,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTPs (deoxinucleotídeo), 5% de glicerol (v/v), 50 pmoles de cada “primer”, 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen™), 100 ηg do DNA viral e água estéril qsp 50 µl. As reações foram inicialmente submetidas a um passo de desnaturação (95 °C, 4 minutos) e anelamento (56 °C, 1:30 minutos) e, só então, foi acrescentado a cada reação a *Taq* DNA polimerase e seguida de uma extensão (72 °C, 2 minutos). Após, procedeu-se cinco ciclos de desnaturação (95 °C, 1 minuto); anelamento (58 °C, 1:30 minutos) e extensão (70 °C, 2 minutos) e 30 ciclos de desnaturação (95 °C, 1 minuto); anelamento (60 °C, 1:30 minutos) e extensão (72 °C, 2 minutos). Após os 30 ciclos, as reações foram submetidas um ciclo final de extensão a 72 °C por 10 minutos.

Ao final das reações no termociclador, uma alíquota de 8 µl foi separada de cada reação de 50 µl, que foram imediatamente testadas por eletroforese em gel de agarose 0,7% a 90 volts por 1 hora em cuba horizontal com tampão TAE. O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta (UV). A medição da altura das bandas foi conferida com o uso de 3,5 µl do marcador de 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen™) diluído 1:5 (ANEXO F).

As reações da PCR com a gE amplificada foram reunidas em um “pool” e imediatamente purificadas para serem posteriormente clonadas com o vetor de clonagem.

2.4.2.1 Purificação das reações da PCR que amplificaram a gE do VDA

As reações da PCR gE amplificadas foram purificadas utilizando o kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega), conforme as orientações do fabricante. Um e meio microlitros de cada DNA purificado foi imediatamente analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% como descrito anteriormente, para verificar sua qualidade e concentração, para em seguida serem usados na ligação com o vetor de clonagem. Meio microlitro do DNA pGem®-T Easy (Promega) (ANEXO C) também foi analisado.

2.5 PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES

Células de *Escherichia coli* DH5 α TM (InvitrogenTM) e DH10BacTM (InvitrogenTM) foram empregadas nos procedimentos de clonagem como hospedeiras para os plasmídeos usados no trabalho. Para torná-las competentes e, portanto prontas para usá-las na transformação dos produtos da ligação vetor-inserto, foram seguidos os seguintes procedimentos:

2.5.1 Preparo de células competentes *Escherichia coli* com cloreto de cálcio (CaCl₂) - Adaptado de Sambrook et al. (1989).

As bactérias *Escherichia coli* DH5 α TM armazenadas em glicerol a -70 °C foram semeadas por esgotamento em meio agar Luria Bertani (LB) (ANEXO F) sem antibióticos e incubadas a 37 °C por aproximadamente 18 horas (durante a noite). Foram transferidas 4 a 5 colônias isoladas de *E. coli* de 1-2 mm, semeadas no dia anterior em placa agar LB, para um tubo contendo 1 ml de meio LB líquido sem antibióticos, que foi homogeneizado com o “Vortex” em moderada velocidade para dispersar bem as bactérias. O conteúdo do tubo foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 1 litro contendo 50 ml de meio LB sem antibiótico e incubado a 37 °C por 3 horas sob agitação constante de 200 x rpm até que atingisse uma densidade óptica (DO), medida em espectrofotômetro sob o comprimento de onda de 600 nanômetros (DO₆₀₀), de 0,4 – 0,6. Foi adicionado 50 ml de meio LB pré-aquecido a 37 °C sem antibióticos e novamente a cultura foi incubada a 37 °C sob agitação

constante de 200 x rpm até que o crescimento bacteriano atingisse uma DO_{600} de 0,6 (cerca de 30 minutos de incubação).

Os cultivos de 100 ml do crescimento bacteriano foram divididos em dois tubos de centrifuga e mantidos em banho de gelo por 10 minutos para baixar a temperatura da cultura para 0 °C. Após isso, as células foram recuperadas por centrifugação a 2500 x g por 10 minutos a 4 °C. Cuidadosamente, o sobrenadante de cada tubo foi descartado e o “pellet” celular de cada tubo foi ressuspensionado em 50 ml de cloreto de magnésio ($Mg Cl_2$) 100 mM gelado (ANEXO F). Posteriormente, as células foram novamente centrifugadas (2500 x g por 10 minutos a 4 °C). O sobrenadante foi descartado, o “pellet” celular de cada tubo foi ressuspensionado em 25 ml de $Mg Cl_2$ 100 mM gelado e as células ressuspensionadas foram reunidas em um único tubo o qual foi novamente centrifugado, conforme já descrito acima. Descartou-se, então, o sobrenadante e o “pellet” foi gentilmente ressuspensionado em 5 ml de $Mg Cl_2$ 100 mM gelado e incubado em banho de gelo durante 15 minutos. Adicionou-se, lentamente gota-a-gota, 2,5 ml de glicerol 70% estéril gelado, sob agitação constante do frasco em banho de gelo. As células foram envasadas em criotubos (200 μ l/criotubo) e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido. Após o congelamento, as ampolas com as células foram estocadas a -70 °C.

2.5.2 Preparo de células competentes *Escherichia coli* com cloreto de rubídio ($RbCl_2$) - Adaptado de Glover (1984).

As bactérias *Escherichia coli* DH10Bac™ armazenadas em glicerol a -70 °C foram semeadas por esgotamento em meio agar LB sem antibióticos e incubadas a 37 °C por aproximadamente 18 horas. O inóculo foi obtido ao utilizar uma colônia bem isolada da placa de agar LB acima citada em 7 ml de meio SOB (ANEXO F) sem antibióticos, que foi incubado a 37 °C por 18 horas (durante a noite). Os 7 ml cultivados foram utilizados como inóculo em 250 ml de meio SOB sem antibióticos acondicionados em um frasco Erlenmeyer de 1000 ml. A cultura foi incubada a 37 °C sob agitação constante de 200 x rpm até que atingisse uma densidade celular de 4 a 7×10^7 células por ml (cerca de 4 a 5 horas de incubação). A densidade celular foi medida em espectrofotômetro sob o comprimento de onda de 600 nanômetros (DO_{600}) de 0,4 a 0,7.

Os 250 ml do crescimento bacteriano foram divididos em tubos de centrifuga de 50 ml e mantidos em banho de gelo por 10 minutos para baixar a temperatura da cultura para 0 °C. Em seguida, as células foram recuperadas por centrifugação a 1000 x g por 15 minutos a 4 °C. Cuidadosamente, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” celular de cada tubo foi ressuscitado com 4 ml da solução RF1 (pH 5,8) (ANEXO F) gelada, totalizando 20 ml da solução. O volume celular ressuscitado foi reunido em um único tubo, o qual foi mantido em gelo por 15 minutos. Após essa incubação em gelo, as células foram novamente centrifugadas a 1000 x g a 4 °C por 15 minutos. O sobrenadante do tubo foi descartado e o “pellet” celular foi cuidadosamente ressuscitado em 10 ml da solução RF2 (pH 6,8) (ANEXO F) gelada e incubada em gelo por 15 minutos.

As células foram envasadas em criotubos (200 µl/criotubo) e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido. Após o rápido congelamento, as ampolas com as células foram estocadas a -70 °C.

2.6 TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES – CLONAGEM E SUBCLONAGEM

Cepas de *E. coli* DH5α™ competentes foram transformadas para as clonagens com os vetores pGem®-T do kit “ pGem®-T Easy Vector Systems” (Promega) e pFastBac™1 do kit “Bac-to-Bac® Baculovirus Expression Systems” (Invitrogen™). Foi utilizado ampicilina [50 mg/ml] (USB) no meio LB líquido e agar LB para uma concentração final de 100 µg/ml.

2.6.1 Clonagem do inserto gE.VDA e do vetor pGem®-T Easy

O “pool” dos produtos das reações da PCR (seqüências gE amplificadas) foi purificado com o kit “Wizarda® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) e ligado ao plasmídeo de clonagem pGem®-T Easy (Promega) através da enzima T4DNA ligase (Promega). Todas as reações foram feitas durante 20 horas a 4 °C, seguindo as condições indicadas pelo fabricante da enzima ligase. Foram feitas ao todo quatro ligações: duas ligações de inserto com vetor com taxa molar de 5:1 e

2:1; uma ligação com o DNA controle positivo do kit e uma ligação usando somente o plasmídeo pGem®-T Easy.

Um volume de 2,5 µl da ligação foi adicionado a um tubo novo estéril de polipropileno (17 x 100 mm), devidamente identificado e mantido no gelo. Ampolas com 200 µl de células competentes *E. coli* DH5α™ foram retiradas do ultracongelador -70 °C e imediatamente acondicionadas em banho de gelo. Cem microlitros dessas células foram passados para cada um dos tubos com a ligação. Como controle das transformações foram também transformadas somente células competentes DH-5α™ e plasmídeo pGem®-T Easy. As transformações foram mantidas em banho de gelo durante 20 minutos.

Um choque térmico durante 45 segundos em banho-maria a 42 °C foi realizado, ao que se seguiu nova incubação em banho de gelo durante dois minutos. Posteriormente, foram adicionados 900 µl de meio SOC (ANEXO F) às células transformantes contendo a ligação e os tubos foram incubados a 37 °C sob agitação constante de 200 x rpm durante 60 a 90 minutos. Após a incubação, 100 µl das transformações inserto/vetor foram diretamente plaqueadas em agar LB com ampicilina e os demais 900 µl das células foram peletizadas sob centrifugação a 1000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, o 'pellet' ressuscitado em 200 µl de meio SOC e 100 µl foi plaqueado (semeado), em duplicata, em placas agar LB contendo ampicilina (concentração final 100 µg/ml). As placas foram incubadas a 37 °C por 16 a 24 horas. As transformações sem ligações, somente com células competentes, foram plaqueadas em agar LB com e sem ampicilina. A transformação somente com plasmídeo circular foi plaqueada em agar LB com ampicilina 100 µg/ml (ANEXO F).

2.6.1.1 Isolamento do DNA plasmideal recombinante (minipreparação) - Adaptado de Sambrook et al. (1989).

Colônias crescidas isoladamente foram selecionadas e inoculadas em 3 ml de meio LB com ampicilina (concentração final 100 µg/ml) acondicionados em tubos estéreis de polipropileno de 15 ml. A incubação foi conduzida a 37 °C sob agitação (200 x rpm) durante 18 horas. Dos tubos com crescimento bacteriano foram separados 1,5 ml deste crescimento e acondicionados em tubos de centrífuga de 2

ml, os quais foram centrifugados a 5000 x g por 1 minuto a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, o “pellet” celular foi ressuscitado com 100 µl da Solução I (ANEXO F) gelado e homogeneizado com “Vortex”. Acrescentou-se 200 µl da Solução II (ANEXO F), homogeneizou o conteúdo do tubo cuidadosamente invertendo o tubo 5 a 6 vezes. Em seguida, foram adicionados 150 µl da Solução III (ANEXO F) gelada e os tubos foram invertidos 3 a 5 vezes com cuidado para não romper o lisado. Os tubos foram incubados no gelo por 3 a 5 minutos e centrifugados a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado em tubos limpos e o DNA plasmideal foi extraído com 220 µl de fenol re-equilibrado com TE (pH 8,0) e 220 µl de clorofórmio. Os tubos foram homogeneizados com “Vortex” por 20 segundos e novamente centrifugados 12.000 x g por 5 minutos a 4 °C. A fase superior foi recuperada em tubos novos estéreis e então precipitada com 900 µl de etanol absoluto na temperatura ambiente. Os tubos foram homogeneizados com “Vortex”, incubados por 2 minutos e centrifugados a 12.000 x g por 5 minutos a 4 °C. Os “pellets” foram lavados com 1000 µl de etanol 70% gelado. Os tubos foram homogeneizados com “Vortex” e centrifugados 12.000 x g por 5 minutos a 4 °C. O etanol foi descartado, o “pellet” desidratado à temperatura ambiente e ressuscitado em 50 µl de TE (pH 8,0) com RNase (USB) (20 µg/ml) (ANEXO F). As amostras de DNA em suspensão foram incubadas a 37 °C por 10 minutos e agitadas no “Vortex”, para produzir uma suspensão homogênea de DNA, incubadas em temperatura ambiente e finalmente armazenadas a -20 °C. Uma alíquota de 4 µl foi separada para ser testada por eletroforese em gel de agarose 0,7% em tampão TAE, conforme já descrito anteriormente.

2.6.1.2 Análise do DNA plasmideal recombinante pGem-gE.VDA com enzimas de restrição

As amostras de DNA eletroforizadas que apresentaram bandas no peso molecular compatível com o esperado (~4800pb) foram digeridos com a enzima EcoR I (Promega) para conferir se produziam duas bandas, uma com aproximadamente 1771 pb (inserto gE.VDA) e outra com 3015 pb (vetor pGem®-T Easy). Dois microlitros de DNA foi digerido com EcoR I para uma digestão final de 15 µl durante três horas a 37 °C. A digestão foi analisada por eletroforese em gel de

agarose 0,7%, conforme já citado anteriormente, com a aplicação de 6 µl de cada digestão com a enzima EcoR I. Para controle da digestão foram também digeridos DNAs transformante vazio (controle negativo), do pGem®-T Easy (somente 0,5 µl) e do vetor pBlueScript® II (Stratagene).

O cultivo bacteriano contendo o clone recombinante pGem-gE.VDA foi propagado num volume maior de meio LB com ampicilina e depois foi armazenado com glicerol a -70 °C.

2.6.1.2.1 Liberação do fragmento gE.VDA

Vinte microlitros do recombinante DNA pGem-gE.VDA foi digerido com EcoR I para uma digestão final de 50 µl durante três horas a 37 °C. A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,7%, conforme já citado anteriormente, com a aplicação de 2 µl de cada digestão com a enzima EcoR I. Após confirmada a total digestão do clone a reação restante foi precipitada e recuperada em gel de agarose LMP (Low Melting Point; Invitrogen™) 1% em TAE com voltagem de 10 volts durante 24 horas a temperatura de 4 a 8 °C. O fragmento de altura aproximada de 1,8 kb liberado foi extraído do gel, purificado com o kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) e antes de ser subclonado, o DNA recuperado foi analisado quanto sua qualidade e concentração em gel de agarose.

2.6.1.2.2 Digestão do fragmento gE.VDA com a endonuclease de restrição Bsr I e análise eletroforética da gE digerida

A seqüência da gE.VDA amplificada com os dois sítios de restrição (EcoR I e BamH I) clonada teve seu mapa de restrição analisado no programa NEBcutter V2.0 (New England BioLabs inc) (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). A enzima Bsr I possui um sítio na seqüência da gE do VDA.

Uma alíquota de 5 µl da seqüência da gE.VDA liberada após a clivagem com a enzima de restrição EcoR I foi digerida com a enzima de restrição Bsr I (seqüência 5´ ...ACTG↓GN...3´; BioLabs) para uma digestão final de 15 µl durante três horas a 65 °C. Também foram digeridos DNAs do subclone pFastBac-gE.VDA e do pFastBac™1, que serviram como controle. Após a digestão uma alíquota de 2 µl da

digestão foi testada por eletroforese, conforme já descrito. Amostras de DNAs não digeridos também foram usados como controle na eletroforese.

2.6.2 Subclonagem do fragmento gE.VDA e do vetor doador pFastBac™1

2.6.2.1 Digestão do plasmídeo doador pFastBac™1

O plasmídeo de expressão foi linearizado por digestão com a enzima EcoR I para posterior clonagem com a gE do VDA.

Setecentos e cinqüenta microgramas (1,5 µl) do DNA plasmideal pFastBac™1 foi digerido com EcoR I para uma digestão final de 30 µl durante três horas a 37 °C. Uma alíquota de 3 µl foi separada para posterior análise. Depois da digestão, o plasmídeo foi defosforilado com 5 unidades de fosfatase alcalina (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase – CIAP [20 U/µl]; Invitrogen™) durante 30 minutos a 37 °C ao que se seguiu a inativação da enzima CIAP por extração orgânica com igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). O DNA foi então precipitado com 0,1 volume de acetato de sódio 3 M e 2,5 volumes de etanol absoluto e depois ressuspendido em 22 µl de TE (pH 8,0). Uma alíquota de 2 µl do DNA plasmideal tratado foi separada e analisada quanto sua qualidade e concentração em gel de agarose 0,8%, conforme já anteriormente descrito.

2.6.2.2 Transformação da gE.VDA e do vetor pFastBac™1

O fragmento totalizando 1778 pb, resultado da digestão do clone pGem-gE.VDA com EcoR I foi ligado ao vetor de expressão pFastBac™1 (kit “Bac-To-Bac® Baculovirus Expression Systems”, Invitrogen™) com 4775pb (ANEXO E).

A ligação do fragmento gE.VDA com o vetor de expressão pFastBac™1, linearizado no sítio de clonagem da enzima EcoR I, foi feita com a enzima T4DNA ligase (Invitrogen™) durante 20 horas a 14 °C. Todas as reações foram feitas seguindo condições indicadas pelo fabricante da enzima ligase. Foram feitas ao todo quatro ligações de 20 µl cada: três ligações de inserto com vetor com taxa molar de

16:1, 12:1 e 8:1 e uma ligação usando somente o plasmídeo pFastBac™1, como controle da ligação.

Ampolas com 200 µl de células competentes *E. coli* DH5α™ foram retiradas do ultracongelador -70 °C e imediatamente acondicionadas em banho de gelo. Cem microlitros dessas células foram passados para seis tubos novos estéreis de polipropileno (17 x 100 mm), devidamente identificados e mantidos no gelo. Foram adicionados aos 100 µl de células competentes 3 µl de cada ligação. Como controle das transformações foram também transformadas somente células competentes DH-5α e plasmídeo circular pFastBac™1. As transformações foram mantidas em banho de gelo durante 60 minutos.

Os demais procedimentos foram realizados como descritos anteriormente.

2.6.2.2.1 Isolamento do DNA plasmideal recombinante pFastBac-gE.VDA (Minipreparação) - Adaptado de Sambrook et al. (1989).

Colônias crescidas isoladamente foram selecionadas e inoculadas em 3 ml de meio LB com ampicilina (USB) (concentração final 100 µg/ml) acondicionados em tubos estéreis de polipropileno de 15 ml. A incubação foi conduzida a 37 °C sob agitação a 200 x rpm durante 18 horas. O preparo do DNA plasmideal foi conduzido seguindo procedimentos de minipreparação adaptado de Sambrook et al. (1989), conforme já descrito anteriormente.

a) Análise do DNA plasmideal recombinante pFastBac-gE.VDA com enzimas de restrição

As amostras de DNA analisados por eletroforese que apresentaram bandas na altura compatível com o esperado (~6550pb) foram digeridas com EcoR I para conferir se liberavam duas bandas, uma de aproximadamente 1778 pb (inserto gE.VDA) e outra de 4775 pb (vetor pFastBac™1) e se inserto estava na orientação correta dentro do plasmídeo (sentido horário). Digestões com a endonuclease BamH I também foram realizadas.

Quatro microlitros de DNA foi digerido com a enzima BamH I (BioLabs) e com a enzima EcoR I para uma digestão final de 30 µl a 37 °C durante uma e três horas

(BamH I e EcoR I, respectivamente). A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,7%, conforme já citado anteriormente, com a aplicação de 6 µl de cada digestão. Para controle da digestão foram também digeridos DNAs transformantes vazios e DNA do pFastBac™1.

O crescimento bacteriano com o subclone recombinante pFastBac-gE.VDA foi cultivado em um volume maior de meio LB com ampicilina e depois foi armazenado com glicerol no ultracongelador a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.7 TRANSPOSIÇÃO DO DNA RECOMBINANTE pFASTBAC-gE.VDA COM O “BACMID” ATRAVÉS DA TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES *E. coli* DH10BAC™

Após a análise através da eletroforese em gel de agarose para observar a qualidade e a concentração do DNA recombinante, este foi diluído (1:30) em tampão TE (pH 8,0) e 3 µl foram usados para transformar células competentes DH10Bac™. Como controle da transposição, foi usado o plasmídeo controle pFastBac™-Gus diluído (1:8) em tampão TE (pH 8,0).

Um volume de 3 µl do DNA recombinante diluído 1:30 foi adicionado a um tubo novo estéril de polipropileno (17 x 100 mm), devidamente identificado e mantido no gelo. Ampolas com 200 µl de células competentes DH10Bac™ foram retiradas do ultracongelador $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e imediatamente acondicionadas em banho de gelo. Cem microlitros dessas células foram passados para cada um dos tubos com os 3 µl do DNA recombinante. Como controle das transformações foram também transformadas somente células competentes DH-10Bac™ e 2 µl do pFastBac™-Gus diluído 1:8.

As transformações foram mantidas em banho de gelo durante 30 minutos. Após, foi realizado o choque térmico, em banho-maria a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 45 segundos, ao que se seguiu nova incubação em banho de gelo durante dois minutos. Posteriormente, foram adicionados 900 µl de meio SOC (ANEXO F) às células transformantes e os tubos foram incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação constante de 200 x rpm durante 4 horas. Após o período de incubação, cada transposição foi diluída com meio SOC 10^{-1} e 10^{-2} (i.e., 100 µl da transposição em 900 µl de meio SOC = 10^{-1} , e deste para a diluição base 10 seguinte). Cem microlitros de cada

diluição foi plaqueado em agar Lúria (ANEXO F) com antibióticos e X-gal/IPTG, e em duplicata . As placas agar Lúria (ANEXO F) foram preparadas com antibióticos (50 µg/ml de kanamicina, 7 µg/ml de gentamicina, 10 µg/ml de tetraciclina) e com X-gal (20 µg/ml; USB) (ANEXO F) e IPTG (40 µg/ml) (ANEXO F). A transformação somente com células DH10Bac™ foram plaqueadas em agar Lúria com e sem antibióticos. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 a 48 horas.

2.7.1 Seleção dos “bacmid” recombinantes pelo fenótipo das colônias bacterianas

Colônias brancas contendo o “bacmid” recombinante (subclone pFastBac-gE.VDA dentro do “bacmid”) foram selecionadas para o isolamento do DNA recombinante. Para confirmar o fenótipo das colônias, elas foram re-semeadas em placa agar Lúria com antibióticos e X-gal/IPTG. As colônias que cresceram isoladas e que confirmaram o fenótipo branco foram colhidas assepticamente e inoculadas em 3 ml de meio LB contendo antibióticos (kanamicina, gentamicina e tetraciclina) e incubadas a 37 °C por 18 horas.

Uma colônia azul da transposição (clone vazio) e uma colônia do pFastBac™-Gus (DNA controle da transposição e da co-transfecção) também foram colhidas e tiveram o DNA isolado para serem usados como controles.

2.7.1.1 Isolamento do DNA recombinante “bacmid” – Isolamento de plasmídeos grandes (>100 kb)

Transferiu-se 1,5 ml do cultivo do DNA recombinante “bacmid” para um tubo de microcentrífuga. O “pellet” celular foi recuperado por centrifugação a 8000 x g por 1 minuto a 4 °C e adicionou-se 300 µl de Solução I-G (ANEXO F). O conteúdo foi cuidadosamente homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados, lentamente, 300 µl de acetato de potássio 3 M (pH 5,5) a 4 °C. Durante a adição do acetato gelado um espesso precipitado branco de proteína e DNA genômico de *E. coli* foi se formando. Os tubos com as amostras foram incubados no gelo por 5 a 10 minutos e então centrifugados por 10 minutos a 14.000 x g. O sobrenadante recuperado, sem nenhum traço de material precipitado branco, foi cuidadosamente transferido para tubos limpos contendo 800 µl de

isopropanol absoluto. O material foi gentilmente misturado por inversão cuidadosa dos tubos (5 a 6 inversões) e depois incubados no gelo por 5 a 10 minutos. Após esta incubação, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 14.000 x g em temperatura ambiente.

O sobrenadante dos tubos foi descartado e ao “pellet” foram adicionados 500 µl de etanol 70%. Os tubos foram invertidos várias vezes e foram novamente centrifugados por 5 minutos a 14.000 x g em temperatura ambiente. Com muito cuidado, o sobrenadante foi totalmente removido. Os tubos foram mantidos abertos sobre a bancada, durante 10 minutos, para permitir que os “pellets” secassem ao ar, para posteriormente serem cuidadosamente ressuspensos em 40 µl de TE (pH 8,0).

Antes de ser armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, uma alíquota do DNA plasmideal recombinante foi separada para ser testada em gel de agarose e PCR.

2.7.1.2 Análise do DNA recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA

2.7.1.2.1 Análise do DNA por eletroforese em gel de agarose

Cinco microlitros do DNA recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA foi testado em gel de agarose 0,5% em tampão TAE a 23 volts durante 12 horas. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e as bandas visualizadas sob luz UV. A amostra do DNA da colônia azul da transposição (clone vazio) e a amostra do DNA da colônia do pFastBac™-Gus (Invitrogen™) (DNA controle da transposição) também foram testados como controles.

Neste mesmo gel de agarose foi analisado, também, a concentração dos DNAs para posterior uso na co-transfecção.

2.7.1.2.2 Análise do DNA por PCR

O DNA recombinante bacmid-gE.VDA foi testado em reações de PCR usando os mesmos “primers” (PF.gE sítio EcoR I e PR.gE sítio BamH I) e as mesmas condições utilizados para amplificar a glicoproteína gE do VDA. Também foram

testados DNA do pFastBac™-Gus e o DNA de uma colônia azul (clone vazio, sem inserto) previamente co-transfectada como controle negativo.

2.8 CO-TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS DE INSETO COM O RECOMBINANTE BACMID.pFASTBAC-gE.VDA

2.8.1 Preparo de placas de 35 mm com células de inseto

Células de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4) em cultura (GRANADOS et al., 1994) foram usadas neste experimento. As células foram mantidas em meio TC-100 (Gibco-BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab) e incubadas a 27 °C.

Uma garrafa de 25 cm² contendo células de inseto BTI-Tn5B1-4 com 4 dias de cultivo foram ressuspendidas em aproximadamente 6,5 ml de meio. Placas de 35 mm de diâmetro receberam 1,5 ml de meio TC-100, suplementado com 10% SFB e 0,5 ml (6x10⁵ células) da suspensão celular foi adicionada a cada placa previamente guarnecida com meio. As células foram cuidadosamente homogeneizadas (rotações manuais suaves da placa) e mantidas a 27 °C por 3 a 4 horas, para a formação da monocamada de células.

2.8.2 Preparo do DNA recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA

Cinco microlitros do DNA recombinante “bacmid” foram diluídos em 250 µl de meio TC-100 sem soro, acondicionado em poços identificados de uma microplaca de 24 poços. Também foram preparados um DNA recombinante “bacmid” vazio (da colônia azul da transposição) e um DNA do “bacmid” pFastBac™-Gus (controle da transposição).

Cinqüenta microlitros de lipofectina (CellFECTIN®, Invitrogen™) foram diluídos em 3,5 ml de meio TC-100 sem soro. Em seguida, 250 µl dessa mistura foi cuidadosamente misturada à solução contendo o DNA recombinante no poço da microplaca e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente.

2.8.3 Co-transfecção em células de inseto do DNA recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA com lipofectina

Retirou-se o meio de cultura das células, adicionou-se 500 µl da mistura de DNA recombinante com lipossomos e as microplacas foram incubadas em temperatura ambiente por 3 horas. Após esse período, a mistura foi retirada, substituída por 2 ml de meio TC-100 contendo 10% SFB e incubadas a 27 °C, por cinco dias. Células com o “bacmid” recombinante apresentaram ECP (efeito citopático), porém com fenótipo sem a formação de poliedros (occ-) no núcleo da célula hospedeira, uma vez que o gene da poliedrina está deletado no “bacmid” do kit “Bac-to-Bac® Baculovirus Expression Systems”. Ao final do período de incubação o sobrenadante e as células co-transfectadas foram ressuspensos, colhidos em dois microtubos de 1,5 ml e centrifugados a 2500 x g por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante contendo os vírus (BV - “budded virus”) recombinantes (subclone pFastBac-gE.VDA dentro do “bacmid” co-transfectado em células de inseto) foram recuperados em tubos novos e armazenados ao abrigo da luz a 4 °C. O “pellet” celular foi lavado duas vezes com 1 ml de PBS (pH 7,2) sob centrifugação a 2500 x g por 5 minutos e armazenados no ultracongelador a -70 °C.

2.8.3.1 Isolamento do DNA recombinante das co-transfecções

Um mililitro do sobrenadante viral recombinante recuperado por centrifugação foi centrifugado a 14.000 x g por 15 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” viral foi ressuspensado com 100 µl de tampão “Virus Disruption” (ANEXO F). Foram adicionados 2,5 µl de proteinase K (20 mg/ml), resultando em uma concentração final de 500 µg/ml. A mistura foi incubada a 37 °C durante a noite (~18 horas). Ao término da digestão, o DNA foi purificado por extração seqüencial. Na primeira extração, foi adicionado aos 100 µl da digestão, 50 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e na segunda extração foi adicionado 50 µl de clorofórmio. Após a homogeneização do conteúdo dos tubos a fase superior foi recuperada por centrifugação a 14.000 x g por 5 minutos. O DNA foi precipitado com a adição de 9 µl (1/10 do volume inicial) de acetato de sódio 3 M (pH 5,2). O conteúdo foi homogeneizado por inversão do tubo (5 a 6 vezes) e foram

adicionados 180 µl de etanol absoluto à temperatura ambiente (duas vezes o volume inicial). O precipitado foi mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 horas e em seguida foi centrifugado a $14.000 \times g$ por 10 minutos. O “pellet” foi lavado com 400 µl de etanol 70% e novamente centrifugado por 2 minutos a $14.000 \times g$. O etanol foi descartado e o tubo foi mantido aberto sobre bancada por aproximadamente 10 minutos para secar ao ar. O “pellet” foi então ressuscitado com 20 µl de água Mill-Q estéril.

2.8.3.1.1 Análise do DNA do vírus recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA por PCR

O DNA extraído do sobrenadante da co-transfecção foi analisado em reações de PCR com os oligonucleotídeos desenhados para amplificar toda a gE do VDA. As reações de PCR foram feitas sob as mesmas condições utilizados para amplificar a glicoproteína gE do VDA. Também foram testados o DNA bacmid-Gus e o DNA de um clone vazio (bacmid-colônia vazia azul) que foram co-transfectados como controle negativo.

2.8.4 Infecção de culturas celulares de inseto com vírus recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA para avaliação dos níveis de expressão e tempo de infecção

Células de inseto BTI-Tn5B1-4 (6×10^5) foram semeadas em 2 ml de meio TC-100 suplementado com 10% SFB em microplacas de 35 mm de diâmetro. As células foram incubadas a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a formação da monocamada celular por 24 horas. Em seguida, as células foram inoculadas com 10 pfu (unidade formadora de placa) /célula de vírus recombinante das co-transfecções. O inóculo foi adicionado às células e mantido por 2 horas, sendo homogeneizado a cada 15 a 20 minutos. Após o período de incubação o inóculo foi retirado, hora zero pós inóculo, as células receberam, 2 ml de meio com 10% SFB e foram incubadas a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir da hora zero, realizou-se as colheitas das células às 12, 24, 48, 72 e 96 hpi. Após cada colheita as células foram recuperadas por centrifugação a $500 \times g$ por 10 minutos, lavadas com PBS, conforme já descrito anteriormente e congeladas a -70°C . Ao final de todas as colheitas, os “pellets” celulares foram preparados para serem aplicados em gel de SDS-PAGE para determinar em qual momento a glicoproteína

de interesse é expressa em maior quantidade e quando as células infectadas expressando a glicoproteína devem ser colhidas.

Também foram infectadas células de inseto com vírus tipo selvagem AcMNPV, recombinante bacmid-Gus e bacmid-clone vazio (colônia azul). Células BTI-Tn5B1-4 não infectadas também foram incubadas (mock).

2.8.5 Preparo das amostras de células co-transfectadas e infectadas com recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA

O “pellet” celular de co-transfecções e de infecções com recombinantes bacmid.pFastBac-gE.VDA lavados em PBS, conforme já descrito anteriormente, e armazenados em $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram ressuspensos em um volume de PBS (pH 7,2) conforme a concentração celular do “pellet”. Uma alíquota do ressuspensado celular foi misturada com igual volume de tampão de amostra de proteína (Tampão Redutor) (ANEXO F) e o material foi aquecido a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos para desnaturação das proteínas. Imediatamente as amostras são mantidas em banho de gelo até o momento de sua aplicação no gel de SDS-PAGE.

O material celular das infecções em células de inseto com vírus recombinante foram colhidos com diferentes horas pós-infecção (hpi).

Como controle, também foram preparados “pellets” celulares infectados com vírus tipo selvagem AcMNPV, recombinante bacmid-gus e bacmid-clone vazio (colônia azul). Células BTI-Tn5B1-4 não infectadas também foram preparadas (mock).

2.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA E (gE) POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) EM CONDIÇÕES DESNATURANTES

O padrão protéico resultante da expressão do vírus recombinante bacmid.pFasBac-gE.VDA foi avaliado segundo Laemmli (1970) para análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Amostras de células previamente preparadas com tampão redutor foram devidamente identificadas e posteriormente aplicadas no gel de SDS-PAGE.

2.9.1 Preparo dos géis de poliacrilamida

A concentração de poliacrilamida utilizada foi de 4% para o gel de empilhamento (concentrador) e de 12% para o gel de separador, em tampão de corrida (ANEXO F). Os géis foram preparados conforme Laemmli (1970).

2.9.2 Condições de corrida dos géis de poliacrilamida

As amostras celulares foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE usando-se ou o “Mini-Protean II Electrophoresis Cell” (Bio-Rad®) e a eletroforese foi realizada a 120 volts (amperagem livre) por 20 minutos (até passar pelo gel concentrador) e em seguida a 130 volts (amperagem livre) por mais 90 minutos; ou utilizando-se o “Hoefer® MiniVE Vertical Electrophoresis System” (Hoefer) e a eletroforese foi realizada a 30 miliamperes (mA) e voltagem livre por 45 minutos (até passar pelo gel concentrador) e em seguida a 50 mA por mais 3 a 4 horas, com voltagem livre. Dez microlitros de cada amostra preparada com tampão redutor foram aplicadas no gel. Foi incluído no teste como padrão de monitoramento da eletroforese um marcador de alto peso molecular. Como marcadores foram utilizados o “BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder” (6 a 180 kDa) (Invitrogen™) ou o “High Molecular Weight Standard Mixture” (29 a 205 kDa) (SDS-6H; Sigma®)

2.9.3 Revelação dos géis

O gel foi corado e fixado em solução Comassie blue/fixadores (ANEXO F) por 18 horas, sob leve agitação e descorado em solução Descorante (ANEXO F) por aproximadamente 2 horas, sob leve agitação.

2.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA gE POR WESTERN BLOTTING

As células BTI-Tn5B1-4 infectadas com vírus recombinante foram centrifugadas a 500 x g por 10 minutos e lavadas duas vezes com PBS (pH 7,2),

conforme já descrito anteriormente. Uma alíquota da amostra ressuspensa em PBS foi aquecida a 95 °C por 5 minutos com tampão desnaturante de amostra e em seguida as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12%, conforme Laemmli (1970). Após a eletroforese o gel foi utilizado para transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose, para realizar a imunodeteção (“Western blotting”).

2.10.1 Transferência do gel poliacrilamida para membrana de nitrocelulose

Após a eletroforese, uma tira do gel, que correspondente ao marcador de alto peso molecular, foi recortada deste e corada com azul de Coomassie, conforme já descrito. O marcador foi incluído no gel como padrão de monitoramento da eletroforese. O restante do gel de proteínas foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (Osmonics), usando-se os aparatos de transferência “MiniVE® Blotter System” (Hoefer®). A transferência do gel foi realizada a 100 volts e miliamperagem livre por 60 minutos. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com proteína (soro albumina bovina) e armazenada a -20 °C ou foi imediatamente lavada para posterior imunodeteção.

Também foi utilizada membrana de nitrocelulose (Schleicher), usando-se os aparatos de transferência da Bio-Rad®, o “Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell”, de acordo com o protocolo do fabricante.

2.10.2 “Western blotting”

Após a transferência a membrana foi bloqueada com 3% de soro albumina bovina (BSA) em PBS por 60 minutos e armazenada a -20 °C ou imediatamente lavada. A membrana foi lavada três vezes, durante 15 minutos, com PBS-T20 0,05% (ANEXO F). A membrana foi, ou não, cortada em tiras (canaletas) ou partes maiores, dependendo do material celular recombinante transferido para a membrana ou do soro sanguíneo e da diluição deste. Depois de lavada, a membrana foi incubada durante 90 minutos em temperatura ambiente ou a noite (~18 horas) a 4 °C com o primeiro anticorpo sob agitação leve (~70 rpm). As membranas ou tiras foram

incubadas com o primeiro anticorpo diluído em PBS-BSA 1%. Foram utilizados soro suíno anti-gE.VDA (Idexx), soro suíno SPF (Embrapa) e soro suíno positivo policlonal para anticorpos contra o vírus da doença de Aujeszky (infecção de campo; Cedisa). Em seguida a membrana foi lavada com PBS-T20 0,05% conforme já descrito e em seguida incubada durante 1 a 2 horas com o segundo anticorpo, conjugado peroxidase (HRP) IgG anti-suíno 0,5 mg (KPL) diluído 1: 3500 a 1: 7000 em PBS-BSA 1%, sob agitação leve (~70 rpm). Após esta incubação a membrana foi lavada conforme já descrito com PBS-T20 0,05% e incubada com solução reveladora tampão DAB (cromatígeno 3 - 3' diaminobenzidine; Sigma®) (ANEXO F) sob agitação leve durante 10 a 20 minutos (até o aparecimento das bandas). A reação foi então bloqueada com PBS-T20 0,05%.

2.11 PRODUÇÃO DE ESTOQUES VIRAIS

O vírus foi amplificado em cultivo de células de inseto *Trichoplusia ni* BTI-Tn5B1-4, mantidas em meio TC-100 (GIBCO-BRL), suplementadas com 10% de SFB e mantidas a 27 °C (GRANADOS et al., 1994).

2.11.1 Produção de proteína heteróloga secretada em células de inseto

A propagação de vírus recombinante em células BTI-Tn5B1-4 foi realizada usando uma MOI de 10 vírus por célula com o vírus de interesse. O inóculo foi mantido por 2 horas, sendo homogeneizado sobre as células a cada 15 a 20 minutos. Após o período de incubação o inóculo foi retirado, as células receberam, 2 ml de meio novo com 10% SFB e foram incubadas a 27 °C durante 96 horas. Ao final do período de incubação as células foram recuperadas por centrifugação a 500 x g por 10 minutos, lavadas com PBS, e congeladas a -70°C. As células inoculadas foram preparadas, conforme já descrito, e foram aplicadas em um gel de SDS-PAGE (e alguns géis foram transferidos para membrana de nitrocelulose para a realização do “Western blotting”) para determinar se estavam expressando a glicoproteína gE do VDA e em qual quantidade.

2.11.2 Produção de estoque do vírus recombinante

O baculovírus selvagem *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), o vírus recombinantes bacmid.pFastBac-gE.VDA, o vírus recombinante vazio (controle negativo) o bacmid-colônia azul e o vírus recombinante (controle da transposição e da co-transfecção) bacmid-pFastBac-Gus (produzidos neste experimento) foram propagados em células BTI-Tn5B1-4 (2×10^6 / garrafa 25 cm²), infectadas com 1 pfu por célula com cada um dos vírus acima citados. Após isso, o sobrenadante foi colhido, centrifugado a $500 \times g$ por 15 minutos, recuperado em frascos limpos e armazenado a 4 °C ao abrigo da luz.

3. RESULTADOS

3.1 PRODUÇÃO DE DNA GENÔMICO

A qualidade e a concentração dos DNAs produzidos foram analisados em gel de agarose. Na figura 11 podemos observar amostras do DNA genômico do VDA não digerido e na figura 12 o DNA digerido com a enzima BamH I.

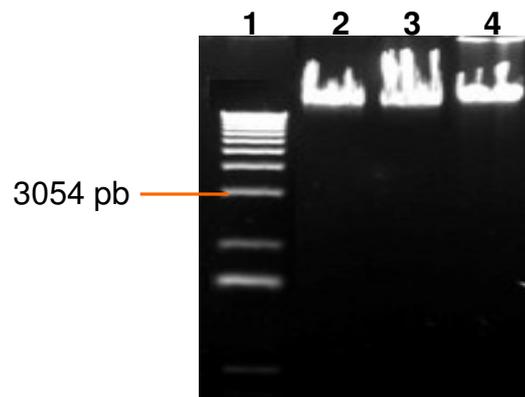


Figura 11 – DNA genômico do vírus da doença de Aujeszky. Poço 1) Marcador 1kb DNA Ladder (Invitrogen™); Poços 2, 3 e 4) Amostras de DNA genômico do VDA.

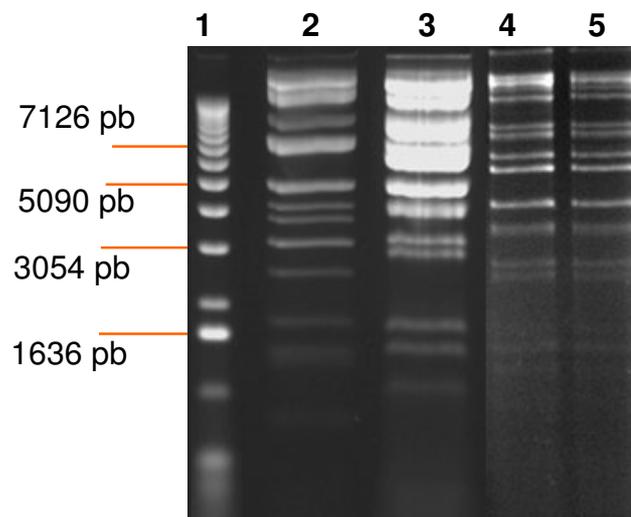


Figura 12 – DNA genômico do VDA clivado com BamH I. Poço 1) Marcador 1 kb DNA Ladder; Poços 2 a 5) DNAs digeridos com BamH I.

3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Foram testados 8 μ l de cada reação de PCR gE.VDA de 50 μ l por eletroforese em gel de agarose 0,7%. A medição da altura das bandas foi conferida com o uso do marcador de 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen) diluído 1:5. A reação de PCR com os “primers” Sense (PF) e antisense (PR) gE com sítios de restrição amplificou um fragmento de 1771 pb correspondente ao tamanho da gE do VDA (Figura 13 A e B).

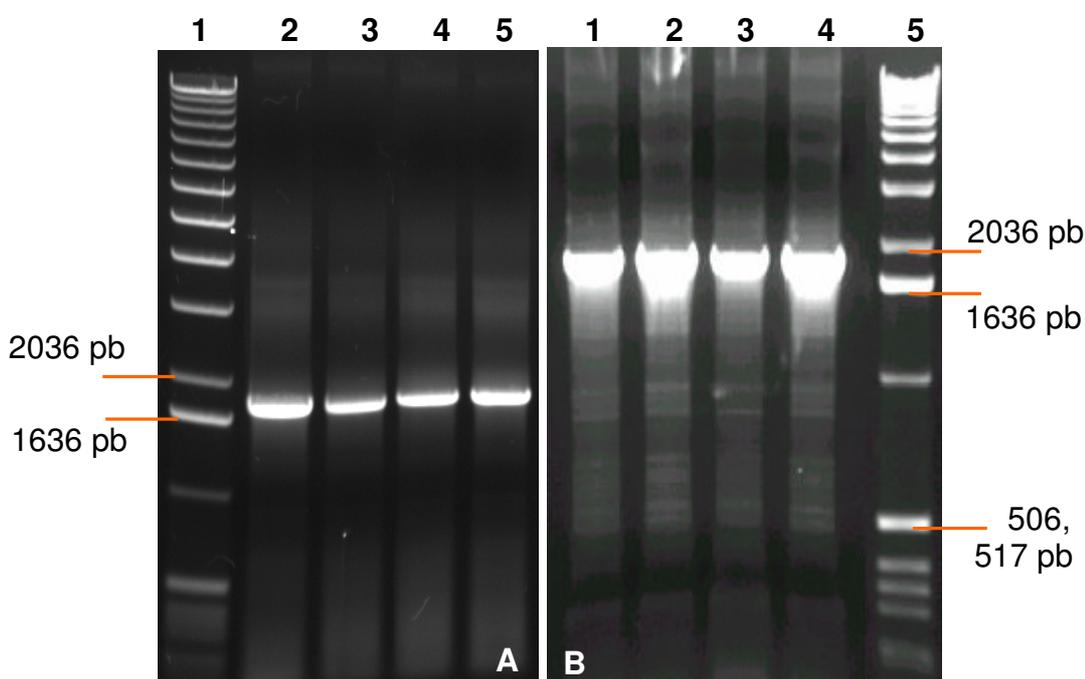


Figura 13 – Gel de agarose 0,7% de PCR gE.VDA. Figura A: Poço) Marcador 1 kb DNA Ladder; Poços 2 a 5) quatro reações de PCR da gE.VDA com amplificação da gE.VDA. Figura B: Poços 1 a 4) quatro reações de PCR da gE.VDA com amplificação da gE.VDA. As regiões amplificadas têm altura de aproximadamente 1,8 kb.

3.2.1 Purificação e análise da gE.VDA amplificada pela PCR

Reações de PCR com a gE do VDA amplificada foram reunidas em “pool”, precipitadas, recuperadas em gel de agarose LMP 1% e o DNA gE foi extraído com fenol. A figura 14 mostra um gel de agarose 0,8% para analisar qualidade e concentração das amostras de DNA gE do VDA purificadas com kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) e vetor pGem®-T Easy (Promega), para serem posteriormente clonados.

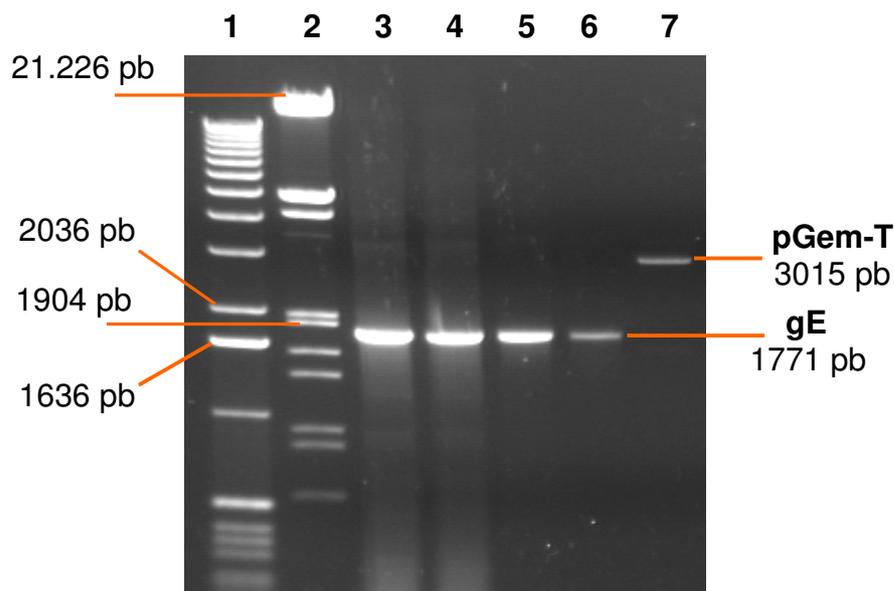


Figura 14 – Teste da qualidade e concentração do DNA gE.VDA precipitado, recuperado em gel LMP e purificado e do vetor pGem®-T Easy. Poço 1) Marcador 1 kb DNA Ladder; Poço 2) Marcador Lambda DNA EcoR I + Hind III (Promega); Poços 3 a 6) Extração do DNA gE: “pool” de reações de PCRs que obtiveram amplificação do gene gE.VDA; Poço 7) DNA pGem®-T Easy.

3.3 CLONAGEM E SUBCLONAGEM DA GLICOPROTEÍNA E (gE) DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY (VDA)

3.3.1 Clonagem do gene gE.VDA amplificado ao vetor pGem®-T Easy

O produto de 1771 pb da seqüência completa da gE do VDA amplificado com dois sítios de restrição (EcoR I e BamH I) pela técnica de PCR foi purificado e clonado no vetor de clonagem pGem®-T Easy (Promega) através da T4DNA ligase (Promega). O produto da ligação foi transformado em células competentes *E. coli* DH5 α (Invitrogen), originando o plasmídeo pGem-gE.VDA, com aproximadamente 4,787 kb (Figuras 15 e 16).

3.3.1.1 Análise dos DNA da minipreparação da clonagem pGem-gE.VDA e digestão dos clones com enzimas de restrição

Nas figuras 15 e 16 as amostras de DNA preparadas por minipreparação resultantes da clonagem da gE.VDA com o pGem®-T Easy. A amostra de DNA recombinante com a gE.VDA inserida no vetor apresenta altura maior (~4,787 kb) que os demais DNAs testados (recombinantes vazios).

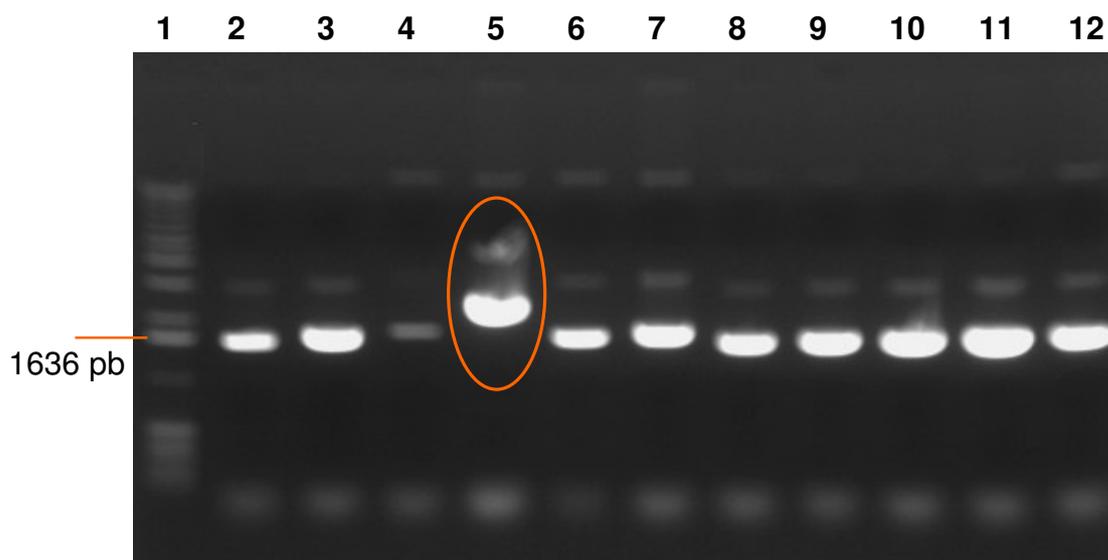


Figura 15 - DNAs da minipreparação da clonagem pGem-T Easy com a gE do VDA. Poço 1) marcador 1 kb DNA Ladder; Poço 2) DNA pGem®-T Easy; Poços 3, 4 e 6 a 12) DNAs recombinantes vazios; Poço 5) DNA recombinante pGem-gE.VDA (clone no detalhe).

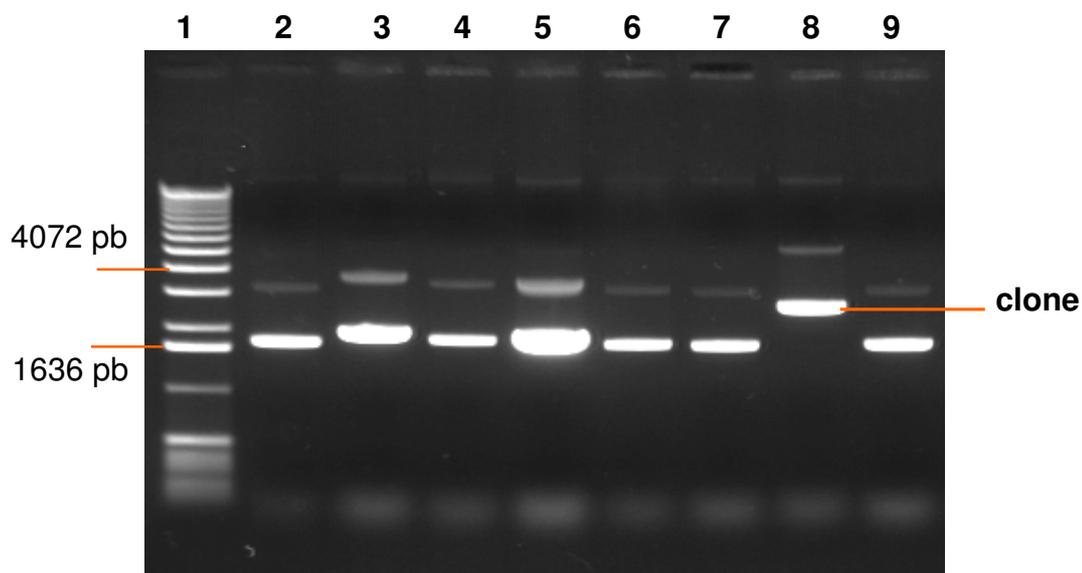


Figura 16 - DNAs minipreparação da clonagem pGem®-T Easy com a gE do VDA. Poço 1) DNA pGem®-T Easy; Poços 3 a 7 e 9) DNAs recombinantes vazios; Poço 8) DNA recombinante pGem-gE.VDA (clone).

3.3.1.2 Análise dos clones com enzima de restrição EcoR I

O gene completo da gE do VDA com 1734 pb foi amplificado por PCR com os dois sítios para EcoR I e BamH I (provenientes dos “primers”) adicionado mais 37 pb durante a amplificação da gE.VDA. Este fragmento de 1771 pb foi clonado na

região de clonagem múltipla do pGem®-T Easy, que é flanqueado pelos promotores da RNA polimerase T7 e SP6. Após a inserção do fragmento gE.VDA (1771 pb) no plasmídeo (3015 pb) temos um recombinante de 4786 pb. Os clones recombinantes foram digeridos com EcoR I que cortou o clone em seus sítios para a EcoR I (dois sítios do vetor e um sítio na gE.VDA amplificada). Com a clivagem ocorreu o corte de 21 pb entre o sítio EcoR I vetor (T7) até o sítio EcoR I no início da gE.VDA (8 pb do vetor e 13 pb do inserto). Outro corte ocorreu no sítio para EcoR I localizado na região de clonagem SP6 do vetor, o qual após a clonagem, está ligado ao final do inserto gE.VDA. Neste corte são acrescentados 14 pb do plasmídeo aos 1758 pb da gE.VDA. Como resultado das digestões com EcoR I, podemos observar no desenho esquemático um fragmento de 2993 pb (vetor), 1772 pb (inserto gE) e mais 21 oligonucleotídeos (8 pb do plasmídeo e 13 pb do inserto), que foram liberados através da digestão do clone nos três sítios para EcoR I com a enzima EcoR I. O fragmento de 21 pb liberados não pode ser visualizado no gel de agarose.

Na figura 17 o DNA plasmídeo transformante pGem-gE.VDA isolado, foi digerido com EcoR I e liberou o inserto gE.VDA de aproximadamente 1772 pb, o vetor pGem®-T Easy de 2993 pb e um pequeno fragmento de 21 pb, que não pode ser visualizado em gel de agarose. Também foram digeridos o plasmídeo pBlueScript® II (Stratagene) com 3000 pb, o vetor pGem®-T Easy vazio e um clone recombinante vazio (Figura 17).

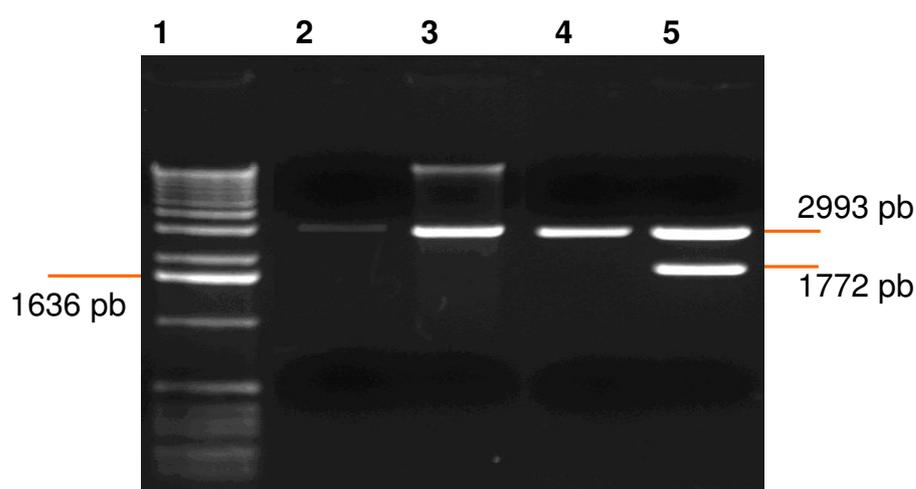


Figura 17 - Digestão de DNAs plasmídeo transformantes com EcoR I. Poço 1) Marcador 1 kb DNA Ladder; Poço 2) DNA pGem-T Easy (3015 pb); Poço 3) DNA pBlueScript II (3000 pb); Poço 4) DNA clone vazio (controle negativo); Poço 5) DNA clone pGem-gE.VDA.

3.3.1.2.1 Análise do DNA gE.VDA liberado com EcoR I, recuperado em LMP e purificado

Após identificar os clones transformantes através da digestão do clone pGem-gE.VDA com a enzima de restrição EcoR I (Figura –17), uma quantidade maior de DNA foi produzida para subclonar com o plasmídeo de expressão pFastBac1 com 4775 pb. Na figura 18 temos a digestão de uma quantia maior de DNA recombinante com EcoR I em gel de agarose LMP 1% (corrida de 18 horas a 13 v). O fragmento da gE.VDA foi recuperado do gel LMP e seu DNA foi extraído com fenol (Figura 18).

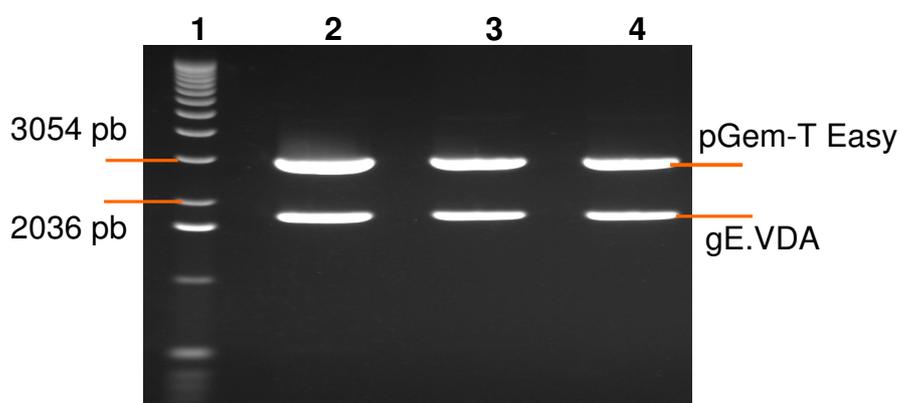


Figura 18 – Gel de agarose LMP 1% de digestão com EcoR I para recuperar gE do clone pGem-gE.VDA. Poço 1) Marcador 1 kb DNA Ladder; Poços 2 e 3) Digestão DNA pGem-gE.VDA clone T2-5; Poço 4) Digestão DNA pGem-gE.VDA clone T2c-33.

Um e meio microlitros dos DNAs gE.VDA recuperados em gel de agarose LMP e purificados foram analisados quanto sua qualidade e concentração em gel de agarose. Um e meio microlitros do vetor de expressão pFastBac™1 digerido com EcoR I também foi testado (Figura 19).

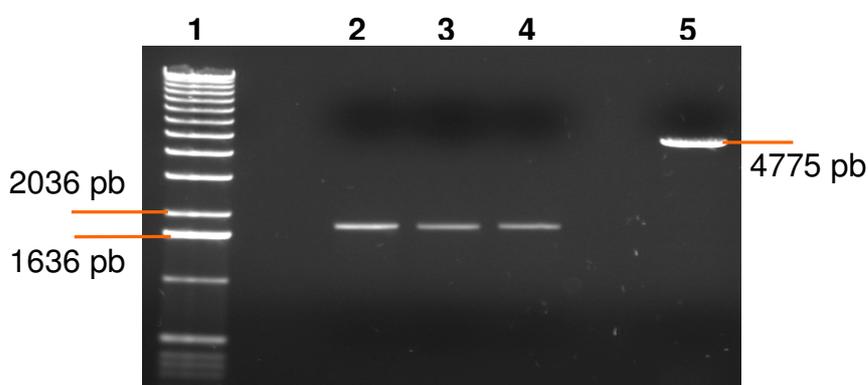


Figura 19 – Teste da qualidade e da quantidade de DNA gE.VDA recuperado do gel de agarose LMP e purificado. Poço 1) marcador de 1 kb DNA Ladder; Poço 2 e 3) DNA gE clone T2-5; Poço 4) DNA gE clone T2c-33; Poço 5) DNA pFastBac1 digerido com EcoR I.

3.3.1.2.2 Digestão do fragmento gE.VDA com a enzima de restrição Bsr I

O DNA gE recuperado do gel LPM foi clivado com enzima de restrição Bsr I e a amostra foi aplicada em gel de agarose conforme já descrito. Foram também incluídos na digestão um clone pFastBac-gE.VDA e o pFastBacTM1. A digestão do DNA gE.VDA liberou dois fragmentos de aproximadamente 950 pb e 820 pb (Figura 20). As amostras de DNA digeridas liberaram fragmentos com tamanho compatível aos simulado pelo programa NEBcutter (Figura 21). Este programa mostra os sítios de todas as enzimas de restrição que cortam a seqüência gE.

O objetivo da análise foi conferir o sítio de restrição da gE purificada com o sítio da glicoproteína E (gE) do VDA. Toda a seqüência da gE amplificada com os dois sítios de restrição (1772 pb) foi submetida BLAST (ncbi) e depois analisada pelo NEBcutter V2.0 (Figura 21).

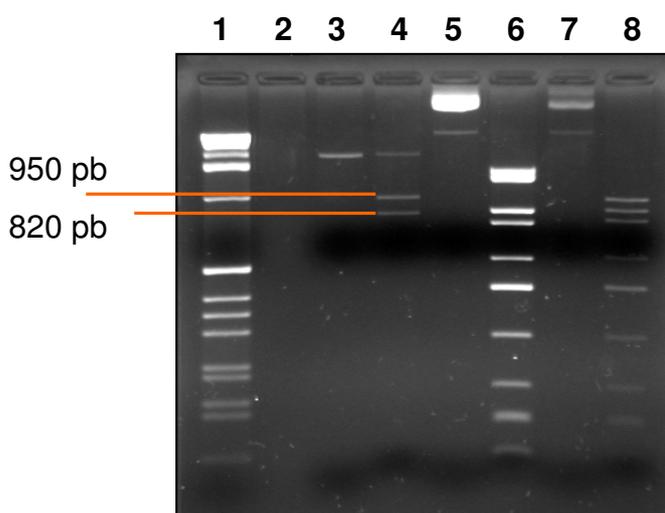


Figura 20 – Digestão de DNA com a enzima Bsr I em gel de agarose 2%. Poço 1) Marcador 1 kb DNA Ladder; Poço 3) DNA gE.VDA; Poço 4) DNA gE.VDA digerido com Bsr I; Poço 5) DNA clone pFastBac-gE; Poço 6) Clone pFastBac-gE digerido; DNA pFastBacTM1; Poço 8) pFastBacTM1 digerido.

a) Simulação do mapa de restrição com o programa NEBcutter V2.0 e da digestão do fragmento gE.VDA com a endonuclease de restrição Bsr I

- O fragmento completo da gE com 1734 pares de base submetido ao programa NEB (ANEXO D), apresentou todos os sítios de enzimas de

restrição, 577 aminoácidos (aa), GC=74% e AT=26%. O sítio para a Bsr I está localizado na altura de aproximadamente 800 pb.

- Na figura 21 é apresentado o mapa de restrição da glicoproteína gE com os dois “primers” com sítios das enzimas de restrição EcoR I e BamH I, resultou em 1772 pb. Simulação junto ao programa NEBcutter V2.0 (BioLabs) (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). O sítio para a Bsr I está localizado na altura de aproximadamente 820 pb.

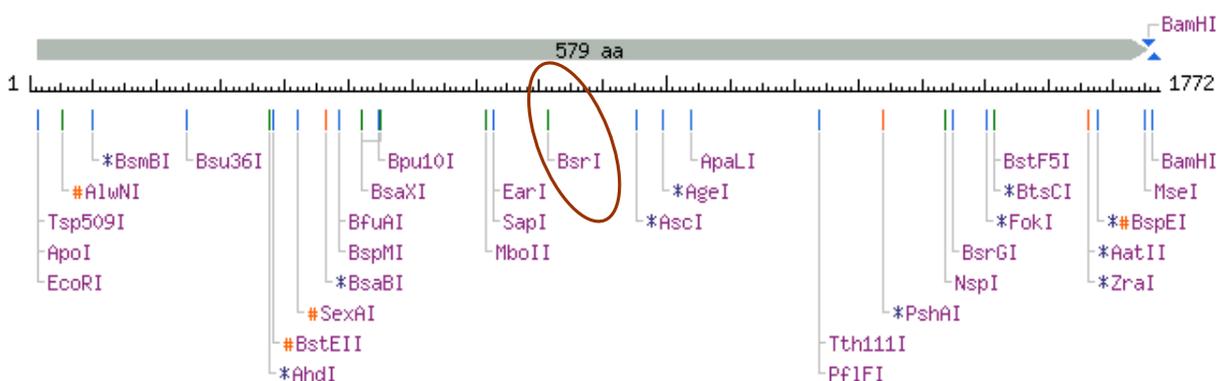


Figura 21 - Simulação mapa de restrição da glicoproteína gE com os dois “primers” com sítios de restrição EcoR I e BamH I (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). No detalhe altura do sítio da Bsr I no DNA gE com sítios de restrição.

O programa NEBcutter V2.0 mostra que a gE do VDA com 1734 pb tem sítio para a enzima Bsr I na altura de 800 pb, o que foi confirmado na clivagem do DNA gE recuperado do gel, com 1772 pb (Figura 20).

3.3.2. Subclonagem do gene gE.VDA ao vetor pFastBacTM1

Para a subclonagem do gene gE.VDA, foi utilizado um plasmídeo de expressão que possui em seu “cassete” de expressão um gene Gm^r (resistência a gentamicina), um promotor específico do baculovírus (poliedrina), um sítio múltiplo de clonagem e um sinal de parada SV40 (simian vírus 40) poly(A) inserido entre o braço (R) e esquerdo (L) do Tn7 (transposon). No ANEXO E podemos observar o desenho esquemático do plasmídeo pFastBacTM1.

Para a subclonagem do gene gE.VDA, o vetor doador de clonagem pFastBac™1 foi digerido com enzima de restrição EcoR I e analisado em gel de agarose (Figura 19) quanto sua qualidade e concentração. O fragmento correspondente ao gene gE.VDA foi ligado ao plasmídeo pFastBac™1, formando um novo plasmídeo de aproximadamente 6,553 kb, por transformação de células DH5α™, denominado pFastBac-gE.VDA, que pode ser observado na figura 22. A figura 22 representa um gel de agarose com amostras de DNA preparadas por minipreparação resultantes da clonagem da gE.VDA com o pFastBac™1. A amostra de DNA recombinante apresenta altura maior que os demais DNAs testados.

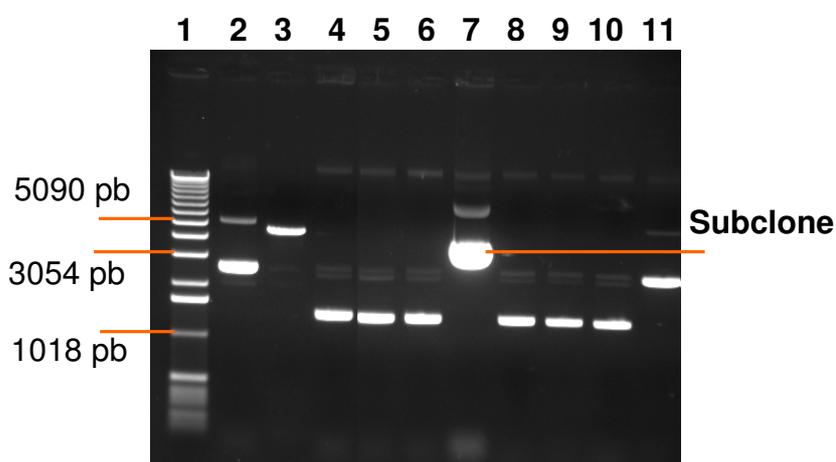


Figura 22 – Gel de agarose 0,8% de amostras de DNA da minipreparação dos subclones pFastBac-gE.VDA. Poço 1) Marcador 1 kb DNA Ladder; Poço 2) DNA pFastBac™1 circular; Poço 3) DNA pFastBac™1 digerido com EcoR I; Poços 4 a 6 e 8 a 11) DNAs recombinantes vazios; Poço 7) DNA recombinante (clone pFastBac-gE.VDA).

3.3.2.1 Análise do DNA do subclone pFastBac-gE.VDA

O subclone pFastBac-gE.VDA foi analisado quanto sua orientação dentro do plasmídeo com BamH I (Figura 23). Após a análise da orientação da gE do VDA dentro do vetor, o recombinante com o gene gE.VDA na orientação correta dentro do plasmídeo foi utilizado para a subsequente transformação de células competentes DH10Bac™ através da transposição dentro do “bacmid”.

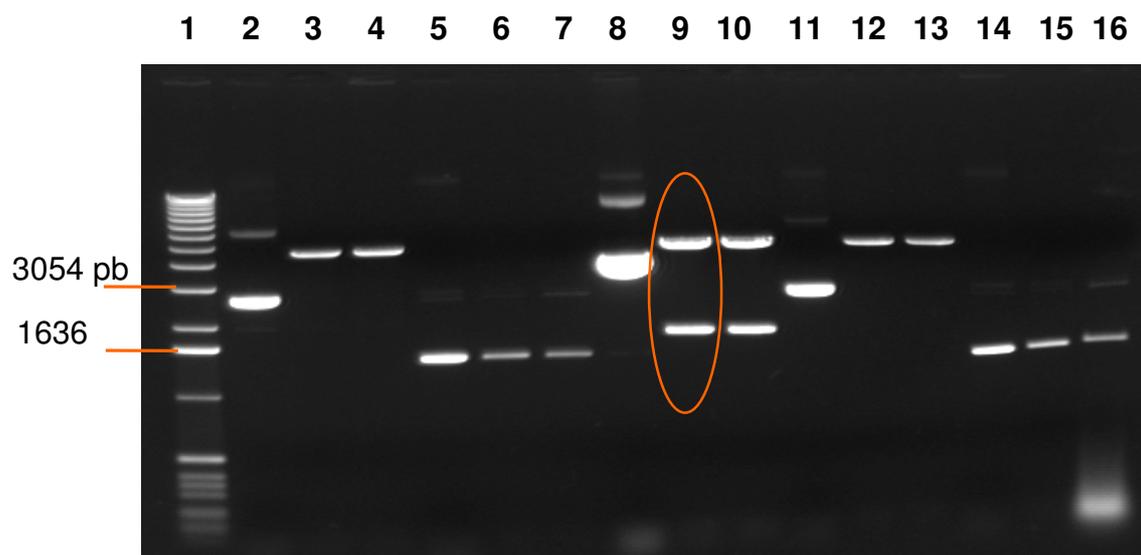


Figura 23- Gel de agarose 0,8% do DNA plasmideal, do recombinante vazio e do recombinante pFastBac-gE.VDA. Cada DNA foi testado na forma circular, digerido com BamH I e com EcoR I, respectivamente. Poço 1) Marcador 1 kb DNA Ladder; Poço 2 a 4) DNA pFastBac™1 (circular, xBamH I e xEcoR I, respectivamente); Poços 5 a 7, 11 a 13 e 14 a 16) DNAs subclone recombinante vazio (circular, xBamH I e xEcoR I, respectivamente); Poços 8 a 10) DNA recombinante pFastBac-gE.VDA (circular, xBamH I e xEcoR I, respectivamente). No detalhe clone com o recombinante na orientação correta.

Dois microlitros do DNA recombinante pFastBac-gE.VDA e 2 μ l do DNA pFastBac™1 foram analisados quanto sua qualidade e concentração em gel de agarose (Figura 24).

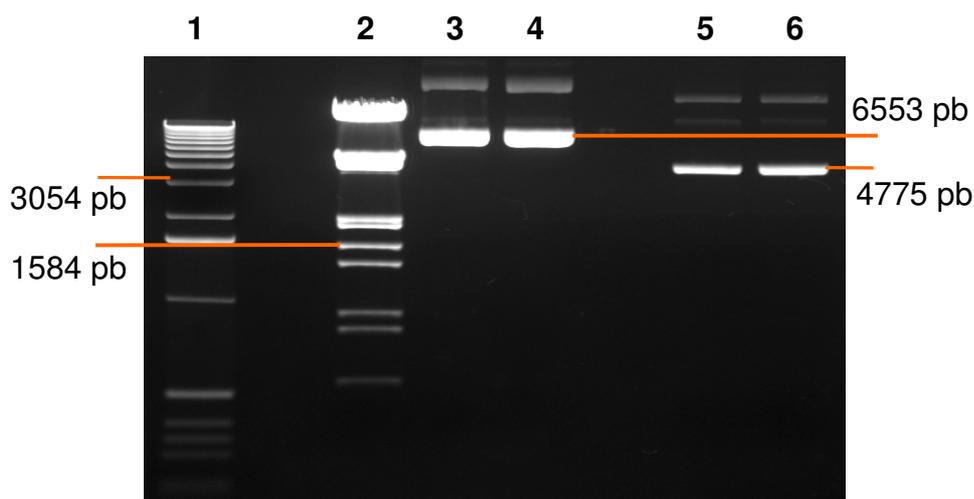


Figura 24 - Teste da qualidade e concentração do DNA recombinante pFastBac-gE.VDA em gel de agarose 1%. Poço 1) Marcador 1 kb DNA Ladder; Poço 2) Marcador Lambda DNA EcoR I + Rind III; Poços 3 e 4) DNA subclone PfastBac-gE.VDA; Poços 5 e 6) DNA pFastBac™1.

3.4 MONTAGEM DO BACULOVÍRUS RECOMBINANTE “BACMID” COM O SUBCLONE pFASTBAC-gE.VDA POR TRANSPOSIÇÃO

O gene completo da gE do VDA foi inserido sob o comando do promotor da poliedrina no vetor pFastBac™1 durante a subclonagem. Dentro das células hospedeiras *E. coli* DH10Bac™ (Invitrogen™) na transposição, ocorreu a recombinação homóloga entre as regiões do plasmídeo vetor recombinante (pFastBac-gE.VDA) e do genoma viral (“bacmid”), ocorrendo a troca de regiões homólogas entre o DNA plasmídeo e o DNA do vírus recombinante AcMNPV (sem o gene da poliedrina).

O “bacmid”, um vetor de transporte de baculovírus, foi inserido em células hospedeiras de *Escherichia coli* DH10B™, para se propagar junto com essas bactérias. A linhagem celular de *E. coli* com o bacmid foi denominada de DH10Bac™. O “bacmid” do kit “Bac-to-Bac® Baculovirus Expression Systems” (Invitrogen™) foi produzido (montado) com o “replicon” mini-F de baixo número de cópias (células *E. coli* DH5OαF’IQ foram usadas como a fonte de DNA plasmídeo F’); com um plasmídeo helper (que confere resistência à tetraciclina e codifica a enzima transposase); um marcador selecionável de resistência a kanamicina (Tn903) e um segmento de DNA que codifica o peptídeo *lacZα*. Inserido no N-terminal do gene da *lacZα* há uma pequena região de ligação para o transposon bacteriano Tn7, denominada de mini-attTn7 (um sítio marcado para o Tn7 com 112 pb). Todos os componentes estão inseridos no lócus da poliedrina do AcMNPV.

Células bacterianas *E. coli* DH10B™ têm em seu genótipo uma deleção para a β-galactosidase. A porção amino-terminal da β-galactosidase codificada pela região *lacZα* do “bacmid” é capaz de uma complementação intra-alélica com a forma defectiva da β-galactosidase. Em função disso, o “bacmid” é propagado em *E. coli* como um plasmídeo grande que confere resistência a kanamicina, pode complementar uma deleção presente da *lacZ* no cromossomo para formar colônias azuis na presença do substrato cromogênico X-gal (USB) e do indutor da cor IPTG (Sigma®).

O vetor recombinante pFastBac-gE.VDA, contendo o plasmídeo doador com o Tn7, o promotor da poliedrina e o gene gE.VDA, foi transformado através de células hospedeiras *E. coli* DH10BAC™ (Invitrogen™), por transposição dentro do “bacmid”. A construção do “bacmid” recombinante ocorreu pela transposição do elemento Tn7

do plasmídeo doador pFastBac™1, que está subclonado ao fragmento gE.VDA, para a região de ligação (“attachment site”) mini-attTn7 no “bacmid” quando a função de transposição do transposon Tn7 foi providenciada “in trans” pelo plasmídeo “helper”.

3.4.1 Resultado da seleção dos “bacmid” recombinantes pelo fenótipo das colônias bacterianas

Uma vez que *E. coli* clonadas tenham o DNA “bacmid” recombinante, elas adquirem resistência marcada para antibióticos e perdem o marcador *lacZ*, e portanto podem ser facilmente selecionadas e identificadas. Um único DNA viral isolado do clone bacteriano positivo e o uso deste “bacmid” DNA para transfectar células de inseto, produzirão o vírus recombinante de interesse (LUCKOW et al., 1993).

A transposição foi confirmada pelo fenótipo das colônias bacterianas crescidas em agar LB com X-gal e IPTG com antibióticos, conforme já descrito. Na figura 25 observa-se colônias azuis não transformantes. Colônias contendo o “bacmid” recombinante têm fenótipo branco devido a ruptura do gene da *lacZ α* na posição N-terminal. A ruptura ocorre durante a transposição, quando o plasmídeo recombinante se insere no “bacmid”, deslocando o gene da *lacZ α* .

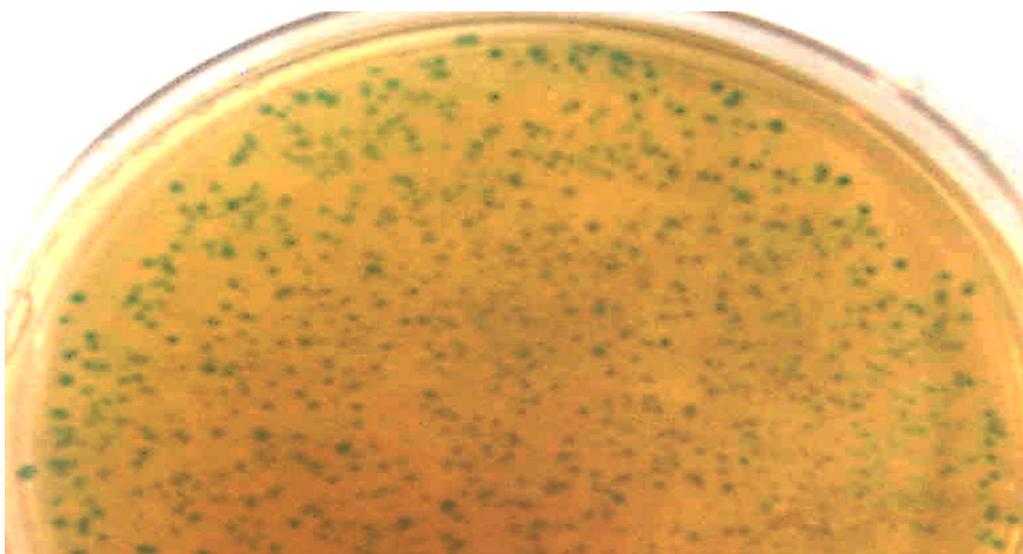


Figura 25 – Placa agar LB com X-gal e IPTG: Transposição do subclone pFastBac-gE.VDA e do “bacmid” em células competentes *E. coli* DH10Bac™. Colônias recombinantes vazias têm fenótipo azul e o colônias brancas contêm recombinante pFastBac-gE.VDA dentro do “bacmid”.

3.4.1.1 Isolamento do DNA recombinante por minipreparação de plasmídeos grandes

O DNA das colônias recombinantes brancas (com inserto), uma colônia azul (clone vazio) e uma colônia do controle da transposição, o pFastBac™-Gus, foram extraídos por minipreparação de DNAs grandes.

Os DNAs das colônias recombinantes foram isolados e usados para co-transfectar células de inseto.

3.4.1.1.1 Análise do DNA recombinante por eletroforese

A análise dos DNAs foi realizada por eletroforese em gel de agarose, conforme mostra a figura 26 A e B.

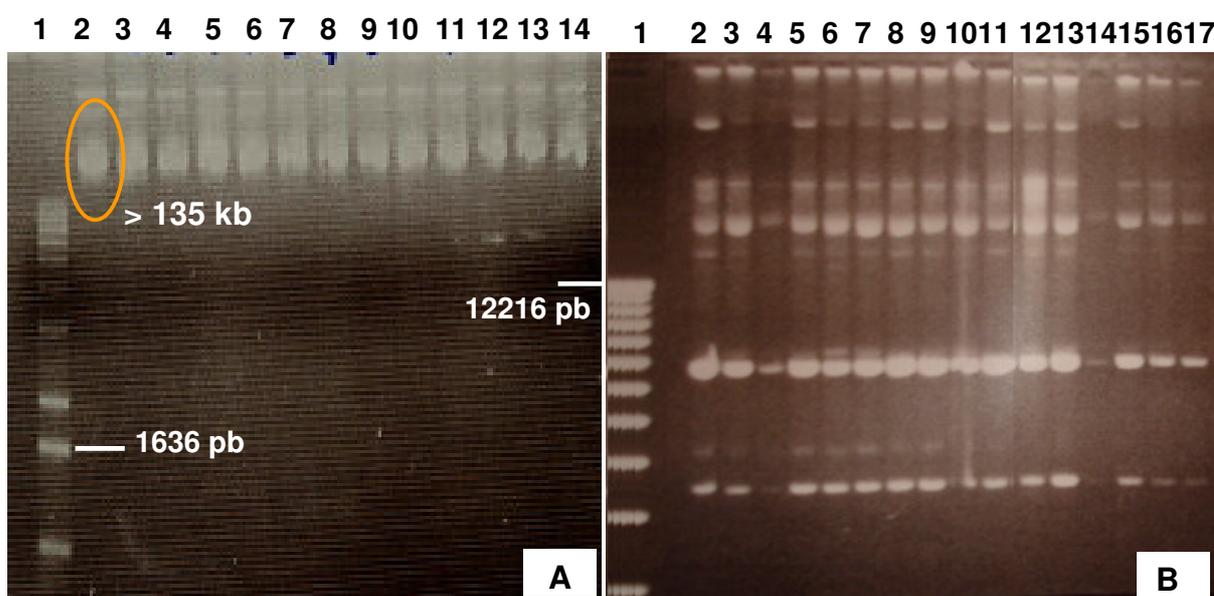


Figura 26 – Análise em gel de agarose 0,5% da minipreparação de DNAs “bacmid” da transposição.
Gel A - corrida 90 v por 90 minutos: Poço 1) Marcador 1 kb DNA Ladder; Poços 2 a 11) Amostras de DNA recombinantes bacmid.pFastBac-gE.VDA; Poço 12) Amostra de DNA recombinante vazio (bacmi-pFastBac-colônia azul); Poço 13) DNA recombinante bacmid.pFastBac-Gus (controle da transposição); Poço 14) DNA “bacmid”.
Gel B - corrida 23 v por 12 horas: Poço 1) Marcador 1 kb DNA Ladder; Poço 2) DNA recombinante bacmid.pFastBac-Gus (controle da transposição); Poço 3) Amostra de DNA recombinante vazio (bacmi-pFastBac-colônia azul); Poços 4 a 17) Amostras de DNA recombinantes bacmid.pFastBac-gE.VDA.

3.4.1.1.2 Análise do DNA recombinante por PCR

O DNA recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA foi testado em reações de PCR usando os mesmos “primers” (PF.gE sítio EcoR I e PR.gE sítio BamH I) e as mesmas condições utilizados para amplificar a glicoproteína gE do VDA. Também foram testados DNA do pFastBac™-Gus e o DNA de uma colônia azul (clone vazio, sem inserto) usada como controle negativo na transposição com o “bacmid” (Figuras 27 e 28).

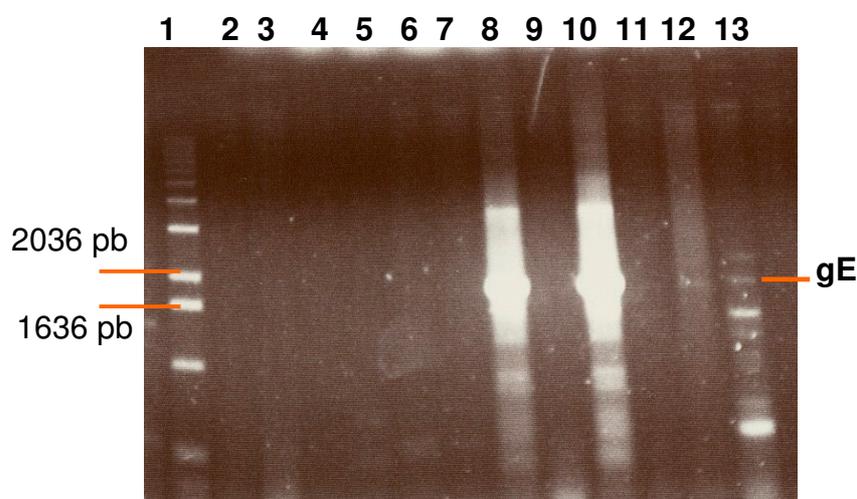


Figura 27 - Gel de agarose das reações da PCR com amostras de DNAs de colônias da transposição pFastBac-gE.VDA com o “bacmid”. Poço 1) Marcador 1 kb DNA Ladder; Poços 2 a 7, 9, 11 e 12) Reações PCR com **DNA recombinante** sem amplificação; Poços 8, 10 e 13) Reações PCR com **DNA recombinante** com amplificação da gE.VDA.

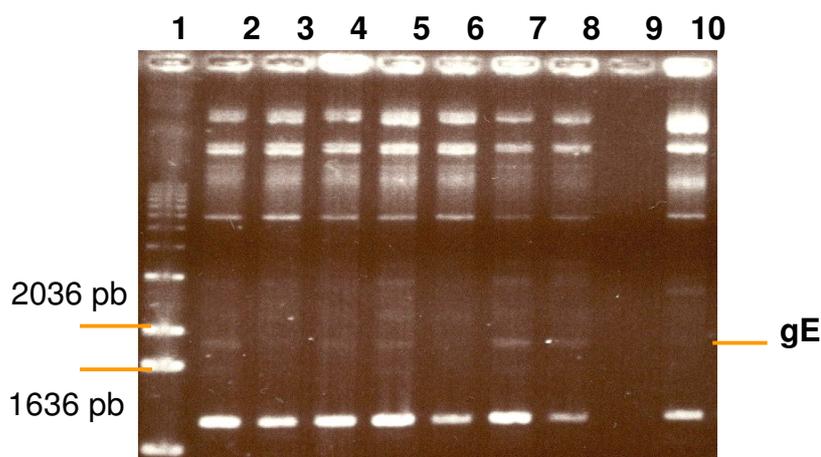


Figura 28 - Gel de agarose das reações da PCR com amostras de DNAs de colônias da transposição pFastBac-gE.VDA com o “bacmid”. Poço 1) Marcador 1 kb DNA Ladder; Poços 2, 4, 5, 7 e 8) Reações PCR com **DNA recombinante** com amplificação da gE.VDA; Poços 3 e 6) Reações PCR com **DNA recombinante** sem amplificação; Poço 9) Reação PCR com água Milli Q estéril no lugar do DNA (controle da PCR); Poço 10) Reações PCR com **DNA recombinante bacmid.pFastBac-Gus** (controle da transposição).

3.5 CO-TRANSFEÇÃO – INTRODUÇÃO DO DNA RECOMBINANTE BACMID.pFASTBAC-gE.VDA DENTRO DE CÉLULAS DE INSETO E EXPRESSÃO DO GENE HETERÓLOGO.

Lipídeos sintéticos foram especificamente projetados para formar lipossomos (vesículas lipídicas esféricas fechadas) (STRYER, 1988) positivamente carregados que espontaneamente interagem com DNA ou RNA (O'REILLY et al., 1992). E, portanto, o uso de lipossomos catiônicos pode facilitar a introdução de ácidos nucléicos dentro de células eucarióticas (ALBERTS et al., 1999).

Quando este reagente é misturado com uma solução de DNA, todo o DNA é ligado ao lipossomo. Somado a isso (O'REILLY et al., 1992), quando o complexo lipossomo-DNA é adicionado às células, o lipossomo liga-se à superfície negativamente carregada da célula. Os lipossomos então, se fusionam com a membrana celular, introduzindo eficientemente o DNA dentro da célula hospedeira (O'REILLY et al., 1992).

O DNA do vírus recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA foi tratado com lipofectin (lipossomo) e co-transfectado em células BTI-Tn5B1-4. O gene gE.VDA foi colocado sob comando do promotor da poliedrina desta forma, dentro das células de inseto o vírus recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA expressa a glicoproteína gE e não expressa a poliedrina (o gene foi deletado). Nas figuras 29 e 30 observa-se as células infectadas com vírus selvagem e recombinante.

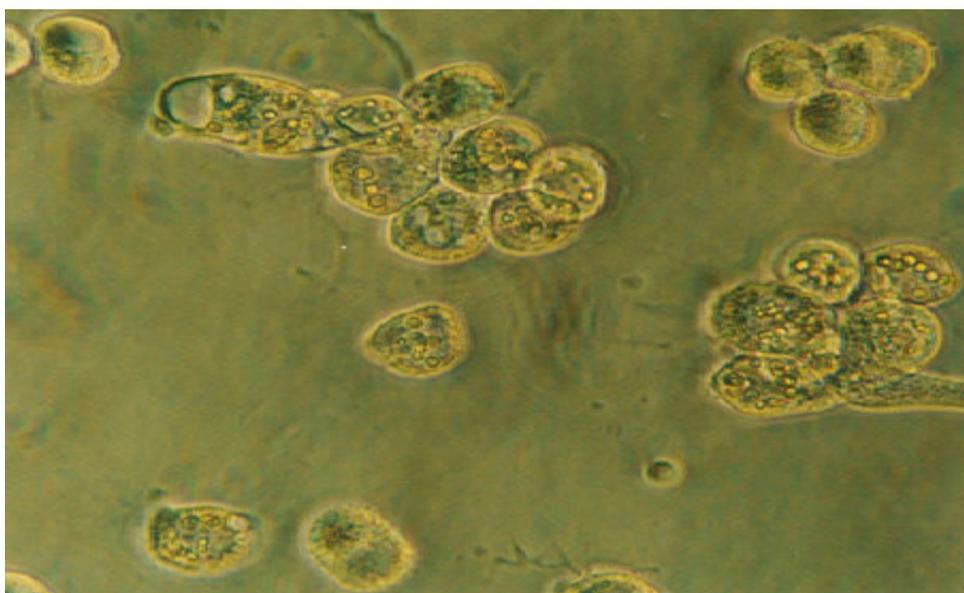


Figura 29 – Fotografia ao microscópio invertido de células BTI-TN5B1-4 infectadas com vírus selvagem AcMNPV. Observa-se núcleo celular repleto de poliedros.

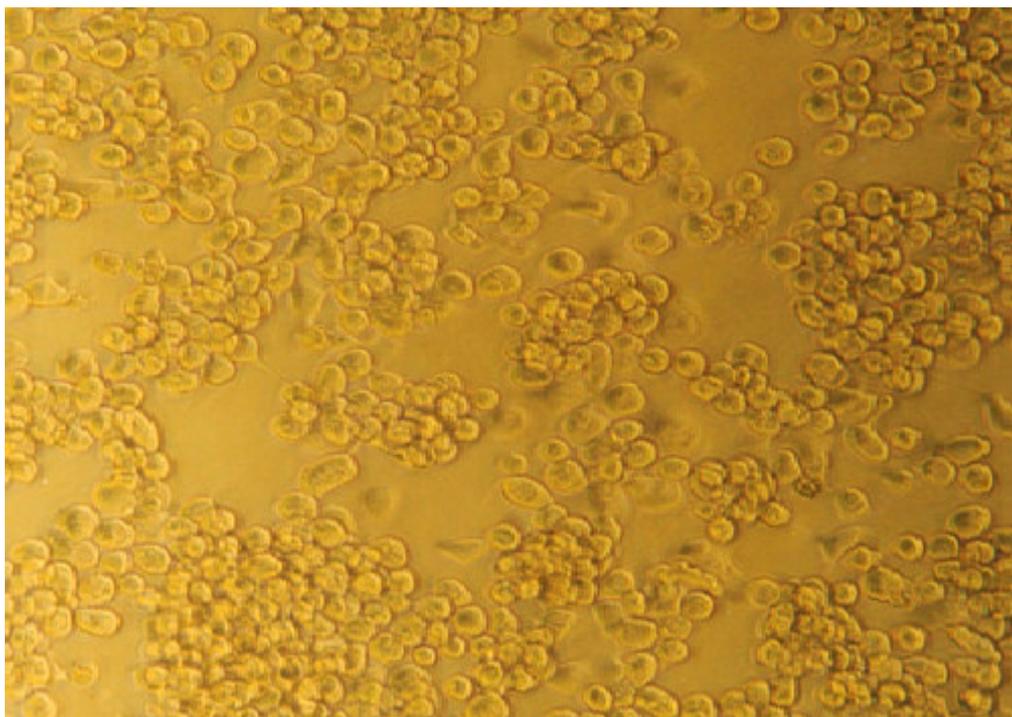


Figura 30 – Fotografia ao microscópio invertido de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com vírus recombinante bacmid-pFastBac.gE.VDA. Observa-se ECP no núcleo celular sem a formação de poliedros.

Cinco dias pós-infecção as células e o sobrenadante foram colhidos e recuperados por centrifugação, conforme descrito anteriormente. O sobrenadante com o vírus recombinante foi recuperado e armazenado a 4 °C. O título viral esperado da co-transfecção inicial é de 2 a 4 x 10⁷ pfu/ml . Os “pellets” celulares foram preparados e aplicados em gel de poli-acrilamida, conforme descrito anteriormente e de um mililitro do sobrenadante viral foi extraído o DNA do recombinante.

3.5.1 Análises dos vírus recombinantes expressos em células de inseto

3.5.1.1 Análises pela PCR

As amostras de DNA dos vírus recombinantes obtidas da co-transfecção foram analisadas pela PCR com os mesmos “primers” e condições da amplificação da gE do VDA. Também foram testadas amostras de DNA bacmid recombinante do

FastBac™-Gus e o DNA de uma colônia azul (clone vazio, sem inserto) co-transfectada como controle negativo (Figura 31).

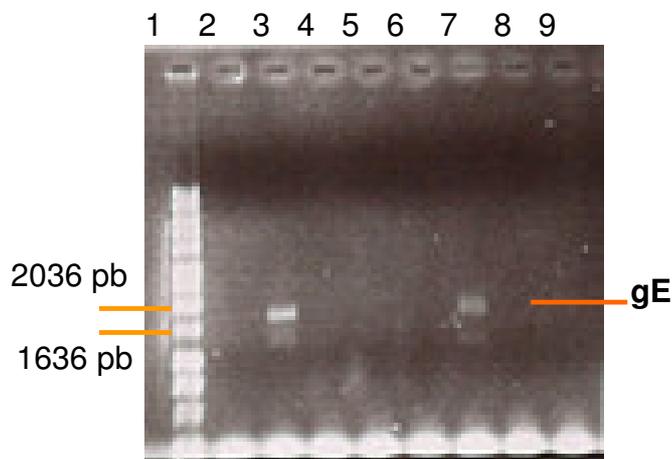


Figura 31 - Gel de agarose da PCR com DNAs dos vírus "bacmid" recombinantes da co-transfecção. Poço 1) Marcador 1kb DNA Ladder; Poços 2, 4 a 6) Reações PCR com DNAs de vírus recombinantes sem amplificação; Poços 3 e 7) Reações PCR com DNAs de vírus recombinantes com amplificação da gE.VD; Poço 8) Reação PCR com DNA não recombinante (colônia azul – clone vazio); Poço 9) Reação PCR com DNA recombinante bacmid-Gus (controle da transposição e da co-transfecção). Observa-se nos poços 3 e 7 amplificação com uma banda na altura entre 1636 e 2036 pb, tamanho compatível com o gene da gE do VDA.

3.5.1.2 Análises eletroforéticas SDS-PAGE e "Western blotting"

Células da co-transfecção, colhidas aos 5 dias pós infecção (dpi), dos vírus recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA foram analisados em gel SDS-PAGE corado com azul de Coomassie (Figura 32) e por "Western blotting" (figura 33). Também foram incluídas células de inseto BTI-Tn5B1-4 não infectadas (mock), recombinante bacmid.pFastBac-colônia azul (subclone vazio) e o recombinante bacmid-Gus (controle da transposição e da co-transfecção) Observa-se banda expressada na altura entre 82,2 kDa e 115,5 kDa nos poços com os vírus recombinantes gE.VDA, o que não é observado nos poços sem os vírus gE.VDA recombinantes.

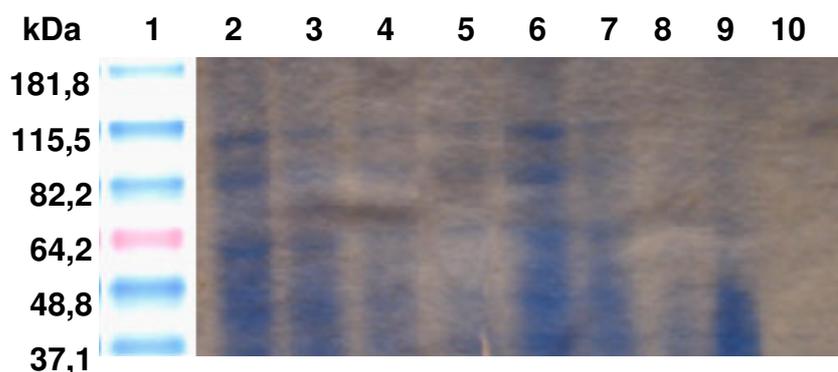


Figura 32 - Gel SDS-PAGE da co-transfecção dos vírus recombinantes bacmid.pFastBac-gE.VDA. Poço 1) Marcador de alto peso molecular Invitrogen; Poços 2 a 7) vírus recombinantes bacmid.pFastBac-gE.VDA em células de inseto e colhidas com 5 dias pi; Poço 8) recombinante bacmid.pFastBac-colônia azul (subclone vazio); Poço 9) células BTI-Tn-5B1-4 (mock); Poço 10) recombinante bacmid-Gus (controle da transposição e da co-transfecção); Observa-se banda expressada na altura entre 82,2 kDa e 115,5 kDa nos poços com os vírus recombinantes gE.VDA, o que não é observado nos poços 8 a 10.

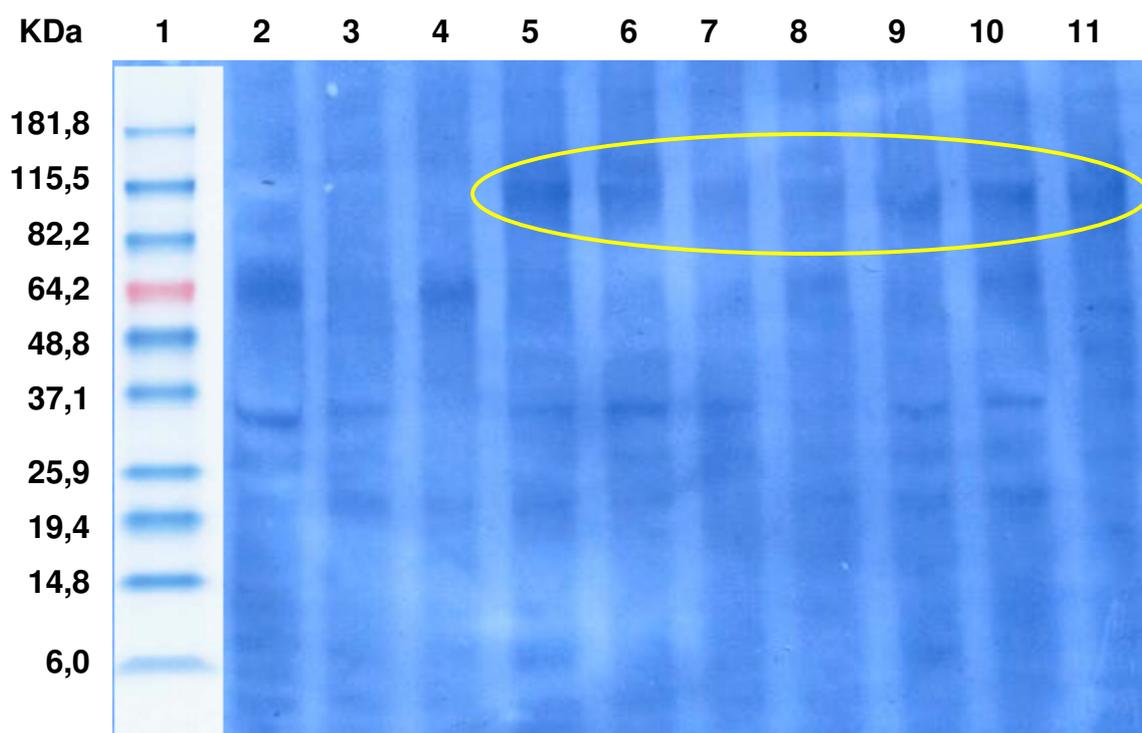


Figura 33 – “Western blotting” de recombinantes bacmid.pFastBac-gE.VDA da co-transfecção. Soro anti-gE (Idexx) doVDA diluído 1:100 e conjugado peroxidase diluído 1:7000. Poço 1) Marcador da Invitrogen de alto peso molecular; Poço 2) Células BTI-Tn5B1-4 (mock); Poço 3) Recombinante bacmid.pFastBac-colônia azul (subclone vazio); Poço 4) Recombinante bacmid-Gus (controle da transposição e da co-transfecção); Poços 5 a 11) Recombinantes bacmid.pFastBac-gE.VDA (no detalhe). Observa-se banda na altura entre 82,2 a 115,5 kDa nos poços 5 a 11, o que não é observado nos poços 2 a 4.

Na figura 34, referente ao SDS-PAGE corado com azul de Coomassie, podemos observar uma banda na altura de ~60 kDa, com o mesmo peso molecular de uma proteína celular sintetizada com este tamanho e uma banda de aproximadamente 100 kDa que pode ser a banda esperada para a expressão da glicoproteína gE do VDA. No poço referente à amostra com o vírus selvagem do VDA infectado em células SK6, também pode ser observada uma banda com altura semelhante a da gE recombinante (Figura 33).

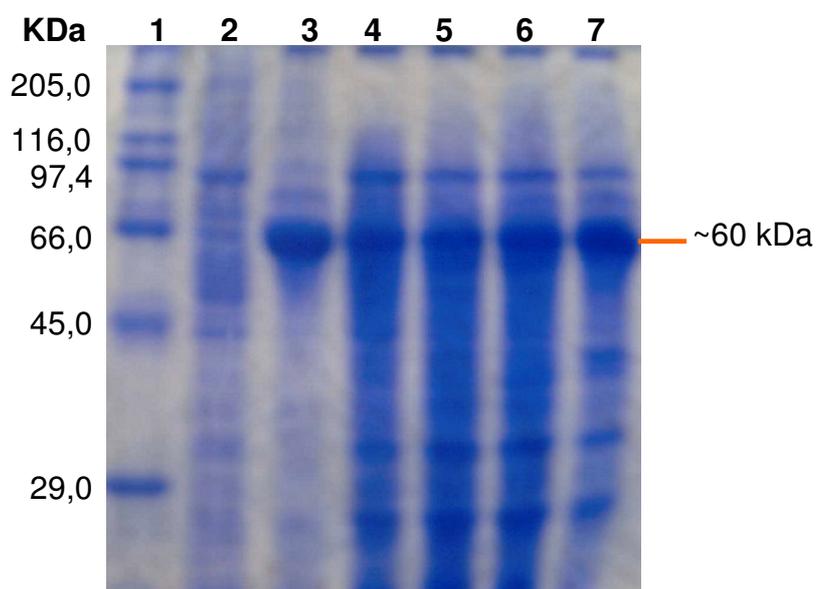


Figura 34 – Gel SDS-PAGE de infecção transiente de vírus recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA. Poço 1) Marcador de alto peso molecular Invitrogen; Poços 2 a 7) vírus recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA inoculado em células de inseto e colhidas a zero, 12, 24, 48, 72 e 96 hpi, respectivamente. Observa-se banda com alta expressão na altura de 60 kDa, referente a uma proteína celular. Banda expressada na altura de 90 kDa é compatível a altura da gE.VDA.

Em um outro “Western blotting”, no poço referente à amostra com o vírus selvagem do VDA infectado em células SK6, também pode ser observada uma banda com altura de aproximadamente 100 kDa semelhante a da gE recombinante (Figura 35).

Vírus recombinantes bacmid.pFastBac-gE.VDA com o inserto e vazio (colônia azul), vírus bacmid.pFastBac-Gus (controle da transposição e da co-transfecção) e o vírus AcMNPV (tipo selvagem com gene da poliedrina) foram usados para infectar células BTI-Tn5B1-4 e os extratos foram analisados em dois géis desnaturantes de poliácridamida SDS-PAGE a 12%. Foram analisados, também, um extrato de células BTI-Tn5B1-4 não infectadas (controle) e células SK-6 infectadas com o vírus

selvagem VDA. Um gel foi corado e fixado em solução azul de Coomassie e o outro foi utilizado para transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose para imunodeteção. Foram utilizados como imunomarcadores o anticorpo anti-gE do VDA (Idexx) (Figura 35), anticorpo policlonal anti-VDA e soro SPF negativo para anticorpos anti-PRV (Figura 36).

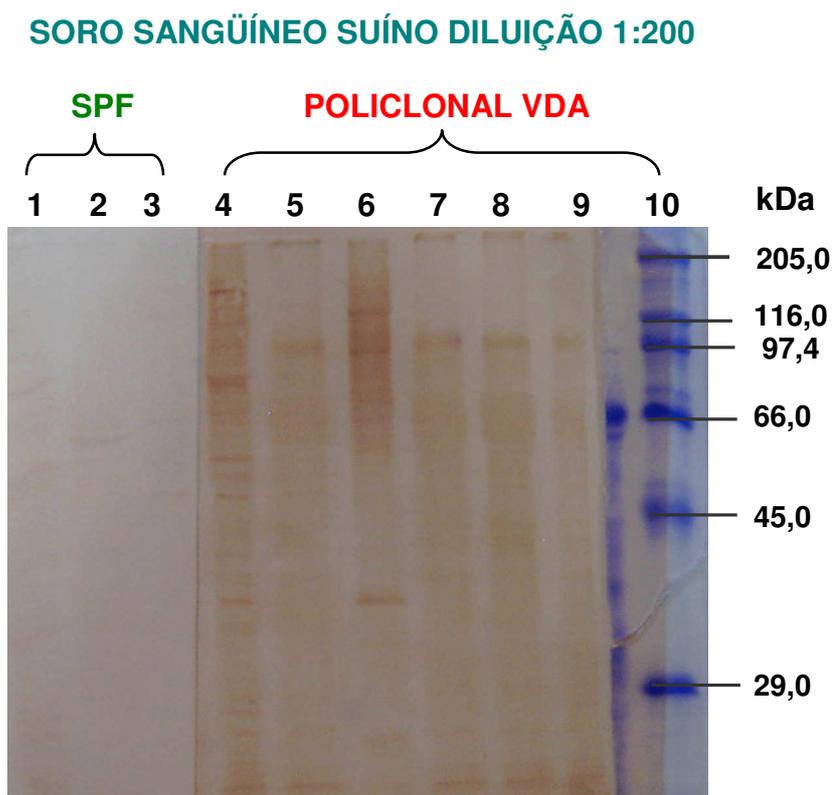


Figura 35 - “Western blotting” de recombinantes bacmid.pFastBac-gE.VDA da infecção em células de inseto. Soro policlonal anti-VDA (Cedisa) e SPF (Embrapa) diluídos 1:200. Conjugado peroxidase diluído 1:4000. Poços 1 e 4) células TN5B não infectadas (mock); Poços 2, 5, 7 a 9) vírus recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA com 96 hpi; ; Poço 3 e 6) vírus VDA com 96 hpi em células SK6; Poço 10) marcador de alto peso molecular (Sigma®). Observa-se banda na altura de 97 kDa do marcador, nos poços 5 a 9 (com soro policlonal para VDA diluído 1:200. No poço 4 (com células não infectadas) e na presença de policlonal VDA como também nos poços 1 a 3, onde foi usado soro suíno SPF, não se observa banda na mesma altura encontrada nos poços com recombinantes e soro com anticorpos contra o VDA.

A imunodeteção com anticorpos anti-gE do VDA foi capaz de detectar uma banda entre 82,2 kDa e 115,5 kDa (Figura 35) nas amostras correspondente ao extrato de células infectadas com o vírus bacmid.pFastBac-gE.VDA. O “Western blotting” com anticorpo anti-VDA (policlonal), também detectou uma banda a uma altura correspondente a citada acima, o que não foi observado nos poços

correspondentes ao extrato celular não infectado (controle celular), ao bacmid.pFastBac-Gus, bacmid.pFastBac-gE⁻ (colônia azul/clone vazio) e com o AcMNPV (tipo selvagem). Também na membrana incubada com soro suíno SPF (livre de anticorpos para o VDA) não foram visualizadas bandas na mesma altura da gE (~90 kDa) (Figuras 35 e 36). Na figura 36 podemos observar um “western blotting” usando como primeiro anticorpo um soro suíno negativo (SPF) para o VDA e um soro suíno positivo policlonal para a DA.



Figura 36 - “Western blotting” de recombinantes bacmid.pFastBac-gE.VDA da infecção em células de inseto. Soro policlonal anti-VDA (Cedisa) e SPF (Embrapa) diluídos 1:250. Conjugado peroxidase diluído 1:4000. Poços 1 e 9) vírus recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA com 72 hpi; Poços 2) recombinante bacmid.pFastBac-colônia azul (clone vazio); Poços 3) células TN5B não infectadas (mock); Poços 4) vírus recombinante bacmid.pFastBac-Gus (controle); Poços 5) vírus selvagem AcMNPV; Poços 6) vírus VDA com 48 hpi em células SK6; Poços 7 e 8) vírus recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA com 120 e 96 hpi, respectivamente; Poço 10) marcador de alto peso molecular (Sigma®). Observa-se banda na altura de 97 kDa do marcador, nos poços com recombinante bacmid.pFast-gE.VDA e com soro policlonal para VDA diluído 1:250. Nos poços sem recombinantes gE.VDA e com soro policlonal para VDA diluído 1:250 ou nos poços com as amostras incubadas com soro SPF não se observa banda na mesma altura encontrada nos poços com recombinantes e soro com anticorpos contra o VDA.

Foi observado nos géis SDS-PAGE e nos “Western blotting” várias outras bandas de diferentes alturas, além da gE.VDA, nos géis e nas membranas incubadas com soro anti-gE, policlonal anti-VDA ou mesmo SPF. Para melhorar a

especificidade, futuramente, os recombinantes serão testados sob diferentes concentrações de soro, conjugado, tempo de incubação, bem como outros tipos e concentrações de bloqueadores de membrana.

Futuramente, serão realizados “western blotting” utilizando-se anticorpo produzido de inoculações em camundongos com glicoproteína gE recuperada em gel de poliacrilamida (experimento em andamento). Espera-se que a imunomarcação com este anticorpo revelará uma banda de ~90 kDa correspondente ao extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com o vírus bacmid.pFastBac-gE.VDA, mostrando a especificidade do anticorpo à glicoproteína expressada pelo vírus em células de inseto.

3.7 Produção de estoque viral recombinante.

O estoque viral obtido da co-transfecção dos recombinantes em células de inseto, com um título estimado de 2×10^7 pfu/ml, foi inoculado usando uma MOI de 1 vírus/célula em BTI-Tn5B1-4. O material foi colhido com 7 dias pós infecção, após a morte celular, que é considerado o melhor momento de colher os recombinantes BVs (“budded virus”). Os vírus colhidos pós-infecção usualmente resulta em uma amplificação de 2 log, ficando portanto com um título aproximado de 2×10^9 pfu/ml. O sobrenadante foi armazenado a 4 °C ao abrigo da luz. Também foram amplificados e estocados os vírus controle (o recombinante bacmid-vazio e o bacmid-Gus).

3.8 Produção de proteína heteróloga secretada em células de inseto

Células de inseto BTI-Tn5B1-4 foram inoculadas usando uma MOI de 10 vírus/célula em BTI-Tn5B1-4. O extrato celular e o sobrenadante foram colhidos após 96 hpi. Este momento foi determinado por se obter maior expressão da glicoproteína. O sobrenadante foi armazenado a 4 °C. Para confirmar a secreção da gE o “pellet” celular foi analisado por “Western blotting” (Figura 37).

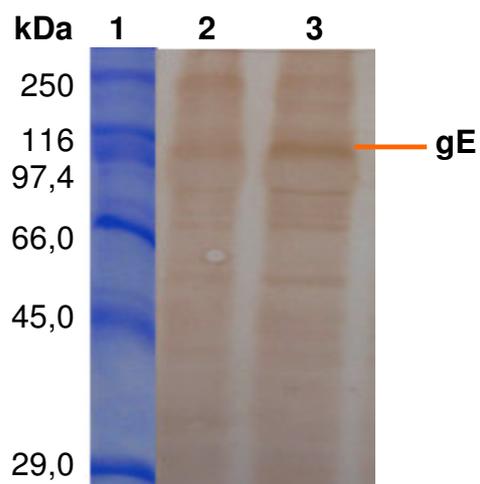


Figura 37 – Análise por “Western blotting” do extrato celular da produção de proteína recombinante gE.VDA em células de inseto BTI-Tn5B1-4. Poço 1) Marcador de alto peso molecular (Sigma®); Poços 2 e 3) Extrato celular da produção de vírus recombinante bacmid.pFastBac-gE.VDA.

4 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi clonado um fragmento de DNA (1,78 kb), amplificado pela PCR, contendo todo o gene da glicoproteína E (gE) do vírus da doença de Aujeszky (VDA) também denominada de pseudo-raiva (PRV) no genoma do baculovírus recombinante “bacmid” do AcMNPV, visando sua expressão em células de insetos. Para a estratégia de clonagem foram usados dois tipos de vetores.

Para a clonagem foi escolhido o vetor “pGem®-T Easy Vector Systems” (Promega) por facilitar a clonagem de produtos da PCR. O vetor pGem®-T Easy é preparado pela digestão com EcoR V e adição, nas duas terminações 3', uma timidina (T). A presença de uma 3'-T na região projetada de clonagem melhora a eficiência de ligação de produtos da PCR dentro do plasmídeo por prevenir a recircularização do vetor e por prover uma projeção compatível (uma timidina) para produtos da PCR gerados por polimerases termoestáveis, as quais adicionam um nucleosídeo ao final da amplificação da PCR, uma adenosina (A). O vetor pGem®-T Easy possui um promotor da RNA polimerase, em cada uma de suas extremidades (o T7 e o SP6) e dentro da região de clonagem múltipla do vetor estão inseridos sítios múltiplos para enzimas de restrição, entre elas a EcoR I, a qual está inserida nas duas extremidades do vetor.

Para a expressão, foi escolhido o kit “Bac-to-Bac® Baculovirus Expression Systems” (Invitrogen™) foi escolhido por conter o vetor de clonagem pFastBac™1 que possui o mini-Tn7 (que permite a transposição no genoma do baculovírus através do sítio de ligação denominado mini-attTn7) e entre os braços direito e esquerdo do Tn7 (transposon) tem um promotor forte (promotor do gene da poliedrina), além de uma região de inserção do gene β -galactosidase, o qual confere cor azul às colônias crescidas em meio com o indutor X-gal/IPTG. Quando o vetor recebe o inserto (gE) interrompe o gene da β -galactosidase, conferindo uma coloração branca às colônias com o recombinante. O kit é composto, ainda de células competentes DH10Bac™ que carregam o “bacmid”, um vetor de transporte de

baculovírus, que contém parte do genoma codificando a β -galactosidase e um sítio de ligação (mini-attTn7) que recebe o mini-Tn7 do pFastBac-gE.VDA quando ocorre a transposição através da enzima transposase fornecida pelo plasmídeo “helper”, que também está inserido no “bacmid”. Durante a inserção da região mini-Tn7 com a gE.VDA inserida no N-terminal do *lacZ*, há o deslocamento da região que codifica o gene da β -galactosidase. Conseqüentemente, colônias bacterianas com o inserto gE.VDA não produzirão cor azul, quando crescidas com o cromógeno X-gal e o indutor IPTG. Este fenótipo permite diferenciar colônias com o inserto das que não o receberam, por não ter ocorrido a transposição do subclone pFastBac-gE.VDA. Se não há transposição, as colônias DH10Bac™ mantêm o gene *lacZ* conservado.

O DNA do “bacmid” quando co-transfectado em células de inseto produz vírus recombinante que induz a formação de efeito citopático sem poliedros, expressando a proteína de interesse.

A glicoproteína E (gE) do vírus da doença de Aujeszky expressa em células de inseto será utilizada para produção de anticorpos monoclonais, para a produção de um ELISA usando a gE como antígeno e para, a provável produção de conjugação do anticorpo monoclonal gE com peroxidase, para ser usado como anti-igG (anticorpo secundário) em testes sorológicos.

O que foi desenvolvido neste trabalho servirá, também, como base para novas investigações e continuação do projeto de desenvolvimento de um ELISA para identificar anticorpos anti-gE do vírus da doença de Aujeszky. O ELISA a ser desenvolvido pretende utilizar a gE conjugada com a glicoproteína I (gI) do VDA. O preparo de ensaios imunoenzimáticos que utilizem somente partes específicas e não infecciosas de patógenos, além de melhorar a sensibilidade e especificidade do teste sorológico, poderá ser usado em áreas livres ou em erradicação da doença de Aujeszky, pois conterà como antígeno, apenas duas glicoproteínas não essenciais para o VDA, a glicoproteína E e a glicoproteína I e não o vírus inteiro infectivo.

Em uma segunda fase deste projeto a gE será co-transfectada com a gI do VDA. As duas glicoproteínas expressas serão usadas como antígeno para a produção de anticorpos monoclonais e produção de um ELISA com as gE/gI conjugadas como antígeno. Essas duas glicoproteínas fazem uma ligação não covalente e quando se pretende identificar anticorpos anti-gE do VDA, a associação desses dois antígenos (gE/gI) melhora o reconhecimento de anticorpos anti-gE com mais especificidade.

O presente projeto proporcionou também, dados técnicos importantes sobre amplificação pela PCR, a otimização de protocolos para a produção de células competentes, identificou as melhores técnicas e vetores de clonagem de produtos da PCR, procedimentos de rotina com células de inseto e conseqüente produção de proteínas recombinantes viabilizada pelo uso de vetores de expressão apropriados.

A engenharia genética com uso criterioso dentro do ambiente laboratorial, permite construir recombinantes que expressem somente proteínas virais de interesse, as quais substituem partículas virais inteiras, quando do preparo de imunoenaios ou produtos afins. Esta tecnologia permite preparar kits de diagnóstico para agentes patogênicos sem que haja risco de disseminar o microorganismo no ambiente laboratorial ou no meio ambiente, o que assegura o uso desses ensaios de diagnóstico em áreas livres ou em erradicação para tal enfermidade.

CONCLUSÕES

Conclui-se que os resultados obtidos alcançaram os objetivos principais.

- O gene completo da gE do VDA tem 1734 pb e na amplificação pela PCR com os dois “primers” iniciadores desenhados, resulta em um fragmento de tamanho de 1771 pb;
- A clonagem do gene do VDA ao vetor pGem®-T Easy foi confirmada com a enzima EcoR I, liberando dois fragmentos (gene gE e vetor) e o fragmento gE do VDA quando digerido com a enzima Bsr I corta o gene na altura de 820 pb, liberando dois fragmentos de tamanho, compatível ao esperado pela simulação com o programa NEBcutter V2.0;
- O subclone gerado da inserção da gE do VDA no vetor de expressão (pFastBac™1) foi confirmado em sua correta orientação dentro do plasmídeo com a enzima BamH I;
- O subclone gE do VDA transposto no vírus recombinante “bacmid” foi confirmado pelo fenótipo branco das colônias bacterianas e pela PCR;
- O gene gE do VDA inserido após o promotor da poliedrina no “bacmid” foi co-transfectado em células de inseto *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4) e sua expressão foi confirmada por SDS-PAGE e “Western blotting”;
- Posteriormente, a gE do VDA expressa em células BTI-Tn5B1-4, será utilizada para produzir antígeno para montagem de um ELISA e para imunizar camundongos (produção de monoclonais);
- Poder-se-á produzir a gE do VDA conjugada com a glicoproteína I (gl) do VDA que será amplificada, clonada e expressada em células de inseto. Os dois genes, gE e gl serão utilizados para o desenvolvimento de um ELISA (produção de antígeno, monoclonais e, provavelmente, conjugado peroxidase gE/gl) para uso no diagnóstica em áreas livres ou em erradicação da doença de Aujeszky.

REFERÊNCIAS

AAIJ, C.; BORST, P. The electrophoresis of DNA. *Biochimica et biophysica acta*, v. 269, n. 2, p. 192-200, May 1972.

ALBERTS, B. et al.; TERMIGNONO, C. et al. (Trad.). Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula. Porto alegre: ArtMed, 1999. 757 p.

BEN-PORAT, T. et al. Latency of pseudorabies virus. In: WITTMANN, G.; GASKELL, R. M.; RZIHA, H. Latent Herpes Virus Infections in Veterinary Medicine. Netherlands: Martinus Nijhoff, 1984. 522 p. Session III: Porcine herpesvírus (Aujeszky's disease-virus), p. 365-445.

BEN-PORAT, T.; KAPLAN, A. S. Molecular biology of pseudorabics virus. In: ROIZMAN, B. (Ed.). *The herpesviruses*. New York: Plenum Press, 1985. v.3, p. 105-173.

BRACK, A. R. et al. Role of the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein E in virion formation. *Journal of Virology*, v. 74, n. 9, p. 4004–4016. May 2000.

CASTRO, M. E. B. et al. Biologia molecular de baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 34, n. 10, p. 1733-1761, 1999.

CHANG, A. C. H.; PAN, M. J.; LEE, S. C. Isolation of gE gene deleted pseudorabies vírus by using a gE specific monoclonal antibody. *Journal of Virological Methods*, v. 60, p. 19-28, 1996. Disponível em: <www.elsevier.com>. Acesso em: 02 jun. 2006.

CHRISTENSEN, L. S.; SOERENSEN, K. J.; LEI, J. C. Restriction fragment pattern (RFP) analysis of genomes from Danish isolates of suid herpesvirus 1 (Aujeszky's disease virus). *Archives of Virology*, Springer, v. 97, p. 215-224, 1987.

DEA, S. et al. Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant *E. coli*-expressed nucleocapsid protein as antigen. *Journal of Virological Methods*, v. 87, p. 109-122, 2000. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/jviromet>. Acesso em: 02 jun. 2006.

DITTRICH, T. C. Subprojeto antígenos TECPAR: Produção de reagentes para o diagnóstico de viroses animais de impacto econômico [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <jdambros@concordia.psi.br> em 15 out. 2003.

ELIOT, M. et al. Development of an ELISA to differentiate between animals either vaccinated with or infected by Aujeszky's disease virus. *The Veterinary Record*, London, v. 124, p. 91-94, Jan. 1989.

ESHAGHI, M.; TAN, W. S.; MOHIDIN, T. B. M.; YUSOFF, K. Nipah virus glycoprotein: production in baculovirus and application in diagnosis. *Virus Research*, v. 106, p. 71-76, 2004.

FAVOREEL, H. W. et al. Antibody-induced and cytoskeleton-mediated redistribution and shedding of viral glycoproteins, expressed on pseudorabies virus-infected cells. *Journal of Virology*, v. 71, n. 11, p. 8254-61, Nov. 1997.

FEDERICI, B. A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L. K. *The baculoviruses*. New York: Plenum Press, 1997. p. 33-59.

FENNER, F.J. et al. *Veterinary Virology*. 2th. ed. San Diego: Academic Press, 1993. Chap. 19: Herpesviridae, p. 337-368.

FRIESEN, P. D. Regulation of baculovirus early gene expression. In: MILLER, L. K. *The baculoviruses*. New York: Plenum Press, 1997. p. 141-170.

FUNK, C. J.; BRAUNAGEL, S. C.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus structure. In: MILLER, L. K. *The baculoviruses*. New York: Plenum Press, 1997. p. 7-32.

GIELKENS, A. L. J.; BERNS, A. J. M. Differentiation of aujeszky's disease virus strains by restriction endonuclease analysis of the viral DNA's. In: WITTMANN e HALL (Eds). *Aujeszky's Disease: current topics in veterinary medicine and animal science*. Martinus Nijhoff: Netherlands, 1982. Session I: Properties of the virus, v. 17, p. 3-37.

GLOVER, D. M. The mechanisms of DNA manipulation. In: BRAMMAR, W. J.; EDIDIN, M. (Eds). *Gene cloning*. Chapman and Hall: [S. I.], 1984. Gene cloning in fungi and plants, v. 1, p. 121.

GUT, M. et al. A highly specific and sensitive competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on baculovirus expressed pseudorabies virus glycoprotein gE and gI complex. *Veterinary Microbiology*, Holland, v. 69, p. 239-249, 1999.

GRANADOS, R. R.; WILLIAMS, K. In vivo infection and replication of baculoviruses. In GRANADOS, R. R.; FREDERICI B. A. (Eds). *The Biology of Baculoviruses*. Boca Raton, California: CRC Press, 1986. 275 p., v.1, p. 89-108.

GRANADOS, R. R. et al. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 64, n. 3, p. 260-266, 1994.

HAMPL, H. et al. Characterization of the envelope proteins of pseudorabies virus. *Virology*, v. 52, n. 2, p. 583-590. Nov. 1984.

HERRMANN, S. C., HEPPNER B.; LUDWIG H. Pseudorabies viruses from clinical outbreaks and latent infections grouped into four major genome types. In: WITTMANN, G.; GASKELL, R. M.; RZIHA, H. *Latent Herpes Virus Infections in Veterinary Medicine*. Netherlands: Martinus Nijhoff, 1984. 522 p. Session III: Porcine herpesvirus (Aujeszky's disease-virus), p. 365 a 445.

HYUN, B. H. et al. Sequence analysis and expression of the gE gene of pseudorabies virus isolated in Korea. GenBank, Accession: AY249861, Version: AY249861.1 - GI:30038768. Journal submitted: Mar. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=30038768>> Acesso em 08 maio 2006.

JARVIS, D. Baculovirus expression vectors. In: MILLER, L. K. *The baculoviruses*. New York: Plenum Press, 1997. p. 389-429.

JARVIS, D. L.; HOWE, D.; AUMILLER, J. J. Novel baculovirus expression vectors that provide sialylation of recombinant glycoproteins in lepidopteran insect cells. *Journal of Virology*, v. 75, n. 13, p. 6223-6227, July 2001.

KIMMAN, T. G. et al. An indirect double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using baculovirus-expressed antigen for the detection of antibodies to glycoprotein E of pseudorabies virus and comparison of the method

with blocking ELISAs. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. v. 3, n. 2, p. 167-174, Mar. 1996.

KINKER, D. R. et al. Evaluation of serological testes for the detection of pseudorabies gE antibodies during early infection. *Veterinary Microbiology*, Holland, v. 55, p. 99-106, 1997.

KIT, S.; KIT, M. Genetically engineered herpesvirus vaccines. *Progress in Medical Virology*, v. 38, p. 128-166, 1991.

KLUGE, J. P. et al. Pseudorabies (Aujeszky's disease). In: LEMAN A. D. et al. (Ed), *Diseases of Swine*. 7th ed. Ames: Iowa State University Press, 1992. cap. 24, p. 312-323.

KLUPP, B.G. et al. Complete, annotated sequence of the pseudorabies virus genome. *Journal of Virology*, v. 78, p. 224-440, 2004.

KNOCHE, K.; KEPHART, D. Cloning blunt-end Pfu DNA polymerase-generated PCR fragments into pGem®-T vector systems. *Promega Notes Magazine*, n. 71, p. 10-13, 1999. Promega Corporation.

KOBS, G. pGem®-T vector: cloning of modified blunt-ended DNA fragments. *Promega Notes Magazine*, n 55, p. 28-29, 1996. Promega Corporation.

KOST, T. A.; CONDREAY, J. P.; JARVIS, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*, v. 23, n. 5, p. 567-575, May 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v, 227, p.680-685, 1970.

LARSKI, Z. *Veterinary Virology*. Washington: Surplus-3, 1980. The herpesvirus group, Chap. 12, p. 345-375.

LEWIN, B. *GENES VII*. New York: Oxford University Press, 2000. 990 p.

LORENZ , R.J.; BOGEL, K. Methods of calculation. In: KAPLAN, MM and KOPROWSKY, H. (Eds.) *Laboratory Techniques in rabies*. Geneva: World Health Organization, 1973. p.329-332.

LUCKOW, V. L.; SUMMERS, M. D. Trends in the development of a baculovirus expression vectors. *Bio/Technology*, v. 6, p. 47-55, 1988.

LUCKOW, V. L. et al. 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*, v. 67, n. 8, p. 4566-4579, Aug. 1993.

MARUNIAK, J. E. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In GRANADOS, R. R.; FREDERICI B. A. (Eds). *The Biology of Baculoviruses*. Boca Raton, California: CRC Press, 1986. 275 p., v.1, p. 129-146.

MENGELING, W. L. et al. Restriction endonuclease analysis of the pseudorabies (Aujeszky's disease) virus before and after serial passage *in vivo* and *in vitro*. *Archives of Virology*, Springer, v. 78, p. 213-220, 1983.

METTENLEITER, T. C. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis—state of the art, June 1999. *The Veterinary Record*, v. 31, p. 99-115, 2000.

METTENLEITER, T. C. Herpesvirus assembly and egress. *Journal of virology*, v. 76, n. 4, p. 1537-1547, Febr. 2002.

METTENLEITER, T. C. Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle. *Veterinary Microbiology*, v. 113, n. 3-4, p. 163-169, Mar. 2006.

MILLER, L. K. (Ed.). *The baculoviruses*. New York: Plenum Press, 1997.

MINSON, A. C. et al. Family *Herpesviridae*. In: van REGENMORTEL, M. H. et al. (Ed.). *Virus taxonom*, New York: Academic Press, 2000. p. 203-255.

MORENKOV, O. S.; FODOR, N.; SOBKO, Y. A.; FODOR, I. Immunological characterisation of glycoprotein E of Aujeszky's disease virus. *Virus Research*, v. 51, p. 65-79, 1997. Disponível em: <www.elsevier.com>. Acesso em: 02 jun. 2004.

MORÉS, N. et al. *Programa de erradicação da doença de Aujeszky no Estado de Santa Catarina*. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005. 8p. Circular técnica, 44.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE): World organization for animal health. *Animal Disease Data: diseases notifiable to the OIE*. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acessado em: 28 abr. 2006.

O'REILLY, D.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. New York: Freeman and Company, 1992. 347 p.

OSÓRIO, F. A. Pseudorabies / Aujeszky's disease Aujeszky's: Vaccine and diagnostic support to the eradication efforts. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10, 2001, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre, 2001. 1 CD-ROM.

PASSAGLIA, L. P.; ZAHA, A. Técnicas de DNA recombinante. In: Zaha, A. (Coord.). *Biologia molecular básica*. Porto alegre: Mercado Aberto, 1996. cap. 15, p. 307-331.

PENSAERT, M. et al. Round table on control of Aujeszky's disease and vaccine development based on molecular biology. *Veterinary Microbiology*, v. 33, n. 1-4, p. 53-67, Nov. 1992.

PIATTI, R. M. Et al. Characterization of Aujeszky's disease virus isolates from south and southeast Brazil by RFLP analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 53-67, Apr./June 2001.

POMERANZ, L. E.; REYNOLDS, A. E.; HENGARTNER, C. Molecular biology of pseudorabies virus: Impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 69, n. 3 p. 462-500, Sept. 2005.

POSSEE, R. D.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus genome organization and evolution. In: MILLER, L. K. *The baculovirus*. New York: Plenum Press, 1997. p. 109-139.

RIBEIRO, B. M.; CROOK, N. E. Construction of occluded recombinant baculoviruses containing the full-length *cry1Ab* and *cry1Ac* genes from *Bacillus thuringiensis*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, p. 763-769. 1998.

_____ ; SOUZA, M. L.; KITAJIMA, E. W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de inseto. In: *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba (SP): Alves – FEALQ, 1998. cap.14, p. 481-507.

_____;_____;_____. *Anticarsia gemmatalis* and baculovirus infection. In: NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 15, 2004, Rio de Janeiro: Imprinta Express. *Anais...*São Pedro, SP, 2004. p. 40.

RIXON, F. J.; BEN-PORAT, T. Structural evolution of the DNA of pseudorabies-defective viral particles. *Virology*, v. 97, p. 151-163, 1979.

ROBBINS, A. K. et al. The pseudorabies virus gII gene is closely related to the gB glycoprotein gene of herpes simplex virus. *Journal of Virology*, v. 61, n. 9, p. 2691-2701, 1987.

ROIZMAN, B. Herpesviridae: a brief introduction. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). *Fundamental Virology*, 2th ed. New York: Raven Press, 1991. cap. 33, p. 841-848.

_____; SEARS, A. E. Herpes simplex viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). *Fundamental Virology*, 2th ed. New York: Raven Press, 1991. Cap. 34, p. 849-895.

ROMERO, C. H. et al. Distribuição e prevalência de anticorpos precipitantes para o vírus da doença de Aujeszky em plantéis suínos no Estado de Santa Catarina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 4, p. 123-127, 1984.

ROMERO, C. H. et al. Erradicação do vírus da doença de Aujeszky de plantéis de reprodutores suínos através da testagem e eliminação de suínos com anticorpos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 6, p. 1-4, 1986.

ROMERO, C. H. et al. Experimental vaccination of rabbits with non-pathogenic strains of Aujeszky's disease virus. *Brazilian Journal of Médice Biology Research*, Ribeirão Preto, v. 22, p. 357-364, 1989.

ROWE, C. A., ROMERO, C. H. Isolamento e identificação do vírus da doença de Aujeszky de surtos em suínos no Estado de Santa Catarina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 6, p. 99-103, 1986.

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

SCHAEFER, R. et al. Characterization of Aujeszky's disease virus isolated in south Brazil in the last twenty years based on restriction enzyme analysis. In: NATIONAL

MEETING OF VIROLOGY, 16, 2005, Salvador. Anais... Salvador, Nov. 2005. v. 10, n. 1.

SESTI, L. Biosseguridade na produção de suínos: plano de contingência para granjas GRSC. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 12, 2003, Fortaleza. Anais... Fortaleza, 2003.

SMITH, G. L.; SUMMERS, M. D.; FRASER, M. J. Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector. *Molecular and Cellular Biology*, v. 3, n. 12, p. 2156-2165, Dec. 1983.

SODEIK, B.; EBERSOLD, M. W.; HELENIUS, A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *The Journal of Cell Biology*, v. 36, p. 1007-1021, 1997.

SPEAR, P. G.; LONGNECKER R. Herpesvirus entry: an update. *Journal of Virology*, v. 77, n. 19, p. 10179-10185, Oct. 2003.

STEGEMAN, A. et al. Evaluation of tests for detection of antibodies to aujeszky's disease (pseudorabies) virus glycoprotein E in the target population. *Veterinary Microbiology*, Holland, v. 55, p. 107-111, 1997.

STRYER, L. Protein conformation, dynamics, and function: introduction to biological membranes. In: _____. *Biochemistry*. 3th ed. New York: W. H Freeman, 1988. p. 141-314.

TODD, D.; McFERRAN, J. B. Restriction endonuclease analysis of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus DNA: comparison of Northern Ireland isolates and isolates from other countries. *Archives of Virology*, Springer, v. 86, p. 167-176, 1985.

_____ ; HULL, J.; McNAIR, J. Antigenically important proteins of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus identified by immunoblotting. *Archives of Virology*, v. 96, p. 215-224, 1987.

TOMA, B.; MOUTOU, B.; FORTIER, B. Recherche des anticorps anti-virus de la maladie d'Aujeszky par la technique Elisa. *Recueil de Medecine Vetrinaire*, v. 155, p. 455-463, 1979.

VAN OIRSCHOT, J. T.; OEI, H. L. Comparison of two ELISAs for detecting antibodies to glycoprotein of Aujeszky's disease virus. *The Veterinary Record*, London, v. 125, p. 63-64, July 1989.

VAN OIRSCHOT, J. T. et al. Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease. *Veterinary Microbiology*, (S.I.), v. 23, n. 1-4, p. 84-101, Jun. 1990.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. Et al. (Ed.). *Virus taxonom*, New York: Academic Press, 2000. p. 203-255.

VOLKMAN, L. E. & KEDDIE, B. A. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. *Seminars in Virology*, v. 1, p. 249-256, 1990.

WATHEN, M. W; PIRTLE, E. C. Stability of the pseudorabies virus genome after *in vivo* serial passage. *The Journal of General Virology*, London, v. 65, p. 1401-1404, Apr. 1984.

WEIGHTMAN, S. A.; BANKS, M. Photochemical inactivation of recombinant baculovirus. *Journal of Virological Methods*, Amsterdam, v. 81, p. 179-182, 1999.

WHEALY, M. E. et.al. Specific pseudorabies infection of the rat visual system requires both g1 and gp63 glycoproteins. *Journal of Virology*, v. 67, p. 3786-3797, 1993.

WOLD, R.; PRINROSE, S. B. *Principles of gene manipulation*. An introduction to genetic engineering. Introduction to gene manipulation, section 1, Studies in microbiology, 7th. ed. London: Oxford, 1991. v.3, 438 p.

ZANELLA, J. R. C. *Estimativa de impacto econômico anual da doença de Aujeszky para a suinocultura da Estado de Santa Catarina*. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2002. 4p. Comunicado Técnico, 294.

ZHAO, Y.; CHAPMAN, D. A. G.; JONES, I. A. Improving baculovirus recombination. *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press.v. 31, n. 2 e6, p. 1-5. 2003.

ZUCKERMANN, F. A. et al. Complex between glycoproteins g1 and gp 63 of pseudorabies virus; its effect on virus replication. *Journal of Virology*, v. 62, p. 4622-4626, 1988.

ANEXOS

ANEXO A - Sequência completa da glicoproteína gE do vírus da doença de Aujeszky – CDS (AY249861)

001 atgcggccct ttctgctgcg cgccgcgcag ctctggcgc tgctggccct ggcgctctcc
061 accgaggccc cgagtctctc cgccgagacg accccgggccc ccgtcaccga ggtcccgagt
121 cctcggccc aggtctggga cctctccacc gaggccggcg acgatgacct caacggcgac
181 ctgcacggcg acgaccgccg cgcgggcttc ggctcggccc tcgcctccct gagggaggcg
241 cccccggccc atctggtgaa cgtgtccgag ggcgccaact tcaccctcga cgcgcgcggc
301 gacggcgccc tgctggccgg gatctggacg ttctgcccg tccgcggctg cgacgccgtg
361 tcggtgacca cgggtgtctt cgagaccgcg tgccaccgag acctggtgct gggccgcgccc
421 tgcgtccccg aggccccgga gatgggcatc ggcgactacc tgccgcccga ggtgccgccc
481 ctccggcgcg agccgcccac cgtcaccccc gagcgggtgg cgccgcacct gagcgtcctg
541 cgggccacgc ccaacgacac gggcctctac acgctgcacg acgcctcggg gccgccccgccc
601 gtgttctttg tggcggtggg cgaccggccc cccgcgcccg cggaccgggt gggccccgccc
661 cgccacgagc cccgcttcca cgcgctcggc ttccactcgc agctctctc gcccggggac
721 acgttcgacc tgatgccgcg cgtggtctcg gacatggggc actcgcgcga gaactttacc
781 gccacgctgg actggtacta cgcgcgcgcg cccccgcccg gctgctgta ctacgtgtac
841 gagccctgca tctaccacc gccgcgcgcc gagtgctcgc gcccggtgga cccggcgctg
901 agcttcacct cgccggcgcg cgcgcggctg gtggcgcgcc gcgctacgc ctctgtcagc
961 ccgctgctcg gggaccgggt gctgaccgcc tgccccttcg acgccttcgg cgaggagggtg
1021 cacacgaacg ccaccgcgga cgagtcgggg ctgtacgtgc tcgtgatgac ccacaacggc
1081 cacgtcgcca cctgggacta cacgctcgtc gccaccgccc cggagtacgt cacggtcatc
1141 aaggagctga cggccccggc ccgggccccg ggcaccccgt gggccccgg cgcgggcgac
1201 gacgcgatct acgtggacgg cgtcacgacg ccggcgcccg ccgcgcgccc gtggaacccc
1261 tacggcccga cgacgcccgg gcggctggtt gtgctggcgc tgggtcctt cgtgatgacg
1321 tgcgtcgtcg ggggggcccgt ctggctctgc gtgctgtgct cccggcgccc ggcggcctcg
1381 cggccgttcc ggggtccgac gcgggcgccc acgcacatgc tctctccggt gtacaccagc
1441 ctgcccacgc acgaggacta ctacgacggc gacgacgacg acgaggaggc gggcgtcatc
1501 cgccggcggc ccgctcacc cggcggggac agcggctacg aggggcccga cgcgagcctg
1561 gacccccagg acgagttcag cagcgacgag gacgacgggc tgtacgtgcg cccgaggag
1621 gcgccccgct ccggcttcga cgtctggctc cgcgatccgg agaaaccgga agtgacgaat
1681 ggacccaact atggcatgac cgccaaccgc ctgttgatgt cccgccccgc ttaa (1734 pb)

ANEXO B - Localização da seqüência dos primers com sítio de restrição desenhados no gene da glicoproteína gE do vírus da doença de Aujeszky (CDS: AY249861)

Primer: **cacaccggggtgaattccatgc;**

Sítio EcoR I: **gaattc;**

Oligos **substituídos** ou adicionados: **att**

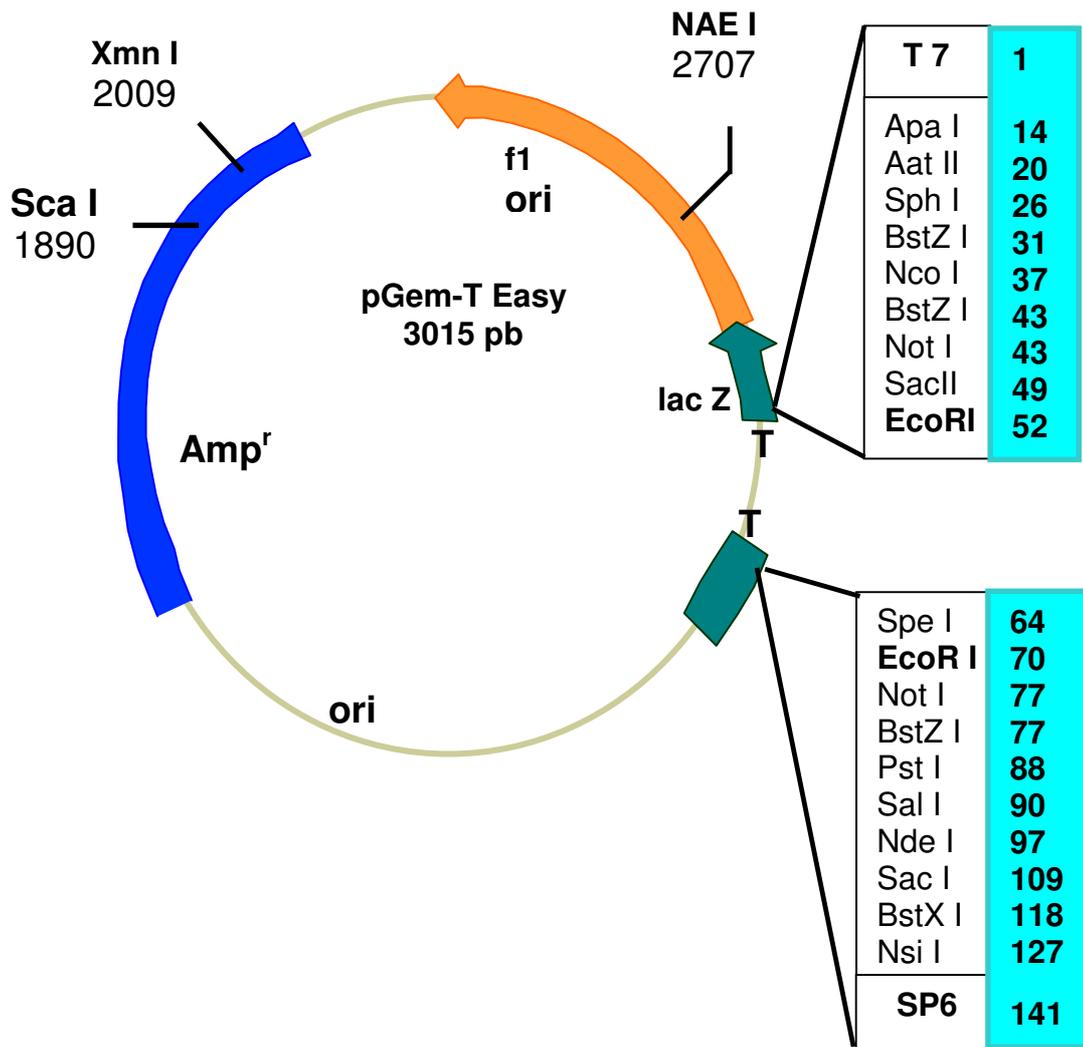
tttaaacctgggcacccccgcgagtcctcgca**cacaccggggtga****gaccatg**cgccctttctgctgcgccgcgagctcctggcgctgctggccctggcgctctccaccgaggccccgagtcctccgccgagacgacccccggccccgacaccgaggtcccgagtcctcggccgaggtctgggacctctccaccgaggccggcgacgatgacctcaacggcgacctcgacggcgacgaccgccgcgaggcttcggctcggccctgcctccctgagggaggcggccccggccccatctggtgaacgtgtccgagggcgccaacttcacctcgacgcgcggcgacggcgccgtgctggccgggatctggacgttctgccccgtccgcggtcgcgacgccgtgctggtgaccacgggtgtgcttcgagaccgctgccaccggacctggtctggggccgcgctgcgtccccgaggccccggagatgggcatcggcgactacctgcccccagggtgccgaggctccggcgagccgccccatctgacccccggagcggtggtcggcgacctgagcgtcctcggggccacgccccaacgacacgggctctacacgctgcacgacgcctcggggccgcgggccccgtgttcttggcggtggggcaccggccccgcggcgggaccgggtgggccccgcgcccagacccccgctccacgcgctcggctccactcgagctctctcgccccgggacacgttcgacctgatgccgcgctggtctcggacatggggcactcgcgcgagaactttaccgccacgctggactggtactacgcgcgcgcccccgggctgctgtactacgtgtacgagccctgcatctaccaccgcgcgcgccccgagtgCctgcgccccggtggacccggcggtgcagcttacctcggcgcgcgcgcgggctggtggcgccgcgctacgcctcgtgcagcccgtgctcggggaccgggtggtgaccgctgccccctcgcgccttcggcgaggaggtgcacacgaacgccaccgcggacgagtcggggctgtacgtgctgtagtaccacaacggccacgtcggcaccctgggactacacgctcgtcgccaccgcggccgagtagctcacggctatcaaggagctgacggccccggccccggcccgggcaccctggtgggccccggcgggcgacgacgcgatctacgtggacggcgtcacgacggcgccgcgccccgctggaaccgtagggccggacgacggccccggcgctggttgcgctggcgctgggctcctcgtgatgacgtgctcgtcggggggccgtctggctcgtgctcctccggcgccggcgccctcgcggccgtccgggtgccccgagcgcggacgcacatgctctcctccggtgtacaccagcctgcccacgcacgaggactactacgacggcgacgacgacgagggaggcggtcatccgcccggcgcccgctcaccggcggggacagcggctacgagggcgtacgcgagcctggacccccgaggacgagttcagcagcagcagggacgacgggctgtacgtgcgccccgaggaggcggccccgctccggcttcgacgtctggttccgcatccggagaaaccggaagtgacgaatggacccaactatggcatgaccgccaaccgcctgtgatgtcccccccc**gcttaa**ataccggg**aga**accggtccgccccgattccgacctgccccggcg;

g t (oligos substituídos);

taa (final da gE);

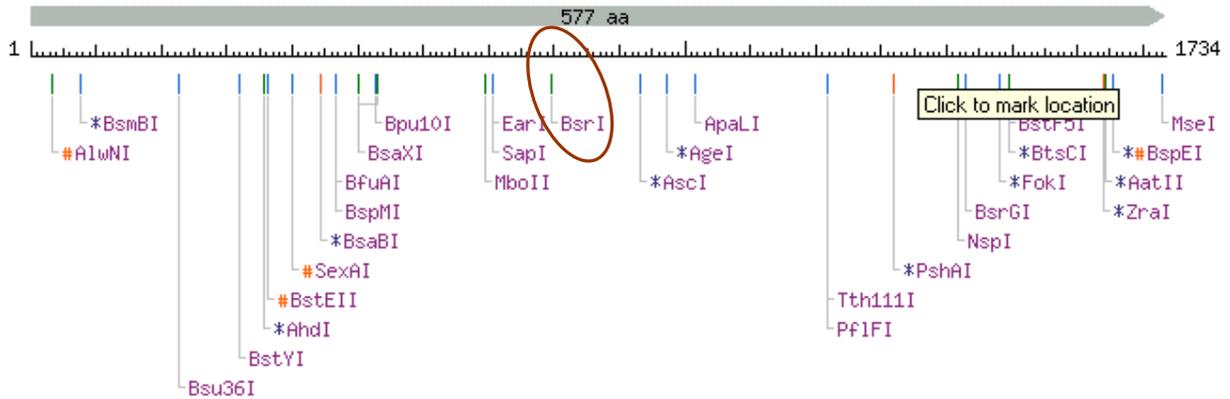
Seqüência final da gE com sítio BamH I: **gcttaa**ataccggg**ggatc**cggtc.

ANEXO C – Desenho esquemático do plasmídeo de clonagem pGem®-T Easy.

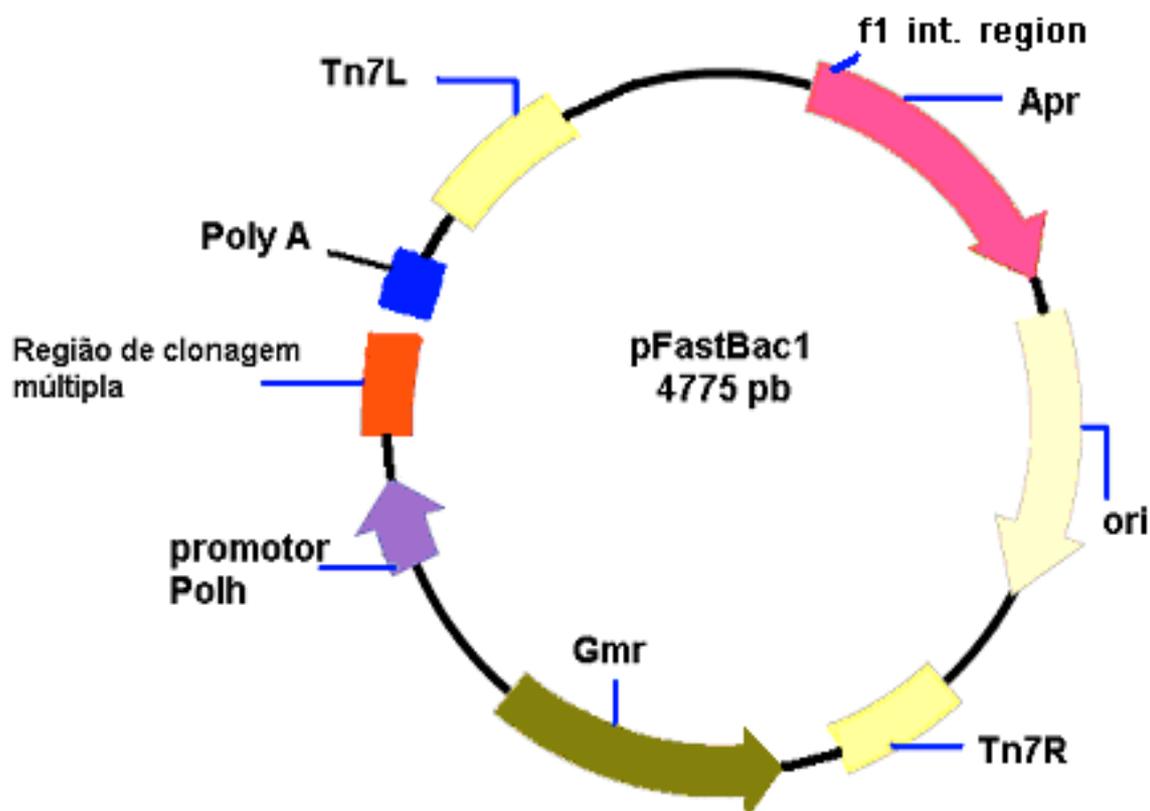


Legenda: Entre T7 e SP6= região múltipla de clonagem com vários sítios de restrição. T7 e SP6 = sítio inicial de transcrição da RNA polimerase (1pb); ori e f1 ori = região origem pUC; *lacZ* = códon inicial do gene *lacZ*; Amp^r = resistência a ampicilina; Sca I, Xmn I e Nae I = sítios de enzimas de restrição no plasmídeo.

ANEXO D – Mapa de restrição da glicoproteína gE.VDA (1734 pb).
Simulação junto ao programa NEBcutter V2.0 (BioLabs)
(<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>).
No destaque região da Bsr I no gene gE.VDA.



ANEXO E - Mapa do vetor doador pFastBac1. A região de clonagem múltipla inicia na altura de 4032 pb com o sítio para BamH I e termina na altura de 4137 com o sítio Hind III. O sítio para EcoR I está localizado aproximadamente a 4053 pb.



Legenda: f1 int. region = região intergênica (início do plasmídeo); Apr = resistência a ampicilina (~900 pb); ori = região de origem (~1850 pb); Tn7R = transposon7, braço esquerdo (~2700 pb); Gmr = resistência a gentamicina (~3260 pb); promotor Polh = região do promotor da poliedrina (~3900 pb); Região de clonagem múltipla = local de inserção dos inseros de interesse com vários sítios de restrição (~4032 pb até 4137 pb); Poly A = sinal de poliadenilação (~4290 pb) e, Tn7L = transposon7, braço direito (final do plasmídeo).

ANEXO F – MEIOS E SOLUÇÕES

DNA

TNE (PH 7,4)

10 mM Tris-HCl (pH 7,4)	
150 mM NaCl	
1mM EDTA (pH 8,0)	
Água Milli-Q estéril qsp	1000 ml

TE (pH 8,0)

10 mM Tris (pH 8,0)	
1 mM EDTA (pH 8,0)	
Água Milli-Q estéril qsp	100 ml

TE-RNASE (pH 8,0) = RNase 1µg/µl

TE (pH 8,0)	49,5 µl
RNase 10 mg/ml	0,5 µl

CLONAGENS

LB CALDO

Triptona	10 g
Extrato de Levedura	5 g
NaCl	5 g
Água Milli-Q qsp	1000 ml
Esterilizar por autoclavação	

LB AGAR

Triptona	10 g
Extrato de Levedura	5 g
NaCl	5 g
Água Milli Q qsp	1000 ml

Agar bacteriológico	15 g
Diluir o agar por aquecimento	
Esterilizar por autoclavação	

LÚRIA AGAR

Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g
Água Milli-Q qsp	850 ml
Diluir por agitação	
Ajustar até pH 7,0 com NaOH 5 M	
Água Milli-Q qsp	1000 ml
Agar bacteriológico	15 g
Diluir o agar por aquecimento	
Esterilizar por autoclavação	

SOB MEIO

Triptona	20 g
Extrato de Levedura	5,0 g
NaCl	0,5 g
Água Milli-Q	850 ml
Diluir por agitação	
Cloreto de potássio 250 mM	10 ml
Ajustar até pH 7,0 com NaOH 5 M	
Água Milli-Q qsp	1000 ml
Esterilizar por autoclavação	
Ajustar até pH 7,0 com NaOH 5 M	

SOC MEIO

Triptona	2,0 g
Extrato de levedura	0,5 g
NaCl	0,05 g
Água destilada	95 ml

Agitar até dissolução	
KCl 250 mM	1,0 ml
Ajustar até pH 7,0 com NaOH 5 M	
Água Milli-Q qsp	98 ml
Esterilizar por autoclavação	
Magnésio estoque estéril (adicionar no momento do uso)	1 ml
Glicose 2 M (adicionar no momento do uso)	1 ml

ESTOQUE DE MAGNÉSIO

MgCl ₂ . 6 H ₂ O	20,33 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	24,65 g
Água Milli-Q qsp	100 ml
Esterilizar com filtro 0,22 µm	

ACETATO DE POTÁSSIO 3 M

Acetato de potássio	29,4 g
Água Milli-Q	50 ml
Ajustar até pH 5,5 com ácido acético glacial	
Água Milli-Q qsp	100 ml

ACETATO DE POTÁSSIO 1M

Acetato de potássio	9,8 g
Água Milli-Q	50 ml
Ajustar até pH 7,5 com ácido acético 2 M	
Água Milli-Q qsp	100 ml

ACETATO DE SÓDIO 3 M

Acetato de sódio x 3H ₂ O	408,3 g
Água Milli-Q	800 ml
Ajustar até pH 5,5 com ácido acético ou até pH 7,0 com ácido acético 2 M	
Água Milli-Q qsp	1000 ml
Esterilizar por autoclavação	

MOPS 0,5 M Solução Estoque

MOPS (C ₇ H ₁₅ NO ₄ S)	2,1 g
Água Milli-Q qsp	20 ml
Ajustar até pH 6,8	

RF1 Solução (pH 5,8)

	g/100ml
RbCl (100 mM)	1,2 g
MnCl ₂ .4 H ₂ O (50 mM)	1,0 g
Acetato de potássio 1 M (30mM)	3,0 ml
CaCl ₂ . 2 H ₂ O (10 mM)	1,5 g
Glicerol (15% p/v)	15,0 ml
Água Milli-Q	85 ml
Agitar até dissolução	
Ajustar até pH 5,8 com ácido cítrico 0,2 M	
Água Milli-Q qsp	100 ml
Esterilizar com filtro 0,22 µm pré-lavado	
Estocar a 4 °C	

RF2 Solução (pH 6,8)

	g/100ml
MOPS 0,5 M (10mM)	2 ml
Rb Cl (10 Mm)	0,12 g
Ca Cl ₂ . 2 H ₂ O (75 mM)	1,1 g
Glicerol (15% p/v)	15 ml
Água Milli-Q	85,0 ml
Agitar até dissolução	
Ajustar até pH 6,8 com NaOH	
Água Milli-Q qsp	100 ml
Esterilizar com filtro 0,22 µm pré-lavado	
Estocar a 4 °C	

MINIPREPARAÇÃO**SOLUÇÃO I**

Glucose (50 mM)	5,0 ml
-----------------	--------

Tris-Cl (pH 8,0) 1 M (25mM)	2,5 ml
EDTA (pH 8,0) 0,5 M (10 mM)	2,0 ml
Água Milli-Q qsp	100 ml
Esterilizar por autoclavagem	
Estocar a 4 °C	

SOLUÇÃO II

NaOH 10 N estéril (0,2 N)
 SDS 10% estéril (1%)
 Água Milli-Q qsp
 Preparo no momento do uso.

SOLUÇÃO III

Acetato de potássio 5 M estéril	60 ml
Ácido acético glacial	11,5 ml
Água Milli-Q estéril	28,5 ml
A solução resultante tem 3 M de potássio e de 5 M de acetato.	
Estocar a 4 °C	

MINIPREPARAÇÃO PLASMÍDEOS GRANDES

SOLUÇÃO I-G	60 ml
Ácido acético glacial	11,5 ml
Tris-HCl (pH 8,0) 15 mM	
EDTA (pH 8,0) 10 mM	
RNase A [100 mg/ml] 100 µg/ml	
Água Milli-Q estéril qsp	
Esterilizar com filtro 0,22 µm	
Estocar a 4 °C	

SOLUÇÃO II-G

NaOH 0,2 N
 SDS 1%

Água Milli-Q estéril qsp
Esterilizar com filtro 0,22 µm
Preparar no momento do uso

X-gal Solução 2% (20 mg/ml)

5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside 2,0 g
DMSO (dimetil sulfoxide) qsp 100 ml
Estocar a -20 °C
Manter ao abrigo da luz

IPTG 20% (0,8 M)

Isopropiltio-β-D-galactoside (IPTG) 2,0 g
Água Mill-Q qsp 10 ml
Esterilizar com filtro 0,22 µm
Estocara a 4 °C

**GEL DE POLIACRILAMIDA e
IMUNODETECÇÃO**

**TAMPÃO DE AMOSTRAS
(SDS TAMPÃO REDUTOR)**

Tris-HCl (pH 6,8) 0,5 M 1 ml
Glicerol 0,8 ml
SDS 10% 1,6 ml
2-β-mercaptoetanol 0,4 ml
Azul de bromofenol 0,05% 0,2 ml
Água Mili-Q estéril 4,0 ml
Estocar em temperatura ambiente

**TAMPÃO DE CORRIDA 5X (pH 8,3) PARA
SDS-PAGE**

Tris-base (15 g/l) 9,0 g
Glicina (72 g/l) 43,2 g

SDS (5 g/l)	3,0 g
Água destilada qsp	600 ml
Estocar a 4 °C	
Uso: diluir 60 ml 5X em 240 ml de água	

GEL DE CORRIDA 12% (SEPARADOR)

Tris-HCl (pH 8,8) 1,5 M	2,5 ml
SDS 10%	100 µl
Água destilada	3,5 ml
Acrilamida/Bis 30%	4,0 ml
Persulfato de amônia (APS) 10% fresco	100 µl
TEMED	10 µl

GEL DE CORRIDA CONCENTRADOR (EMPILHAMENTO) 5%

Tris-HCl (pH 6,8) 0,5 M	1,25 ml
SDS 10%	50 µl
Água destilada	3,05 ml
Acrilamida/Bis 30%	650 µl
Persulfato de amônia (APS) 10% fresco	50 µl
TEMED	10 µl
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	2,3 g
Água destilada qsp	1000 ml

SOLUÇÃO CORANTE

Ácido acético glacial	100 ml
Metanol	400 mL
Coomassie blue R-250	1 g
Água destilada	500 ml
Estocar em temperatura ambiente	

SOLUÇÃO DESCORANTE

Ácido acético glacial	10 ml
-----------------------	-------

Metanol	40 ml
Água destilada	50 ml
Estocar em temperatura ambiente	

TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA 1X
Tampão Bjerrum e Schafer-Nielsen
(pH 9,2)

Tris-base (48 mM)	5,82 g
Glicina (39 mM)	2,9 g
SDS 10% (0,0375 %)	3,75 ml
Água destilada	700 ml
Dissolver e adicionar metanol	
Metanol	200 ml
Água destilada qsp	1000 ml
Estocar a 4 °C	
Usar frio (4°C)	

TRIS-HCl 1M (pH 8,8)

Tris base	60,57 g
Água estéril	450 ml
Ajustar até pH 8,8 com HCl	
Água destilada qsp	500 ml

TRIS-HCl 1M (pH 6,8)

Tris base	12,11 g
Água estéril	85 ml
Ajustar até pH 6,8 com HCl	
Água destilada qsp	100 ml

PBS 50 X (pH 7,2)

KCl	10 g
Na ₂ HPO ₄	72,45 g
KH ₂ PO ₄	12 g

Água destilada	900 ml
Ajustar até pH 7,2 com HCl	
Água destilada qsp	1000 ml
Acondicionar em pequenas alíquotas	
Esterilizar por autoclavação	
Estacar em temperatura ambiente	

PBS 1 X (pH 7,2)

PBS 50 X	20 ml
NaCl	8 g
Água destilada qsp	1000 ml

PBS T20 0,05%

PBS 1 X	995 ml
TWEEN 20	5 ml

EDTA 0,5 M (pH 8,0)

EDTA x 2 H ₂ O	74,44 g
Água Milli-Q	300 ml
Ajustar até pH 8,0 com NaOH 10 N, sob agitação	
Água Milli-Q qsp	400 ml
Esterilizar por autoclavação	
Estocar em temperatura ambiente	

GLICOSE 2 M

Glicose (D-glicose anidra)	7,2 g
Água Milli-Q	18 ml
Dissolver bem e adicionar água Milli-Q qsp	20 ml
Esterilizar com filtro 0,22 µm	
Estocar em temperatura ambiente	

SACAROSE 25%

Sucrose (sacarose)	25 g
TEN (pH 7,4) qsp	100 ml
Esterilizar com filtro 0,22 µm	
Estocar a 4 °C	

GLICEROL 70%

Glicerina [C ₃ H ₅ (OH) ₃]	14 ml
Água Milli-Q	6 ml
Esterilizar por autoclavagem	
Estocar em temperatura ambiente	

GLICEROL 60%

Glicerina [C ₃ H ₅ (OH) ₃]	12 ml
Água Milli-Q	8 ml
Esterilizar por autoclavagem	
Estocar em temperatura ambiente	

ELETROFORESE

TAE 50X

TRIS base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA (pH 8,0) 0,5 m	100 ml
Água destilada qsp	1000 ml
A solução de trabalho 1x tem 40 mM Tris- acetato / 1 mM EDTA.	
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	100 ml

TAE 1X

TAE 50X	200 ml
Água destilada qsp	1000 ml

TAMPÃO CORRIDA AMOSTRAS 6X

Azul de bromofenol	25 mg
Xileno cianol	25 mg
Ficoll 400	1,5 g
Água Milli-Q qsp	10 ml

BROMETO DE ETÍDEO 10 mg/ml

Brometo de etídeo	1 g
Água destilada qsp	100 ml
Manter sob agitação por várias horas até a completa dissolução	
Armazenar em frasco escuro a 4 °C	

MARCADOR DE PESO MOLECULAR

1 kb DNA Ladder 1:5

1 Kb DNA Ladder 1 mg (1,0 µg/µl)	10 µl
Tampão corrida amostras 6X	20 µl
Água Milli-Q estéril	20 µl
Estocar a -20 °C	