UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Programa de Pós Graduação em Microbiologia

RICARDO BARROS MARIUTTI

EXPRESSÃO EM *Escherichia coli* E PRODUÇÃO DE ANTISSORO POLICLONAL PARA PROTEÍNA P1 DO *Southern bean mosaic virus*

Orientador: Prof. Dr. José Osmar Gaspar

São José do Rio Preto – SP
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Programa de Pós Graduação em Microbiologia

RICARDO BARROS MARIUTTI

EXPRESSÃO EM *Escherichia coli* E PRODUÇÃO DE ANTISSORO POLICLONAL PARA PROTEÍNA P1 DO *Southern bean mosaic virus*

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. José Osmar Gaspar

São José do Rio Preto – SP
2009

Mariutti, Ricardo Barros.
Expressão em *Escherichia coli* e produção de antissoro policlonal para proteína P1 do *Southern bean mosaic virus* / Ricardo Barros Mariutti. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2009.
xx f. : il. ; 30 cm.

Orientador: José Osmar Gaspar
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Fitopatologia. 2. Vírus de plantas. 3. Sobemovirus. 4. Expressão em *E. coli*. 5. Sorologia. I. Gaspar, José Osmar. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 581.2

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

RICARDO BARROS MARIUTTI

EXPRESSÃO EM *Escherichia coli* E PRODUÇÃO DE ANTISSORO POLICLONAL PARA PROTEÍNA P1 DO *Southern bean mosaic virus*

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

BANCA EXAMINADORA

Presidente e Orientador: _____

(Prof. Dr. José Osmar Gaspar)

2° Examinador: _____

(Prof. Dr. Mário Tyago Murakami)

3°Examinador: _____

(Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio)

São José do Rio Preto, 22/06/2009.

Aos meus pais Ana e Germano
"As pessoas mais importantes da minha vida"

Ao meu orientador Prof. Dr. José Osmar Gaspar
"Um exemplo de profissional no qual me espelho"

AGRADECIMENTOS

Aos Meus pais, Ana e Germano, pela educação dada e por sempre me apoiarem em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. Dr. José Osmar Gaspar, um profissional exemplar, pela amizade, confiança e comprometimento com este trabalho, me orientando sem nunca poupar esforços.

À Profª. Drª. Priscila Belintani, pela paciência e pelos ensinamentos fundamentais para que eu pudesse iniciar minha carreira científica.

Aos Professores: Dr. Marinônio Cornélio, Dr. Roberto da Silva e Dr. Mário Tyago Murakami pela participação nas bancas de defesa, contribuindo para a correção e aprimoramento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jorge Rezende e ao pessoal do Laboratório de Virologia Vegetal da ESALQ/USP pela produção do antissoro policlonal utilizado neste trabalho.

Aos amigos e companheiros de Laboratório de Fitovirologia: Aninha, Livia, Luana e Tadaiti pela colaboração no trabalho e pela amizade.

À FAPESP pela bolsa de mestrado concedida, N° Processo 06/59285-0.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

No Brasil, foram descritas mais de dez viroses em feijoeiro, citando-se aquela causada pelo *Southern bean mosaic virus* (SBMV) do gênero *Sobemovirus*. Este vírus tem uma restrita gama de hospedeiras, confinada quase exclusivamente a espécies da família das leguminosas, sendo algumas de interesse econômico como o feijoeiro comum e a soja. O SBMV é a espécie tipo do gênero, possui partículas isométricas (28-30nm) contendo RNA genômico de 4-4,5kb com polaridade positiva e proteína capsidial com massa molecular de 29-30 kDa. O genoma do SBMV é constituído por quatro *Open Reading Frames* (ORFs) com sobreposição entre elas. A ORF 1 codifica uma possível proteína do movimento, a ORF 2 uma poliproteína, que por clivagem, origina três produtos funcionais: uma serino protease, uma proteína ligadora do genoma viral (VPg) e uma polimerase com atividade relacionada à replicação do RNA viral (RNA polimerase RNA-dependente, RpRd). Dentro da ORF 2 encontra-se a ORF 3, que codifica uma proteína de função desconhecida. A ORF 4 codifica a proteína capsidial, traduzida a partir de um RNA subgenômico. O presente trabalho consiste na expressão da proteína P1 do SBMV-SP em *Escherichia coli*, sua purificação e a posterior utilização para a produção de antissoro policlonal. As atividades realizadas compreenderam a purificação das partículas virais do SBMV isolado São Paulo (SBMV-SP) a partir de folhas infectadas de *Phaseolus vulgaris* 'Jalo', obtenção do RNA viral a partir de partículas purificadas, produção de cDNA utilizando primer anti-senso, amplificação do gene da proteína do movimento, purificação do fragmento amplificado, ligação em vetor de multiplicação pGEM-T, transformação em células competentes de *Escherichia coli* linhagem TOP 10, purificação do vetor, corte enzimático com as enzimas *Bam* HI e *Hind* III, subclonagem nos vetores de expressão pMAL e pET28a e testes de expressão. A análise em gel de poliacrilamida mostrou a eficiência dos testes de expressão. Utilizando-se o vetor pET28a obteve-se a expressão de uma proteína de aproximadamente 22 kDa (17 kDa referentes à MP + 5 kDa referentes à cauda de histidina) que foi purificada utilizando-se coluna com resina à base de níquel. Utilizando-se o vetor pMAL obteve-se a expressão de uma proteína de aproximadamente 60 kDa (17 kDa referentes à MP + 43 kDa referente à Proteína de fusão –"Maltose Binding Protein") que foi purificada em colunas com resina à base de amilose. A proteína recombinante produzida em pMAL foi utilizada na produção de antissoro em coelhos da raça Nova Zelândia. Os anticorpos produzidos mostraram-se eficientes ao reagirem especificamente e ao detectar as proteínas de interesse mesmo em concentrações relativamente baixas quando analisados em reações de "Dot-blot" e "Western-blot".

Palavras-chave: Sobemovírus, vírus de plantas, expressão em *E. coli*, sorologia.

ABSTRACT

In Brazil, more than ten bean viroses were described, including the one caused by *Southern bean mosaic virus* (SBMV) from genus *Sobemovirus*. This virus has a strict host range, confined almost exclusively to species from leguminosas family, and some of them have economic importance, like the common bean and soya. SBMV is the type species from this genus, has isometric particles (28-30nm) that contains genomic RNA of 4-4,5kb with positive polarity and a capsidal protein with molecular mass of 29-30kDa. SBMV genome consistis of four *Open Reading Frames* (ORFs) with overlap between them. ORF 1 encodes a possible movement protein, ORF 2 a poliprotein, which origin three functional products by clivage: a serin protease, a viral genomic biding protein (VPg) and a polimerase. Inside ORF 2 is situated the ORF 3, that encodes a protein with unknow function. ORF 4 encodes the capsidal protein, translated by a subgenomic RNA. The activities performed until this moment were the purification of SBMV isolated São Paulo(SBMV-SP) viral particles, obtention of viral RNA from SBMV purified partcles, cDNA production using anti-sense primer, amplification of the supposed gene of movement protein, purification of the amplified fragment and later biding on expression vector pGEM-T. The recombinat vector were transformed in *Escherichia coli* cells competent and than purified and digested with *Bam* HI and *Hind* III enzime. The released fragment was subcloned in pMAL and pET28a, which were used on competent cells for expression tests. Analysis of gel poliacrialamida showed the efficiency of tests of expression. Using pET28a was observed an expression of a protein of approximately 22 kDa (17 kDa relating to MP + 5 kDa relating to the tail of histidine) which was purified in resin Ni-NTA by affinitive chromatography.Using pMAL was observed an expression of a protein of approximately 60 kDa (17 kDa relating MP + 43 kDa referring to Maltose-Binding Protein) which was purified by affinity chromatography on amylose resin , the protein purified was used in the production of anti-serum in habbits of race New Zealand. The antibodies produced have proved efficient and to respond specifically to detect the proteins of interest even at relatively low concentrations when analyzed in reactions of dot-blot and western-blot.

Keywords: Sobemovirus, plant virus, expression in *E. coli*, serology.

.

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO 11
I.1 - O GÊNERO *Sobemovirus* 11
I.2 – ORGANIZAÇÃO DO GENOMA 12
I.3 - PRODUTOS GÊNICOS E SUAS POSSÍVEIS FUNÇÕES 14
I.3.1 - PROTEINA P1 14
I.4- CITOPATOLOGIA 15
I.5- O *Southern bean mosaic vírus* NO BRASIL 16
I.6.-PROTEÍNA DO MOVIMENTO 18

II OBJETIVOS 21

III MATERIAL E MÉTODOS 22
III. 1 - PURIFICAÇÃO DAS PARTÍCULAS VIRAIS 22
III. 2 - OBTENÇÃO DE RNA VIRAL 22
III. 3 – DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS 22
III. 4 - PRODUÇÃO DE cDNA 23
III. 5 - AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA PROTEÍNA DO MOVIMENTO 23
III. 6 - PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO 23
III. 7 - LIGAÇÃO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO EM VETOR PARA MULTIPLICAÇÃO (pGEM) 23
III. 8 – SEQUENCIAMENTO DO VETOR PGEM+INSERTO 24
III. 9 - TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULA COMPETENTE (*E. coli* – TOP 10) 24
III. 10 - PURIFICAÇÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE 24
III. 11 - DIGESTÃO ENZIMÁTICA COM *Bam* HI E *Hind* III 25
III. 12 - DIGESTÃO ENZIMÁTICA E DEFOSFORILAÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO(pMAL) 25
III. 13 - LIGAÇÃO DO DNA EM VETOR DE EXPRESSÃO (pMAL) 25
III. 14 - TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS COMPETENTES (*E. coli* - DH5α) 25
III. 15- TESTES DE EXPRESSÃO 25
III. 16 - ANÁLISE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) 10% 26
III. 17- EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE (pMAL) 26
III. 18 - PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 26
III. 19 - PRODUÇÃO DE ANTICORPOS 27
III. 20 - EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROVÁVEL MP EM VETOR DE EXPRESSÃO (pET28a) 27
III. 21 - TESTE DE TITULAÇÃO DO ANTI-SORO POLICLONAL POR “DOT-BLOT” 27
III. 22 - TESTE DE TITULAÇÃO E ESPECIFICIDADE DO ANTI-SORO POR “WESTERN-BLOT” 28
III. 23 - DETECÇÃO 28

IV RESULTADOS..... ..29
IV. 1 - PURIFICAÇÃO DAS PARTÍCULAS VIRAIS 29
IV. 2 - EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL..... ..30
IV. 3 - AMPLIFICAÇÃO POR PCR DO GENE DA POSSÍVEL PROTEÍNA DO MOVIMENTO..... ..31
IV. 4 - DIGESTÃO ENZIMÁTCA DO VETOR pGEM COM *Bam* HI e *Hind* III 31
IV. 5 - TESTES DE EXPRESSÃO DA MP EM VETOR pMAL E PURIFICAÇÃO DA ´PROTEÍNA RECOMBINANTE MP-MBP..... ..32
IV. 6- EXPRESSÃO DA PROVÁVEL MP EM VETOR pET28a 33
IV. 7 - TESTE DE TITULAÇÃO DO ANTISSORO POR "DOT-BLOT" 34
IV. 8 – TESTE PARA DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO ANTISSORO POR "WESTERN-BLOT" 34
IV. 9 - TESTE PARA DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA ANTISSORO POR "DOT-BLOT'' 35

V DISCUSSÃO 35

VI CONCLUSÕES 38

ANEXOS 39

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 42

ABREVIAÇÕES DE SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

- **2-ME**: 2ß-mercaptoetanol
- **BCIP/NBT**: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitro-blue tetrazolio
- **BSA**: soro albumina bovina
- **dATP, dCTP, dGTP, dTTP**: desoxinucleotídeos (ATP: adenina trifosfato; CTP: citosina trifosfato; GTP: guanidina trifosfato; TTP: timidina trifosfato)
- **DEPC**: dietil pirocarbonato de sódio
- **dsDNA**: DNA de fita dupla
- **DTT**: ditiotreitol
- **EDTA**: ácido etileno diamino tetra acético
- **IPTG**: isopropil- ß-D-galactosidase
- **KCl**: cloreto de potássio
- **LB**: meio Luria-Bertani
- **$MgCl_2$**: cloreto de magnésio
- **NaCl:** cloreto de sódio
- **NaOH**: hidróxido de sódio
- **ORF**: Open Reading Frame
- **PBS**: solução salina tamponada com fosfato
- **PBS-T**: PBS contendo Tween 20 0,3%
- **PEG**: polietileno glicol
- **SDS**: lauril sulfato de sódio ou dodecil sulfato de sódio
- **ssRNA**: RNA de fita simples
- **Tris-HCl**: tampão Tris-base com pH ajustado com HCl
- **X-gal**: substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- ß-D-galactosidase

I. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), leguminosa comum da família das fabaceas (Leguminoseae) (Cronquist, 1981), constitui uma das culturas mais importantes existentes, sendo consumida por todo o mundo, devido principalmente ao seu valor nutritivo. A cultura do feijão no Brasil assume um grande valor social, pois constitui a base da alimentação da população, sendo fonte de proteína vegetal de baixo custo. A dupla feijão com arroz é o prato principal na alimentação da maioria da população brasileira (Cultura, 2000). Dados das safras (2008) mostram que o Brasil produziu cerca de 3,52 milhões de toneladas de feijão, sendo a região sudeste a maior produtora (CONAB, 2009).

A produtividade da cultura é grandemente afetada pela ocorrência de doenças que diminuem sensivelmente a produção e, conseqüentemente, reduzem a sua oferta, provocando um aumento nos preços de mercado (Cultura, 2000). Estas doenças têm exercido um papel relevante na baixa produtividade de feijoeiros no Brasil e outros países latino-americanos (Jayasinghe, 1982; Costa & Costa, 1983). As mais numerosas são ocasionadas por fungos seguindo-se as de etiologia viral, várias com expressiva importância econômica (Gamez, 1977).

No Brasil, foram descritas mais de dez viroses em feijoeiro (Costa et al., 1972; Bianchini et al.,1997), citando-se aquela causada pelo *Southern bean mosaic virus* (SBMV), do gênero *Sobemovirus* (Hull & Fargette, 2005). Este vírus tem uma restrita gama de hospedeiras, confinada quase exclusivamente a espécies da família das leguminosas, sendo algumas de interesse econômico como o feijoeiro comum e a soja. Muito embora o SBMV não seja no momento um problema fitossanitário, observações de campo no Estado do Paraná têm indicado a sua presença em infecções mistas principalmente com o *Bean golden mosaic virus* (Gênero *Begomovirus*, Família *Geminiviridae*), levando à possibilidade de problemas futuros para a cultura do feijoeiro (Bianchini, A. Comunicação pessoal).

I.1 GÊNERO *Sobemovirus*

O nome *Sobemovirus* é originado das iniciais da espécie tipo do gênero ***So**uthern **be**an **mo**saic **virus*** e o gênero compreende 13 espécies definitivas, sendo elas: *Blueberry shoestring virus* (BSSV), *Cocksfoot mottle virus* (CoMV), *Lucerne transient streak virus* (LTSV), *Rice yellow mottle virus* (RYMV), *Ryegrass mottle virus* (RGMoV), *Sesbania mosaic*

virus (SeMV), *Solanum nodiflorum mottle virus* (SNMoV), *Southern bean mosaic virus* (SBMV), *Southern cowpea mosaic virus* (SCPMV), *Sowbane mosaic virus* (SoMV), *Subterranean clover mottle virus* (SCMoV), *Turnip rosette virus* (TRoV) e *Velvet tobacco mottle virus* (VTMoV) (Hull & Fargette, 2005). As espécies SBMV e SCPMV eram a princípio consideradas como isolados do SBMV (respectivamente isolados feijão e caupí) (Fauquet & Mayo, 1999). Há ainda 4 possíveis espécies no gênero, cujas características são similares aos sobemovírus, mas que necessitam de informações adicionais para serem incluídas. São elas: *Cocksfoot mild mosaic virus* (CMMV), *Cynosurus mottle virus* (CnMoV), *Ginger chlorotic fleck virus* (GCFV) e *Rottboellia mottle virus* (RoMoV) (Hull & Fargette, 2005).

A maioria das espécies dos sobemovírus apresentam distribuição geográfica limitada, mas algumas espécies são encontradas em várias partes do mundo (Hull, 1988). Os sobemovírus infectam plantas tanto mono como dicotiledôneas, mas a gama de hospedeiras de cada espécie é relativamente restrita. Os sintomas induzidos são, principalmente, mosaico e mosqueado e, em geral, causam infecção sistêmica invadindo quase todos os diferentes tipos de tecidos das plantas hospedeiras (Hull, 1988). São transmitidos mecanicamente, por vetores e por sementes. Para a maioria das espécies (CoMV, RYMV, SNMoV, SBMV, SCPMV, TRoV) a transmissão é feita por besouros coleópteros enquanto o BSSV é transmitido por afídeos, o VTMoV por mirídios e o SoMV por dípteros, homópteros e hemípteros (Hull, 1988; Tamm & Truve, 2000).

I.2 ORGANIZAÇÃO DO GENOMA

Os sobemovírus possuem partículas virais isométricas com cerca de 30 nm de diâmetro, com uma única camada proteica formada por 180 subunidades com massa molecular igual a 26-34 kDa. O RNA genômico é uma molécula de fita única e polaridade positiva com tamanho de aproximadamente 4 a 4,5 kb. A região 5’ terminal do RNA possui uma proteína ligada ao genoma (VPg) e na região 3’ terminal falta uma cauda poliadenilada. O genoma dos sobemovírus possui quatro cadeias abertas de leitura (“Open reading frame”, ORF) (Fig.1). Todos os sobemovírus seqüenciados contêm uma pequena ORF1 na extremidade 5’-terminal do genoma, que codifica a possível proteína do movimento célula-a-célula, e uma ORF4 na extremidade 3’-terminal que codifica a proteína capsidial. Com base nas diferenças de organização na parte central do genoma (que codifica uma poliproteína), os sobemovírus podem ser divididos em dois grupos: aqueles semelhantes ao SCPMV e aqueles semelhantes ao CoMV.

A poliproteína do SCPMV é codificada por uma longa e contínua ORF2, contendo também uma região codificadora interna, ORF3. Organização semelhante do genoma já foi descrita para o isolado Arkansas do SBMV (SBMV-Ark) (Lee & Anderson, 1998), isolado "Ivory Coast" do RYMV (RYMV-CI) (Yassi et al., 1994) e LTSV (Feffries et al., GenBank U31286).

Por outro lado, na organização genômica do CoMV falta a ORF2 contínua e uma região codificadora similar à ORF3 do SCPMV. Em vez disso, CoMV possui duas ORFs sobrepostas, ORF2a e ORF2b, e a poliproteína é expressa através de um mecanismo de mudança de fase ("frameshift") ribossomal -1 (Mäkinen et al., 1995a; Ryabov et al., 1996).

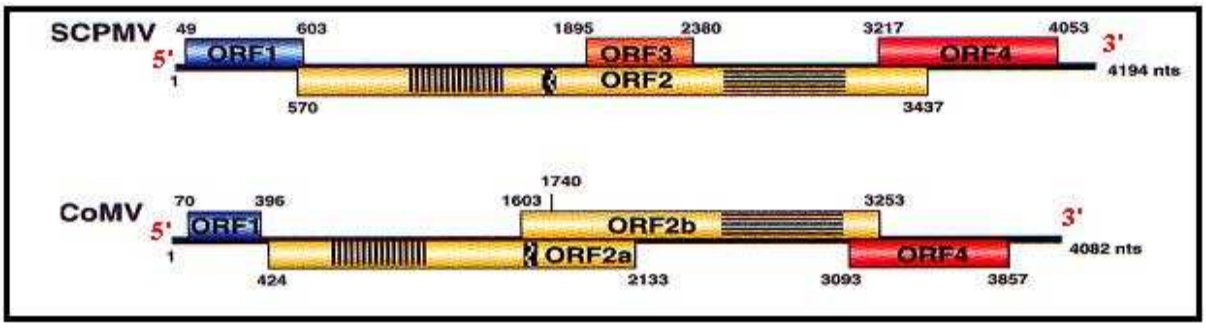


FIG. 1. Organização genômica dos sobemovírus *Southern cowpea mosaic virus* (SCPMV) e *Cocksfoot mottle virus* (CoMV). Figura obtida de Hull & Fargette (2005).

A única exceção com relação a esta subdivisão dos sobemovírus é o genoma do SBMV seqüenciado por Othman & Hull (1995). Neste, as ORFs 1, 2 e 4 não se sobrepõem como acontece com o SBMV-Ark e SCPMV (Fig.2).

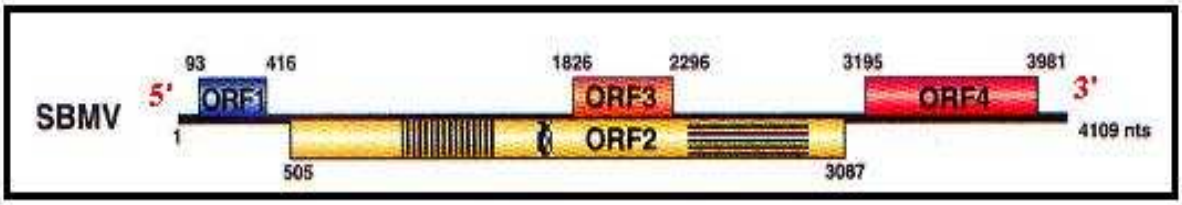


FIG.2. Organização do genoma do *Southern bean mosaic virus* descrito por Othman & Hull (1995). Figura obtida de Hull & Fargette (2005).

Diferentemente do SBMV, o isolado SBMV-Ark contém quatro ORFs que se sobrepõem, tornando-o mais similar em organização genômica (mas não em seqüência de

aminoácidos de suas proteínas) ao SCPMV (Lee & Anderson, 1998). Foi proposto que essa diferença na organização genômica entre o SBMV e SMBV-Ark resulta ou de mutações ou de erro no seqüenciamento do SBMV.

I.3 PRODUTOS GÊNICOS E SUAS POSSÍVEIS FUNÇÕES

Os RNA de vários sobemovírus já foram traduzidos *in vitro* em sistemas de "lisado de reticulócitos de coelho" e de "extrato de germe de trigo". Os RNA do SBMV e SCPMV codificam a tradução de 4 proteínas nesses sistemas: 105 kDa, 75 kDa, 29 kDa e 14 kDa para o SBMV e 100 kDa, 70 kDa, 30 kDa e 20 kDa para o SCPMV (Mang et al., 1982; Salerno-Rife et al., 1980). Quatro polipeptídeos foram também traduzidos a partir dos RNA do CoMV (Mäkinen et al., 1995), LTSV (Morris-Krsinick & Forster, 1983), SNMoV (Kiberstis & Zimmern, 1984) e TRoV (Morris-Krsinick & Hull, 1981), apresentando somente ligeiras diferenças na massa molecular.

Estudos têm demonstrado que as proteínas de 100 e 70 kDa do SCPMV são relacionadas e traduzidas a partir do RNA genômico enquanto a proteína de 20 kDa é presumivelmente codificada pela ORF1 (Mang et al., 1982; Wu et al., 1987). Já a poliproteína codificada pela ORF2 do SCPMV é processada por clivagem proteolítica para dar o produto de tradução de 70 kDa (Wu et al., 1987). A proteína de 30 kDa (proteína capsidial) é traduzida a partir de um pequeno RNA subgenômico (sgRNA) que já foi encontrado em tecidos infectados por sobemovírus bem como em partículas virais (Rutgers et al., 1980; Weber & Sehgal, 1982; Ryabov et al., 1996; Tamm et al., 1999). Estudos com o CoMV, utilizando a síntese de proteínas *in vitro* e imunoprecipitação com anticorpos específicos, mostraram que as proteínas de 12 kDa, 71 kDa e 100 kDa são sintetizadas a partir do RNA genômico do vírus. A proteína 12 kDa é produzida a partir da ORF1, a proteína 71 kDa a partir da ORF2a e a 100 kDa é a poliproteína produzida a partir das ORFs 2a e 2b. A proteína de 34 kDa (proteína capsidial) é produzida a partir de um sgRNA.

I.3.1 Proteína P1

Todos os sobemovírus caracterizados codificam uma pequena proteína a partir da ORF1, mas estas apresentam seqüências e massas moleculares diferentes (11,7 a 24,3 kDa) e não

são relacionadas com qualquer outra proteína conhecida. Análises de mutantes incapazes de produzir P1 ou mutantes produtores de proteínas truncadas indicaram que as proteínas P1 do RYMV ou do SCPMV não são necessárias para a replicação viral, porém são necessárias para o movimento célula-a-célula e movimento sistêmico (Bonneau et al., 1998; Sivakumaran et al., 1998). Proteína P1 recombinante do CoMV foi capaz de interagir com RNA de fita única (ssRNA) numa maneira independente da seqüência mas não com dsDNA (Tamm & Truve, 2000). Assim, levando-se em conta que nenhum outro produto gênico dos sobemovírus estaria relacionado com o movimento célula-a-célula ou movimento sistêmico do vírus, é proposto que a proteína P1 representa a proteína do movimento dos sobemovírus. Entretanto, a localização da proteína P1 *in vivo* ainda não foi possível para nenhum sobemovírus. Foi também descrito que a proteína P1 do RYMV funciona como supressora do mecanismo de silenciamento gênico ("posttranscriptional gene silencing", PTGS) (Voinnet et al., 1999).

I.4 CITOPATOLOGIA

Os efeitos citopáticos mais evidentes causados por espécies de sobemovírus são a distribuição de partículas virais no citoplasma e a formação de grandes agregados cristalinos no citoplasma e vacúolos (Francki et al., 1985). As células infectadas mostram extensa vacuolização citoplasmática, sendo que algumas espécies invadem células do floema e xilema (SBMV, RYMV) e partículas virais podem também ser encontradas em membranas das pontuações das paredes primárias (RYMV) (de Zoeten & Gaard, 1969; Opalka et al., 1998; Weintraub & Ragetli, 1970). Partículas virais são também encontradas no núcleo celular de plantas infectadas por sobemovírus. Yassi et al, (1994) verificaram que a parte N-terminal da proteína capsidial do RYMV contém uma seqüência que é idêntica ao "motivo de localização nuclear do tipo bipartido" (Dingwall & Laskey, 1991). Um motivo similar foi encontrado na região N-terminal da capa proteica de vários outros sobemovírus (Mäkinen et al., 1995). Estes resultados podem explicar a presença de partículas virais dos sobemovírus no núcleo celular durante o processo de infecção. Fora estas observações, nenhum determinante molecular tem sido associado com a localização tecido-específica ou subcelular das partículas dos sobemovírus. Nada é conhecido sobre a localização subcelular das proteínas não estruturais dos sobemovírus (Tamm & Truve, 2000).

I.5 O *Southern bean mosaic virus* NO BRASIL

O nome *Southern bean mosaic virus* deve-se ao fato de o vírus ter sido primeiramente descrito infectando feijoeiros na região sul dos Estados Unidos da América do Norte (Zaumeyer & Harter, 1942). Atualmente, sabe-se que o SBMV apresenta-se amplamente disseminado, sendo encontrado também em outros países como México, Nicarágua, Venezuela, Gana, Nigéria, Senegal, França, Índia, Paquistão e Espanha (Hull & Fargette, 2005; Tamm & Truve, 2000; Verhoeven et al., 2003; Segundo et al., 2004).

No Brasil, o SBMV foi detectado pela primeira vez no Distrito Federal (SBMV-DF) (Cupertino et al., 1982) e, posteriormente, mas ainda nos anos 80, foi também encontrado no Estado de São Paulo (SBMV-SP) (A.S. Costa. Dados não publicados). Mais recentemente, um isolado do SBMV foi encontrado no Estado do Paraná (Gasparin et al., 2005). No entanto, devido à facilidade de transmissão do SBMV (Sehgal, 1981; Hull, 1988), pode-se aventar que a distribuição geográfica do vírus pelo Brasil seja mais ampla.

Os besouros crisomelídeos *Diabrotica speciosa* e *Ceratoma arcuata* são os principais vetores do SBMV no Brasil (Costa & Batista, 1979; Silveira Jr. et al., 1983; Meyer et al., 1992), sendo que *C. arcuata* foi identificado como o vetor mais eficiente na transmissão desse vírus (Silveira Jr. et al., 1983), porém as relações vírus/vetor ainda não são bem conhecidas (Meyer et al., 1992). Também foi descrita a transmissão do SBMV pelas larvas de *C. arcuata*, do sistema radicular de plantas infectadas para o de plantas sadias, em uma taxa de 5,1% (Meyer et al., 1993). Esta taxa é pequena se comparada com a taxa de transmissão pelo inseto adulto (58,3%) (Silveira Jr. et al., 1983), no entanto, as larvas constituem população mais numerosa, o que torna a transmissão substancialmente importante (Meyer et al., 1993). Isso evidencia a possibilidade de transmissão do vírus através do solo, fato importante para a epidemiologia do SBMV.

Algumas propriedades moleculares foram determinadas para o isolado SBMV-SP: (a) as partículas virais apresentam diâmetro de 28-30 nm e a proteína capsidial possui massa molecular de 30 kDa; (b) das partículas virais foram extraídos RNAs de vários tamanhos, sendo o de 4,2 kb o RNA genômico e o de 1,0 kb supostamente um RNA subgenômico que codifica a proteína capsidial (Moreira & Gaspar, 2002).

A região 5’-terminal do SBMV-SP foi caracterizada (Espinha et al., 2004) evidenciando uma região não codificadora, com 92 nucleotídeos (nt), precedendo o códon de iniciação da ORF1. Na região não codificadora foi detectado um segmento parcialmente

complementar ao RNA ribossomal 18S. A ORF1 codifica uma proteína de 147 aminoácidos com massa molecular estimada de 17080 Da. A extremidade 3'-terminal da ORF1 do SBMV-SP sobrepõe a extremidade 5'-terminal da ORF2 em 34 nucleotídeos. A região 3'-terminal foi também caracterizada (Espinha et al., 2005) mostrando a ORF4 (proteína capsidial) contendo 801 nt (incluindo o códon de terminação UGA) com seqüência deduzida de 266 aminoácidos e massa molecular estimada de 28.800 Da. Sessenta e um aminoácidos terminais da ORF2 estão sobrepostos na ORF4. A seqüência da ORF4 do SBMV-SP apresentou identidade de nucleotídeos e aminoácidos de, respectivamente, 91% e 93% com o isolado Arkansas (SBMV-Ark) descrito nos EUA, indicando serem isolados muito proximamente relacionados. Mais recentemente, o genoma completo do SBMV-SP foi determinado através do seqüenciamento da ORF2 (Ozato Jr. et al., 2006). Os domínios para serino protease, VPg e RpRd (poliproteína) foram identificados bem como a presença da ORF3 contida na ORF2. Juntos, esses dados permitem concluir que o genoma do SBMV-SP possui 4133 nucleotídeos, com 3 ORFs sobrepostas e uma ORF2 contínua contendo uma região codificadora interna (ORF3). Assim, a organização do genoma do SBMV-SP mostra-se semelhante ao SBMV-Ark (Lee & Anderson, 1998) e diferente do SBMV (Othman & Hull, 1995), corroborando a proposição de erro no seqüenciamento do SBMV. A Figura 3, mostra a organização do genoma do SBMV-SP.

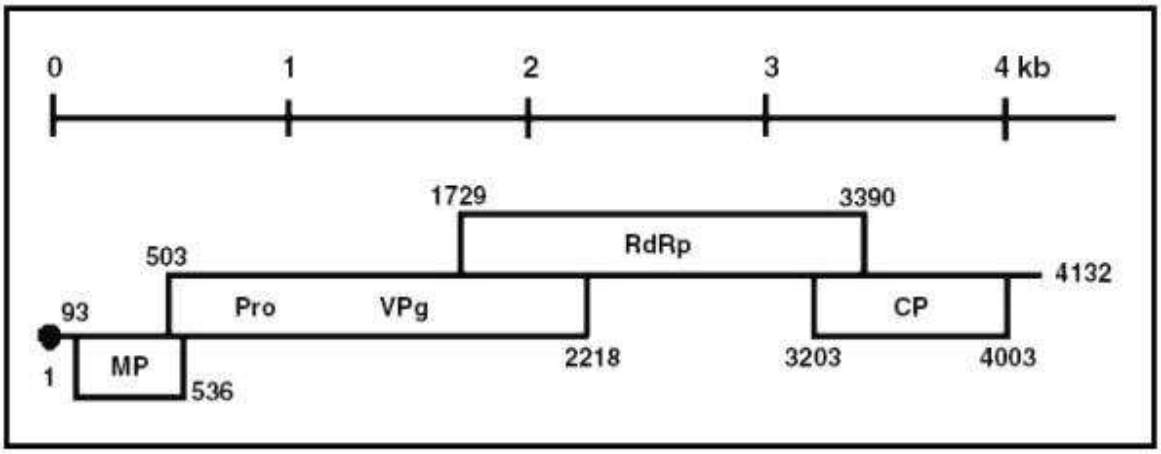


FIG.3. Organização do genoma do *Southern bean mosaic virus* isolado São Paulo (SBMV-SP).MP, proteína do movimento; VPg, proteína ligada ao genoma; RdRp, polimerase; CP, capa protéica.

I.6 Proteína do Movimento

Para realizar uma infecção sistêmica na planta hospedeira, os fitovírus precisam superar diversas barreiras. Eles devem entrar na célula através de um ferimento ou inoculação por vetores, iniciar a multiplicação, translocar para as células vizinhas (movimento célula a célula) e finalmente para as outras partes da planta (movimento a longa distância).

Os fitovírus empregam comunicações intercelulares para se movimentarem pela planta. No movimento célula a célula os vírus utilizam os plasmodesmos para atravessar a parede celular. Os plasmodesmos são canais estreitos revestidos pela membrana plasmática e atravessados por um túbulo de retículo endoplasmático modificado, conhecido como desmotúbulo. Esses canais permitem a continuidade do citoplasma e do sistema de endomembranas entre as células (Raven et al., 2001). Em células vegetais sadias, apenas moléculas com massa molecular inferior a 1 kDa são capazes de atravessar passivamente esses canais, que possuem limite de exclusão muito inferior à massa molecular dos menores fitovírus, ou mesmo de seus RNAs ou DNAs genômicos (Wolf et al., 1987). Para suprir essa restrição física, os fitovírus codificam proteínas especializadas, denominadas Proteínas do Movimento (MPs), capazes de dilatar os plasmodesmos permitindo a passagem de complexos formados por proteínas mais ácidos nucléicos virais ou mesmo de vírions inteiros (Deom et al., 1992).

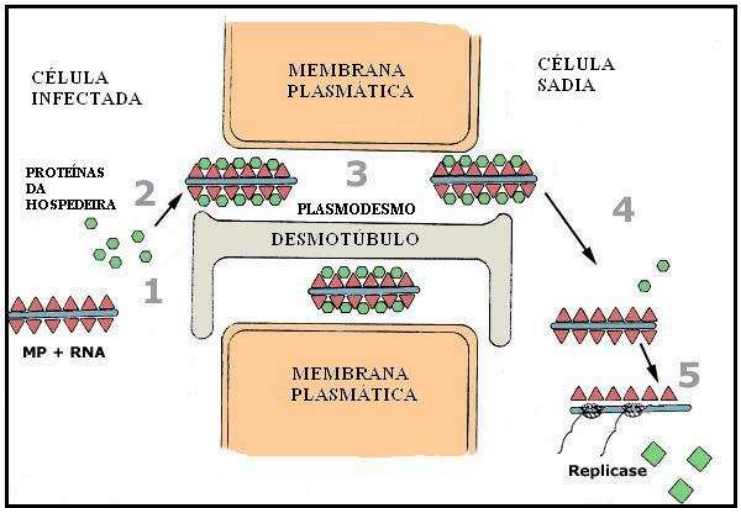


Figura 4. Movimento célula-célula do *Tobacco mosaic virus* (TMV). Neste modelo a proteína do movimento (MP) se liga ao RNA viral.[1] Proteínas da hospedeira podem se ligar ao complexo MP.[2] O complexo MP atravessando o plasmodesmo.[3,4 e 5] As proteínas se desligam do RNA viral permitindo que as replicases iniciem a replicação.

Para o transporte a longa distância, além dos plasmodesmos, foi proposta a utilização do sistema vascular da planta (floema) (Carrington et al., 1996).

Durante todo esse processo de transporte, uma ou mais proteínas virais exercem papel fundamental. A maior parte dos vírus de plantas estudados parece expressar uma proteína especificamente relacionada com o movimento, denominada "Proteína do Movimento" ("Movement Protein" - MP), que está envolvida no transporte dos vírus através dos plasmodesmos (Lazarowitz & Beachy, 1999). O papel da MP no movimento a longa distância ainda é mal compreendido, no entanto alguns autores sugerem que a MP realize funções específicas no espalhamento dos vírus sistemicamente (Hilf & Dawson, 1993). Os fitovírus são classificados em três grupos principais com base na necessidade ou não da proteína capsidial (CP) para atravessarem os plasmodesmos. O grupo I compreende os vírus que não necessitam da CP para realizarem o movimento. Nos vírus do grupo II a CP age auxiliando a MP no movimento e protegendo o genoma viral. Os vírus do grupo III também requerem a CP, porém, são transportados como partículas inteiras (Scholthof, 2005). O movimento envolvendo CP pode ocorrer através de túbulos (movimento "túbulo-guiado") e é utilizado por uma grande variedade de vírus de planta, dentre eles: tospovírus, comovírus, caulimovírus, bromovírus, alfamovírus (Lazarowitz e Beachy, 1999; Carrington et al., 1996). Nesses casos, os plasmodesmos das células infectadas são drasticamente modificados, os desmotúbulos são removidos e um túbulo formado por MP é inserido no poro plasmodesmal (Figura 5). É por esse túbulo que as partículas virais são transportadas, sendo que neste tipo de transporte a proteína capsidial é também requerida (Lazarowitz e Beachy, 1999; Carvalho et al., 2004).

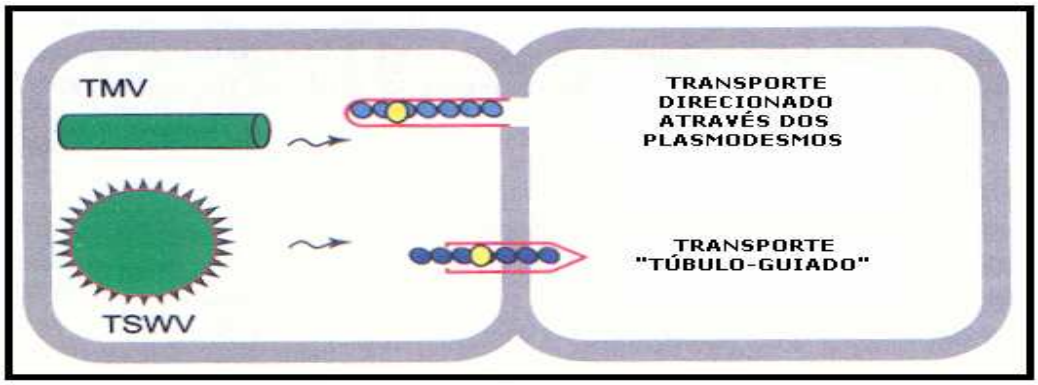


Figura 5. [A] Movimento célula a célula do TMV e [B] do TSWV. As esferas amarelas representam a proteína do movimento e as esferas azuis representam a proteína capsidial, ambas associadas ao RNA viral A linha vermelha representa o desmotúbulo. *(Figura adaptada de Scholthof, 2005).*

As MPs virais podem ser agrupadas em quatro superfamílias: I) MPs codificadas pelo bloco triplo de genes dos potexvírus e vírus relacionados; II) MPs dos tymovírus; III) uma série de pequenos polipeptídeos menores que 10 kDa, codificados pelos carmovírus e alguns geminivírus; IV) a superfamília '30 K', relacionada com a MP de 30 kDa do TMV. Para a superfamíla '30 K' foram propostos dois modelos de movimento, o primeiro é exemplificado pelo *Tobacco mosaic virus* (TMV) e está relacionado com o aumento do limite de exclusão dos plasmodesmos e o segundo, típico dos comovírus, ocorre através de túbulos (Fig. 5). Melcher (2000) após alinhar a seqüência de aminoácidos das MPs de 30 kDa de vários gêneros de fitovírus mostrou que os agrupamentos formados estão relacionados com o tipo de movimento realizado pelo vírus. Um grupo reúne os vírus formadores de túbulos e outro, aqueles vírus que não se movimentam por túbulos

II. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram a expressão da possível proteína do movimento do SBMV e sua purificação por cromatografia de afinidade para produção de anti-soro policlonal. O anti-soro produzido será utilizado para testes imunológicos visando detecção da proteína P1 em tecidos de planta infectado, permitindo expandir o conhecimento a respeito das estratégias de multiplicação e movimentação do SBMV nas hospedeiras.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III. 1 Purificação das partículas virais

Folhas de *Phaseolus vulgaris* (L) 'Jalo' infectadas pelo SBMV-SP foram trituradas em liquidificador com 2 volumes de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2, contendo 0,5% 2-mercaptoetanol. A solução foi filtrada em gaze, clarificada com clorofórmio (0,5 ml/g de folha) e centrifugada 20 min a 16.000 g e 4°C. O vírus foi precipitado pela adição de polietilenoglicol (PEG 8000) a 10% e NaCl 1,0%, sob agitação por 2 h a 4°C, e então centrifugado por 10 min a 16000 g e 4°C. O sedimento foi ressuspendido em 1/10 do volume inicial de tampão fosfato 0,01 M pH 7,2 e submetido a um ciclo de baixa e alta rotação (16000 g/10 min e 100000g/90min). O "pellet" final foi ressuspendido em tampão fosfato e aplicado em gradiente de sacarose (10-50%) em tampão fosfato 0,01 M pH 7,2. por 1:30 h a 100000 g. A banda formada pelo vírus purificado foi coletada, diluída e ultracentrifugada por 1 h a 100000 g, dissolvendo-se o sedimento final em 1 ml de tampão fosfato 0,01 M pH 7,0.

III. 2 Obtenção de RNA viral

O RNA foi obtido a partir de partículas purificadas do SBMV. A extração do RNA viral foi feita utilizando-se o "RNeasy Plant Mini Kit" conforme especificações do fabricante (QIAGEN). O extrato foi eluído em água DEPC e estocado a -20°C.

III. 3 Desenho dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando-se o programa "Primer 3.0" a partir da seqüência (DQ875594) do genoma do SBMV depositada no GenBank.

A seqüência da possível proteína do movimento foi amplificada utilizando-se os oligonucleotídeos:

SBMVMP-pETF: 5' – CCGGATCCATGAGCTATCGT – 3'

SBMVMP-pETR: 5' – AAGCTTCCGCGCAGATAA – 3'

Os sítios de restrição, para as enzimas *Bam* HI (oligonucleotídeo senso) e *Hind* III (oligonucleotídeo anti-senso), estão sublinhados.

III. 4 Produção de cDNA

Oligonucleotídeo anti-senso (3'-AAGCTTCCGCGCAGATAA-5') e o RNA viral foram desnaturados por aquecimento a 94°C por 10 min, imediatamente resfriados em gelo, e, em seguida os demais componentes foram adicionados. A reação teve volume total de 20 µl, consistindo de: 50 mM Tris.HCl pH 8,3; 75 mM KCl; 10 mM DTT; 0,1 mM cada dCTP, dGTP, dATP, dTTP; 0,4 µM do oligonucleotídeo, 2 unidades de inibidor de RNAse; 1µg RNA viral e 40 unidades de Transcriptase Reversa "Superscript II" (Invitrogen). A reação permaneceu incubada por 2 h a 42°C.

III. 5 Amplificação do gene da proteína do movimento (PCR)

O volume de cada reação da PCR foi de 25µl consistindo de tampão (Tris.HCl 20mM pH 8,4; KCl 50 mM); 5,0 mM $MgCl_2$; 0,2 mM cada dCTP, dGTP, dATP, dTTP; 10µg/mL de cada oligonucleotídeo (senso e anti-senso); 1 µl da mistura de reação de cDNA; e 2 unidades de *Taq* polimerase (Invitrogen). O programa da PCR foi realizado em Termociclador MJ Reserch que consiste em uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 1 minuto de anelamento a 53°C e um minuto de extensão a 72°C. Após 35 ciclos e uma extensão final por 10 minutos a 72 °C os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% como descrito no item a seguir.

III. 6 Purificação do fragmento amplificado

Uma alíquota da reação de PCR foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (Tris.HCl 0,04 M; acetato de sódio 0,02 M; EDTA 0,001 M pH 8,3). A banda, referente ao fragmento amplificado, foi retirada do gel com lâmina e purificada com o "Mini Elute Gel Extraction Kit" (Invitrogen) seguindo-se as orientações do fabricante. O DNA foi quantificado em gel de agarose 1%, utilizando-se "Low DNA Mass Ladder" (Invitrogen) como marcador.

III. 7 Ligação do fragmento amplificado em vetor para multiplicação (pGEM)

Para esta ligação foi utilizado o "pGEM – T Easy Vector System I" seguindo-se as orientações do fabricante (Promega). A reação foi submetida a 4°C por 16h.

III. 8 Sequenciamento do vetor pGEM + inserto

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando-se o seqüenciador automático "ABI 377 DNA Sequencer" e o "ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Perkin Elmer), seguindo as instruções do fabricante. Para o sequenciamento do DNA purificado foi utilizado o oligonucleotídeo senso "T7" (Promega). A reação consistiu em: 200µg de DNA, 1µL de primer (10 pmol/µL) e 2 µL dasolução de BigDye.

As comparações com seqüências existentes no banco de dados do GenBank foram feitas através do programa BLAST do "National Center for Biotechnology Information" (NCBI).

III. 9 Transformação em célula competente (*Escherichia coli* - TOP 10)

Após a reação de ligação o vetor recombinante foi transformado em *E. coli* linhagem TOP 10, utilizando-se 50µL de células competentes e 5µL da reação de ligação. Essa mistura permaneceu no gelo durante 1 hora e, então, submetida ao choque de temperatura a 42ºC por 1 min e 2 min no gelo. Em seguida foram adicionados 250µL de meio líquido SOC (meio SOB + 200mM de glicose) e as bactérias foram submetidas à regeneração (1 hora a 37ºC com agitação à 250 rpm). Posteriormente, as bactérias foram plaqueadas em meio sólido seletivo (LB + ampicilina 100µg/mL), contendo ainda 40µL de X-Gal 20mg/mL (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranoside) e as colônias brancas testadas para comprovar a existência do inserto através de PCR. As colônias que apresentaram o inserto foram inoculadas em tubos individuais de 5mL de meio líquido seletivo (LB + ampicilina 100µg/ml) sob agitação e aeração constantes a 37ºC para posterior extração do DNA plasmidial.

III. 10 Purificação do plasmídeo recombinante

O DNA plamidial foi purificado utilizando-se o "Pure Link Quick Plasmid Miniprep Kit", seguindo-se as orientações do fabricante (Invitrogen). O DNA plasmidial foi eluído em 50 µl de tampão TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH: 8,0).

III. 11 Digestão enzimática com *Bam* HI e *Hind* III

Para cada 1 μg de DNA foram utilizadas 10 unidades (1μl) de cada enzima *Bam* HI e *Hind* III (Promega). A reação de digestão de 50 μl consistiu de: 25 μl de vetor (125 ng/μl), 3 μl de cada enzima, 5 μl de tampão E 10X, 5,0 μl de BSA 10X e 9 μl de água. A mistura foi submetida à temperatura de 37°C por 2h e a 65°C por 15 min. Em seguida, a mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose e a banda referente ao fragmento extraída conforme o item III. 6.

III. 12 Digestão enzimática e defosforilação do vetor de expressão (pMAL)

O vetor de expressão pMAL-2c do "pMAL Protein Fusion and Purification System" (Bio Labs) foi digerido seguindo os passos descritos no item VI.9. Em seguida, o vetor digerido foi defosforilado utilizando-se a enzima CIAP (Fosfatase alcalina de intestino de bezerro) (Invitrogen), 5 unidades de enzima para cada 1μg de DNA. A mistura foi submetida a 37°C por 30 min e a 75°C por 10 min.

III. 13 Ligação do DNA em vetor de expressão (pMAL)

Para esta reação de ligação foram utilizados 50 ng de vetor pMAL previamente digerido e defosforilado, 50 ng de DNA, 3 unidades de T4 DNA ligase (Promega) e tampão de ligação (Promega). A mistura foi submetida a 4°C por 16h.

III. 14 Transformação em célula competente (*E. coli* linhagem DH5α)

A transformação do vetor recombinante pMAL em *E. coli* linhagem DH5α seguiu o mesmo protocolo descrito no item III.9. As colônias que apresentaram o inserto foram inoculadas em tubos individuais de 5mL de meio líquido seletivo (LB + ampicilina 100μg/ml) sob agitação e aeração constantes a 37ºC, o que serviu como pré-inóculo para o teste de expressão.

III. 15 Testes de expressão

Inicialmente 700 μl do pré–inóculo foram transferidos para um novo tubo contendo 7 ml de meio líquido seletivo (LB + ampicilina 100μg/ml). O tubo foi mantido sob agitação e aeração a 37°C por 90 min e em seguida foi feita uma leitura da amostra em espectrofotômetro (a OD_{550} deverá estar entre 0,5 e 0,65 nm para que a expressão possa ser induzida). A indução

de expressão foi feita com IPTG 1 mM por 4 horas. Foram coletadas amostras após 30 min, 2 h e 4h da indução.

III. 16 Análise em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%

A eletroforese foi feita em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970). As proteínas foram desnaturadas por fervura (3min a 100°C) em tampão de amostra (Tris.HCl 0,125 M pH 6,8, contendo SDS 4%, glicerol 20%, 2-ME 10% e azul de bromofenol 0,001 M). As amostras foram centrifugadas por 5 min a 16.000 g e 10 μl do sobrenadante de cada amostra foram aplicados no gel. A eletroforese foi conduzida por 90 min a 100 V em aparelho Mini Protean II (BioRad). Os géis foram fixados e corados em mistura contendo metanol, água, ácido acético (50:50:10) e Comassie Blue 0,25% por 3 h e descorados com metanol e água (1:1) por 18 h.

III. 17 Expressão da proteína recombinante (pMAL)

Inicialmente, 4 ml de pré-inóculo foram transferidos para um novo tubo contendo 250 ml de meio líquido seletivo (LB + ampicilina 100μg/ml). O tubo foi mantido sob agitação e aeração a 37°C por 3h e em seguida foi feita uma leitura da amostra em espectrofotômetro (a OD_{550} deverá estar entre 0,5 e 0,65 para que a expressão possa ser induzida). A indução de expressão foi feita com IPTG 1 mM por 4 horas. Em seguida, o meio foi centrifugado por 20 min a 4.000 g e 4°C. O “pellet” foi ressuspendido em 12,5 ml de tampão de lise (20 mM tampão fosfato, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,2) e mantido a –20°C por 16h. A solução foi descongelada em banho de gelo e submetida a pulsos de 15s a 300 W em sonicador (Marconi, modelo MA 103) para lise celular. Esta amostra foi centrifugada por 20 min a 4.000 g a 4°C. A fase aquosa foi coletada e utilizada para a purificação da proteína de interesse.

III. 18 Purificação da proteína recombinante

A proteína de interesse expressada foi purificada por cromatografia de afinidade em colunas com resina à base de amilose (BioLabs), conforme o protocolo do “pMAL Protein Fusion and Purification System” (Bio Labs). A eluição foi feita em tampão fosfato 20 mM pH 7,2, NaCl 200mM, contendo Maltose 100 mM.

III. 19 Produção de Anticorpos

A produção do antissoro policlonal para a proteína recombinante do SBMV-SP foi realizada no Laboratório de Virologia (Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Esalq/USP – Piracicaba) sob orientação do professor Dr. Jorge A. M. Rezende. A proteína purificada foi injetada em coelho branco da raça Nova Zelândia através de cinco injeções intramusculares, a intervalos semanais, com 300 μg de proteína por injeção.

III. 20 Expressão e purificação da provável MP em vetor de expressão pET-28a

Os passos anteriores à construção do vetor de expressão foram idênticos aos descritos nos itens III.5 até III.13. Para a construção do vetor de expressão foram utilizados 50 ng de vetor pET-28a (Novagen), previamente digerido e defosforilado, 50 ng de DNA, 3 unidades de T4 DNA ligase e tampão de ligação (Promega). A mistura foi submetida a 4 °C por 16 h. A transformação em *E. coli* linhagem BL21(DE3)-RIL foi feita como descrito no item III.14. As colônias foram testadas por PCR, sendo que uma das colônias positivas foi utilizada para o pré-inóculo. Inicialmente, 4 mL de pré-inóculo foram transferidos para um novo tubo contendo 250 mL de meio líquido seletivo (LB + canamicina e cloranfenicol 100 μg/mL). O tubo foi mantido sob agitação e aeração a 37 °C por 1h30 e em seguida foi feita uma leitura da amostra em espectrofotômetro. A indução de expressão foi feita com IPTG 1 mM por 4 h. Em seguida, o meio foi centrifugado a 3.000 x g por 20 min. O "pellet" foi ressuspendido em 20 mL tampão de lise (20mM fosfato de potássio, 500 mM NaCl e 6 M Guanidina). A solução foi submetida a 6 pulsos de 15 s a 300 W em sonicador (Marconi - MA 103) para lise celular. A purificação foi feita em coluna de afinidade utilizando resina de níquel (ProBond) conforme instruções do fabricante (Invitrogen).

III. 21 Teste de Titulação do antissoro policlonal por "Dot-blot"

Para o teste de titulação utilizou-se uma amostra da provável MP expressa e purificada conforme o item III.20. A amostra foi aplicada em membrana de nitrocelulose (Hybond-C, Amersham Biosciences) utilizando-se o "Bio-Dot Microfiltration Apparatus" conforme especificações do fabricante (Bio-Rad). A concentração de proteína aplicada por "Dot" foi 20 ng. Foram testadas as seguintes diluições do antissoro: 1:1000; 1:2000; 1:4000; 1:8000; 1:16000; 1:32000 e 1:64000. A detecção foi feita conforme o item III.23.

III. 22 Teste de Titulação e especificidade do antissoro policlonal por "Western blot"

Alíquotas da proteína purificada pelo sistema pET28a foram aplicadas em gel desnaturante de SDS-poliacrilamida. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em um eletrotransferidor (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad) operando sob voltagem constante (100V) por 60 minutos utilizando tampão de transferência Tris-Glicina (Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M) contendo Metanol 20%. A membrana foi incubada com o antissoro específico em diluição 1:1000. Alíqotas de Soro de Albumina Bovina (BSA) e Polimerase recombinante do SBMV-SP foram utilizadas para testar a especificidade do antissoro.

III. 23 Detecção

A detecção da proteína na membrana de nitrocelulose foi feita incubando a membrana em tampão PBS (Fosfato de sódio 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,2) contendo Tween-20 0,3% (PBS-T) e albumina de soro bovino (BSA) 3% por 3h. Em seguida, a membrana foi incubada por 1h com o antissoro específico diluído 1:1.000 em tampão PBS-T contendo BSA 0,3% e heparina (20 μg/ml). A membrana foi lavada com tampão PBS-T e incubada com anti-soro anti-IgG de coelho acoplado com fosfatase alcalina (Sigma) diluído em tampão PBS-T contendo BSA 0,3% na proporção de 1:30.000 por 1 h. Após lavagens com tampão PBS, a membrana de nitrocelulose foi incubada com mistura de BCIP/NBT ("5-bromo-4chloro-3-indolyl-phosphate/nitro-blue tetrazolium") até o aparecimento do resultado da reação (cor azul púrpura).

VI. RESULTADOS

IV.1 Purificação das partículas virais

Uma fração do vírus purificado foi observada em gel SDS-PAGE 12% (Figura 6). Observou-se uma única banda de aproximadamente 30kDa referente à proteína capsidial do vírus. A amostra não apresentou contaminantes, mostrando a eficiência do procedimento de purificação. A relação da leitura da absorbância à luz ultravioleta 260nm/280nm foi de 1,648. Os dados de absorbância permitiram o cálculo da concentração viral que foi de 9,06mg/ml e um rendimento de 45,3mg/kg de folha.

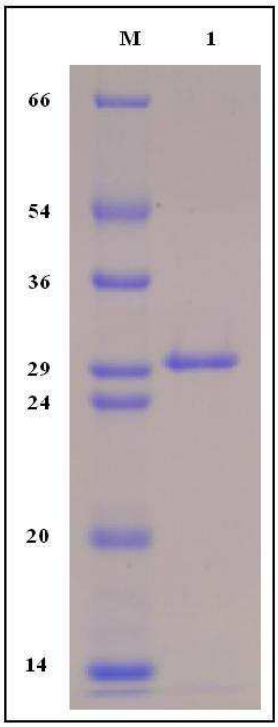


Figura 6. SDS-PAGE 12 % evidenciando a proteína capsidial das partículas virais purificadas. (M) Marcador para proteínas Dalton Mark VII-L (Sigma), valores representados em kDa. (1) Proteína capsidial do SBMV-SP.

IV.2 Extração do RNA viral

O RNA viral extraído a partir de partículas purificadas foi analisado em gel de agarose 1% evidenciando única banda com massa molecular de aproximadamente 4,2 kb, correspondente ao RNA genômico do SBMV-SP (Figura 7).

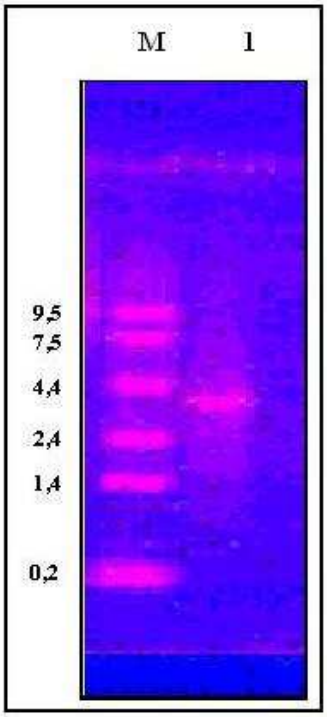


Figura 7. Análise do RNA viral extraído de partículas purificadas de SBMV em gel de agarose 1%. (**M**): Marcador de tamanho molecular em kb; (**1**): RNA com 4,2kb.

IV.3 Amplificação por PCR do gene da possível proteína do movimento

O produto da reação de PCR, amplificado com os oligonucleotídeos específicos, foi analisado em gel nativo de agarose 1%, apresentando única banda de aproximadamente 500pb correspondente ao fragmento de tamanho esperado para o possível gene codificador da proteína do movimento (Figura 8). O fragmento amplificado foi purificado e ligado ao vetor pGEM-T.

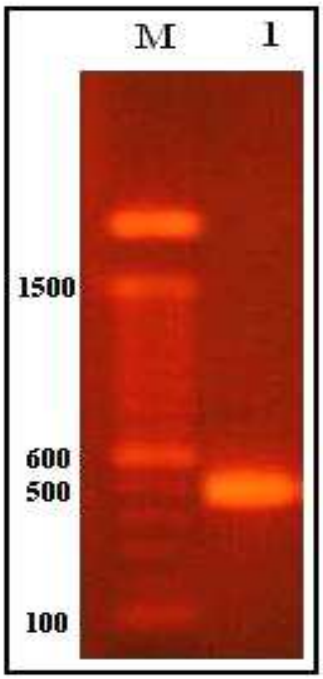


Figura 8. Gel nativo de agarose 1% evidenciando o fragmento de 500 pares de bases amplificado por PCR. M: Marcador molecular DNA Ladder 100bp (Invitrogen); 1: Fragmento amplificado de aproximadamente 500 pb.

IV.4 Digestão enzimática do vetor pGEM com *Bam* HI e *Hind* III

A digestão do vetor recombinante pGEM-T com as enzimas *Bam* HI e *Hind* III liberaram o fragmento clonado de 500 pb, conforme esperado (Figura 9). O fragmento foi purificado e utilizado na reação de ligação ao vetor pMAL.

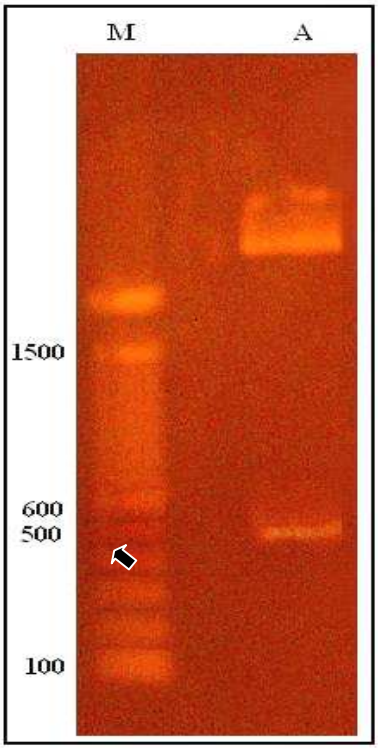


Figura 9. Gel nativo de agarose 1% evidenciando digestão enzimática do vetor pGEM com liberação de fragmento. (M) Marcador molecular DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). (A) Fragmento referente ao DNA plasmidial na parte superior do gel e fragmento liberado de aproximadamente 500 pb (seta).

IV.5 Testes de expressão da MP em vetor pMAL e purificação da proteína recombinante MP-MBP

Em SDS-PAGE 10% (Figura 10) ficou evidenciada a expressão de uma proteína de cerca de 60 kDa (17 kDa referentes à provável MP viral + 43 kDa referentes à proteína de fusão do pMAL – "Maltose Binding Protein"). A partir de agora, a proteína recombinante de 60 kDa, será denominada MP-MBP. Esta proteína foi purificada em condições nativas e as frações referentes às eluições da proteína de interesse estão evidenciadas em SDS-PAGE 10% (Figura

10). As frações de G a L (sem contaminantes) foram juntadas, concentradas e utilizadas para produção de antissoro.

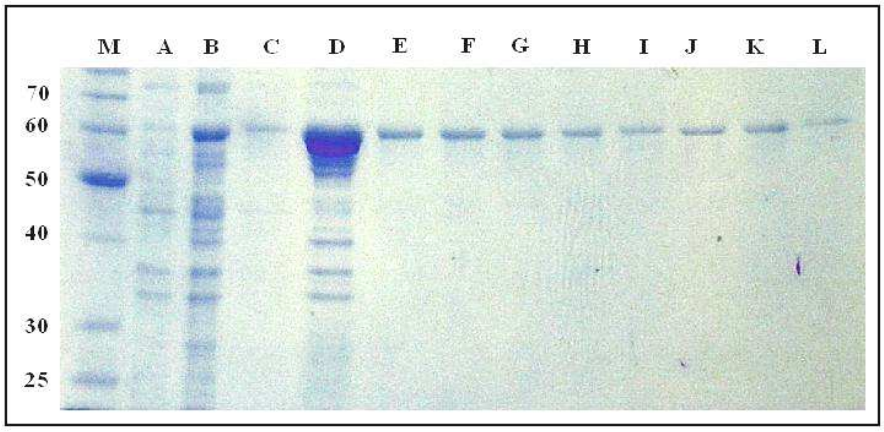


Figura 10. SDS-PAGE 10% mostrando a expressão da proteína de fusão MP-MBP. (M) Marcador para proteínas, Bench Mark Protein Lader (Invitrogen) (A) Amostra-controle sem indução. (B) Amostra após 1hora de indução, (C) Etapa de Lavagem do processo de purificação, (D ,E, F, G, H, I, J, K e L) Frações referentes às eluições

IV.6 Expressão da provável MP em vetor pET28a

O fragmento amplificado foi também ligado em pET28a, transformado em E. *coli* linhagem BL21(DE3)-RIL e a proteína expressa foi purificada em coluna contendo resina de níquel. Neste sistema a proteína é expressa contendo uma cauda contendo 6 histidinas, aumentando sua massa molecular em 5kD como observado na figura 11.

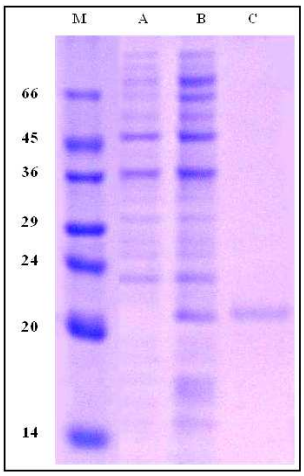


Figura 11. Gel de poliacrilamida 12% mostrando a expressão da proteína de aproximadamente 22 kDa (MP-His). (M) Marcador para proteínas, Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen); (A) Amostra-controle contendo pET28a sem inserto. (B) 1 h de indução de amostra contendo pET28a recombinante, (C) MP-His purificada (17 kDa referente à MP + 5 kDA referente à cauda de histidina).

IV.7 Teste de titulação do antissoro policlonal por "Dot-blot"

O teste de titulação para o antissoro MP-SBMV produzido foi realizado aplicando-se 20 ng de proteína purificada obtida pelo sistema de expressão e purificação pET 28a, MP-His. Para cada "dot" foi testada uma diluição diferente do antissoro (Figura 12).

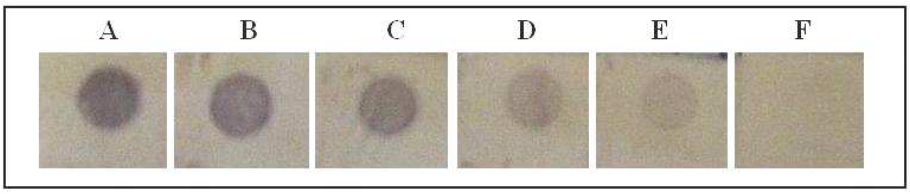


Figura 12. Teste de titulação do antissoro policlonal obtido em coelho contra a proteína MP-His do SBMV. As letras de A a F representam as diluições do antissoro na seguinte ordem: 1:1.000; 1:2.000; 1:4.000; 1:8.000; 1:16.000; 1:32.000.

IV.8 Teste para determinação da especificidade do antissoro por "Western-blot"

A especificidade do antissoro produzido foi determinada por testes de "Western-blot" e representados pela Figura 13. As proteínas mostradas na Figura 13A (gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%) foram transferidas para membrana de nitrocelulose, que foi incubada com o AS-MP-SBMV (Figura 13B).

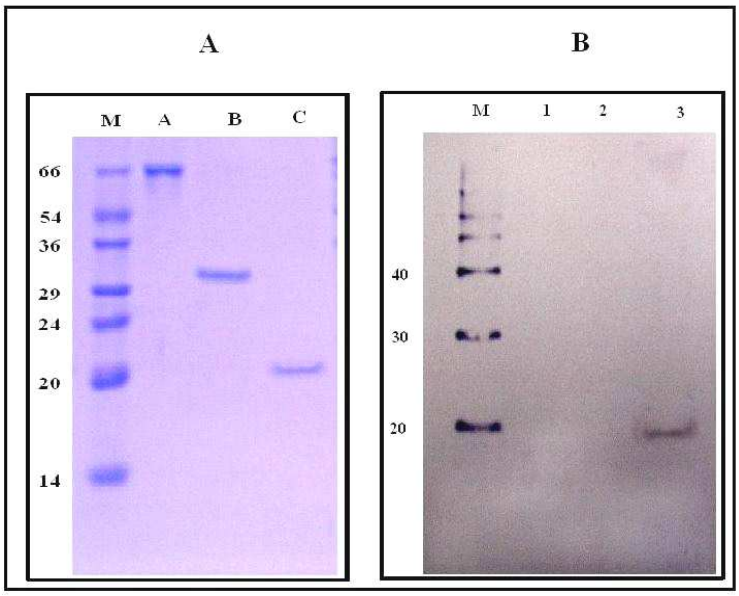


Figura 13. **Quadro (A)** SDS-PAGE 12% : (M) Marcador de massa molecular, Dalton Mark VII-L (Sigma); (A) BSA; (B) Porção C-terminal da Polimerase do *Southern bean mosaic virus*, SBMV (proteína obtida no Laboratório de Fitovirologia do IBILCE/UNESP); (C) MP-His do SBMV. **Quadro (B)** "Western-blot" utilizando o AS-MP-SBMV-MP (M) Marcador de massa molecular, Magic Mark XP (Invitrogen); (1) BSA; (2) Porção C-terminal da Polimerase do SBMV; (3) MP-His do SBMV.

IV.9 Teste para determinação da eficiência do antissoro por "Dot-blot"

Em membrana de nitrocelulose foram aplicadas, nos diferentes "dots", concentrações decrescentes de proteína purificada. A Figura 14 mostra o resultado do teste de eficiência realizado com o AS-MP-SBMV a uma diluição de 1:1000. Concentrações maiores que 1,8ng foram detectadas.

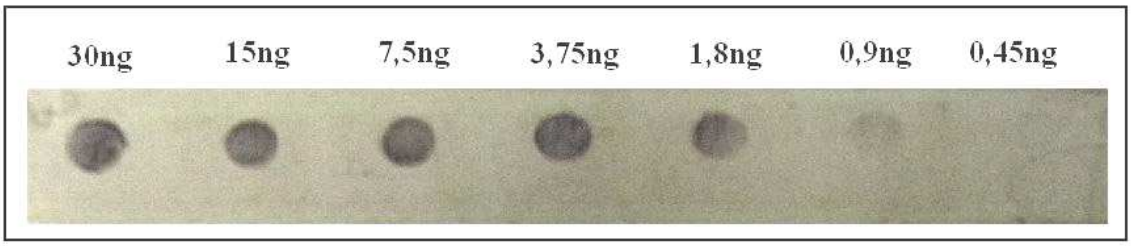


Figura 14. Teste de detecção da proteína MP-His do SBMV em diferentes concentrações utilizando antissoro policlonal obtido em coelho.

V. DISCUSSÃO

A primeira evidência de que uma proteína relacionada com o movimento era codificada pelos fitovírus foi dada pelos estudos de Nishiguchi e coloboradores em 1978. Através de estudos com mutantes do TMV sensíveis a uma temperatura específica ficou comprovado que na ausência de uma determinada proteína o vírus se replicava normalmente, porém, não se espalhava pela planta. Esses experimentos permitiram identificar uma proteína de 30 kDa como a proteína responsável pelo movimento célula a célula do TMV. Desde então, proteínas relacionadas com a movimentação viral de uma célula a outra têm sido identificadas para a maioria, senão todas, as famílias de vírus de plantas (Carrington et al., 1996; Hull, 2002). As MPs, assim como as replicases, são proteínas não estruturais que, em geral, são produzidas em baixa concentração nas plantas, o que dificulta a identificação, localização e a purificação (Hull, 2002).

Uma das técnicas moleculares utilizadas para estudo de proteínas não estruturais é a expressão em *Escherichia coli*, o que permite que grandes quantidades de proteínas sejam produzidas, purificadas e, posteriormente, utilizadas para, por exemplo, a produção de antissoros policlonais específicos. As células procarióticas (*E. coli*) são normalmente preferidas para a expressão de proteínas heterólogas pelo fato de oferecerem algumas vantagens como (1) fonte de

carbono de baixo custo para o crescimento, (2) rápido acúmulo de biomassa, (3) possibilidade de uso em processo de fermentação com alta densidade de células, (4) possibilidade de produção de proteínas em larga escala (Panda, 2003). Um variável número de protocolos está à disposição, os quais descrevem várias estratégias de expressão (Sahdev et al., 2008).

Nos sistemas pET (Novagen) e pMAL (BioLabs), a expressão da proteína recombinante está sob o controle do promotor de transcrição do bacteriófago T7. A grande vantagem destes vetores é que eles podem ser induzidos por IPTG em E. *coli* BL21(DE3) e são transcritos pela T7 RNA polimerase, a qual é muito seletiva e ativa, sendo capaz de elongar cadeias de RNA aproximadamente 5 vezes mais rápido que a RNA polimerase de *E. coli.* A linhagem BL21(DE3) contém ainda o plamídeo pLysS que fornece um controle mais rigoroso dos níveis basais da proteína expressa e facilita a lise bacteriana (Studier et al.,1990).

No presente trabalho, a clonagem do gene da provável proteína do movimento do SBMV-SP em vetor de expressão pMAL permitiu que grandes quantidades dessa proteína fossem produzidas e, em seguida, purificadas no sistema de purificação pMAL. Neste sistema de expressão e purificação a proteína é obtida em sua forma nativa, porém, é uma proteína de fusão, ou seja, está ligada a uma outra proteína (“Maltose Binding Protein”, MBP) codificada pelo genoma do vetor. Devido à afinidade de ligação da MBP colunas contendo resina de amilose são utilizadas para a purificação da proteína de fusão a partir de extratos de bactérias. Além de permitir que a proteína se ligue à resina, alguns autores (Kapust e Waugh, 1999) têm observado que a MBP não só aumenta a imunogenicidade, como também, a solubilidade da proteína expressa. Vários testes foram realizados visando obter amostras mais puras, sendo que, tampões de eluição que possuíam quantidades maiores de maltose apresentaram maior eficiência. A utilização de baixas concentrações de maltose no processo de lavagem permitiu que proteínas não específicas, ligadas mais fracamente à resina, fossem eluídas. Já aquelas que estavam ligadas especificamente à resina precisaram de concentrações mais elevadas de maltose para se desligarem da matriz.

A expressão foi também realizada utilizando-se o vetor pET-28a e a purificação da proteína recombinante realizada através de cromatografia por afinidade em resina de níquel. Essa técnica baseia-se na afinidade diferencial que íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida apresentam por certos grupamentos expostos na superfície de uma molécula em solução. Esta afinidade resulta de ligações de coordenação reversíveis formadas entre um íon metálico

quelatado (o centro de adsorção) e certos resíduos de aminoácidos, tais como imidazol da histidina, tiol da cisteína e indol do triptofano, os quais doam elétrons para o íon metálico. Diferentes testes para uma purificação mais eficiente evidenciaram que altas concentrações de NaCl nos tampões permitiam ligações mais específicas da proteína de interesse à resina, livrando-a de proteínas contaminantes. Como conseqüência mais níquel estaria exposto para a retenção de mais proteína recombinante por volume de resina. No entanto, nesse sistema a proteína obtida encontra-se desnaturada e, como a intenção deste estudo era a produção de antissoro policlonal, optou-se pela utilização da proteína em sua forma nativa, acreditando-se que nessa forma os epitopos permaneceriam preservados.

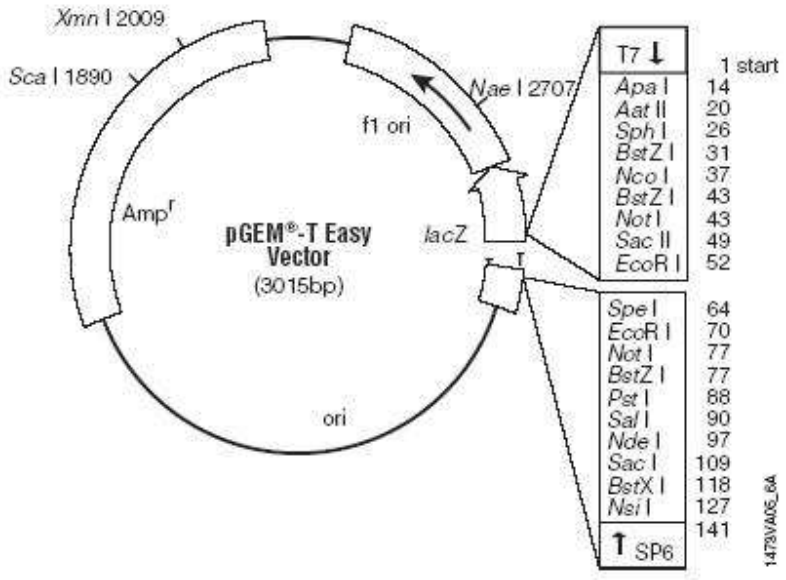
Um antissoro policlonal para uma proteína recombinante deve ser muito específico, mas também versátil o suficiente para ser usado em todos os tipos de testes serológicos. No presente trabalho foi demonstrado que o antissoro obtido funciona bem nas técnicas de “Dot-blot” e “Western-blot”. Outras técnicas como, por exemplo, o ELISA, ainda não foram testadas. O título do anti-soro obtido foi determinado por meio de “Dot-blot” utilizando-se o anti-soro nas diluições de 1:1000 a 1:32000. Mesmo na diluição de 1:16000, o anti-soro foi eficiente na detecção de 20 ng da proteína recombinante (Fig. 12). Visando determinar a especificidade do antissoro obtido para a proteína de fusão (MBP-MP) testes foram feitos pela técnica de “Western-blot”. Como é evidente na Figura 8B, o antissoro reagiu especificamente com a proteína de 22 kDa recombinante (His-MP) mostrando que mesmo quando fusionada à MBP (43 kDa), que contém maior massa molecular do que a MP do SBMV, os epitopos da proteína de interesse não foram encobertos. Nenhuma reação foi verificada com outras proteínas (BSA e polimerase do SBMV-SP). Também quando testadas por “Dot-blot” e na diluição de 1:1000 o anti-soro foi eficiente em detectar até cerca de 2 ng de proteína recombinante (Fig. 14). Estes resultados indicaram que o antissoro produzido a partir da proteína expressa em vetor pMAL é específico e eficiente na detecção da proteína recombinante mesmo que em baixas concentrações. Alguns testes preliminares (Dados não mostrados) efetuados por “Western-blot” não permitiram a detecção da MP do SBMV em extratos de plantas infectadas. Levando-se em conta que o antissoro foi eficiente na detecção de cerca de 2 ng da proteína recombinante, a falha na detecção pode ser devido ao fato de a proteína ser sintetizada transitoriamente e em concentração nas células infectadas abaixo do limite de detecção permitido pelas técnicas utilizadas. Outros experimentos visando concentrar a MP em extratos de folhas infectadas, serão realizados brevemente.

VI. CONCLUSÕES

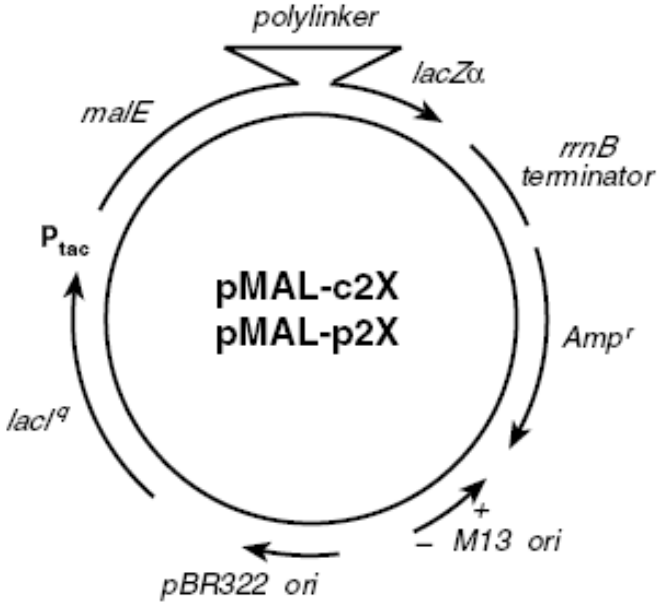
- O sistema de expressão pMAL, utilizado neste trabalho, foi eficiente para a produção da provável proteína do movimento do SBMV-SP em concentrações suficientes para obtenção de antissoro policlonal.
- O antissoro produzido é específico e eficiente para detecção de baixas concentrações da proteína recombinante.

ANEXO 1 – Mapas dos vetores utilizados neste trabalho

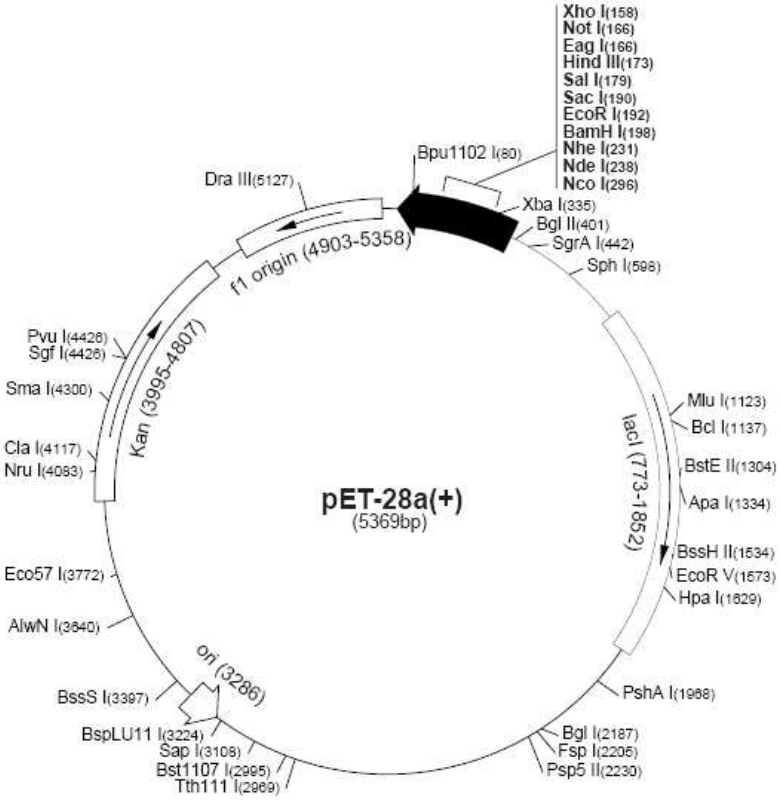
Vetor pGEM – "T Easy Vector System I" (Promega)



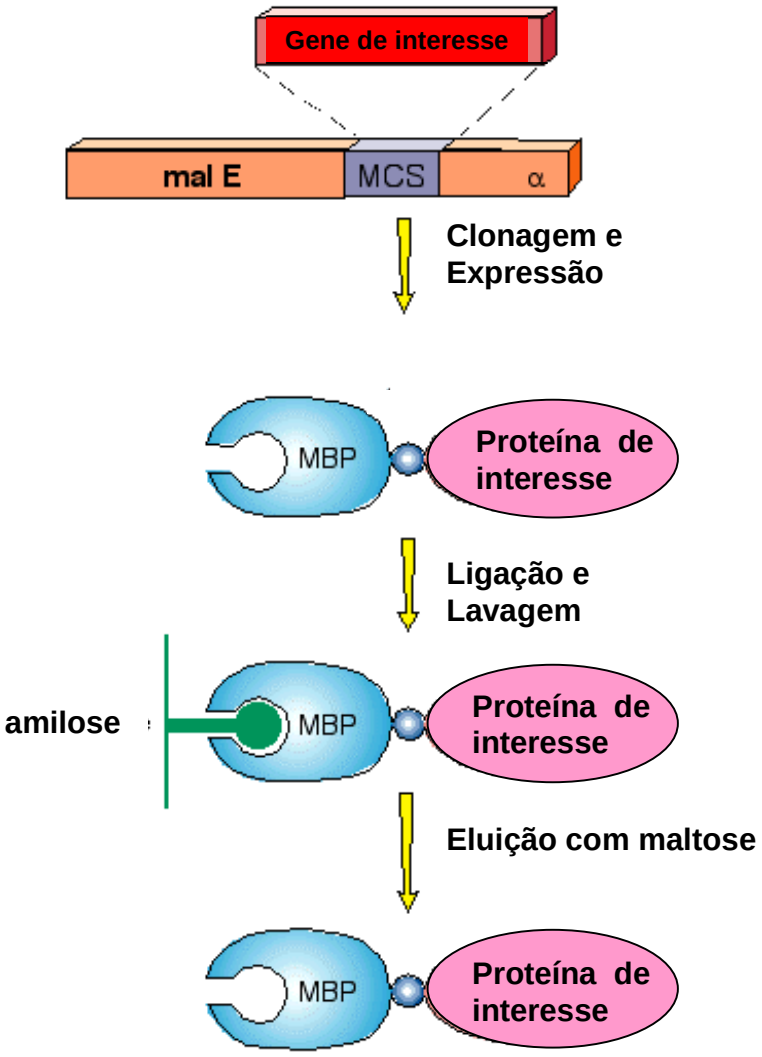
Vetor pMAL "Protein Fusion and Purification System" (BioLabs)



Vetor pET 28a (+) (Novagen)



ANEXO 2 – Sistema de expressão e purificação pMAL (BioLabs)



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIANCHINI, A., MARINGONI, A.C., CARNEIRO, S. M.T. P.G. Doenças do feijoeiro. In: Kimati, H., Amorin, L., Bergamim Filho, A., Camargo, L.E.A & Rezende, J.A.M. (Eds) **Manual de Fitopatologia. 3nd ed**., Agronômica Ceres, p. 376-399, 1997.

BONNEAU, C., BRUGIDOU, C., CHEN, L., BEACHY, R. N., FAUQUET, C. Expression of the rice yellow mottle virus P1 protein *in vitro* and *in vivo* and its involvement in virus spread. **Virology**, v. 244,p. 79-86, 1998.

CARRINGTON, J. C. et al. Cell-to-cell and long distance transport of viruses in plants. **The Plant Cell,** v. 8, p. 1669-1681, 1996.

CARRINGTON, J. C. et al. Host compatibility functions during virus infection. **Biology of Plant-Microbe Interactions,** v. 3, p. 146-51, 2002.

CARVALHO, C. M et al. The movement protein of Cowpea mosaic virus binds GTP and single-stranded nucleic acid in vitro. **Journal of Virology**, v. 78, p.1591-1594, 2004.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), 2008. Disponível em <http://www.conab.gov.br/> Acesso em: 28 de julho de 2008.

COSTA, C. L., BATISTA, M. F. Viroses transmitidas por coleópteros no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 4, p. 177-179, 1979.

COSTA, A.F. & COSTA, C.L. Efeitos de infecções simples e duplas de quatro vírus sobre a produção e algumas características da planta do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Fitopatologia Brasileira** v. 8, p. 616, 1983.

COSTA, A.S., KITAJIMA, E.W., MIYASAKA, S. ALMEIDA, L.D. Moléstias de feijoeiros causadas por vírus. In: **Anais do I Simpósio Brasileiro do Feijão**. Vieira, C. (Ed) Imprensa Universitária, Viçosa, p. 342-384, 1972.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification on the flowering plants. Columbia University Press, New York, p.1262, 1981.

CULTURA-FEIJÃO; Bahia, 2000. Disponível em http://www.seagri.ba.gov.br/feijão1.htm> Acesso em: 24 janeiro 2001.

CUPERTINO, F.P., LIN, M.T., KITAJIMA, E.W. & COSTA, C.L. Occurrence of southern bean mosaic virus in central Brazil. **Plant Disease**. v. 66, p. 742-743, 1982.

de ZOETEN, G.A. & GAARD, G. Possibilities for inter and intracellular translocation of some icosahedral plant viruses. **Journal of Cell Biology** v. 40, p. 814-823, 1969.

DEOM, C. M.; OLIVER, M. J.; BEACHY, R. N. The 30-kilodalton gene product of Tobacco mosaic virus potentiates virus movement. **Science**, v. 237, p. 389-394, 1987.

DINGWALL, C., & LASKEY, R. A. Nuclear targeting sequences a consensus? **Trends Biochem**. Sci, v.16, p. 478-481, 1991.

ESPINHA, L.M., GASPAR, J.O., WARD, R.J., RULLER, R., CAMARGO, L.E.A. Caracterização da região 5'-terminal de um isolado brasileiro do *Southern bean mosaic virus*. **Fitopatologia Brasileira,** v. 29, p. 328-331, 2004.

ESPINHA, L.M., GASPAR, J.O., MOREIRA, A.E., PEREIRA, A.C.B., BELINTANI, P., CAMARGO, L.E.A. Caracterização da região 3'-terminal de um isolado brasileiro do *Southern bean mosaic virus*. **Fitopatologia Brasileira** , v. 30, p. 546-549, 2005.

FAUQUET, M.C. & MAYO, M.A. Abreviations for plant virus names-1999. **Archives of Virology,** v. 144, p. 1249-1273, 1999.

FRANCKI, R. I. B., MILNE, R. G.; HATTA, T. Sobemovirus group. In: **Atlas of Plant Viruses.** CRC Press, Boca raton, v. 1, p 153-169. 1985b.

GASPARIN, M.D.G., BIANCHINI, A., DE SOUTO, E.R., GASPAR, J.O., ALMEIDA, A.M.R. & KITAJIMA, E.W. Detecção do *Southern bean mosaic virus* no Paraná, e Separação do *Bean rugose mosaic virus* em Feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira,** v. 30, p. 75-78, 2005.

GAMEZ, R. Las enfermedades virales como factores limitantes em la produccion del frijol (*Phaseolus vulgaris* L) en America Latina. **Fitopatologia** (Lima), v. 12, p. 24-26, 1977.

HILF, M. E.; DAWSON, W. O. The tobamovirus capsid protein functions as a host-specific determinant of long-distance movement. **Virology**, v. 193, p. 106-114, 1993.

HULL, R. The sobemovirus group. In: The Plant Viruses, Polyhedral virions with monopartide genomes. Koenig, R. (Ed). Plenum Press, v. 3, p. 113-146, 1988.

HULL, R. **Matthews' Plant Virology**. 4. ed. San Diego, CA: Academic Press, 2002.

HULL, R. & FARGETTE, D. Genus *Sobemovirus*. *In*: Virus Taxonomy. 8th Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Falquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L.A. (Eds). Elsevier/Academic Press, San Diego, CA., p.1259, 2005.

JAYASINGHE, W. U. Chlorotic mottle of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). CIAT series 09EB (2), Cali, Colombia, v. 82, p. 156, 1982.

KAPUST, R. B.; WAUGH, D. S. Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. **Protein Science**, v. 8, p. 1668-1674, 1999.

KIBERSTIS, P. A., AND D. ZIMMERN**.** Translational strategy of *Solanum nodiflorum* mottle virus RNA: synthesis of a coat protein precursor in vitro and in vivo. **Nucleic Acids Res,** v. 12, p. 933–943, 1984.

LAZAROWITZ, S. G.; BEACHY, R. N. Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. **The Plant Cell,** v. 11, p. 535-548, 1999.

LEE, L. & ANDERSON, J. Nucleotide sequence of a resistance breaking mutant of southern bean mosaic virus. **Archives of Virology,** v. 143, p. 2189-2201, 1998.

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

MÄKINEN K., TAMM T., NAESS V., TRUVE E., PUURAND U. MUNTHE T., SAARMA M. Characterization of cocksfoot mottle sobemovirus genomic RNA and sequence comparison with related viruses. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 2817-2825, 1995a.

MANG, K.-Q., GHOSH, A., KAESBERG, P. A comparative study of the cowpea and bean strains of southern bean mosaic virus.**Virology, v.** 116, p. 264-274, 1982.

MAYERS, C.N.; PALUKAITIS, P.; CARR, J.P. Subcellular distribution analysis of the cucumber mosaic virus 2b protein. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 219-226, 2000.

MELCHER, U. The '30K' superfamily of viral movement proteins. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 257-266, 2000.

MEYER, M. C.; COSTA, C. L.; SANTOS, O. R. Inter-relações de *Ceratoma arcuata* (Coleoptera: Chysomelidae) com quatro vírus de leguminosas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 314-320, 1992.

MEYER, M. C.; COSTA, C. L.; SANTOS, O. R. Transmissão de quatro vírus de leguminosas pelas larvas de Ceratoma arcuata (Coleoptera: Chysomelidae). **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, p. 97-101, 1993.

MOREIRA, A.E. & GASPAR, J.O. Propriedades moleculares de um isolado brasileiro do *Southern bean mosaic virus*. **Fitopatologia Brasileira,** v. 27, p. 292-297, 2002.

MOORIS-KRSINICH, B. A. M. & FOSTER, R. L. S. *Lucerne transient streak virus* RNA and its translation in rabbit reticulocyte lysate and wheat germ extract. **Virology**, v. 128, p. 176-185, 1983.

MORRIS-KRSINICH, B. A. M., & R. HULL**.** Translation of turnip rosette virus RNA in rabbit reticulocyte lysates. **Virology,** v. 114, p. 98–112, 1981.

NISHIGUCHI, M.; MOTOYOSHI, F.; OSHIMA, N. Behaviour os a temperature sensitive strain os Tobacco mosaic virus in tomato leaves and protoplasts. **Journal of General Virology**, v.39, p. 53-61, 1978.

NOVÁKOVÁ, S., KLAUDINY, J., KOLLEROVÁ, E., SUBR, Z. W. Expression of a part of the *Potato virus* A non-structural protein P3 in *Escherichia coli* for the purpose of antibody preparation and P3 immunodetection in plant material. **Journal of Virological Methods**, v. 137, p. 229-235, 2006.

OPALKA, N., BRUGIDOU, C., BONNEAU, C., NICOLE, M., BEACHY, R., YEAGER, M., FAUQUET, C.M. Movement of rice yellow mottle virus between xylem cells through pit membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 95, p. 3323-3328, 1998.

OTHMAN, Y. & HULL, R. Nucleotide sequence of the bean strain of southern bean mosaic virus. **Virology,** v. 206, p. 287-297, 1995.

OZATO Jr, T., GASPAR, J. O., BELINTANI, P. Completion of the nucleotide sequencing of a Brazilian isolate of Southern bean mosaic virus. **Journal of Phytopatology**, v 157, p. 000-000, 2009. doi: 10.1111/j.1439-0434.2008.01516.x

PANDA, A.K. Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of *Escherichia coli.* **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology,** v. 85, p. 43-93, 2003.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2001.

RYABOV, E. V., KRUTOV, A. A., NOVIKOV, V. K., ZHELEZNIKOVA, O. V., MOROZOV, S. YU., ZAVRIEV, S. K. Nucleotide sequence of RNA from the sobemovirus found in infected cocksfoot shows a luteovirus-like arrangement of the putative replicase and protease genes. **Phytopathology,** v. 86, p. 391-397, 1996.

RUTGERS, T., SALERNO-RIFE, T. AND KAESBERG, P. Messenger RNA for the coat protein of southern bean mosaic virus. **Virology**, v.104, p 506, 1980.

SALERNO-RIFE, T., T. RUTGERS, AND P. KAESBERG**.** Translation of southern bean mosaic virus RNA in wheat embryo and rabbit reticulocyte extracts. **Journal of Virology,** v. 34, p. 51–58, 1980.

SAHDEV, S., KHATTAR, S.K., SAINi, K.S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry,** v. 307, p. 249-264, 2008.

SCHOLTHOF, H. B. Plant virus transport: motions of functional equivalence. **Trends in Plant Science**, v. 10, n.8, p. 376-382, 2005.

SEGUNDO, E., GIL-SALAS, F.M., JANSSEN, D., MARTIN, G., CUADRADO, I.M. First report of *Southern bean mosaic virus* infecting French bean in Morocco. **Plant Disease,** v. 88, p. 1162, 2004.

SEHGAL, O.P. Southern Bean Mosaic Virus Group. In: Kurstak, P. (Ed.) **Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis**. Elsevier/North Holland 91-121, 1981.

SILVEIRA JR., W. G.; COSTA, C. L.; COSTA, A. F.; LIN, M. T. *Diabrotica speciosa* e *Cerotoma arcuata*, vetores do vírus do mosaico do feijoeiro no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira,** v. 8, p. 625, 1983.

SIVAKUMARAN, K.; BENJAMIN, C. F., HACKER, D. L. Identification of viral genes required for cell-to-cell movement of southern bean mosaic virus. **Virology,** v. 252**,** p**.** 376-386, 1998.

TAMM, T; MÄKINEM, K., TRUVE, E.. Identification of genes encoding for the cocksfoot mottle virus proteins. **Arch. Virol**, v. 144, p. 1557-1567, 1999.

TAMM, T.; TRUVE, E. RNA-binding activities of cocksfoot mottle sobemovirus protein. **Virus Research.** v. 66, p. 197-207, 2000.

VERHOEVEN, J. Th.J., ROENHORST, J. W., LESEMANN, D. -E., SEGUNDO, E., VELASCO L., RUIZ L., JANSSEN D. E CUADRADO, I. M. *Southern bean mosaic virus* the Causal Agent of a New Disease of *Phaseolus vulgaris* Beans in Spain. **Journal of Plant Pathology,** v. 109, p. 935-941, 2003.

VOINNET, O.; PINTO, Y. M. AND BAULACOMBE, D. C. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 96, p. 14147-14152, 1999.

WEBER, K. A., AND O. P. SEHGAL**.** Subgenomic RNAs in virions of southern bean mosaic virus. **Phytopathology,** v. 72, p. 909–913, 1982.

WEINTRAUB, M. & RAGETLI, H.W.J. Electron microscopy of the bean and cowpea strains of Southern bean mosaic virus within leaf cells. **Journal of Ultrastructural Research,** v. 32, p. 167-189, 1970.

WOLF, S. et al. Movement protein of Tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. **Science**, v. 246, p. 377-379, 1989.

WU, S., RINEHART, C. A., KAESBERG, P. Sequence and organization of southern bean mosaic virus genomic RNA. **Virology**, v. 161, p. 73-80, 1987.

YASSI, M. N., C. RITZENTHALER, C. BRUGIDOU, C. FAUQUET., BEACHY, R. N. Nucleotide sequence and genome characterization of rice yellow mottle virus RNA. **J. Gen. Virol**, v. 75, p. 249–257, 1994.

ZAUMEYER, W. J., & HARTER, L. L. A new virus disease of bean. **Phytopatology,** v. 32, p. 438, 1942.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo