

AUXÍLIO EM ANÁLISES CROMATOGRAFICAS E ELETROFORÉTICAS DE AMPLIFICAÇÕES GENÉTICAS

Beatriz Valgas Marques, Anderson Varela de Andrade, Gustavo Felippe da Silva

INTRODUÇÃO

O Vírus do Mosaico Estriado do Trigo (WhMV) é uma ameaça à produção de trigo, transmitido pelo fungo *Polymyxa graminis*, sendo capaz de reduzir a produtividade em até 50%, com registros no Sul do Brasil, Paraguai e África do Sul. A detecção precoce é fundamental para o manejo da doença, mas os métodos convencionais apresentam limitações de custo e infraestrutura. Este estudo propõe uma abordagem inovadora para detecção do WhMV através de uma técnica molecular conhecida como LAMP. Esta técnica é capaz de identificar a presença de DNA de patógenos de forma rápida e sensível. No entanto, a detecção à campo ainda é um problema, pois carece de métodos preciso de visualização do DNA amplificado. A estratégia usada neste estudo usa a proteína GCN4 para capturar o DNA amplificado permitindo a detecção simples, rápida e de baixo custo, com potencial de quantificação em equipamentos comuns de laboratório ampliando a aplicabilidade para monitoramento de viroses agrícolas.

DESENVOLVIMENTO

A proteína GCN4 foi expressa e purificada em bactérias *Escherichia coli* BL21 PlyS que receberam, por **eletroporação** — técnica que utiliza pulsos elétricos para abrir poros temporários na membrana celular e permitir a entrada do plasmídeo contendo o gene GCN4 — o plasmídeo de interesse. A proteína foi produzida com seis **caudas de histidina**, que são capazes de se ligar à resina de níquel (Ni-NTA) devido à interação de cargas, permitindo a captura seletiva da proteína durante a purificação. As células foram cultivadas em meio SOC, induzidas com IPTG para estimular a expressão da proteína e, em seguida, rompidas por **sonicação**, um processo que utiliza ondas sonoras para quebrar as membranas celulares e liberar o conteúdo intracelular. A proteína foi então purificada por afinidade na resina de níquel, analisada por SDS-PAGE 12% e quantificada em espectrofotômetro. Para os ensaios de detecção do vírus WhSMV, foram coletadas folhas e caules de trigo (cultivar BRS Guaramirim) com sintomas de mosaico, confirmadas por RT-PCR, e amostras de plantas sadias foram usadas como controle. Para garantir a **especificidade**, foram incluídos controles negativos com o vírus da necrose estriada do arroz (RSNV, família *Benyviridae*) e o vírus do nanismo amarelo da cevada (BYDV, família *Tombusviridae*). O RT-LAMP foi realizado com seis primers (F3, B3, FIP, BIP, LF e LB) direcionados a oito regiões do gene **CEP11**, envolvido na formação do capsídeo viral, proteção do RNA e transmissão. Os primers internos FIP e BIP foram **modificados**: o FIP recebeu um sítio de reconhecimento para a proteína GCN4, permitindo que o produto amplificado fosse capturado especificamente por GCN4, e o BIP foi **biotinilado**, de forma que pudesse interagir com a esteptavidina nos ensaios de detecção. As reações de RT-LAMP foram incubadas a 65 °C por 60 min e finalizadas a 80 °C por 10 min, com os produtos analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Posteriormente, os produtos foram aplicados em ensaios de **ELISA**, com GCN4 imobilizado em placas de 96

poços e detecção por estreptavidina-HRP/TMB, e em **Dot Blot**, com GCN4 immobilizado em membrana de nitrocelulose e revelação por quimioluminescência e TMB.

RESULTADOS

A proteína GCN4 foi expressa em *E. coli* e purificada com sucesso por Ni-NTA, apresentando alta solubilidade e pureza, confirmada por SDS-PAGE (~10 kDa, sem contaminantes). Nos ensaios de detecção do WhSMV, os primers modificados (FIP com sítio para GCN4 e BIP biotinilado) permitiram a captura específica dos produtos de RT-LAMP em ELISA e Dot Blot. A amplificação ocorreu com ou sem modificações, mas a detecção foi observada apenas quando ambos os primers estavam alterados. Controles negativos não geraram sinais, confirmando especificidade. O Dot Blot mostrou captura eficiente e detecção por métodos colorimétricos e quimioluminescentes. Assim, a immobilização via GCN4 demonstrou ser eficiente, específica e promissora para ensaios rápidos de diagnóstico molecular em campo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho mostrou que a proteína GCN4, aliada ao RT-LAMP, permite detectar WhSMV de forma rápida, específica e de baixo custo, com potencial para uso em kits rápidos de campo.

Palavras-chave: LAMP; RT-LAMP; WhSMV; WHEAT.

ILUSTRAÇÕES

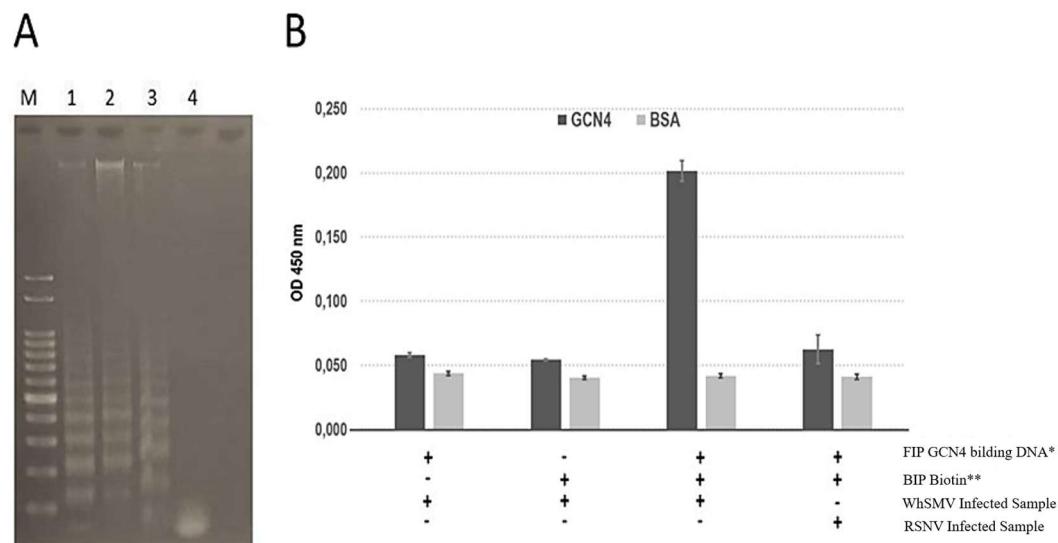


Figura 1. Dupla análise dos produtos LAMP do WhSMV. As mesmas reações LAMP foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (A) ou ensaio ELISA (B).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VALENTE, Juliana Borba; PEREIRA, Fernando Lourenço; STEMPKOWSKI, L. A.; FARIAS, M.; KUHNEM, R.; LAU, D.; FAJARDO, M.; NHANI, A.; CASA, Ricardo Trezzi; BOGO, A.; SILVA. A novel putative member of the family Benyviridae is associated with soil-borne wheat mosaic disease in Brazil. *Plant Pathology*, Hoboken, v. 68, n. 3, p. 588-600, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12970>.

ESQUIVEL-FARIÑA, Arnaldo; CAMELO-GARCÍA, Viviana Marcela; KITAJIMA, E. W.; ALBERTO, J.; GONZÁLEZ-SEGNANA, L. R. First report of Wheat Stripe Mosaic Virus in Paraguay. *Australasian Plant Disease Notes*, Cham, v. 14, n. 1, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13314-019-0355-4>.

TEREFE, T. G. et al. Detection and molecular characterization of Wheat Stripe Mosaic Virus on wheat in South Africa. *Crop Protection*, Oxford, v. 143, p. 105464, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105464>.

PEREIRA, F. S. et al. Resistance to Wheat Stripe Mosaic Virus (WhSMV): response of contrasting wheat genotypes under infection in the field. *Tropical Plant Pathology*, Cham, v. 49, n. 2, p. 322-329, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-023-00624-2>.

LIU, W. et al. A one step real-time RT-PCR assay for the quantitation of Wheat Yellow Mosaic Virus (WYMV). *Virology Journal*, London, v. 10, n. 1, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-173>.

MEHETRE, G. T. et al. Current developments and challenges in plant viral diagnostics: a systematic review. *Viruses*, Basel, v. 13, n. 3, p. 412, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13030412>.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 28, n. 12, p. e63, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.

VARELA, A. et al. Validation and optimization of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique for rapid detection of Wheat Stripe Mosaic Virus, a wheat-infecting pathogen. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, Cairo, v. 22, n. 2, p. 100373, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2024.100373>.

URIBE-ALVAREZ, C. et al. Low saliva pH can yield false positive results in simple RT-LAMP-based SARS-CoV-2 diagnostic tests. *PLOS ONE*, San Francisco, v. 16, n. 5, e0250202, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250202>.

DIAZ, L. M.; JOHNSON, B. E.; JENKINS, D. M. Real-time optical analysis of a colorimetric LAMP assay for SARS-CoV-2 in saliva with a handheld instrument improves accuracy compared with endpoint assessment. *Journal of Biomolecular Techniques*, Rockville, v. 32, n. 3, p. 158-171, 2021. DOI: <https://doi.org/10.7171/jbt.21-3203-011>.

JANG, W. S. et al. Loop-mediated isothermal amplification and lateral flow immunochromatography technology for rapid diagnosis of Influenza A/B. *Diagnostics*, Basel, v. 14, n. 9, p. 967, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/diagnostics14090967>.

KÖNIG, P.; RICHMOND, T. J. The X-ray structure of the GCN4-bZIP bound to ATF/CREB site DNA shows the complex depends on DNA flexibility. *Journal of Molecular Biology*, London, v. 233, n. 1, p. 139-154, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1490>.

WANG, X.; CAO, W.; CAO, A.; LAI, L. Thermodynamic characterization of the folding coupled DNA binding by the monomeric transcription activator GCN4 peptide. *Biophysical Journal*, Bethesda, v. 84, n. 3, p. 1867-1875, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(03\)74994-7](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(03)74994-7).

SAUDEK, V. et al. Solution structure of the DNA-binding domain of the yeast transcriptional activator protein GCN4. *Protein Engineering, Design and Selection*, Oxford, v. 4, n. 1, p. 3-10, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1093/protein/4.1.3>.

KELLER, W.; KÖNIG, P.; RICHMOND, T. J. Crystal structure of a bZIP/DNA complex at 2.2 Å: determinants of DNA specific recognition. *Journal of Molecular Biology*, London, v. 254, n. 4, p. 657-667, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0645>.

ELLENBERGER, T. E. et al. The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted α helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell*, Cambridge, v. 71, n. 7, p. 1223-1237, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(05\)80070-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(05)80070-4).

ZHANG, X. et al. Evolution of the probe-based loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays in pathogen detection. *Diagnostics*, Basel, v. 13, n. 9, p. 1530, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/diagnostics13091530>.

LAI, M. Y. et al. Point-of-care diagnosis of malaria using a simple, purification-free DNA extraction method coupled with loop-mediated isothermal amplification-lateral flow. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, Basel, v. 8, n. 4, p. 199, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8040199>.

DADOS CADASTRAIS

BOLSISTA: Beatriz Valgas Marques

MODALIDADE DE BOLSA: PIBIC/CNPq

VIGÊNCIA: 09/2024 a 08/2025 – Total: 12 meses

ORIENTADOR(A): Gustavo Felippe da Silva

CENTRO DE ENSINO: CAV

DEPARTAMENTO: Engenharia Florestal

ÁREAS DE CONHECIMENTO: Ciências Biológicas / Bioquímica

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: Auxílio em análises cromatográficas e eletroforéticas de amplificações genéticas.

Nº PROTOCOLO DO PROJETO DE PESQUISA: NPP4220-2023