

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

Clonagem e purificação da proteína capsidial do *Banana streak virus* e produção de antissoro policlonal a partir de preparações purificadas do vírus

RICARDO LOMBARDI

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Vegetal, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio

Orientadora: Dra. Addolorata Colariccio

São Paulo

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Núcleo de Informação e Documentação - Biblioteca

Instituto Biológico

Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo

Lombardi, Ricardo

Clonagem e purificação da proteína capsial do *Banana streak virus* e produção de antissoro policlonal a partir de preparações purificadas do vírus / Ricardo Lombardi. -- São Paulo, 2010.

Dissertação (Mestrado) Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Sanidade Vegetal.

Linha de pesquisa: Fitossanidade.

Orientador: Addolorata Colariccio.

Versão do título para o inglês: Cloning and purification of *Banana streak virus* coat protein and production of polyclonal antisera from purified viral particles.

1. *Banana streak virus* 2. *Endogenous Pararetrovirus Sequences* (EPRVs) 3. Proteína capsial 4. Antissoro policlonal 5. Proteínas recombinantes, Clonagem e expressão 6. Microscopia eletrônica de transmissão I. Colariccio, Addolorata II. Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação III. Título

IB/Bibl. /2010/012



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo – SP
pg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidato: Ricardo Lombardi

Título: Clonagem e purificação da proteína capsidial do *Banana streak virus* e produção de antissoro policlonal a partir de preparações purificadas do vírus

Orientador(a): Addolorata Colariccio

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Vegetal, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a):

Instituição:

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a):

Instituição:

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a):

Instituição:

AGRADECIMENTOS

À Dra. Addolorata Colariccio, minha orientadora, por me aceitar como orientado e pelas oportunidades de aprendizado que foram e continuarão a ser de valor inestimável para a continuidade da minha carreira como cientista, pesquisador e professor. Agradeço também pela confiança e livre acesso às dependências do Laboratório de Fitovirologia-IB/SP assim como a utilização dos reagentes e equipamentos necessários para a conclusão deste trabalho. Agradeço muito pelo reconhecimento da minha dedicação ao trabalho e confiança na minha pessoa.

Ao Dr Ricardo Harakava, que atuou como co-orientador, por ter aberto as portas do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica-IB/SP, confiando na minha competência mesmo sem termos trabalhado anteriormente. A todas as suas contribuições, ensinamentos e assessoria na área de biologia molecular e também suas valiosas correções, sugestões e auxílio na resolução de problemas para o bom andamento do trabalho. Ainda, agradeço pelos reagentes e materiais que nunca me foram negados durante qualquer experimento realizado.

Ao Instituto Biológico, pela oportunidade de estagiar, ser bolsista de iniciação científica (CNPq/PIBIC-IB) e aluno bolsista de mestrado (FAPESP). Poder vivenciar o trabalho de um instituto com tanta história e de grande importância nacional certamente corroborou minha formação como profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, pelo apoio a esta pesquisa na forma de bolsa de mestrado, sem o qual seria impossível a conclusão deste trabalho. Aos revisores de relatórios científicos, os quais reconheceram todos os esforços para a realização das etapas do trabalho e contribuição à pesquisa científica.

À MsC. Silvia R. Galleti pela amizade e orientação incansável durante minha iniciação científica que perduram até os dias atuais. À oportunidade de trabalhar na organização de eventos científicos no IB, eventos da Associação Brasileira de Editores Científicos-ABEC, à introdução dos conceitos relacionados à publicação científica e implementação de sistemas de qualidade ISO. Agradeço o livre acesso e confiança na utilização das dependências do Laboratório de Microscopia Eletrônica-Sanidade Vegetal que foi muitas vezes meu “quartel-general”. Quantas preparações de purificação do BSV foram observadas sob o microscópio eletrônico antes que pudéssemos ver as tão procuradas partículas baciliformes... Na minha concepção, a MsC. Galleti acredita na vertente em que a orientação é uma via de duas mãos, onde o orientador e o orientado trocam conhecimento entre si, e cultivam uma relação de respeito e honestidade. Estou certo que este tipo de orientação é a que trás melhores resultados e sempre foi aplicada por nosso orientador comum, Dr. César M. Chagas.

Aos Membros da banca de avaliação Dr. Marcelo Eiras, Dr. Ivan G. Maia, Dra. Sylvia D. Guzzo e Dra. Desiré S. Frangioni pelas correções e comentários dos manuscritos tanto da qualificação quanto da versão final da tese. Essa colaboração foi importantíssima, melhorando a qualidade e valorizando o trabalho final.

À Dra. Rosa M. Piatti e dos funcionários do Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução-IB/SP pela ajuda no cuidado dos camundongos, inoculações e preparação do antissoro obtido neste trabalho. À Dra. Piatti ainda agradeço as sugestões e ensinamentos sobre imunologia e no correto uso do antissoro.

Às valiosas contribuições dos pesquisadores do IB/SP Dr. Marcelo Eiras, Dra. Sylvia D. Guzzo, MsC Silvia R. Galleti, Dr. Marcos C. Gonçalves e Dr. César M. Chagas durante a parte experimental deste trabalho. Tenho certeza que estes profissionais acreditam na importância de compartilhar o conhecimento com os alunos menos experientes. Estes estavam sempre de portas abertas e nunca negaram qualquer tipo de ajuda.

Ao Médico Veterinário Ricardo S. Jordão (IB/SP) pela ajuda na aquisição dos camundongos Balb/c e orientação nos cuidados destes animais.

Aos organizadores do III Curso de Virologia Vegetal, Dr. Marcelo Eiras e Dr. Alexandre Chaves por confiarem na minha competência para ministrar aulas práticas durante o curso. Foi um aprendizado enorme, muito valioso para minha formação, e além disso, fiz muitas novas amizades.

Aos pesquisadores Dr. Márcio Hipólito (IB/SP) e Dra. Cláudia M. F. Mostério (Instituto de Pesca/SP) pela oportunidade de trabalhar, mesmo que somente por alguns dias, com a pesquisadora norte-americana Dra. Lisa M. Schloegel. Mesmo não trabalhando na mesma área de atuação me foi possibilitado o contato com outra cultura, um treinamento real do domínio da língua Inglesa, além de orientações sobre a formação e oportunidades para cientistas em instituições internacionais. Passar alguns dias como “tradutor” foi muito divertido!

Agradeço aos professores do curso de Pós Graduação do IB, amigos, colegas, pesquisadores e todas as outras pessoas que se envolveram de qualquer maneira para o bom andamento deste trabalho.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

“I have been trying to point out that in our lives chance has an astonishing influence and, if I may offer advice to the young laboratory worker it would be this – never to neglect an extraordinary appearance or happening. It may be (usually is, in fact) a false alarm that leads to nothing, but it may on the other hand be the clue provided by fate to lead you to some important advance”.

Alexander Fleming, em palestra na Universidade de Harvard.

LOMBARDI, R. CLONAGEM E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CAPSIDIAL DO *BANANA STREAK VIRUS* E PRODUÇÃO DE ANTÍSSORO POLICLONAL A PARTIR DE PREPARAÇÕES PURIFICADAS DO VÍRUS. São Paulo. 2010. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico

RESUMO

O *Banana streak virus* (BSV) (família *Caulimoviridae*, gênero *Badnavirus*), é considerado o vírus que mais frequentemente ocorre em bananeiras (*Musa* sp.) A detecção sorológica e molecular deste vírus é de fundamental importância, mas tem se mostrado uma tarefa bastante complexa, devido à presença de sequências virais (*Endogenous Pararetrovirus Sequences-EPRVs*) integradas no genoma da bananeira. A ausência de hospedeiras alternativas e a baixa concentração do vírus em bananeiras impõem uma séria restrição à produção de antissoros contra o BSV. Este trabalho teve como objetivos a clonagem e purificação da proteína capsidial do *Banana streak OL virus* (BSOLV-CP) e a produção de antissoro policlonal a partir de preparações purificadas do *Banana streak Mysore virus* (BSMysV) para a detecção do BSV em tecidos de bananeira infectados. Foi amplificado um fragmento de aproximadamente 390 pb da região central da BSOLV-CP por PCR, que foi clonado em vetor pGEM-T® Easy, subclonado em vetor pQE-30 e transformado em células de *E. coli* M15 [pREP4] por choque térmico. A proteína de aproximadamente 14 kDa foi expressa após indução por IPTG, detectada em Western-Blot e purificada em coluna de níquel-agarose. A proteína BSOLV-rcCP foi armazenada a -20 °C para futuros estudos visando à produção de antissoro específico. A preparação purificada do BSMysV, a partir de folhas de bananeira 'Mysore', foi inoculada em camundongos Balb/c para a produção de antissoro policlonal, o qual foi avaliado em Dot-, Western-Blot e ELISA. O antissoro apresentou reação com a purificação do vírus, entretanto não possibilitou a detecção do BSV em extrato bruto de bananeiras infectadas. Em microscopia eletrônica de transmissão, foi possível visualizar a reação do antissoro com as partículas de BSMysV, demonstrando que o antissoro reconhece epítopos presentes na capa protéica do vírus e em testes de decoração permite que o vírus seja detectado.

Palavras chave: *Banana streak virus*, *Endogenous Pararetrovirus Sequences-EPRVs*, proteína capsidial, antissoro policlonal, microscopia eletrônica de transmissão, clonagem e expressão de proteínas recombinantes

LOMBARDI, R. CLONING AND PURIFICATION OF BANANA STREAK VIRUS COAT PROTEIN AND PRODUCTION OF POLYCLONAL ANTISERA FROM PURIFIED VIRAL PARTICLES. São Paulo. 2010. Dissertation (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico

ABSTRACT

Banana streak virus (BSV) (family *Caulimoviridae*, genus *Badnavirus*) is considered the most frequently occurring virus in banana (*Musa* sp.). Serological and molecular detection of episomal virus particles infection in banana is an important but complex issue since there are integrated BSV sequences (*Endogenous Pararetrovirus Sequences-EPRVs*) in the banana genome. The lack of alternative hosts and the low titer of BSV in infected banana tissues pose a challenge in obtaining specific antiserum against this virus. On this work, we cloned, expressed and purified a recombinant fragment of the coat protein of *Banana streak OL virus* (BSOLV-CP) in *Escherichia coli* and also produced an antisera against *Banana streak Mysore virus* in order to detect BSV in infected tissues. A 390 bp fragment was amplified by PCR using primers designed for a region inside BSOLV-CP. The fragment was cloned in pGEM-T® Easy vector, subcloned in pQE-30 expression vector and transformed into competent *E. coli* M15 [pREP4] cells by heat shock. The protein expression was induced by IPTG and the 14kDa BSOLV-CP was detected in western blotting. The expressed recombinant BSOLV-rcCP protein was stored at -20 °C for future studies aiming the production of an antiserum to detect BSV in banana tissues. Polyclonal antiserum was obtained from purified BSMysV infected 'Mysore' banana leaves inoculated in Balb/c mice. The antiserum was evaluated in Dot-, Western-Blot and ELISA, reacting against purified virus; however, it was unable to detect BSV in infected tissues. Under electron transmission microscopy, we were able to visualize the reaction of the antisera with BSV particles, showing that it reacts with BSV coat protein epitopes enabling its detection in decoration tests.

Keywords: *Banana streak virus*, Endogenous pararetroviral sequences- EPRVs, coat protein, polyclonal antisera, transmission electron microscopy, recombinant protein cloning and expression.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema da Organização genômica do BSV. O círculo completo representa o genoma de DNA de fita dupla. As setas em forma de arcos indicam a posição das 3 ORFs (Imagem retirada de HARPER, G; HULL, R. Cloning and sequence analysis of *Banana streak virus* DNA. **Virus Genes**, n. 17, v. 3, 1998).....7
- Figura 2. Folhas de bananeira ‘Galil-7’ com sintomas de estrias cloróticas (A1); detalhe (A2); folhas de bananeira ‘Terra-anã’ com sintomas de estrias cloróticas, mosaico e necrose (B1) detalhe (B2); folhas de bananeira ‘Mysore’ com sintomas de estrias cloróticas (C1) e lesões foliares cloróticas e necróticas (C2).....13
- Figura 3. Esquematização linear do genoma do BSOLV, a posição de suas ORFs e alinhamento dos *primers* utilizados.....15
- Figura 4. Esquema do vetor de clonagem pGEM[®]-T Easy que possui múltiplos sítios de clonagem. Amp^r: gene de resistência à ampicilina; ori: origem de replicação; lacZ: operon lac (Fonte: PROMEGA. www.promega.com).....18
- Figura 5. Esquema do vetor de expressão pQE-30 para construções com cauda de 6xHis N-terminal. Esse vetor possui: gene de resistência a ampicilina (Ampicilin); origem de replicação Col E1 (Col E1); promotor T5 (PTS); operon lac (lac O); sítio de ligação ao ribossomo (RBS); códon de iniciação (ATG); sequência da etiqueta de 6xHis (6xHis); múltiplos sítios de clonagem (MCS); códons de terminação (Stop Codons) (Fonte: The QIAexpressionist[™]: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, QIAGEN, 2003. www.qiagen.com).....20
- Figura 6. Perfil eletroforético do produto da reação de PCR utilizando o par de *primers* BSOLV-CP4 e BSOLV-CP5. 1: fragmento de aproximadamente 390 pb, correspondente ao gene BSOLV-rcCP. M: Marcador de peso molecular *100 pb DNA ladder* (INVITROGEN).....32
- Figura 7. Perfil eletroforético do produto da reação de digestão da construção pQE-30+BSOLV-rcCP (1) e do vetor pQE-30 (2) com as enzimas *Hind* III e *Sst* I. 1: fragmentos de aproximadamente 3500 pb (correspondente ao vetor pQE-30) e de aproximadamente 390 pb (correspondente ao gene BSOLV-rcCP); 2: fragmento de aproximadamente 3500 pb; M: Marcador de peso molecular *1000 pb DNA ladder* (INVITROGEN).....32
- Figura 8. Dot-Blot dos 16 clones selecionados de *E. coli* M15 contendo a construção pQE-30 + BSOLV-rcCP após indução da expressão da proteína. Nos clones 10, 11 e 13 ocorreu a formação de halo mais intenso. Utilizou-se como controle negativo uma colônia transformada com a construção pQE-30 + BSOLV-rcCP não induzida, e como controle positivo uma colônia transformada com a construção pQE-30 + BSOLV-rcCP induzida.....33

- Figura 9. Dot-Blot das alíquotas do lisado bacteriano e das frações da purificação da proteína BSOLV-rcCP. 1: lisado bacteriano bruto; 2: lisado após passagem pela coluna; 3: lavagem da coluna; 4 a 8: eluições da proteína BSOLV-rcCP.....33
- Figura 10. Perfil eletroforético em SDS-PAGE (A) e Western-Blot (B) do lisado bacteriano e das frações da proteína BSOLV-rcCP purificada. A: observa-se fragmento de 14 kDa; B: observa-se a reação da proteína de 14 kDa com o antissoro anti-6xHis e que as eluições 4 e 5 contêm maior quantidade da proteína BSOLV-rcCP purificada; M: marcador de peso molecular *BenchMark™ Prestained Protein Ladder* (INVITROGEN); 1: lisado bacteriano bruto; 2: lisado após passagem pela coluna; 3: lavagem da coluna; 4 a 8: eluições da proteína BSOLV-rcCP.....34
- Figura 11. Curva de espectro de absorvância da purificação BSMysV-Pur1000g, diluída na proporção de 1:20 em PBS 0,1M, pH 7,4, nos comprimentos de onda de 200 nm a 360 nm.....37
- Figura 12. Western-Blot das amostras de BSMysV-Pur100g (1), ‘Mysore’ (2), ‘Terra-anã’ (3) e *Musa sp.* sadia (4). A amostra 1 não apresentou reação, enquanto que as amostras 2, 3 e 4 apresentaram um padrão de bandas similares. M: marcador de peso molecular *BenchMark™ Prestained Protein Ladder* (INVITROGEN).....39
- Figura 13. Micrografias eletrônicas de transmissão de contraste negativo da ETAPA P1 da purificação BSV-Pur1000g (A), ETAPA P2 da purificação BSV-Pur1000g (B), purificação BSV-Pur1000g diluída na proporção de 1:20 em PBS (C), e ETAPA 1 da purificação utilizando-se o **Método P2** (D). Nas imagens foram observadas partículas baciliformes com aproximadamente de 120 a 150 nm de comprimento. Nota-se que o aspecto granuloso do campo de fundo da preparação (A) é reduzido na preparação (B).....42
- Figura 14. Micrografia eletrônica de transmissão de contraste negativo da preparação obtida pelo **Método M2**. A e B: estruturas de conformação semelhantes a túbulos, possuindo aproximadamente 50 nm de diâmetro e comprimento de tamanhos variados.....43
- Figura 15. Contraste negativo de partículas do BSMysV não decoradas (A) e decoradas (B). Observa-se a reação do AS-BSMysV com a partícula do BSMysV evidenciada pela formação do halo elétron-denso ao redor da partícula em (B).....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- <i>Primers</i> utilizados, sequência de nucleotídeos (nt), sítios para as enzimas de restrição e posições no genoma do BSOLV.....	14
Tabela 2- Par de <i>primers</i> utilizados e tamanho esperado dos produtos de amplificação.....	17
Tabela 3- Enzimas de restrição utilizadas para a digestão dos insertos BSOLV-CP e vetor pQE-30.....	19
Tabela 4- Valores de absorbância ($A_{405 \text{ nm}}$) obtidos em teste de ELISA utilizando o AS-BMysV.....	38

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A- CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB (FRENTE DO DOCUMENTO).....	51
ANEXO B- CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB (VERSO DO DOCUMENTO).....	52
ANEXO C- PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES UTILIZADOS NESTE TRABALHO.....	53
ANEXO D- PREPARAÇÃO DOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA.....	59
ANEXO E- REAÇÕES DE PCR, CLONAGEM, DIGESTÃO E PREPARAÇÃO DE CÉLULAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> COMPETENTES.....	60
ANEXO F- ESQUEMATIZAÇÃO DO RESULTADO DA REAÇÃO SOROLÓGICA DE DOT-BLOT UTILIZANDO-SE O AS-BSMysV.....	62

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ANEXOS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 A BANANEIRA: HISTÓRICO, ORIGEM, CLASSIFICAÇÃO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	3
2.2 <i>BANANA STREAK VIRUS</i> : PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E MOLECULARES.....	5
2.3 ESTRATÉGIAS PARA O DIAGNÓSTICO DO BSV.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 MATERIAL.....	12
3.2 MÉTODOS.....	14
3.2.1 CLONAGEM DA PROTEÍNA CAPSIDIAL DO <i>BANANA STREAK OL VIRUS</i> (BSOLV-CP).....	14
3.2.1.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>).....	14
3.2.1.2 Extração de DNA total de tecido vegetal.....	16
3.2.1.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	16
3.2.1.4 Purificação dos produtos da PCR.....	17
3.2.1.5 Clonagem no vetor pGEM®-T Easy.....	17
3.2.1.6 Reação de digestão dos plasmídeos pGEM®-T Easy e pQE- 30.....	18
3.2.1.7 Subclonagem do gene BSOLV-CP em vetor de expressão PQE-30 e transformação de células competentes de <i>E. coli</i> DH10α.....	19
3.2.1.8 Digestão dos plasmídeos pQE-30 contendo o gene BSOLV- CP.....	20
3.2.1.9 Subclonagem da construção pQE-30 + BSOLV-CP e transformação de células competentes de <i>E. coli</i> M15 [pREP4].....	20
3.2.1.10 Seleção de clone para expressão da proteína BSOLV-CP.....	21
3.2.1.11 Purificação da proteína BSOLV-CP.....	21
3.2.1.12 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS- PAGE).....	22
3.2.1.13 Western-Blot.....	22
3.2.1.14 Dot-Blot.....	23

3.2.1.15 Armazenagem de clones de <i>E. coli</i> M15 [pREP4] em glicerol.....	23
3.2.2 PRODUÇÃO DE ANTÍSSORO POLICLONAL CONTRA O <i>BANANA STREAK MYSORE VIRUS</i> (BSMysV) A PARTIR DE PREPARAÇÃO PURIFICADA DE VÍRUS.....	24
3.2.2.1 Purificação do BSV a partir de tecidos foliares infectados.....	24
3.2.2.2 Produção de antissoro policlonal contra o BSMysV.....	25
3.2.2.3 Dot-Blot.....	25
3.2.2.4 Western-Blot.....	26
3.2.2.5 Enzime-Linked Immunosorbent Assay.....	26
3.2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	28
3.2.3.1 Contraste Negativo.....	28
3.2.3.2 Monitoramento do processo de purificação do vírus.....	28
3.2.3.3 Monitoramento de plantas de bananeira sintomáticas.....	28
3.2.3.4 Decoração.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 CLONAGEM DA PROTEÍNA CAPSIDIAL DO <i>BANANA STREAK OL VIRUS</i> (BSOLV-CP).....	30
4.2 PRODUÇÃO DE ANTÍSSORO POLICLONAL CONTRA O <i>BANANA STREAK MYSORE VIRUS</i> (BSMysV) A PARTIR DE PREPARAÇÃO PURIFICADA DE VÍRUS.....	35
4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	40
5. CONCLUSÕES.....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
7. ANEXOS.....	51

1. INTRODUÇÃO

A detecção do *Banana streak virus*, pertencente à família *Caulimoviridae*, gênero *Badnavirus*, é de fundamental importância para a cultura da bananeira, mas tem se mostrado uma questão bastante complexa devido à presença de sequências virais integradas no genoma da bananeira e a dificuldade de obtenção de antissoros contra este vírus para sua detecção.

A bananeira é uma planta herbácea e monocotiledônea, pertencente ao gênero *Musa* (Musaceae, Zingiberales). O Brasil figura atualmente como o quarto maior produtor de bananas no mundo. A propagação *in vitro* da bananeira tem sido a opção mais utilizada atualmente para a obtenção de uma maior quantidade de mudas, além de outras vantagens como uniformidade e fácil indexação.

Estudos recentes comprovaram a presença no genoma da bananeira de EPRVs (*Endogenous pararetroviral sequences*), que são sequências virais integradas no genoma de plantas. Na bananeira já foram descritos dois tipos de EPRVs relacionados ao BSV: um tipo que contém o genoma completo do vírus e que pode originar partículas virais causando infecção epissomal; e outro tipo contendo sequências incompletas do BSV, não relacionadas com a manifestação da doença. A hipótese de que a propagação *in vitro* pode atuar como desencadeadora da infecção a partir das EPRVs ganhou força com estudos recentes realizados por Dallot et al. (2001), ainda que os mecanismos para que tal evento ocorra não sejam entendidos.

Pela existência das EPRVs no genoma da bananeira, o diagnóstico do vírus por PCR pode levar a falsos resultados positivos, pois a reação de PCR pode amplificar tanto as EPRVs quanto o DNA viral epissomal. Testes sorológicos ou moleculares associados à sorologia, como IC-PCR, podem discriminar a presença da infecção epissomal, mas essas técnicas apresentam uma demanda de antissoros de alta qualidade, que não são facilmente obtidos devido à baixa concentração do vírus em bananeiras infectadas, além da existência de uma heterogeneidade biológica dos isolados do BSV.

Atualmente, devido à maior disponibilidade de técnicas moleculares, existem alternativas para a produção de antissoros, como a produção destes a partir de proteínas recombinantes expressas em *Escherichia coli*, sendo de fundamental

importância a utilização destas metodologias na produção de novos antissoros contra o BSV.

O presente trabalho teve como objetivos a clonagem em *Escherichia coli* e purificação da proteína capsidial do *Banana streak OL vírus*, e a produção de antissoro policlonal a partir de preparações purificadas do *Banana streak Mysore virus* para a detecção do BSV em tecidos de bananeira infectados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A BANANEIRA: HISTÓRICO, ORIGEM, CLASSIFICAÇÃO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Referências históricas sobre bananas são abundantes e variadas. A referência mais antiga é redigida em sânscrito e data de aproximadamente 500 a.C. Antigos registros gregos da campanha de “Alexandre, o Grande” na Índia em 327 a.C. também descrevem bananas. Os antigos árabes e romanos utilizavam bananas. Na idade média, a banana era considerada por ambos muçulmanos e católicos como a fruta proibida do paraíso (INIBAP, 1996).

As primeiras informações de que indígenas brasileiros já conheciam e cultivavam a banana datam de 1570. Porém, a bananicultura brasileira como atividade agrícola de grande valor comercial teve início no século XIX, por volta de 1820. Baseando-se em informações de cultivo trazidas das regiões Centro Americanas, Caribe, Ilhas Canárias, África, Filipinas entre outras, os plantios de banana se desenvolveram e se expandiram das frias encostas rio-grandenses até a foz do Amazonas, ou seja, onde houvesse gente disposta a efetua-los (MOREIRA, 1985).

As bananeiras pertencem ao gênero *Musa* (Musaceae, Zingiberales). O centro de origem do grupo é o sudeste asiático, sendo que o centro de diversidade tem sido atribuído à Malásia e Indonésia. As bananeiras estão naturalmente distribuídas nas margens de florestas tropicais (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007).

A bananeira é uma planta herbácea e monocotiledônea. Possui tronco curto e subterrâneo, denominado de rizoma, que constitui um órgão de reserva onde se inserem as raízes adventícias e fibrosas. O pseudocaule, resultante da união das bainhas foliares, termina com uma copa de folhas longas e largas, com nervura central desenvolvida. Do centro da copa emerge a inflorescência com brácteas ovaladas de coloração normalmente roxo-avermelhada, em cujas axilas nascem as flores. Cada grupo de flores reunidas forma uma penca (mão) com número variável de pseudofrutos (dedos), originados por partenocarpia. Os pseudofrutos inicialmente são verdes, tornando-se amarelos com a maturação, posteriormente começam a escurecer e nesse estágio diz-se que a planta morreu. Entretanto, durante o desenvolvimento há formação de novos rebentos (filhos), que surgem na base da planta, possibilitando a constante renovação dos bananais (ALVES, 1999).

Sendo uma das fruteiras mais cultivadas nos países tropicais, a cultura da bananeira é a quarta mais importante em países em desenvolvimento (FIGUEIREDO et al., 2006; HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007). Diferencia-se das demais espécies de plantas frutíferas, pois apresenta um fluxo de produção a partir do primeiro ano de cultivo, atraindo os produtores, que obtêm o retorno do capital investido rapidamente (BOAS et al., 2002).

O Brasil figura atualmente como o quarto maior produtor de bananas do mundo, sendo a Índia o maior produtor seguido pela China e Filipinas (FAOSTAT, 2008). Em 2007, o Brasil produziu 7098353 toneladas da fruta, numa área total de 515346 hectares (IBGE, 2009). Atualmente, são produzidas no mundo mais de 81 milhões de toneladas da fruta anualmente, sendo que o continente que mais produz é o Asiático com aproximadamente 47 milhões de toneladas por ano, seguido pelo continente Americano com produção próxima a 25 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2008).

O estado brasileiro que mais colheu bananas em 2007 foi a Bahia, com 89.466ha, seguido pelo Estado de São Paulo, com 52379 ha (IBGE, 2009). Os municípios brasileiros que mais produzem são Wenceslau Guimarães (BA), Corupá (SC), Bom Jesus da Lapa (BA), Luis Alves (SC), Cajati (SP) e Registro (SP), com uma produção de 166320, 147992, 138000, 113400, 103200 e 97440 toneladas, respectivamente (IBGE, 2009). A banana é a fruta de maior consumo anual no país, com quantidades próximas a 35 kg *per capita* (MATSUURA et al., 2004).

Embora exista um número expressivo de cultivares de banana no Brasil, quando se consideram aspectos como preferência dos consumidores, produtividade, tolerância a pragas e doenças, resistência à seca, porte e resistência ao frio, restam poucas com potencial agrônomo para serem usadas comercialmente. Os cultivares mais difundidos no Brasil são: 'Prata', 'Pacovan', 'Prata Anã', 'Maçã', 'Mysore', 'Terra' e 'd'Angola', do grupo AAB, e 'Nanica', 'Nanicão' e 'Grande Naine', do grupo AAA, utilizados principalmente na exportação. Os cultivares 'Prata' e 'Pacovan' são responsáveis por aproximadamente 60% da área cultivada do Brasil (ALVES, 1999).

Na evolução das bananeiras comestíveis participaram principalmente as espécies diplóides selvagens *Musa acuminata* Colla e *M. balbisiana* Colla, de modo que cada cultivar pode conter combinações variadas de genoma completo dessas espécies. Esses genomas são denominados pelas letras A (*M. acuminata*) e B (*M. balbisiana*), cujas combinações resultam em grupos diplóides (AA, AB e BB) triplóides (AAA, AAB e ABB) e tetraplóides (AAAA, AABB e ABBB) (ALVES, 1999).

As bananeiras comerciais são estéreis, produzindo frutos sem sementes e, portanto, devem ser propagadas vegetativamente. Tradicionalmente isto é feito por meio de mudas, mas desde a última década a cultura de tecidos tem sido mundialmente adotada e

existe um banco de germoplasma de bananeira, cujo material vem sendo distribuído internacionalmente (FIGUEIREDO; BRIOSO, 2007).

Os cultivares de banana apresentam uma lenta taxa de multiplicação no campo, que varia de 5 a 10 mudas por planta matriz por ano (OLIVEIRA; SILVEIRA; SILVA, 2001). Entretanto, por meio de cultura de tecidos podem ser obtidas aproximadamente 200 mudas por planta matriz a cada 8 meses (OLIVEIRA; SILVA, 1997). Por isso, a multiplicação *in vitro*, ou micropropagação, consiste na melhor alternativa para se obter quantidade suficiente de mudas para o estabelecimento de novos plantios, principalmente com cultivares/híbridos recém-lançados por Centros de Pesquisa, atendendo com maior rapidez e eficiência a necessidade dos produtores (BRAGA; SÁ; MUSTAFA, 2001; OLIVEIRA; SILVEIRA; SILVA, 2001). Além desse aspecto, as mudas micropropagadas¹ apresentam as vantagens de: (1) serem multiplicadas em qualquer época do ano em pequeno espaço físico; (2) serem isentas de patógenos ou pragas, uma vez que são indexadas para a presença de vírus; e (3) proporcionarem uma homogeneidade para os tratos culturais e colheita devido a sua uniformidade e promoverem aumento na produção (OLIVEIRA; SILVEIRA; SILVA, 2001).

2.2 BANANA STREAK VIRUS: PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E MOLECULARES

O cultivo da bananeira no Brasil é afetado por problemas de diversas etiologias, que são responsáveis por severas perdas na produção em pré e pós-colheita. São exemplos a murcha bacteriana ou Moko (*Ralstonia solanacearum*), o nematóide *Radopholus similis*, a broca-do-rizoma e os fungos que causam diversas doenças, tais como o “Mal-do-Panamá” (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*), a “Sigatoka Amarela” (*Mycosphaella musicola*) e a “Sigatoka Negra” (*Mycosphaella fijiensis*) (GASPAROTTO et al., 2006; GONDIM; CAVALCANTE, 2001).

Além desses problemas, a bananeira está sujeita a infecção por diferentes espécies de vírus: *Banana streak virus* (BSV) gênero *Badnavirus*, família *Caulimoviridae*; *Cucumber mosaic virus* (CMV) gênero *Cucumovirus*, família *Bromoviridae*; *Banana bunchy*

¹ A micropropagação da banana consiste em isolar ápices vegetativos de filhos de matrizes vigorosas e produtivas, em condições assépticas, em meio de cultura *in vitro*. Em tais condições, proporciona-se uma profícua brotação de gemas axilares a partir do ápice vegetativo isolado (BRAGA; SÁ; MUSTAFA, 2001).

top virus (BBTV) gênero *Babuvirus*, família *Nanoviridae*; *Banana bract mosaic virus* (BBrMV) gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*; *Banana mild mosaic virus* (BanMMV) e *Banana virus X* (BVX) ambos da família *Flexiviridae* (ADAMS et al, 2004; HARPER; HULL, 1998; HOOKS et al., 2007; TEYCHENEY et al., 2005a; TEYCHENEY et al., 2005b).

As doenças ocasionadas por vírus merecem atenção especial. Os vírus podem ser transmitidos por insetos vetores e por meio de propagação vegetativa, o que pode ocasionar uma ameaça à produção, tanto nas áreas onde os vírus são endêmicos, quanto naquelas livres de vírus, mas que recebem novas mudas (FIGUEIREDO; BRIOSO, 2007). Até o momento, somente o BSV e o CMV foram registrados em bananeiras cultivadas no Brasil (FIGUEIREDO; BRIOSO, 2007; COLARICCIO et al., 2006).

A primeira ocorrência do BSV foi registrada na Costa do Marfim em bananeiras do cultivar 'Poyo' por Lassoudiere (1974). Entretanto, o agente causal só foi posteriormente identificado por Lockhart (1986). Após o primeiro relato, a presença do BSV foi registrada em 43 países da África, Europa, Oceania e América Tropical (DAHALL et al., 2000).

O BSV apresenta partículas baciliformes com largura constante de 30 nm e comprimento que varia de 120 a 150 nm (HULL et al., 2005). Possui genoma composto de DNA circular de fita dupla com tamanho aproximado de 7,4 kb e três ORFs (*open reading frames*) (Fig. 1). As ORF I e ORF II potencialmente codificam duas pequenas proteínas (22,8 kDa e 14,5 kDa, respectivamente) de funções desconhecidas. A ORF III codifica uma poliproteína de 208 kDa consistindo numa provável proteína de movimento célula a célula, proteína capsial, protease aspártica e uma replicase viral, a qual possui funções de transcriptase reversa e ribonuclease H. Acredita-se que esta poliproteína é clivada após sua transcrição em suas unidades funcionais pela protease aspártica (HARPER; HULL, 1998).

Este vírus pode ser disseminado na natureza pelas cochonilhas *Planococcus citri* e *Saccharicoccus sacchari*. As bananeiras infectadas podem apresentar sintomas de estrias foliares, lesões foliares cloróticas, mosaico, má formação dos frutos, diminuição do cacho, atrasos na colheita dos frutos e redução da produção (DANIELLS et al., 2001). Os sintomas de estrias e mosaico ocorrem esporadicamente durante o ano, dificultando sua identificação visual (FIGUEIREDO; BRIOSO, 2007).

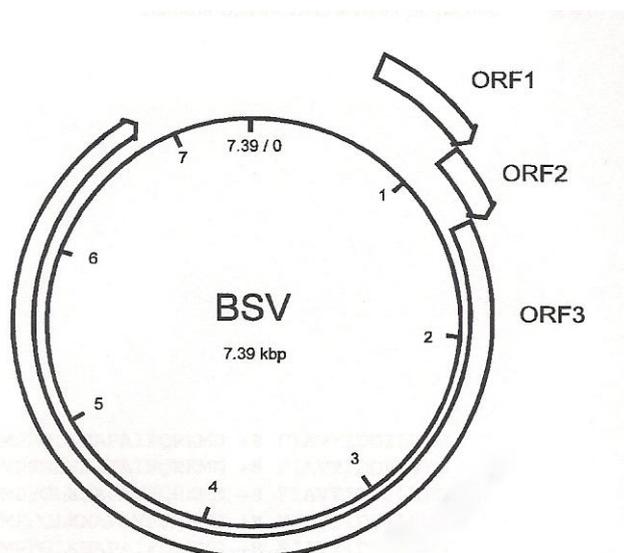


Figura 1. Esquema da Organização genômica do BSV. O círculo completo representa o genoma de DNA de fita dupla. As setas em forma de arcos indicam a posição das 3 ORFs (Imagem retirada de HARPER, G; HULL, R. Cloning and sequence analysis of *Banana streak virus* DNA. **Virus Genes**, n. 17, v. 3, 1998)

No Brasil, a ocorrência do BSV foi descrita pela primeira vez em associação com o CMV por Brioso et al. (2000). Foi relatado também em diferentes cultivares de bananeiras (pertencentes a diferentes grupos genômicos) em infecções simples ou em associação com o CMV, na Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo (BRIOSO, 2004). Posteriormente, foi identificado em mudas provenientes de cultura de meristemas importadas de Israel e Costa Rica (MARINHO; BATISTA, 2005; COLARICCIO et al., 2006).

Mesmo que originalmente não tenha sido considerado economicamente importante, o BSV tem causado grande preocupação nos últimos anos devido ao aumento de relatos de infecção nas linhagens de bananeira e híbridos micropropagados (LE PROVOST et al., 2006). Genótipos resultantes de cruzamentos entre *M. acuminata* e *M. balbisiana*, incluindo uma variedade de novos híbridos mostraram a tendência de produzir propágulos infectados pelo BSV, mesmo utilizando-se plantas assintomáticas em cultura de tecidos (DALLOT et al., 2001).

Estudos recentes revelaram que sequências virais podem ocorrer dispersas no genoma de plantas, originárias de uma infecção viral anterior que se fixou na linhagem germinativa (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009). O mecanismo desta integração ainda é desconhecido, visto que nenhum fitovírus descrito até agora exige um passo de integração como parte de sua replicação (STAGINNUS; RICHERT-PÖGGELER, 2006).

Sequências endógenas de pararetrovírus (*Endogenous Pararetroviral Sequences - EPRVs*) são a classe mais abundante de sequências virais endógenas em diferentes

espécies de plantas (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009). Estas foram encontradas no genoma nuclear de espécies de famílias distantes, como Rutaceae (citros, *Poncirus trifoliata*), Solanaceae (batata, *Solanum* sp.; petúnia, *Petunia* sp.; tabaco, *Nicotiana* sp.), Poaceae (arroz, *Oriza sativa*), Musaceae (banana, *Musa* sp.) (STAGINNUS; RICHERT-PÖGGELER, 2006), e mais recentemente nas famílias Agavaceae (*Drascena sanderiana*) (SU et al., 2007) e Asteraceae (*Dahlia variabilis*) (PAHALAWATTA et al., 2008).

Todas as EPRVs descritas até o momento possuem um padrão de arranjo similar com repetições em *tandem*, duplicações internas, fragmentações e inversão do genoma viral. A maioria das EPRVs resulta em genomas virais parciais e não funcionais, porém várias integrações contêm toda extensão do genoma viral, com sequências de leitura aberta (ORFs) funcionais. Tais sequências podem então ser ativadas resultando na liberação do genoma viral funcional que infectará o hospedeiro (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009). EPRVs que podem causar infecção já foram descritas para o *Petunia vein clearing virus* (PVCV) em petúnia (*Petunia hybrida*) (RICHERT-POEGGELER; SHEPPERD, 1997), para o *Tobacco vein clearing virus* (TVCV) em *Nicotiana edwardsonii* (LOCKHART et al., 2000) e para o *Banana streak virus* (BSV) em banana (*Musa* sp.) (DALLOT et al., 2001; NDOWORA et al., 1999).

Dois tipos de EPRVs no genoma da *Musa* já foram descritas para o BSV. Um tipo de integração que está associado ao genoma B de *Musa*, carrega o genoma inteiro do vírus, intercalado com sequências invertidas, não contínuas, capazes de excisão e recombinação, para produzir a forma episomal (presença de partículas) do vírus. Outro tipo de integração está associado ao genoma A, que não origina a forma episomal, pelo fato desta EPRV ser incompleta ou por conter mutações (JAUFEERALLY-FAKIM; KHORUGDHARRY; HARPER, 2006).

A hipótese de que a micropropagação *in vitro* e a hibridização seriam responsáveis por iniciar a infecção pelo BSV devido ao aparecimento de linhagens infectadas derivadas de parentais não apresentando sintomas da infecção pelo BSV foi sugerida por NDOWORA et al. (1999). Em 2001, DALLOT et al. mostraram evidências de que a propagação *in vitro* é determinante na expressão do BSV integrado no genoma da 'FHIA 21' (genótipo AAAB), monitorando por testes de imunocaptura seguidos da reação em cadeia da polimerase (IC-PCR) cada estágio da cultura de tecidos. Ainda que o mecanismo pelo qual a cultura de tecidos possibilita a ativação das sequências integradas do BSV seja desconhecido, a cultura de tecidos é reportada como responsável por causar aberrações cromossômicas, incluindo fusão entre segmentos de cromossomos quebrados resultando em rearranjos incluindo translocações, inversões, duplicações e deleções. Além disso, a cultura de tecidos induz a redução dos níveis de metilação do DNA que está associada à ativação de transposons (NDOWORA et al., 1999).

Atualmente, são reconhecidas pelo ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) três espécies do BSV: o *Banana streak Mysore virus*, o *Banana streak OL virus* e o *Banana streak GF virus* (ICTVdB, 2009) na família *Caulimoviridae*, gênero *Badnavirus* (HULL et al., 2005). Ainda, existe a proposição de outras espécies baseando-se em diferenças nas sequências de nucleotídeos da ORF III do BSV (AGINDOTAN et al., 2006; JAUFEEERALLY-FAKIM; KHORUGDHARRY; HARPER, 2006).

O cultivar 'Mysore' (genótipo AAB) é um dos muitos híbridos naturais de *M. acuminata* e *M. balbisiana*, originário da Índia, levando o nome da cidade de Mysore localizada no sul do Estado de Karnataka. Este cultivar é reconhecido pelas estrias cloróticas e necróticas em suas folhas, uma condição que inicialmente se pensava ser uma desordem genética, já que todos os indivíduos deste cultivar apresentavam os mesmos sintomas, e não havia sinais da transmissão destes para plantas vizinhas de outros cultivares. Somente recentemente, esses sintomas foram reconhecidos como causados por um isolado do BSV (Geering et al., 2005).

2.3 ESTRATÉGIAS PARA O DIAGNÓSTICO DO BSV

Os métodos atualmente utilizados para a detecção do BSV são: (1) a inspeção visual de sintomas que são periódicos e podem ser confundidos por aqueles causados pelo CMV; (2) imunomicroscopia eletrônica de transmissão (*Immunosorbent Electron microscopy* - ISEM); (3) ELISA (*Enzime-Linked Immunosorbent Assay*); (4) PCR (*Polimerase Chain Reaction*); e (5) *Immunocapture-PCR* (imunocaptura seguida de PCR – IC-PCR).

A PCR tem sido utilizada em numerosos estudos para a detecção de espécies do gênero *Badnavirus* (HARPER et al., 1999). Porém, a presença de EPRVs no genoma da bananeira dificulta a detecção da infecção epissomal do BSV por PCR, visto que esta técnica pode amplificar igualmente tanto o DNA viral encapsidado quanto sequências virais integradas, levando a falsos resultados positivos (LE PROVOST et al., 2006).

Em contraste com a PCR, o emprego das técnicas de ELISA e ISEM, que têm como alvos as proteínas, podem ser empregadas na detecção do BSV epissomal em bananeiras (HARPER et al., 1999). Assim, para detecção da forma epissomal do BSV foram desenvolvidas metodologias, que combinam uma etapa de captura imunológica das partículas do BSV por um antissoro policlonal específico, com a subsequente amplificação de sequências do DNA viral por PCR, denominada IC-PCR (HARPER et al., 1999; LE PROVOST et al., 2006).

Porém, os testes de ISEM, ELISA e IC-PCR, que podem discriminar especificamente a presença de partículas do vírus (HARPER *et al.*, 1999), necessitam de antissoros específicos contra o BSV e estes são obtidos com dificuldade, devido às baixas concentrações do vírus, falta de hospedeiras experimentais e dificuldades para a purificação do vírus (AGINDOTAN *et al.*, 2003).

Atualmente, a utilização de técnicas de biologia molecular tem tornado possível a clonagem do gene da proteína capsidial (CP) de vírus em plasmídeos vetores que permitem sua expressão em *Escherichia coli*. O que permite que quantidades virtualmente ilimitadas da proteína sejam produzidas, pois os clones podem ser armazenados por tempo indeterminado a -80°C, bastando o cultivo de uma cultura bacteriana para obtenção da proteína. Além disso, como o protocolo de purificação da proteína a partir de *E. coli* é relativamente simples (BARBIERI *et al.*, 2004), torna-se possível a utilização das proteínas recombinantes para a obtenção de antissoros específicos que podem ser empregados nas diferentes técnicas de detecção de vírus.

Os estudos com *E. coli* durante as décadas de 1960 e 1970, o transformou no mais compreendido organismo na natureza. Atualmente, a tecnologia do DNA recombinante é uma extensão direta das análises genéticas e bioquímicas conduzidas no passado. Mesmo antes do advento da clonagem, linhagens geneticamente alteradas de *E. coli* eram utilizadas para produzir quantidades de proteínas com interesse científico, devido à sua facilidade de manuseio e sua rápida multiplicação em meios de cultivo (AUSUBEL *et al.*, 1998).

A abordagem básica utilizada para expressão de genes exógenos em *E. coli* inicia-se na inserção de um gene num vetor de expressão, usualmente um plasmídeo. Esse vetor contém vários elementos: (1) sequências que codificam um marcador para assegurar a manutenção do plasmídeo na célula; (2) um promotor passível de controle, que uma vez induzido pode produzir grandes quantidades de mRNA do gene clonado; (3) sequências de controle de transcrição, como sítio de ligação ao ribossomo e códon iniciador ATG; e (4) sítios para a correta inserção do gene de interesse na orientação correta. Uma vez construído, o vetor de expressão pode ser introduzido numa linhagem adequada de *E. coli* (AUSUBEL *et al.*, 1998).

Existem várias abordagens disponíveis para a expressão de proteínas recombinantes com a finalidade de produção de antígenos. As duas melhores abordagens são: (1) a síntese de uma “etiqueta” fusionada à proteína de interesse que possibilita sua recuperação por uma cromatografia de afinidade e (2) a síntese da proteína em condições que causem sua precipitação em corpos de inclusão insolúveis que podem ser purificados por centrifugação (AUSUBEL *et al.*, 1998).

Em 2004, Abdelkaber *et al.* relataram a produção de um antissoro contra a CP do *Banana bunchy top virus* (BBTV), um vírus que assim como o BSV é difícil de ser purificado

a partir de tecidos foliares infectados, concluindo que as propriedades do antissoro obtido contra a CP em comparação com aquelas do antissoro obtido a partir de preparações purificadas do BBTV eram similarmente sensíveis e específicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Neste estudo foram empregados dois isolados do *Banana streak OL virus* (BSOLV), o isolado 'Terra-anã' procedente de São José dos Campos (SC) e o isolado 'Galil-7' procedente do Vale do Ribeira (SP) e um isolado do *Banana streak Mysore virus* (BSMysV), o isolado 'Mysore' procedente do Vale do Ribeira. Folhas de bananeira (*Musa* sp.) 'Terra-anã', 'Mysore' e 'Galil-7' com sintomas de estrias foliares, mosaico e lesões foliares cloróticas e necróticas (Fig. 2) foram empregadas como fonte do vírus. Como controles foram empregadas folhas de *Musa* sp. sem sintomas.

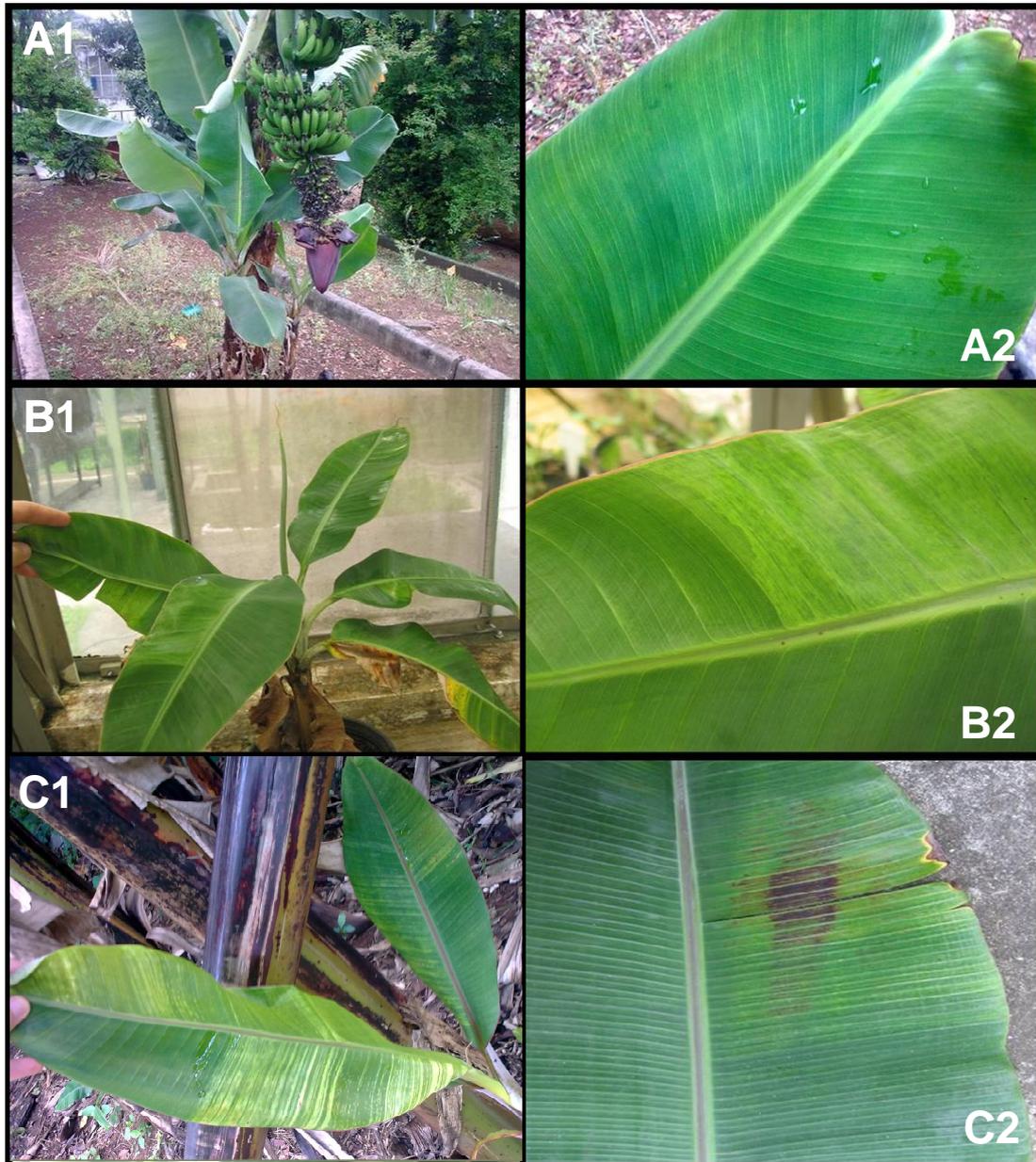


Figura 2. Folhas de bananeira 'Galil-7' com sintomas de estrias cloróticas (A1); detalhe (A2); folhas de bananeira 'Terra-anã' com sintomas de estrias cloróticas, mosaico e necrose (B1) detalhe (B2); folhas de bananeira 'Mysore' com sintomas de estrias cloróticas (C1) e lesões foliares cloróticas e necróticas (C2)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 CLONAGEM DA PROTEÍNA CAPSIDIAL DO *BANANA STREAK OL VIRUS* (BSOLV-CP)

3.2.1.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Com o objetivo de amplificar o gene da capa protéica do isolado 'Terra Anã' do *Banana streak OL virus* (BSOLV-CP), *primers* dirigidos para a esta região (Tabela 1; Fig. 3) foram desenhados de acordo com a sequência do (BSOLV) depositada no GENBANK (nº de acesso NC_003381.1).

Tabela 1 - *Primers* utilizados, sequência de nucleotídeos (nt), sítios para as enzimas de restrição e posições no genoma do BSOLV

<i>Primer</i>	Sequencia de nucleotídeos	Sítios para as enzimas de restrição	Posição no genoma do BSOLV
BSOLV-CP1 (antissenso)	5'- <u>AAG CTT</u> GAC TCT ATC CAT GAT CTT TCT T -3'	<i>Hind</i> III	nt 3742 ao 3721
BSOLV-CP2 (senso)	5'- <u>GCA TGC</u> GAT TCC AGA TCA CAA TAC GT -3'	<i>Sph</i> I	nt 2615 ao 2635
BSOLV-CP3 (senso)	5'- <u>GAG CTC</u> AGG GAA ATT GAA AAA GT -3'	<i>Sst</i> I (<i>Sac</i> I)	nt 2672 ao 2689
BSOLV-CP4 (antissenso)	5'- <u>AAG CTT</u> GGA TAA TTC TTC TGA GG -3'	<i>Hind</i> III	nt 3340 ao 3333
BSOLV-CP5 (senso)	5'- <u>GAG CTC</u> ATT ACC CTC CTA CAC AT -3'	<i>Sst</i> I (<i>Sac</i> I)	nt 2954 ao 2971

Os *primers* BSOLV-CP4 e BSOLV-CP5 foram desenhados para amplificar em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) um provável sítio antigênico da região central da BSOLV-CP, baseando-se em algoritmos, utilizando a ferramenta *Antibody Epitope Prediction* (IEDB Analysis Resource; http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input).

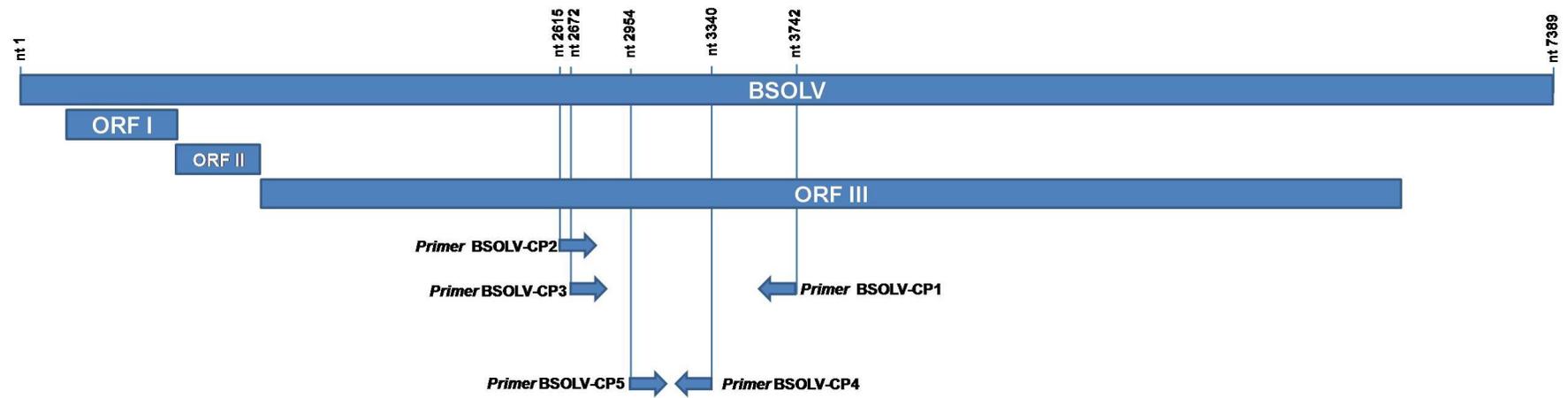


Fig 3. Esquematização linear do genoma do BSOLV, a posição de suas ORFs e alinhamento dos *primers* utilizados

3.2.1.2 Extração de DNA total de tecido vegetal

Amostras foliares de bananeira 'Terra-anã', infectadas pelo BSOLV foram submetidas à extração de DNA segundo Dellaporta, Woods e Hicks (1983) para obtenção do DNA total que será empregado nas reações de PCR.

Aproximadamente 0,1 g de fragmentos foliares foram triturados em nitrogênio líquido em microtubo, e então adicionados de 600 µl de solução de extração CTAB. A mistura foi homogeneizada e submetida à agitação moderada por 30 minutos a 65°C. Adicionaram-se 600 µl de clorofórmio/álcool isoamílico à solução que foi agitada por inversão e centrifugada a 7500 g por 5 minutos a 4°C. Foram transferidos aproximadamente 400 µl do sobrenadante para novos tubos onde se adicionou 40 µl de solução de CTAB/NaCl. Os tubos foram então agitados por inversão. Adicionaram-se 500 µl de clorofórmio/álcool isoamílico e os tubos foram agitados e centrifugados novamente a 7500 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos onde se adicionaram 400 µl de solução de precipitação CTAB. Os tubos foram agitados por inversão e submetidos a 65°C por 30 minutos, para então serem centrifugados a 500 g por 5 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 500 µl solução High-Salt TE aos tubos. Após agitação por inversão foram adicionados 300 µL de isopropanol aos tubos que foram agitados por inversão e centrifugados a 7500 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se aos tubos 500 µL de álcool 70%, os quais foram centrifugados a 10000 g por 10 minutos a 4°C. O álcool foi descartado, os tubos secos em aparelho concentrador de amostras (Eppendorf™ Concentrator 5301) por 15 minutos e o DNA foi suspenso em 40 µL de água destilada deionizada estéril.

3.2.1.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a amplificação do gene BSOLV-CP a partir de amostra de DNA total extraído de folhas de bananeira 'Terra-anã', utilizou-se o kit *GoTaq® DNA Polymerase* (PROMEGA) obedecendo às recomendações do fabricante. A reação foi conduzida em termociclador PTC-100 (MJ RESEARCH) e as temperaturas e tempos de incubação foram: 94°C por 2 minutos; 40 ciclos de 94°C por 30 s, 54°C por 30 s, 72°C por 60 s; 72°C por 4 minutos e 4°C até a utilização da amostra, para o par de *primers* BSOLV-CP1 e BSOLV-CP2 e o par BSOLV-CP1 e BSOLV-CP3. Para o par de *primers*

BSOLV-CP4 e BSOLV-CP5 as temperaturas e tempos de incubação foram: 94°C por 2 minutos; 40 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 30 s, 72°C por 60 s; 72°C por 4 minutos e 4°C até a utilização da amostra.

A presença do produto amplificado foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,5 % em tampão TAE, contendo brometo de etídeo (1 µg/L), e visualizada sob luz ultravioleta em fotodocumentador Alphamager TM 1220.

Na tabela 2 estão relacionados os tamanhos dos produtos da PCR esperados para os pares de *primers* utilizados.

Tabela 2 - Par de *primers* utilizados e tamanho esperado dos produtos de amplificação

Par de <i>primers</i>	Tamanho esperado em pares de bases (pb)
BSOLV-CP1 e BSOLV-CP2	1127 pb
BSOLV-CP1 e BSOLV-CP3	1070 pb
BSOLV-CP4 e BSOLV-CP5	386 pb

3.2.1.4 Purificação dos produtos da PCR

Para remoção dos *primers*, desoxinucleotídeos (dNTP's) e sais dos produtos obtidos na PCR, foi realizada uma purificação utilizando-se o kit comercial *QIAquick® PCR Purification kit* (QIAGEN), conforme indicação do fabricante.

3.2.1.5 Clonagem no vetor pGEM®-T Easy

O produto de DNA amplificado e purificado (inserto) foi inserido no vetor pGEM®-T Easy (PROMEGA) (Fig. 4), conforme protocolo do fabricante: foram misturados 5 µL de 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase, 1 µL pGEM®-T Easy (50 ng), 3 µL produto da PCR, 1 µL T4 DNA Ligase e a reação foi incubada por 1 h a temperatura ambiente.

O vetor contendo o inserto foi então inserido em células competentes de *Escherichia coli* DH10B por meio de transformação via choque térmico; onde as células foram misturadas ao vetor permanecendo por 1 minuto a 42 °C seguido de 2

minutos em gelo. Foi adicionado 1 mL de meio de cultura LB e as bactérias foram incubadas sob agitação por 1 h a 37 °C.

O meio LB contendo as bactérias foi centrifugado a 10000 g e aproximadamente 850 µL do sobrenadante foi descartado. As bactérias foram suspensas e plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg/mL) e X-gal (4 µl de solução 20 mg/mL) e incubadas a 37 °C por 16 a 18 h. Após o crescimento, as colônias brancas foram cultivadas em meio Circlegrow® (CG) (Qbiogene) por 24 h a 37 °C sob agitação e então submetidas a uma mini-preparação (*Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems*- PROMEGA), visando à purificação dos plasmídeos, conforme indicação do fabricante.

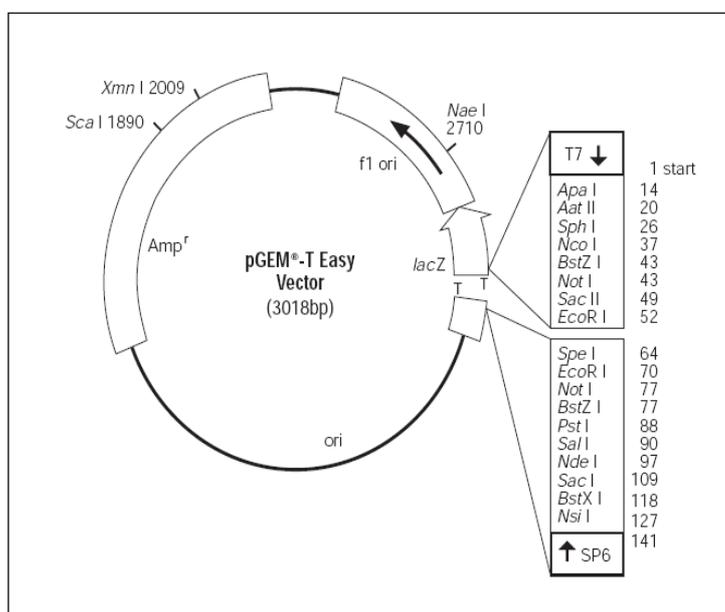


Figura 4. Esquema do vetor de clonagem pGEM®-T Easy que possui múltiplos sítios de clonagem. Amp^r: gene de resistência à ampicilina; ori: origem de replicação; lacZ: operon lac (Fonte: PROMEGA. www.promega.com)

3.2.1.6 Reação de digestão dos plasmídeos pGEM®-T Easy e pQE-30

A construção vetor pGEM®-T Easy + BSOLV-CP, e plasmídeos pQE-30 (QIAGEN) (Fig. 5) foram submetidos à digestão com as mesmas enzimas de restrição relacionadas na Tabela 3, por 2 h a 37 °C para obter o inserto com extremidades compatíveis com o vetor pQE-30. Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 % e observada sob luz ultravioleta em aparelho Eletronic U.V. Transluminator (ULTRA-LUM) em intensidade baixa.

Tabela 3 - Enzimas de restrição utilizadas para a digestão dos insertos BSOLV-CP e vetor pQE-30

Inserto BSOLV-CP	Enzimas de restrição utilizadas para digestão
1127 pb (BSOLV-CP1 e BSOLV-CP2)	<i>Hind</i> III e <i>Sph</i> I
1070 pb (BSOLV-CP1 e BSOLV-CP3)	<i>Hind</i> III e <i>Sst</i> I
386 pb (BSOLV-CP4 e BSOLV-CP5)	<i>Hind</i> III e <i>Sst</i> I

As bandas correspondentes ao BSOLV-CP e ao vetor pQE-30 foram cortadas do gel e o DNA foi purificado com o kit *PureLink™ Quick Gel Extraction Kit* (INVITROGEN), segundo indicação do fabricante.

3.2.1.7 Subclonagem do gene BSOLV-CP em vetor de expressão PQE-30 e transformação de células competentes de *E. coli* DH10 α

A reação de ligação entre o vetor pQE-30 (Fig. 5) e o inserto BSOLV-CP foi realizada conforme indicação do fabricante (*The QIAexpressionist™*- QUIAGEN).

Células competentes de *E. coli* DH10 α foram transformadas com a construção pQE-30 + BSOLV-CP por meio de choque térmico, onde as células competentes foram expostas ao vetor permanecendo por 1 minuto à 42°C seguido de 2 minutos em gelo. Foi adicionado 1 mL de meio de cultura LB e então as bactérias ficaram sob agitação por 1 h a 37°C. A solução contendo as bactérias foi centrifugada e aproximadamente 850 μ L do sobrenadante foi descartado. As bactérias foram suspensas e plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (100 μ g/mL), e mantidas a 37°C por 24 h. Após crescimento, colônias foram cultivadas em 2 mL de meio CG contendo ampicilina (100 μ g/mL) por 16 h sob agitação moderada, e então submetidas a uma minipreparação para extração de DNA plasmidial utilizando-se o kit *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (PROMEGA), seguindo as indicações do fabricante.

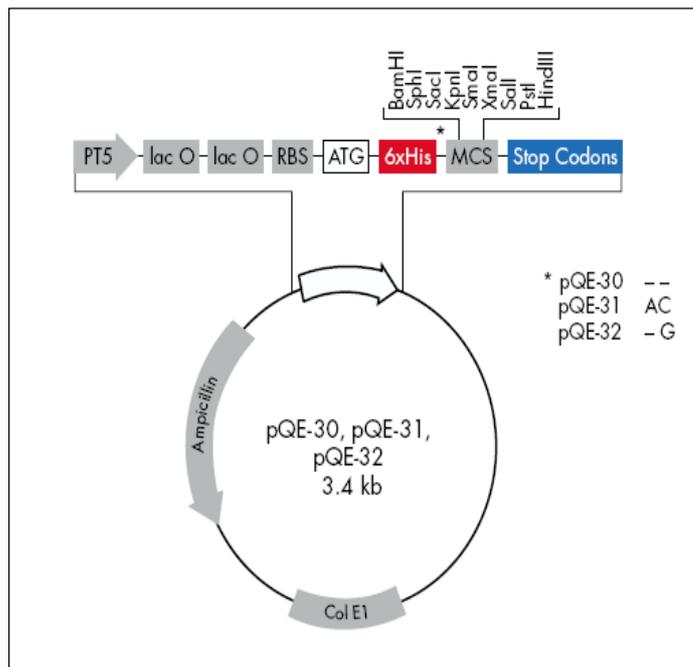


Figura 5. Esquema do vetor de expressão pQE-30 para construções com cauda de 6xHis N-terminal. Esse vetor possui: gene de resistência a ampicilina (Ampicilin); origem de replicação Col E1 (Col E1); promotor T5 (PTS); operon lac (lac O); sítio de ligação ao ribossomo (RBS); códon de iniciação (ATG); sequência da etiqueta de 6xHis (6xHis); múltiplos sítios de clonagem (MCS); códon de terminação (Stop Codons) (Fonte: The QIAexpressionist™: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, QIAGEN, 2003. www.qiagen.com)

3.2.1.8 Digestão dos plasmídeos pQE-30 contendo o gene BSOLV-CP

Os plasmídeos recombinantes foram digeridos com as mesmas enzimas por 2 h a 37 °C e visualizados em gel de agarose 1,5 %, contendo brometo de etídeo (1 µg/L), em tampão TAE sob luz ultravioleta para a confirmação da presença do inserto BSOLV-CP nas colônias selecionadas.

3.2.1.9 Subclonagem da construção pQE-30 + BSOLV-CP e transformação de células competentes de *E. coli* M15 [pREP4]

Células competentes de *E. coli* M15 [pREP4] foram transformadas com a construção pQE-30 + BSOLV-CP por meio de choque térmico (item 3.2.1.7). As bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg/mL) e

canamicina (25 µL/mL), e mantidas a 37°C por 24 h. Após crescimento, colônias foram cultivadas em 2 mL de meio CG contendo ampicilina (100 µg/mL) e canamicina (25 µL/mL) por 16 h sob agitação moderada, sendo então submetidas a uma minipreparação para extração de DNA plasmidial utilizando-se o kit *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (PROMEGA), seguindo as indicações do fabricante.

3.2.1.10 Seleção de clone para expressão da proteína BSOLV-CP

Foram selecionados 16 clones de *E. coli* M15 [pREP4] contendo a construção PQE-30 + gene BSOLV-CP. Cada clone foi cultivado em 2 mL de meio CG contendo ampicilina (100 µg/mL) e canamicina (25 µg/mL) por 30 minutos. A expressão da proteína foi induzida pela adição de IPTG na concentração final de 1 mM por 16 h. As células bacterianas foram sedimentadas por centrifugação a 10000 g, lisadas em tampão da amostra de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (item 3.2.1.12) e a presença da proteína BSOLV-CP foi verificada por Dot-Blot (item 3.2.1.14).

3.2.1.11 Purificação da proteína BSOLV-CP

A purificação da proteína BSOLV-CP expressa em *E.coli* M15 [pREP4] foi realizada em coluna de níquel-agarose conforme protocolo *HisTrap™ HP Kit* (Amersham Biosciences), sob condições desnaturantes de uréia 8 M. Um volume de 100 mL de cultura bacteriana induzida com IPTG na concentração final de 1 mM durante 16 h, foi centrifugado a 7000 g por 15 minutos e o precipitado foi suspenso em tampão de lise. Todas as frações da lavagem da coluna e de eluição da proteína foram coletadas e submetidas à SDS-PAGE (item 3.2.1.12), Western-Blot e Dot-blot visando localizar a fração da proteína eluída. A fração contendo a proteína BSOLV-CP purificada foi aplicada em gel desnaturante de poliacrilamida (gel concentrador 4% e gel de separação 12%), submetida à eletroforese e corada com solução aquosa de Coomassie® Brilliant Blue R-250 0,05% por 1 h. O gel foi descorado com lavagens sucessivas de água destilada deionizada até a visualização da banda correspondente

à proteína BSOLV-CP. A banda foi excisada do gel e homogeneizada com igual volume de água destilada deionizada.

3.2.1.12 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Alíquotas do lisado bacteriano bruto e das frações da proteína purificada BSOLV-CP foram adicionadas de igual volume de tampão da amostra de SDS-PAGE e submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (gel concentrador 4% e gel de separação 12%) utilizando equipamento para eletroforese vertical Mini Protean II® (Bio-Rad). Foi utilizado como marcador de peso molecular pré-corado a solução *BenchMark™ Prestained Protein Ladder* (Invirogen). O gel foi submetido a 200 V por 45 minutos. Em seguida o gel foi incubado em solução corante de Coomassie® Brilliant Blue R-250 por 2 h e descorado com sucessivas lavagens de solução descorante.

3.2.1.13 Western-Blot

As proteínas presentes no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema semi-seco, em equipamento Trans-Blot SD® (Bio-Rad), sob 15V com limite de corrente de 23 A por 30 minutos.

Em seguida, a membrana foi incubada em solução bloqueadora a 37°C. Após 30 minutos a membrana foi lavada duas vezes com tampão TTBS, seguida de incubação por 1 h a 37 °C com antissoro anti-6xHis (Amersham-Pharmacia) (1:1000 em TTBS). Após o período de incubação, a membrana foi lavada duas vezes com TTBS e incubada com o conjugado *antimouse*-fosfatase alcalina (Sigma) (1:30000 em TTBS) por 1 h a 37 °C. A membrana foi lavada duas vezes com TTBS seguida de uma lavagem de TBS. Finalmente, a membrana foi revelada em solução de visualização BCIP (Bromochloroindolyl phosphate) /NBT (Nitrobluetetrazolium).

3.2.1.14 Dot-Blot

Alíquotas de 2 μ L do lisado bacteriano bruto e das frações da proteína purificada BSOLV-CP foram depositadas sobre membrana de nitrocelulose e secas em estufa a 37 °C por 20 minutos. A membrana foi submetida à mesma metodologia seguida no Western-Blot (item **3.2.1.13**).

3.2.1.15 Armazenagem de clones de *E. coli* M15 [pREP4] em glicerol

Foram selecionados 3 clones que apresentaram, em reação de Dot-Blot, uma maior expressão da proteína BSOLV-CP, para armazenamento em glicerol. As colônias foram incubadas por 16 h em meio CG contendo ampicilina (100 μ g/mL) e canamicina (25 μ g/mL) a 37 °C sob agitação. Em seguida, 750 μ L de cada cultura foram adicionados a tubos de polipropileno contendo 250 μ L de glicerol estéril, que foram agitados e armazenados a -20 °C.

3.2.2 PRODUÇÃO DE ANTISSORO POLICLONAL CONTRA O *BANANA STREAK MYSORE VIRUS* (BSMysV) A PARTIR DE PREPARAÇÃO PURIFICADA DE VIRUS

3.2.2.1 Purificação do BSMysV a partir de tecidos foliares infectados

Metodo P1: A purificação de partículas do isolado de bananeira do BSMysV foi feita seguindo a metodologia utilizada por AGINDOTAN et al. (2003) com modificações. Foram realizadas quatro tentativas de purificação partindo de 20 g, 80 g, 200 g e 1 kg de folhas de bananeira 'Mysore'. Tecido foliar fresco (excluindo-se as nervuras) foi cortado e triturado em liquidificador adicionado de PBS 0,2M, pH 6,0, contendo 1 % de sulfito de sódio e 2 % de polivinilpirrolidona (PVP) na proporção de 1:3 (g:mL). O extrato resultante foi filtrado em gaze e centrifugado por 20 minutos a 10000 g para remoção de material vegetal grosseiro. Em seguida, 6% de Polietilenoglicol p-8000 (PEG) e 1,5% de cloreto de sódio foram adicionados ao sobrenadante que então foi agitado por 40 minutos a 4 °C, seguido de centrifugação por 20 minutos a 10000 g. O precipitado foi suspenso em PBS 0,1 M, pH 7,2 contendo 1,5 % de cloreto de sódio. Foi adicionado à solução resultante 4 % de PEG p-8000 e 1,5 % de cloreto de sódio, que foi agitada por 1 h a 4 °C e então centrifugada por 20 minutos a 10000 g. O precipitado foi ressuspenso em PBS 0,1 M, pH 7,2 contendo 1,5 % de cloreto de sódio, à solução resultante adicionou-se de 0,5 % de Triton X-100 e agitou-se por 1 h a 4°C, e finalmente centrifugou-se por 20 minutos a 10000 g.

O sobrenadante foi depositado sobre colchão de sacarose a 30 % (30g de sacarose em 100 mL de PBS 0,1 M, pH 7,2 contendo 1,5 % de cloreto de sódio) e ultracentrifugado por 2 h a 105.000 g. O precipitado foi suspenso em PBS 0,1 M, pH 7,2 contendo 1,5 % de cloreto de sódio, adicionado de igual volume de clorofórmio gelado, agitado e centrifugado por 20 minutos a 10000 g, quando o sobrenadante foi recolhido (ETAPA P1). Quando utilizado 1 kg de material foliar, foi adicionado a este sobrenadante 6 % de PEG (p-6000) e 1,5 % de NaCl, seguido de agitação a 4°C por 1 h e centrifugação por 20 minutos a 10000 g. O precipitado foi suspenso em pequeno volume de PBS 0,1 M, pH 7,2 contendo 1,5 % de NaCl, adicionado de igual volume de clorofórmio gelado, agitado e centrifugado por 20 minutos a 10000 g (ETAPA P2). O sobrenadante de cada purificação (utilizando massa de folhas de 20 g, 80 g, 200 g e 1

kg) foi recolhido e denominado, respectivamente, de BSMysV-Pur20g, BSMysV-Pur80g, BSMysV-Pur200g e BSMysV-Pur1000g.

A presença de partículas virais foi confirmada por microscopia eletrônica de transmissão em preparação de contraste negativo (item **3.2.3.2**). Efetuou-se também a leitura das absorvâncias de luz ultravioleta da purificação BSMysV-Pur1000g diluída na proporção de 1:20 (v:v) em PBS 0,1 M, pH 7,2, nos comprimentos de onda de 200 a 360 nm, em espectrofotômetro UV-160A (Shimadzu).

Método P2: Idêntico ao **Método P1**, partindo de uma massa inicial de 1kg de tecido foliar de bananeira 'Mysore', até a ETAPA P1. Após esta etapa, o sobrenadante foi depositado sobre gradiente de sacarose (10%-20%-30%-40%) e centrifugado a 82500 g por 2 h.

3.2.2.2 Produção de antissoro policlonal contra o BSMysV

Fêmeas adultas de camundongos Balb/c foram imunizadas, com injeções intramusculares, visando à obtenção de antissoro contra o BSMysV. Uma alíquota da purificação BSMysV-Pur1000g, previamente diluída 1:10 (v:v) em PBS 0,1M pH 7,2, foi empregada na proporção 1:1 (v:v) diluída em adjuvante completo de Freund para a primeira imunização. Cada animal foi imunizado com um volume de 100 µL desta preparação. Foram realizadas três novas imunizações com intervalo de quinze dias, sendo a primeira em adjuvante completo de Freund e, as duas últimas em adjuvante incompleto de Freund. As sangrias foram realizadas 7 dias após as 2^{as} e 3^{as} injeções. Previamente à primeira imunização, foi realizada uma sangria para a coleta do soro normal, pré-imune, dos animais. O antissoro obtido foi chamado de AS-BSMysV.

3.2.2.3 Dot-Blot

Tecidos foliares de bananeira 'Mysore', 'Terra-anã' e de *Musa* sp. sadia, empregada como controle negativo, foram triturados em nitrogênio líquido e adicionados de PBS 0,2M, pH 6,0, na proporção de 1:1 (g:ml), contendo 2% de PVP e 1 % de sulfito de sódio, e diluídas em TTBS na proporção de 1:10 e 1:20 (v:v). Como controle positivo foi empregado uma alíquota do BSV-Pur-1000g. A presença do BSV

foi avaliada nas amostras utilizando o AS-BSMysV conforme a metodologia descrita no item **3.2.1.14**.

O AS-BSMysV foi adsorvido em extrato foliar de bananeira 'Mysore' e do controle negativo obtido triturando-se 5 g de tecido foliar em nitrogênio líquido e adicionando-se 10 mL de PBS 0,1M, pH 7,4 contendo 1 % de sulfito de sódio e 10 mL de TBS. O antissoro foi diluído no extrato bruto na proporção de 1:10; 1:50; 1:100; 1:250; 1:500 e 1:1000 (v/v) e incubado por 1 h a 37 °C antes de seu uso.

3.2.2.4 Western-Blot

As mesmas amostras obtidas para a realização do Dot-Blot (item **3.2.2.3**), foram analisadas em ensaios de Western-Blot, após a diluição em tampão de SDS-PAGE, na proporção de 1:1 (v/v). As amostras foram submetidas à SDS-PAGE (item **3.2.1.12**) e Western-Blot (item **3.2.1.12**). O AS-BSMysV foi diluído na proporção de 1:50 em TTBS.

3.2.2.5 Enzime-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Amostras foliares de bananeira 'Mysore', 'Terra-anã', e de *Musa* sp. empregada como controle negativo foram trituradas em nitrogênio líquido adicionando-se a seguir, tampão carbonato na proporção de 1:10 (g/mL). Como controle positivo foi utilizada uma alíquota da purificação BSMysV-Pur1000g diluída em igual volume de tampão de cobertura. Os extratos e a BSMysV-Pur1000g foram aplicados nos poços de uma placa de poliestireno adequada para reação de ELISA, que foi incubada a 37 °C por 1 h. Em seguida, a placa foi lavada por 3 vezes com PBST e bloqueada com 1% de leite desnatado diluído em PBS 37 °C por 1 h. A placa foi lavada novamente com PBST, adicionando-se a seguir o AS-BSMysV diluído nas proporções de 1:100, 1:250 e 1:500 em PBST, e incubada novamente a 37 °C por 1 h. A placa foi novamente lavada e adicionou-se o conjugado anti-mouse+fosfatase alcalina (Sigma) diluído na proporção de 1:1000 em PBST sendo em seguida incubada a 37 °C por 1 h. Após a última lavagem com PBST foi adicionado p-fenilnitrofosfato diluído em tampão Dietanolamina (1mg/mL). Após aproximadamente 30 minutos foi realizada a leitura da placa em leitor de ELISA Modelo 450 (Bio-Rad) no comprimento de onda de 405 nm.

Foram consideradas positivas as amostras com média dos valores de absorvância do infectado sobre o sadio superior ou igual a 3,0.

3.2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

3.2.3.1 Contraste Negativo

Tela de níquel, coberta com filme plástico Parlodion (EMS Sciences) reforçado com carvão, foi depositada sobre gota da preparação purificada do vírus e gota de extrato bruto de fragmentos foliares de bananeira triturados em PBS 0,1M, pH 7,2, por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, a tela foi lavada com água destilada e contrastada negativamente com acetato de uranila 2,5 % por 5 minutos. A preparação foi observada sob microscópio eletrônico de transmissão (MET) Philips EM 208, numa ampliação de 40000x com a finalidade de investigar a presença de partículas virais semelhantes às do gênero *Badnavirus* (MARTELLI; RUSSO, 1984). Quando observada a presença destas partículas virais, realizou-se o registro das imagens em chapas de celulóide, as quais foram reveladas e, os negativos, passados para papel fotográfico.

3.2.3.2 Monitoramento do processo de purificação do vírus

Para monitorar a presença e concentração de partículas virais durante o processo de purificação do BSMysV, alíquotas da preparação ETAPA 1 e ETAPA 2 (item 3.2.2.1) foram contrastadas negativamente, conforme o item 3.2.3.1.

3.2.3.3 Monitoramento de plantas de bananeira infectadas pelos isolados BSOLV e BSMysV

Método M1: Fragmentos foliares de bananeira 'Terra-anã' e 'Galil-7' infectadas pelo BSOLV e de bananeira 'Mysore' infectada pelo BSMysV foram triturados em gotas de PBS 0,1M, pH 7,2. O extrato resultante foi contrastado negativamente conforme item 3.2.3.1.

Método M2: Em função da dificuldade na visualização das partículas de BSOLV e do BSMysV ao MET foi desenvolvida uma metodologia na tentativa de

umentar a concentração de partículas virais. Aproximadamente 3g de tecido foliar de bananeira 'Galil-7' foi triturado em nitrogênio líquido e adicionado de PBS 0,2 M, pH 6,0 na proporção de 1:2 (g:mL). O extrato resultante foi filtrado em gaze e adicionado de 6 % de PEG (p-8000) e 1,5 % de NaCl, seguido de agitação por 30 minutos a 4 °C. A solução foi centrifugada a 10000 g por 5 minutos a 4 °C e o precipitado suspenso em PBS 0,1 M, pH7,2. Adicionou-se à solução clorofórmio gelado e a mistura foi agitada por inversão, seguido de centrifugação a 10000 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado e contrastado negativamente, conforme o item **3.2.3.1**.

3.2.3.4 Decoração

Alíquota da purificação BSMysV-Pur1000g foi exposta a tela de níquel, coberta com filme plástico Parlodion (EMS Sciences) reforçado com carvão por 1 h a temperatura ambiente. A tela foi então lavada com PBS e incubada em AS-BSMysV (1:50 em PBS) por 1 h a temperatura ambiente, lavada com água destilada e contrastada negativamente com acetato de uranila 2,5% por 5 minutos. Realizou-se o registro das imagens em chapas de celulóide, as quais foram reveladas e, os negativos, passados para papel fotográfico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CLONAGEM DA PROTEÍNA CAPSIDIAL DO *BANANA STREAK OLIVUS VIRUS* (BSOLV-CP)

Numa primeira tentativa de clonagem do gene da capa protéica do BSOLV (BSOLV-CP) foi utilizado o par de *primers* BSOLV-CP1 e BSOLV-CP2. Reações de PCR utilizando estes *primers* amplificaram fragmentos de tamanhos correspondentes ao esperado (~1127 pb). Após a ligação do produto da PCR em vetor pGEM®-T Easy, células competentes de *E. coli* DH10 α foram transformadas. A confirmação da transformação foi efetuada após crescimento das colônias brancas em meio de cultivo líquido, extração de DNA plasmidial, reação de digestão dos plasmídeos com as enzimas *Hind* III e *Sph* I, seguida de eletroforese em gel de agarose dos produtos da digestão.

Após a eletroforese dos produtos da digestão, os fragmentos correspondentes ao gene BSOLV-CP foram excisados do gel, purificados e então tentativamente subclonados em vetor de expressão pQE-30. Após a transformação de células competentes de *E. coli* DH10 α e *E. coli* M15 [pREP4], crescimento de colônias em meio de cultivo líquido, extração de DNA plasmidial, reação de digestão dos plasmídeos seguida de eletroforese em gel de agarose, observou-se que as colônias obtidas não possuíam o gene BSOLV-CP ligado ao vetor. O perfil eletroforético dos produtos da reação de restrição apresentou somente bandas correspondentes ao vetor pQE30.

A mesma metodologia descrita para a clonagem do gene BSOLV-CP utilizando o par de *primers* BSOLV-CP-1 e BSOLV-CP-2, foi aplicada utilizando-se o par de *primers* BSOLV-CP1 e BSOLV-CP3. A clonagem do gene BSOLV-CP no vetor pGEM®-T Easy foi obtida com sucesso, confirmada por reação de restrição da purificação de DNA plasmidial com as enzimas *Hind* III e *Sst* I. Já a subclonagem em vetor de expressão pQE-30 não foi mais uma vez alcançada. A obtenção de proteínas recombinantes utilizando sistemas de expressão procariotos depende de diversos fatores que influenciam a sua expressão, tais como características da sequência gênica e potencial tóxico da proteína para a célula hospedeira (SCHUMANN; FERREIRA, 2004). O controle rígido da expressão de proteínas recombinantes é um fator muitas vezes determinante no sucesso da produção destas proteínas. Este controle é necessário já que a expressão da proteína recombinante pode ser letal ao

crescimento das bactérias (SCHUMANN; FERREIRA, 2004). Esse controle pode ser alcançado quando utilizamos células de *E. coli* M15 (pREP4), já que a expressão da proteína é alcançada somente com adição de IPTG ao meio de cultivo (QIAexpress-The complete system for 6xHis technology, QIAGEN, 2000).

Uma hipótese para o insucesso da clonagem da proteína BSOLV-CP é que sua expressão seja tóxica para a célula bacteriana. Assim, todas as colônias transformadas com a construção pQE-30+BSOLV-CP não sobreviveriam, e após o crescimento das colônias só restariam aquelas que possuem o vetor pQE-30 que carrega gene para resistência ao antibiótico adicionado ao meio de cultivo. A presença de células transformadas apenas com o vetor pQE-30 pode ser explicada já que as enzimas de restrição utilizadas não apresentam 100% de eficiência. Conseqüentemente, após a reação de digestão do vetor para obter extremidades compatíveis com o inserto, pode ainda existir uma contaminação de plasmídeos não digeridos.

Na eletroforese dos produtos da reação de PCR conduzida utilizando o par de *primers* BSOLV-CP4 e BSOLV-CP5, foram visualizados fragmentos do tamanho esperado (Fig. 6). Este fragmento de aproximadamente 390 pb, correspondente à região central da BSOLV-CP, será denominado de BSOLV-rcCP deste ponto em diante.

O algoritmo que prediz as regiões antigênicas num polipeptídeo, utilizado pela ferramenta *Antibody Epitope Prediction* (IEDB Analysis Resource; http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input), baseia-se na predição da hidrofiliidade de regiões do polipeptídeo, que está diretamente correlacionada com sua antigenicidade. Estas porções hidrofílicas são regiões mais acessíveis, ou mais expostas do polipeptídeo (PARKER; GUO; HODGES, 1986; MANT, 2009).

Após a ligação deste produto em vetor pGEM®-T Easy, células competentes de *E. coli* DH10 α foram transformadas. Na eletroforese em gel de agarose, após a reação de digestão dos plasmídeos com as enzimas *Hind* III e *Sst* I, foram visualizadas bandas correspondentes ao vetor (aproximadamente 3000 pb) e ao gene BSOLV-rcCP (aproximadamente 390 pb), confirmando a transformação.

Por meio de eletroforese em gel de agarose verificou-se a presença do fragmento correspondente ao gene BSOLV-rcCP (Fig. 7), após a digestão da construção BSOLV-rcCP + pQE-30 transformada em células de *E. coli* M15 [pREP4] com as enzimas *Hind* III e *Sst* I.

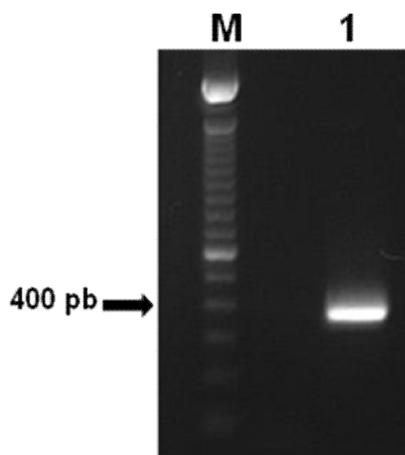


Figura 6. Perfil eletroforético do produto da reação de PCR utilizando o par de *primers* BSOLV-CP4 e BSOLV-CP5. 1: fragmento de aproximadamente 390 bp, correspondente ao gene BSOLV-rcCP. M: Marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder (INVITROGEN)

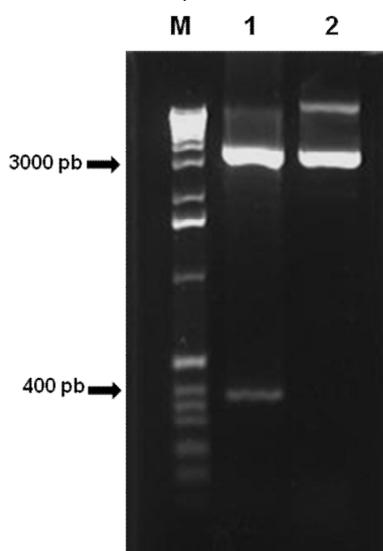


Figura 7. Perfil eletroforético do produto da reação de digestão da construção pQE-30+BSOLV-rcCP (1) e do vetor pQE-30 (2) com as enzimas *Hind* III e *Sst* I. 1: fragmentos de aproximadamente 3500 pb (correspondente ao vetor pQE-30) e de aproximadamente 390 pb (correspondente ao gene BSOLV-rcCP); 2: fragmento de aproximadamente 3500 pb; M: Marcador de peso molecular 1000 bp DNA ladder (INVITROGEN)

Após a obtenção de clones de *E. coli* M15 [pREP4] contendo a construção pQE-30+BSOLV-rcCP, foram selecionadas 16 colônias para um ensaio de expressão da proteína em pequena escala. Após indução da expressão por meio da adição de IPTG e incubação por 16h, as colônias foram precipitadas e lisadas. A reação de Dot-blot (Fig. 8) revelou diferenças nos padrões de expressão da proteína BSOLV-rcCP das diferentes colônias, indicado pela formação e intensidade do halo, após a revelação da membrana. A colônia 10 foi utilizada para a produção e purificação da proteína BSOLV-rcCP, e armazenada em glicerol a -20°C. O lisado bacteriano bruto

da colônia 10 e frações da purificação foram submetidas à SDS-PAGE, Western-Blot e Dot-Blot. As colônias 11 e 13 também foram armazenadas em glicerol a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

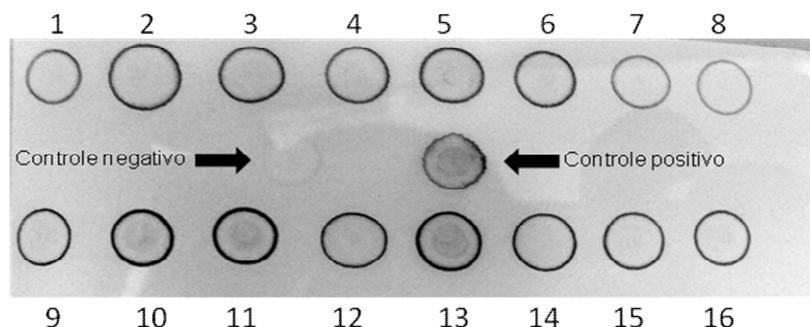


Figura 8. Dot-Blot dos 16 clones selecionados de *E. coli* M15 contendo a construção PQE-30 + BSOLV-rcCP após indução da expressão da proteína. Nos clones 10, 11 e 13 ocorreu a formação de halo mais intenso. Utilizou-se como controle negativo uma colônia transformada com a construção pQE-30 + BSOLV-rcCP não induzida, e como controle positivo uma colônia transformada com a construção pQE-30 + BSOLV-rcCP induzida

Em Dot-Blot, observou-se que o lisado bruto, assim como as frações da eluição da proteína reagiram com o antissoro anti-6xHis (Fig. 9).

Na figura 10A verifica-se a presença de proteínas nas frações eluídas de 4 a 8, obtidas após os procedimentos de purificação. Em Western-Blot observou-se a presença de proteína de aproximadamente 14 kDa, correspondente a BSOLV-rcCP no lisado bruto, na fração passada pela coluna e nas 4 primeiras eluições (Fig. 10B), que possibilitou verificar a presença e localização da proteína BSOLV-rcCP (Fig. 10). Tanto na reação de Dot blot, quanto na reação de Western-Blot observou-se que as eluições 4 e 5 possuíam a proteína purificada em maior quantidade, devido a presença de bandas proeminentes de $\sim 14\text{ kDa}$ (Fig. 9 e 10B).

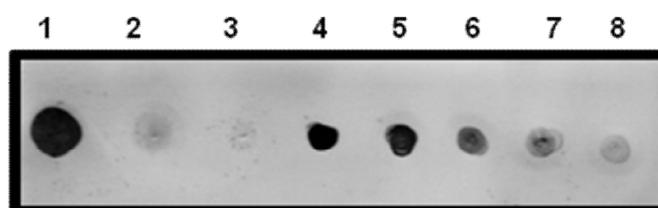


Figura 9. Dot-Blot das alíquotas do lisado bacteriano e das frações da purificação da proteína BSOLV-rcCP. 1: lisado bacteriano bruto; 2: lisado após passagem pela coluna; 3: lavagem da coluna; 4 a 8: eluições da proteína BSOLV-rcCP

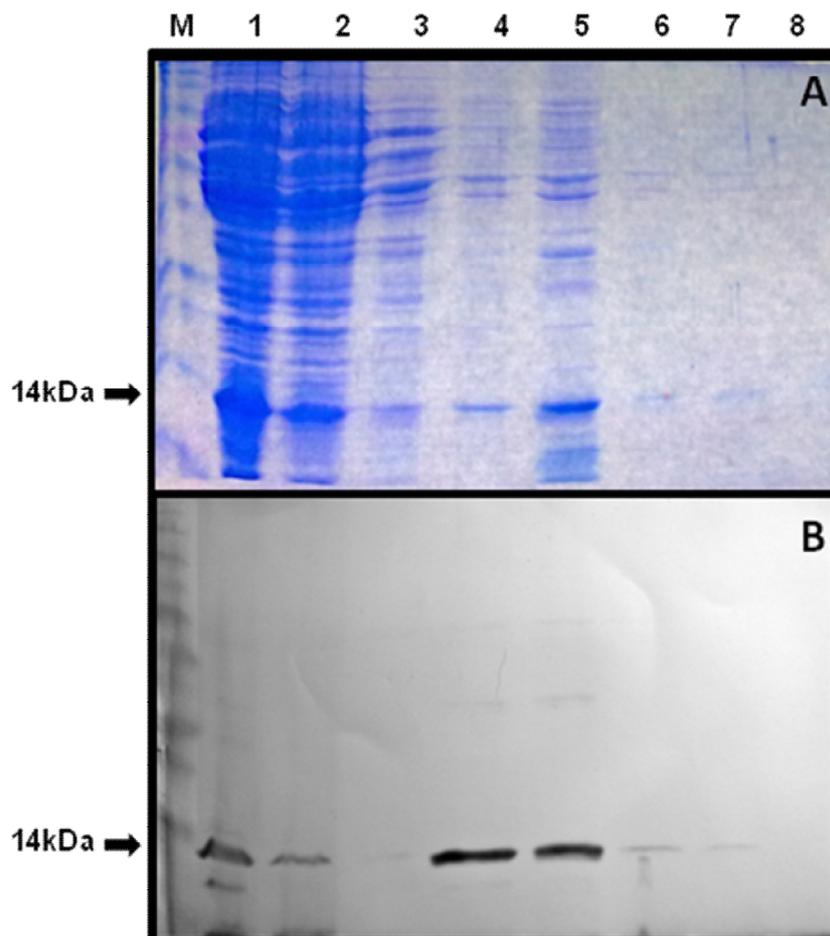


Figura 10. Perfil eletroforético em SDS-PAGE (A) e Western-Blot (B) do lisado bacteriano e das frações da proteína BSOLV-rcCP purificada. A: observa-se fragmento de 14 kDa; B: observa-se a reação da proteína de 14 kDa com o antissoro anti-6xHis e que as eluições 4 e 5 contêm maior quantidade da proteína BSOLV-rcCP purificada; M: marcador de peso molecular *BenchMark™ Prestained Protein Ladder* (INVITROGEN); 1: lisado bacteriano bruto; 2: lisado após passagem pela coluna; 3: lavagem da coluna; 4 a 8: eluições da proteína BSOLV-rcCP

As frações contendo a proteína BSOLV-rcCP foram submetidas à SDS-PAGE e coradas com solução aquosa de Coomassie® Brilliant Blue R-250 0,05%. A banda correspondente à proteína de ~14 kDa foi excisada do gel, homogeneizada com igual volume de água destilada deionizada, e armazenada a -20 °C. Trabalhos futuros poderão ser realizados com esta proteína purificada para a produção de antissoro e detecção do BSV em extratos foliares de bananeira.

4.2 PRODUÇÃO DE ANTISORO POLICLONAL CONTRA O *BANANA STREAK MYSORE VIRUS* (BSMysV) A PARTIR DE PREPARAÇÃO PURIFICADA DE VÍRUS

Foram efetuadas cinco tentativas de purificação do BSMysV a partir de tecidos foliares infectados, variando-se a massa foliar inicial e a passagem ou não em gradiente de sacarose.

No **Método P1**, partindo-se de massa de tecido foliar de 20 g, 80 g e 200 g e não submetida a gradiente de sacarose, a purificação não resultou na observação de partículas virais sob MET.

A purificação BSMysV-Pur1000g, a partir de massa de 1kg de folhas de bananeira do 'Mysore' e não submetida a gradiente de sacarose, rendeu um volume de 25mL (ETAPA P1). O monitoramento desta etapa por MET, revelou uma baixa concentração de partículas virais. Este fato observado condiz com a literatura que relata uma baixa concentração de partículas do BSV nos tecidos infectados (AGINDOTAN et al., 2003).

Com a intenção de aumentar a concentração de partículas na preparação, foi adicionado ao protocolo mais uma etapa de precipitação com auxílio de polietileno glicol *p-6000* (PEG *p-6000*).

O PEG é um polímero de cadeia não ramificada composto de uma única unidade, $H(OCH_2CH_2)_nOH$, que se repete, sendo disponível numa gama de pesos moleculares que reflete o número (n) de repetições em cada molécula. O PEG induz a agregação de macromoléculas em soluções aquosas (SAMBROOK, RUSSEL, 2001; ZHOU, RIVAS, MINTON, 2008), sendo relatado na literatura que a precipitação com PEG pode ser utilizada para muitos vírus, até mesmo vírus frágeis (HULL, 2002).

Após esta etapa de precipitação (ETAPA P2), a preparação apresentou-se mais 'limpa' e com uma concentração maior de partículas do BSV, a qual também foi monitorada por meio de preparação para MET.

Os valores de absorvância de luz ultravioleta da preparação purificada BSMysV-Pur1000g, diluída na proporção 1:20, foram de 1,473 e 0,738 nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm respectivamente (Fig. 11). O valor da absorvância 260 nm/280 nm foi de 1,9975.

O espectro de absorção de luz ultravioleta é uma ferramenta útil para se averiguar a pureza de uma preparação purificada de vírus. O espectro de absorção de luz ultravioleta dos vírus é uma combinação do espectro de absorção do ácido nucleico e da capa protéica. Ácidos nucleicos têm um espectro de absorção máximo a

260 nm e um mínimo a 230 nm, enquanto que o espectro de absorção das proteínas tem um pico a 280 nm e um mínimo a 250 nm. Como a absorção específica dos ácidos nucleicos é relativamente maior (aproximadamente 25 vezes) que a absorção específica das proteínas, a combinação dos espectros de absorbância para os vírus possui um pico de absorção a 260 nm e um mínimo a 230-240 nm (HULL, 2002). Baseando-se nestes dados, o espectro de absorção da preparação BSMysV-Pur1000g é um indicativo de que esta é uma purificação que não possui contaminantes, visto que foram observados picos de absorção a 260 nm e um mínimo a 230-240 nm.

Em 2003, Agindotan et al. produziram um antissoro caracterizado como sensível e específico contra o BSV, a partir de uma preparação purificada de partículas do vírus que não foi submetida a gradiente. Os valores da absorbância a 260 nm e a 280 nm aqui obtidos foram semelhantes aos obtidos por Agindotan et al. (2003), que foi de 1,433 e 1,084 respectivamente. Estes mesmos autores obtiveram o valor de absorbância de 1,32 para a relação 260 nm/280 nm. Esses dados motivaram a utilização da BSMysV-Pur1000g como antígeno para a produção de anticorpos.

A diluição da amostra BSMysV-Pur1000g na proporção de 1:20 em PBS foi escolhida tanto para a observação sob MET, quanto para leituras do espectro de absorbância de luz ultravioleta. A padronização foi usada pelo fato de ser esta a diluição final utilizada nas inoculações dos animais, pois para estas imunizações a amostra BSMysV-Pur1000g foi diluída 1:10 (v:v) em PBS, e então diluída 1:1 (v:v) em adjuvante completo de Freund.

No **Método P2**, que corresponde àquele submetido ao gradiente de sacarose, a purificação do BSMysV a partir de tecidos foliares infectados não resultou na observação de uma banda característica, nem tão pouco foram visualizadas partículas virais ao MET após a centrifugação no respectivo gradiente (ETAPA P2), apesar da observação sob MET de uma aliquota da ETAPA P1 ter revelado a presença de partículas baciliformes.

A centrifugação em gradiente de sacarose pode aumentar a qualidade da preparação, mas é sabido que um alto grau de pureza é inversamente proporcional a quantidade de partículas virais (AGINDOTAN et al., 2003) e essa perda só pode ser justificada se este passo de purificação resultar numa preparação que originará uma antissoro mais específico.

Podemos levantar a hipótese de que esse passo de centrifugação em gradiente de sacarose causou a destruição e/ou a difusão das partículas virais através do gradiente devido a diferenças em seus tamanhos, o que resultou na ausência de uma banda característica após este passo da purificação, além da dificuldade de sua

visualização sob MET. Essas hipóteses são suportadas pela confirmação da presença de partículas virais ao MET na etapa anterior ao gradiente.

Thottappilly, Dahal e Lockhart (1998) realizaram uma purificação de um isolado nigeriano do BSV, onde utilizaram gradiente de cloreto de céσιο como último passo na metodologia de purificação. Os autores alcançaram à visualização de duas bandas distintas após passagem pelo gradiente. Numa das bandas, foi observada a presença de maior concentração de partículas do BSV por espectro de absorção de luz ultravioleta. Agindotan et al. (2003) também realizaram uma purificação do BSV submetendo a amostra a gradiente de cloreto de céσιο, onde puderam inferir, também por espectro de absorção de luz ultravioleta, que o rendimento desta purificação foi aproximadamente 15 vezes menor comparado a uma purificação que não incluía a passagem por tal gradiente.

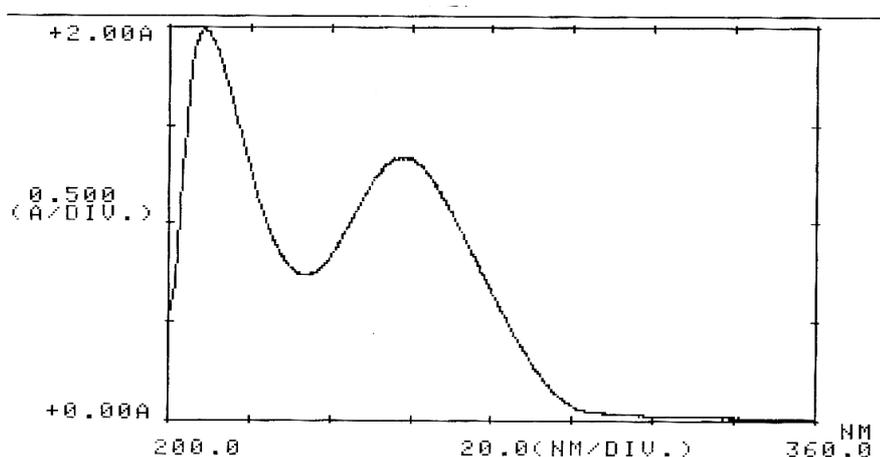


Figura 11. Curva de espectro de absorbância da purificação BSMysV-Pur1000g, diluída na proporção de 1:20 em PBS 0,1M, pH 7,4, nos comprimentos de onda de 200 a 360 nm

A última sangria dos camundongos gerou aproximadamente 3,5 μ L de antissoro, que nos testes sorológicos (Dot-Blot, Western-Blot e ELISA) reagiu da mesma maneira que as outras duas sangrias. Por este motivo, optou-se pela apresentação dos resultados obtidos utilizando-se nestes testes o AS-BSMysV da terceira sangria. As reações de Dot-Blot (ANEXO F), independentemente da diluição ou da adsorção do antissoro, foram positivas quando testadas com amostras do BSMysV-Pur1000g, demonstrando que o AS-BSMysV possui afinidade por proteínas presentes nesta purificação.

Quando utilizado o AS-BSMysV adsorvido com extrato bruto de bananeira 'Mysore', foi observado um resultado positivo para as amostras de 'Mysore e 'Terra

aná', e negativo para o controle sadio, nas diluições de 1:10 para o extrato bruto e de 1:250, 1:500 e 1:1000 do antissoro.

As reações de Dot-Blot, utilizando o AS-BSMysV não adsorvido ou adsorvido com extrato de *Musa sp.* sadia, não possibilitaram diferenciar as amostras 'Mysore' e 'Terra-anã' infectadas com o BSMysV e BSOLV respectivamente, do controle negativo.

Com base nos dados do Dot-Blot, foram empregadas as diluições do AS-BSMysV em ELISA, observando-se mais uma vez que o antissoro possui afinidade pela BSMysV-Pur1000g, nas concentrações avaliadas. A leitura de absorbância da preparação purificada foi maior do que o controle negativo. Entretanto, mais uma vez não foi possível diferenciar as amostras 'Mysore' e 'Terra-anã' infectadas com o BSMysV e BSOLV respectivamente, do controle negativo (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de absorbância ($A_{405\text{ nm}}$) obtidos em teste de ELISA utilizando o AS-BSMysV

Amostra	AS-BSMysV ¹	AS-BSMysV ²	AS-BSMysV ³
'Mysore'	0,368	0,000	0,000
'Terra-anã'	0,281	0,072	0,000
<i>Musa sp.</i> sadia	0,373	0,108	0,000
BSMysV-Pur1000g	1,945	1,469	1,633

Diluição do AS-BSMysV: ¹1:100, ²1:250 e ³1:500.

Nos ensaios de Western-Blot, foi observado o mesmo padrão de reação contra o AS-BSMysV nas amostras de "Mysore", 'Terra-anã' e de *Musa sp.* sadia. A amostra de BSMysV-Pur1000g não apresentou nenhuma banda neste teste, possivelmente por uma baixa concentração do vírus na amostra (Fig. 12)

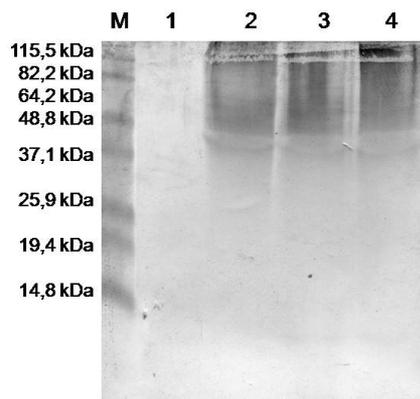


Figura 12. Western-Blot das amostras de BSMysV-Pur100g (1), ‘Mysore’ (2), ‘Terra-anã’(3) e *Musa* sp. sadia (4). A amostra 1 não apresentou reação, enquanto que as amostras 2, 3 e 4 apresentaram um padrão similar de reação. M: marcador de peso molecular *BenchMark™ Prestained Protein Ladder* (INVITROGEN)

Com estes resultados, a hipótese de que o antissoro aqui produzido não possui especificidade para a detecção do BSV é levantada. Pelas metodologias empregadas neste trabalho não foi possível a obtenção de uma preparação purificada do BSMysV-Pur1000g de boa qualidade. O fato da não obtenção de uma banda específica para o vírus em gradiente de sacarose impossibilitou a obtenção de uma preparação purificada de melhor qualidade do vírus, o que provavelmente diminuiria as reações inespecíficas nos testes realizados para a detecção do BSV em extrato bruto. Entretanto, o uso do gradiente de sacarose para se obter preparações mais limpas, também pode acarretar uma diminuição na concentração das partículas do vírus. Este procedimento poderia resultar numa maior purificação do BSMysV, pela exclusão dos contaminantes proteicos, possivelmente presentes na preparação do BSMysV-Pur1000g. A presença de proteínas da própria bananeira na preparação purificada do vírus pode ter contribuído para a produção de um antissoro com baixa especificidade.

Uma alternativa seria a utilização do AS-BSMysV em IC-PCR, uma vez que esta técnica tem como alvo DNA e não as proteínas. Com o uso de controles internos (*primers* para genes da bananeira) na reação, seria possível a detecção segura do BSV episomal, mesmo que o antissoro apresente reação inespecífica com as proteínas da bananeira.

4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

O monitoramento dos processos de purificação do **Método P1**, das amostras BSMysV-Pur20g, BSMysV-Pur80g, BSMysV-Pur200g, sob MET não revelou a presença de partículas virais. O monitoramento da ETAPA P1 da purificação BSMysV-Pur1000g evidenciou a presença de partículas semelhantes às do BSV numa concentração baixa (Fig. 13). As partículas apresentavam-se com largura constante de aproximadamente 30 nm e comprimento de 120 a 150 nm e, também, ultraestruturalmente preservadas em sua maioria. O campo de fundo desta preparação mostrou-se com aspecto granuloso. Na análise da ETAPA P2 sob MET (Fig. 13), foi observado que houve um aumento do número de partículas, indicando que a tentativa de concentração das partículas com o auxílio da precipitação com PEG foi válida. Do mesmo modo que na ETAPA P1, as partículas mostraram-se com diâmetro constante de aproximadamente 30 nm, e comprimento de 120 a 150 nm, além de ultraestruturalmente preservadas em sua maioria. Pode-se observar que a preparação apresentava-se mais limpa, já que o campo de fundo da mesma não apresentava o aspecto granuloso observado anteriormente.

O monitoramento do extrato bruto de folhas de bananeira infectadas pelo BSOLV e BSMysV sob MET, utilizando-se o **Método M1**, não revelou em nenhum momento a presença de partículas virais, nem mesmo em bananeira 'Mysore', na qual foi observada a presença de partículas após purificação. Este fato concorda com a literatura, que relata que a concentração do BSV em plantas infectadas é baixa (AGINDOTAN et al., 2003).

Com a intenção de aumentar a concentração de partículas numa preparação obtida a partir de uma pequena massa inicial de tecido vegetal, foi desenvolvido o **Método M2**, baseado em protocolos de clarificação e concentração de preparações de vírus (CHRISTIE et al., 1987; AGINDOTAN et al., 2003). Este método foi testado, apenas para amostra de bananeira 'Galil-7'.

Na análise da preparação obtida pelo **Método M2** ao microscópio eletrônico de transmissão, apesar da não observação da presença de partículas virais semelhantes as do BSV, estruturas de conformação semelhantes a túbulos, possuindo aproximadamente 50 nm de diâmetro e comprimento de tamanhos variados foram visualizados (Fig. 14). O interior dessas estruturas tubulares mostrou-se mais elétron denso quando comparado à parede dos túbulos. Estruturas semelhantes foram observadas por Agindotan et al. (2006) em amostras de banana infectadas por isolados do BSV. Estruturas tubulares, desta vez contendo partículas virais em seu

interior, foram descritas para outra espécie do gênero *Badnavirus*, o *Commelina yellow mottle badnavirus* (CoYMV) (Cheng et al., 1998). Estudos revelaram que estas estruturas são sorologicamente relacionadas à proteína de movimento do CoYMV, estando possivelmente envolvidas no movimento célula a célula desse vírus.

A análise de preparações de amostras foliares de banana sob MET para o diagnóstico da presença do BSV, utilizando-se tanto o **Método M1**, quanto o **Método M2** não revelou a presença do BSV nas amostras de bananeiras avaliadas. Na literatura, a MET mostra bons resultados na detecção da infecção epissomal do BSV quando utilizada em conjunto com a sorologia (imunomicroscopia eletrônica de transmissão - ISEM) (AGINDOTAN et al., 2006).

A reação de decoração da alíquota BSMysV-Pur1000g (Fig. 15) revelou a afinidade do AS-BSMysV pelas partículas do BSMysV, evidenciadas pela formação de halo elétron-denso ao redor das partículas. Nos testes sorológicos (ELISA, Dot- e Western-Blot), realizados com o referido antissoro, a detecção do vírus em extrato bruto foi dificultada pelas reações inespecíficas, enquanto que na decoração da partícula foi possível mostrar que de fato o antissoro possui moléculas de imunoglobulina específicas contra o BSMysV.

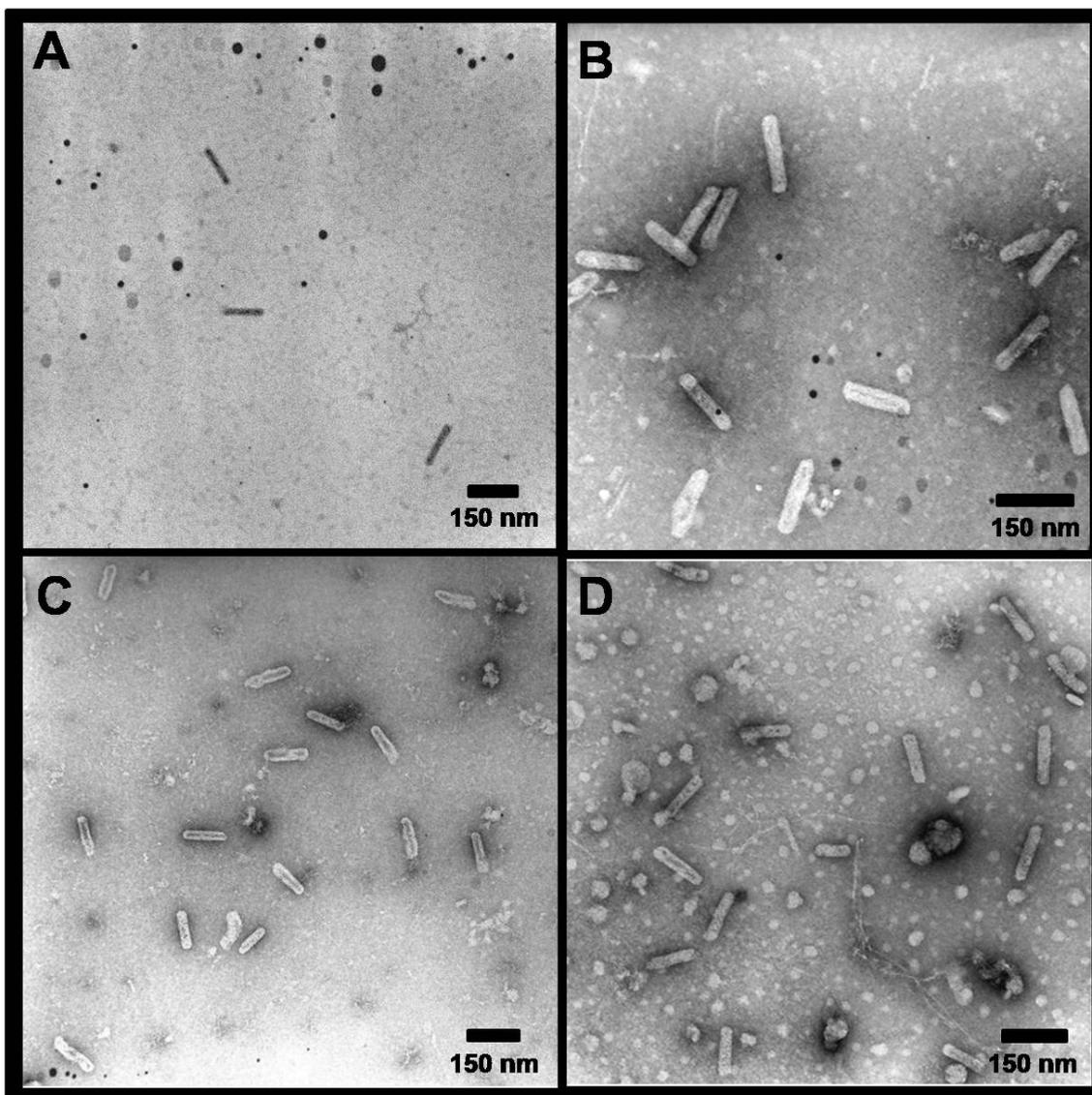


Figura 13. Micrografias eletrônicas de transmissão de contraste negativo da ETAPA P1 da purificação BSV-Pur1000g (A), ETAPA P2 da purificação BSV-Pur1000g (B), purificação BSV-Pur1000g diluída na proporção de 1:20 em PBS (C), e ETAPA 1 da purificação utilizando-se o **Método P2** (D). Nas imagens foram observadas partículas baciliformes com aproximadamente de 120 a 150 nm de comprimento. Nota-se que o aspecto granulado do campo de fundo da preparação (A) é reduzido na preparação (B)

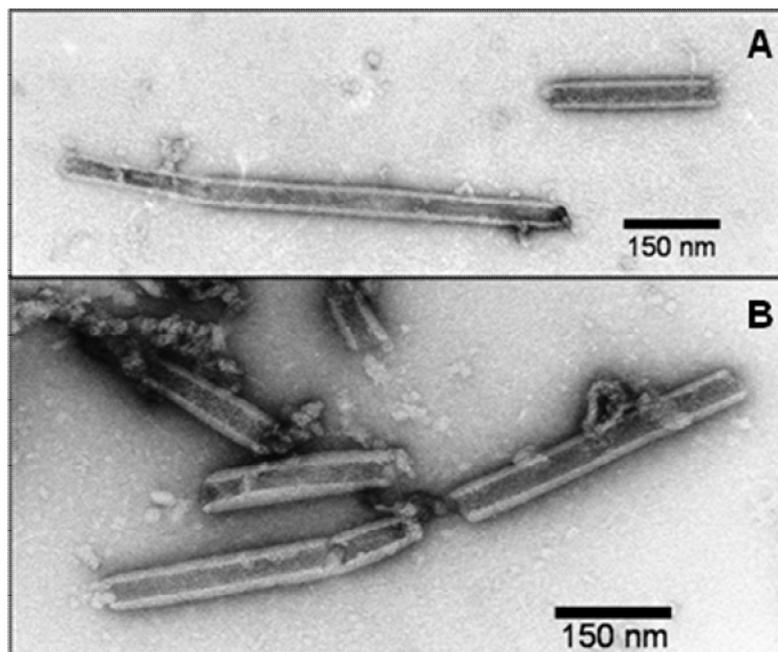


Figura 14. Micrografia eletrônica de transmissão de contraste negativo da preparação obtida pelo **Método M2**. A e B: estruturas de conformação semelhantes a túbulos, possuindo aproximadamente 50 nm de diâmetro e comprimento de tamanhos variados

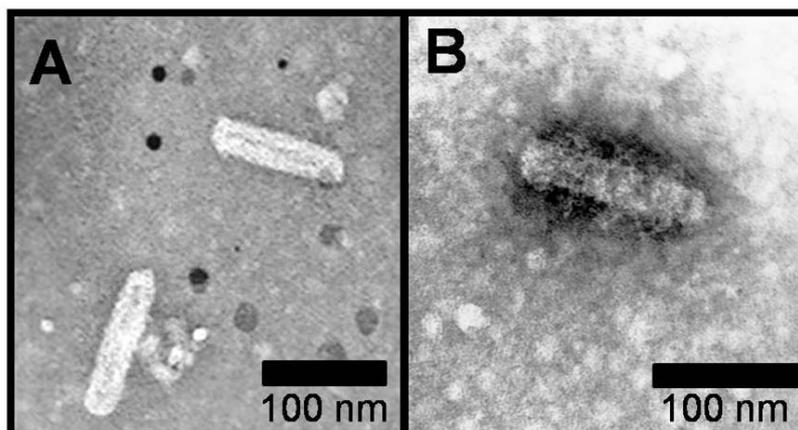


Figura 15. Contraste negativo de partículas do BSMysV não decoradas (A) e decoradas (B). Observa-se a reação do AS-BSMysV com a partícula do BSMysV evidenciada pela formação do halo elétron-denso ao redor da partícula em (B)

5. CONCLUSÕES

A metodologia utilizada para a expressão e purificação da proteína capsidial do BSV é adequada, e pode ser utilizada como alternativa na obtenção de antígeno para a produção de antissoro específico contra o BSV. A produção de antissoro a partir da proteína recombinante purificada poderá eliminar reações inespecíficas, levando a uma melhor detecção do BSV por técnicas sorológicas e moleculares associadas à sorologia.

O antissoro AS-BSMysV produzido apesar de ter apresentado reações inespecíficas na detecção do BSV em extrato bruto em testes de ELISA, Dot-Blot e Western-Blot, reagiu positivamente com BSMysV-Pur1000g, nos testes acima citados. A reação positiva do AS-BSMysV com o BSMysV-Pur1000g em decoração, ELISA, Dot-Blot e Western-Blot, demonstrou a afinidade do antissoro pelo BSMysV. Isto abre a possibilidade da utilização deste antissoro em reações moleculares associadas à sorologia, como a IC-PCR, que poderão ser avaliados futuramente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELKADER, H.S.; ADBEL-SALAM, A.M.; SAGHIR, S.M.; HUSSEIN, M.H. Molecular cloning and expression of recombinant coat protein gene of *Banana bunchy top virus* in *E. coli* and its use in the production of diagnostic antibodies. **Arabian Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 173-188, 2004.

ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; BAR-JOSEPH, M.; BRUNT, A.A.; CANDRESSE, T.; FOSTER, G.D.; MARTELLI, G.P.; MILNE, R.G.; FAUQUEUT, C.M. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. **Archives of Virology**, v. 146, n. 5, p. 1045-1060, 2004.

AGINDOTAN, B.O.; THOTTAPPILLY, G.; UWAIFO, A.; WINTER, S. Production of monoclonal and polyclonal antibodies against a Nigerian isolate of *Banana streak virus*. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n. 7, p. 171-178, 2003.

AGINDOTAN, B.O.; WINTER, S.; LESEMAN, D.; UWAIFO, A.; MIGNOUNA, J.; HUGHES, J.; THOTTAPPILLY, G. Diversity of banana streak inducing viruses in Nigeria and Ghana: Twice as many sources detected by immunoelectron microscopy (IEM) than by TAS-ELISA or IC-PCR. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 12, p. 1194-1203, 2006.

ALVES, E.J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Cruz das Almas: Embrapa. 1999. 585p.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SELDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (Eds.) **Short protocols in molecular biology**. United States of America, New York. Wiley. 3ª edição. 1998.

BARBIERI, M.R.; CARVALHO, M.G.; ZAMBOLIN, E.M.; ZERBINI, F.M. Expressão em *Escherichia coli* da proteína capsidial do *Watermelon mosaic virus* e produção de antígeno. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 215-219, 2004.

BOAS, L.C.V.; TENENTE, R.C.V.; GONZAGA, V.; NETO, S.P.S.; ROCHA, H.S. Reação de clones de bananeira (*Musa spp.*) ao nematóide *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, Raça 2. **Revista Brasileira de fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 690-693, 2002.

BRAGA, M. F.; SA, M. E.; MUSTAFA, P. C. Avaliação de um protocolo para a multiplicação in vitro da bananeira (*Musa sp.*) cv. caipira (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.2, p. 215-219, 2001.

BRIOSO, P.S.T. Importance and current status of *Badnavirus* genus. **Virus Reviews & Research**, v.9, n. 1, p.49-50, 2004.

BRIOSO, P.S.T.; CORDEIRO, Z.J.M.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W.; PIMENTEL, J.P.; FIGUEIREDO, A.R. Infecção mista em bananeiras pelo vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus-CMV*) e da risca da bananeira (*Banana streak virus-BSV*) no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.2, p.255-257, 2000.

CHENG, P.; TZAFIR, I.; LOCKHART, B.E.L.; OLSZEWSKI, E. Tubules containing virions are present in plant tissues infected with *Commelina yellow mottle badnavirus*. **Journal of General Virology**, v.79, n. 4, p. 925-929, 1998.

CHRISTIE, S.R.; PURCIFULL, D.E.; CRAWFORD, W.E.; AHMED, N.A. **Electron microscopy of negatively stained clarified viral concentrates obtained from small tissue samples with appendices on negative staining techniques**. Technical Bulletin 872. Florida: Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 1987. 45p.

COLARICCIO, A.; CHAVES, A.L.R.; EIRAS, M.; PALAZZO, S.R.L.; MOREIRA, S.M.; MATTOS, M.A.N. Detecção do *Banana streak virus* (BSV) em mudas de meristemas de banana importadas. **Summa Phytopathologica**, v.32, suplement., p.S96-S97, 2006.

DAHAL, G.; ORTIZ, R.; TENKOUANO, A.; HUGHES, J. d'A.; THOTTAPPILLY, G.; VUYLSTEKE, D.; LOCKHART, E.B.L. Relationship between natural occurrence of banana streak badnavirus and symptom expression, relative concentration of viral antigen, and yield characteristics of some micropropagated *Musa* spp. **Plant Pathology**, v.49, n. 1, p.68-79, 2000.

DALLOT, S.; ACUÑA, P.; RIVERA, C.; RAMIREZ, P.; CÔTE, F.; LOCKHART, B.E.L.; CARUANA, M.L. Evidence that the proliferation stage of micropropagation procedure is determinant in the expression of *Banana streak virus* integrated in the genome of FHIA 21 hybrid (*Musa* AAAB). **Archives of Virology**, v.146, n. 11, p.2179-2190, 2001.

DANIELLS, J.W.; GEERING, A.D.; BRYDE, N.J.; THOMAS, J.E. The effect of *Banana streak virus* on the growth and yield of dessert bananas in tropical Australia. **Annals of Applied Biology**, v. 139, n. 1, p. 51-60, 2001.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.1, n.4, p. 19-21, 1983.

FAOSTAT- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICAL DIVISION. 2008. Disponível em. <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em 29/11/2008.

FIGUEIREDO, D.V.; BRIOSO, P.S.T. PCR multiplex para a detecção de BSV e CMV em bananeiras micropropagadas. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 3, p. 229-232, 2007.

FIGUEIREDO, D.V.; MEISSNER FILHO, P.E.; SILVA NETO S. P.; BRIOSO, P.S.T. Detection and analysis of *Banana streak virus* (BSV) sequences variability of banana from Brazil. **Summa Phytopathologica**, v.32, n. 2, p. 118-123, 2006.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R.; HANADA, R.E.; MONTARROYOS, A.V.V. **Sigatoka-negra da bananeira**. Manaus: Embrapa Amazônia ocidental. 2006. 177p.

GAYRAL, P.; ISKRA-CARUANA, M. Phylogeny of *Banana streak virus* reveals recent and repetitive endogenization in the genome of its host (*Musa* sp.). **Journal of Molecular Evolution**, v.69, n. 1, p. 65-80, 2009.

GEERING, A.D.W.; POOGGIN, M.M.; OLSZEWSKI, H.E.; LOCKHART, B.E.L.; THOMAS, J.E. Characterization of *Banana streak Mysore virus* and evidence that its DNA is integrated in the B genome of cultivated *Musa*. **Archives of Virology**, v. 150, n. 4, p. 787-796, 2005.

GONDIM, T.M.S.; CAVALCANTE, M.J.B. **Como produzir banana**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2001. 31 p.

HARPER, G.; DAHAL, G.; THOTTAPPILLY, G.; HULL, R. Detection of episomal Banana Streak Badnavirus by IC-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.79, n. 1, p.1-8, 1999.

HARPER, G.; HULL, R. Cloning and sequence analysis of banana streak virus DNA. **Virus Genes**, v.17, n. 3, p.271-278, 1998.

HESLOP-HARRISON, J.S.; SCHWARZACHER, T. Domestication, Genomics and the future for banana. **Annals of Botany**, v.100, n. 5, p. 1073-1084, 2007.

HOOKS, C.R.R.; WRIGHT, M.G.; KABASAWA, D.S., MANANDHAR, R., ALMEIDA, R.P.P. Effect of banana bunchy top virus infection on morphology and growth characteristics of banana. **Annals of Applied Biology**, v. 153, n. 1, p. 1-9, 2007.

HULL, R. *Matthew's Plant Virology*. San Diego: Academic Press, 2002. 999 p.

HULL, R.; GEERING, A.; HARPER, G.; LOCKHART, B.E.; SCHOELZ, J.E. Family *Caulimoviridae*. In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, A.L. (Eds.). **Virus Taxonomy**. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier, 2005. p.385-396.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2009. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 13/04/2009.

ICTVdB – International Committee on Taxonomy of viruses -The Universal Virus Database, version 4. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>. Acesso em 29/07/2009.

INIBAP - International Network for the Improvement of Banana and Plantain. **INIBAP Annual Report 1995**. Montpellier: INIBAP. 1996. 48p.

JAUFEEERALLY-FAKIM, Y.; KHORUGDHARRY A.; HARPER G. Genetic variants of *Banana streak virus* in Mauritius. **Virus Research**, v. 115, n. 1, p. 91-98, 2006.

LASSOUDIÈRE, A. La mosaïque dite "a tirets" du bananier 'Poyo' en Côte d'Ivoire. **Fruits**, v.29, p.349-357, 1974.

- LE PROVOST, G.; ISKRA-CARUANA, M.; ACINA, I.; TEYCHENEY, P. Improved detection of episomal *Banana streak viruses* by multiplex immunocapture PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 137, n.1, p.7-13, 2006.
- LOCKHART, E.B.L. Purification and serology of a bacilliform virus associated with a streak disease of banana. **Phytopathology**, v.76, n. 10, p.995-999, 1986.
- LOCKHART, B.E.L.; MENCKE, J.; DAHAL, G.; OLSZEWSKI, N.E. Characterization and genomic analysis of *Tobacco vein clearing virus*, a plant pararetrovirus that is transmitted vertically and related to sequences integrated in the host genome. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 6, p. 1579-1585, 2000.
- MANT, C.T.; KOVACS, J.M.; KIM, H.M.; POLLOCK, D.D.; HODGES, R.S. Intrinsic amino acid side-chain hydrophilicity/hydrophobicity coefficients determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography of model peptides: comparison with other hydrophilicity/hydrophobicity scales. **Biopolymers**, v.92, n. 6, p. 573-595, 2009.
- MARINHO, V.L.A.; BATISTA, M.F. Interceptação, pelo serviço de quarentena de mudas, de vírus em mudas meristemáticas de bananeiras importadas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 552, 2005.
- MARTELLI, G.P.; RUSSO, M. Use of thin sectioning for visualization and identification of plant viruses. In: MARAMOROSH, K. & KOPROWSKI, H. (Eds.) **Methods in Virology**. New York. Academic Press. 1984. pp. 87-120.
- MATSUURA, F.C.A.U.; COSTA, J.I.P.; FOLEGATTI, M.I.S. Marketing da banana: preferências do consumidor quanto aos atributos de qualidade dos frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 48-52, 2004.
- MOREIRA, R.S. **Banana: teoria e prática de cultivo**. Campinas: Fundação Cargill. 1985. 335p.
- NDOWORA, T.; DAHAL, G.; LaFLEUR, D.; HARPER, G.; HULL, R.; OLSZEWSKI, N.E.; LOCKHART, B.E.L. Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. **Virology**, v. 255, n. 2, p. 214-220, 1999.
- OLIVEIRA, R.P.; SILVA, S.O. Avaliação da micropropagação comercial em bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 415-420, 1997.
- OLIVEIRA, R.P.; SILVEIRA, D.G.; SILVA, S.O. Concentração de BAP e a eficiência de micropropagação de bananeira tetraplóide (grupo AAAB). **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p. 73-78, 2001.
- PAHALAWATTA, V.; DRUFFEL, K.; PAPPU, H. A new and distinct species in the genus *Caulimoviridae* existits as an endogenous plant pararetroviral sequence in its host, *Dahlia variabilis*. **Virology**, v. 376, n. 2, p. 253-257, 2008.

PARKER, J.M.; GUO, D.; HODGES, R.S. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. **Biochemistry**. v. 25, n. 19, p. 5425-5432, 1986.

PROMEGA. Disponível em: www.promega.com. Acesso em 20/04/2009.

QIAexpress- The complete system for 6xHis technology, QIAGEN, 2000. Disponível em www.qiagen.com. Acesso em 20/04/2009.

RICHERT-POGGELER, K.R.; SHEPERD, R.J. *Petunia vein clearing virus*: a plant pararetrovirus with the core sequences for an integrase function. **Virology**, v.236, n. 1, p.137-146, 1997.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual, volume 1**. 3ª edição. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

SASAYA, T.; ISHIKAWA, K.; KOGANEZAWA, H. Nucleotide sequence of the coat protein gene of *Lettuce big-vein virus*. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 6, p. 1509-1515, 2001.

SCHUMANN, W.; FERREIRA, L.C. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n. 3, p. 442-453, 2004.

STAGINNUS, C; RICHERT-PÖGGELER, K.R. Endogenous pararetroviruses: two-faced travelers in the plant genome. **Trends in Plant Sciences**, v.11, n.10, p.485-491, 2006.

SU, L.; GAO, S.; HUANG, Y.; JI, C.; WANG, D.; MA, Y.; FANG, R.; CHEN, X. Complete genomic sequence of *Dracena mottle virus*, a distinct badnavirus. **Virus Genes**, v.35, n.2, p. 423-429, 2007.

TEYCHENEY, P.-Y.; LABOUREAU, N.; ISKRA-CARUANA, M.-L.; CANDRESSE, T. High genetic variability and evidence for plant-to-plant transfer of *Banana mild mosaic virus*. **Journal of General Virology**, v. 30, n.11, p. 3179-3187, 2005a.

TEYCHENEY, P.-Y.; MARAIS, A.; SVANELLA-DUMAS, L., DULUCQ, M.-J. CANDRESSE, T. Molecular characterization of *Banana virus X* (BVX), a novel member of the *Flexiviridae* family. **Archives of Virology**, v. 150, n. 9, 1715-1727, 2005b.

The QIAexpressionist™: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, QIAGEN, 2003. Disponível em: www.qiagen.com. Acesso em 20/04/2009.

THOTTAPPILLY, G.; DAHAL, G.; LOCKHART, B.E.L. Studies on a nigerian isolate of banana streak badnavirus: I. Purification and enzyme-linked immunosorbent assay. **Annals of Applied Biology**, v.132, n. 2, p. 253-261, 1998.

ZHOU, H.; RIVAS, G.; MINTON, A.P. Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. **Annual Review of Biophysics**, v. 37, n. 1, p. 375-397, 2008.

ANEXO A

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL –
CETEA-IB (FRENTE DO DOCUMENTO)



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 63/08, sobre o Projeto: Produção de anti-soro para a detecção de isolados de *Banana streak vírus* a partir a expressão da proteína capsidial em *Escherichia coli*, sob a responsabilidade da Dra. Adolorata Colarício está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Protocolo aprovado pela CETEA-IB em 15 de outubro de 2008.

São Paulo, 15 de outubro de 2008.


Dra. Vera Cecilia Annes Ferreira

Coordenadora da CETEA-IB

ANEXO B**CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL –
CETEA-IB (VERSO DO DOCUMENTO)****CETEA - IB**

INSTITUTO BIOLÓGICO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

Registro**Número : 063/08****Livro : 01****Folha : 74****Data: 15/10/2008****CERTIFICADO**

em atendimento ao Protocolo nº 063/08, sobre o Projeto: Produção de soro para a detecção de anticorpos de Bactérias e vírus, sob a responsabilidade da Dra. Adolaine Colares, em conformidade com os princípios éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

ANEXO C

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES UTILIZADOS NESTE TRABALHO

Acetato de uranila 2,5 %

- Adicionar 2,5 g de acetato de uranila e completar com água destilada deionizada aquecida para 100 mL. Filtrar em papel filtro e armazenar em frasco âmbar a 4 °C por vários meses

Acrilamida/bis-acrilamida 30 %

- 87,6 g de acrilamida
- 2,4 g bis-acrilamida
- Completar o volume para 300 mL com água destilada deionizada
- filtrar em filtro *Acrodisc® syringe filter* (Pall Corporation) 0,44 µm

APS (Persulfato de amônio 10 %)

-1g de persulfato de amônio ((NH₄)₂S₂O₈) e completar o volume para 10 mL com água destilada deionizada. Armazenar em alíquotas de 1 mL a -20°C

CaCl₂, 1 M (Cloreto de cálcio)

- 147 g CaCl₂.2H₂O
- Completar o volume para 1 L com água destilada deionizada.

Clorofórmio/Álcool isoamílico

-Misturar 10 mL de álcool isoamílico em 290 mL de clorofórmio. Armazenar a 4 °C

Coomassie® Brilliant Blue, solução aquosa, 0.05%

-Adicionar 500 mg de Coomassie® Brilliant Blue R-250 a completar o volume para 100 mL com água destilada deionizada

EDTA, 0,5 M (Ethylenediamine tetraacetic acid)

Adicionar 19,1 g de EDTA em 70 mL de água destilada deionizada. Ajustar o pH para 8,0 (O EDTA não dissolve completamente até o pH da solução ficar próximo a 8,0). Ajustar o volume para 100 mL com água destilada deionizada.

IPTG (Isopropyl β-D-Thiogalactoside), 100 mM

- 500 mg de IPTG

- 20 mL de água destilada deionizada
- Armazenar em alíquotas de 1 mL a -20°C

Meio CG (Circlegrow®- Qbiogene)

- 40 g de meio Circlegrow® e completar com água destilada deionizada para 1 L. Autoclavar a 121°C por 15 minutos

Meio LB (Luria-Bertani, Fisher Biotech®)

- 10 g de triptone
- 5 g de extrato de levedura
- 10 g de NaCl
- Adicionar água destilada deionizada para 1 L e autoclavar a 121°C por 15 minutos

Meio LB sólido (Luria-Bertani, Fisher Biotech®)

- 25 g de Meio LB (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl)
- 15 g de ágar bacteriológico
- Adicionar água destilada deionizada para 1 L e autoclavar a 121°C por 15 minutos

MgCl₂, 1 M (Cloreto de magnésio)

- 20,3 g MgCl₂.6H₂O
- Água destilada deionizada para 100 mL

NaCl, 5 M (Cloreto de sódio)

- 292 g de NaCl
- Água destilada deionizada para 1L

PBS, 1M (Tampão fosfato salino)

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 11,5 g NaHPO₄.7H₂O (ou 29 g de Na₂HPO₄.12H₂O)
- 2 g KH₂PO₄
- Água destilada deionizada para 1L. Ajustar para o pH desejado.

Tampão de eletroforese do SDS-PAGE (10X)

- 30,3 g de Tris

-144 g de glicina

-10 g de SDS

-Completar com água destilada deionizada para 1 L. Diluir 1 parte de tampão de corrida do SDS-PAGE 10X em 9 partes de água destilada deionizada ao utilizar.

SDS, 10 % (Sodium dodecyl sulfate)

-dissolver 10 g de SDS em 90 mL de água destilada deionizada. Completar o volume para 100 mL com água destilada deionizada.

Solução bloqueadora

-0,2 % de leite desnatado em pó em tampão TTBS

Solução corante de Coomassie® Brilliant Blue R-250

-50 % metanol

-0,05 % Coomassie® Brilliant Blue R-250

-10 % ácido acético

-40 % de água destilada deionizada

-Dissolver o Coomassie® Brilliant Blue R-250 no metanol antes de adicionar o ácido acético e a água destilada deionizada. Pode ser armazenado por até 6 meses.

Solução CTAB de precipitação

-1 % de CTAB

-50 mM de Tris.Cl, pH 8,0

-10 mM de EDTA, pH 8,0

Solução CTAB/NaCl

-Dissolver 2,05 g de NaCl em 40 mL de água destilada deionizada. Adicionar lentamente 5 g de CTAB sob agitação. Se necessário aquecer a 65 °C. Ajustar o volume para 50 mL.

Solução de CaCl₂

-60 mM CaCl₂

-15 % glicerol

-10 mM PIPES, pH 7,0

- Autoclavar por 15 minutos a 121 °C

Solução descorante

- 7 % ácido acético
- 5 % metanol
- 88 % de água destilada deionizada

Solução de extração CTAB

- 2 % de CTAB
- 100 mM Tris.Cl, pH 8,0
- 20 mM EDTA, pH 8,0
- 1,4 M NaCl
- Adicionar 2 % de β -mercaptoetanol antes de utilizar.

Solução de visualização BCIP (Bromochloroindolyl phosphate)/NBT (Nitrobluetetrazolium)

-Misturar 33 μ L de NBT (100 mg NBT em 2 mL de Dimetilformamida 70 %; armazenar sob 4 °C por até 1 ano) em 5 mL de tampão substrato da fosfatase alcalina. Adicionar 17 μ L de BCIP (100 mg BCIP em 2 mL de Dimetilformamida 100 %; armazenar sob 4 °C por até 1 ano) e agitar. A solução BCIP/NBT é estável por 1 h em temperatura ambiente.

Solução High-salt TE

- 10 mM Tris.Cl, pH 8,0
- 0,1 mM EDTA, pH 8,0
- 1 M NaCl

Pode ser guardado a temperatura ambiente por vários anos

Tampão da amostra do SDS-PAGE

- 1,05 mL de água destilada deionizada
- 1,25 mL de 0,5M Tris.Cl, pH 6,8
- 5 mL de glicerol
- 2 mL de SDS 10%
- 0,2 mL de azul de bromofenol 0,5%

Adicionar 50 μ L de β -mercaptoetanol para cada 950 μ L de tampão antes de utilizar. Diluir a amostra neste tampão e aquecer a 95°C por 5 minutos.

Tampão de cobertura, pH 9,6

-Adicionar 1,59 g de Na_2CO_3 e 2,93 de NaHCO_3 e completar o volume para 500 mL com água destilada deionizada. O pH deve ser 9,6 sem ajustes.

Tampão de eluição da proteína

-20 mM NaH_2PO_4

-0,5 M NaCl

-500 mM imidazol

Tampão de lise, pH 7,4

-20 mM NaH_2PO_4

-0,5 M NaCl

-8 M uréia

-20 mM imidazol

-Ajustar o pH para 7,4.

Tampão Dietanolamina

-Adicionar 48,5 mL de Dietanolamina em 400 mL de água destilada deionizada. Ajustar o pH para 9,8 com HCl. Adicionar MgCl_2 para 0,5 mM e ajustar o volume para 500 mL com água destilada deionizada.

Tampão PBST

-Adicionar 0,05% de Tween-20® em PBS 0,1M, pH 7,4.

Tampão TAE (solução estoque 50X, pH~8,5)

-242 g de Tris

-57,1 mL de ácido acético glacial

-37,2 g de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

-Água destilada deionizada para 1L

Tampão TAE (solução 1X)

-40 mM Tris.acetato

-2 mM EDTA

Tampão TBS (Tris-buffered saline)

- 100 mM Tris.Cl, pH 7,5
- 0,9% NaCl (w/v)
- Armazenar sob 4°C por vários meses

Tampão TTBS

- Adicionar 500 µL de Tween-20® em 500 mL de tampão TBS

Tris HCl, 1 M

- 121 g de Tris em 800 mL de água destilada deionizada
- Ajustar para o pH desejado com HCl concentrado e completar o volume para 1L com água destilada deionizada

Tris HCl, pH 6,8, 0,5 M

- 6g de Tris
- 60 mL de água destilada deionizada
- Ajustar o pH para 6,8 com HCl concentrado
- Completar o volume para 100 mL

Tris HCl, pH 8,8, 1,5 M

- 27,23 g de Tris
- 80 mL de água destilada deionizada
- Ajustar o pH para 8.8 com HCl concentrado
- Completar o volume para 150 mL

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside), 20 mg/mL

- Preparar a solução em Dimetilformamida estéril e armazenar em recipiente escuro por vários meses à -20°C

ANEXO D
PREPARAÇÃO DOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA

Formulações dos géis de poliacrilamida utilizados no SDS-PAGE

Formulação do gel concentrador de poliacrilamida 4 % (para 2 mL)

- 1,22 mL de água destilada deionizada
- 0,26 mL de Acrilamida/bisacrilamida 30 %
- 0,5 mL de Tris.Cl, pH 6,8; 0,5 M
- 20 µL de SDS 10 %

Formulação do gel de separação de poliacrilamida 12 % (para 5 mL)

- 1,7 mL de água destilada deionizada
- 2 mL de acrilamida/bisacrilamida 30 %
- 1,25 mL de Tris.Cl, pH 8,8; 1,5 M
- 50 µL de SDS 10%

Imediatamente antes de aplicar o gel, adicionar 20 µL de APS 10% e 4µL de TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl-1,2-diaminoethane, C₆H₁₆N₂). Agitar gentilmente para iniciar a polimerização. Utilizar o tampão de corrida do SDS-PAGE 1X para a corrida do gel.

ANEXO E
REAÇÕES DE PCR, CLONAGEM, DIGESTÃO E PREPARAÇÃO DE CÉLULAS DE
ESCHERICHIA COLI COMPETENTES

Reação de PCR - GoTaq® DNA Polymerase (PROMEGA)

- 10 µL 5X GoTaq® Reaction Buffer
- 1 µL de mistura de dNTPs (10 mM cada dNTP)
- 1 µL de primer senso (1 µM)
- 1 µL de primer antisenso (1 µM)
- 0,2 µL GoTaq® DNA polymerase (5 U/ µL)
- 2 µL de DNA molde
- Água destilada deionizada estéril para 50 µL

Clonagem no vetor pGEM®-T Easy (PROMEGA)

- 5 µL de 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase
- 1 µL pGEM®-T Easy (50 ng)
- 3 µL produto da PCR
- 1 µL T4 DNA Ligase
- Incubar a reação por 1 h a temperatura ambiente

Reação de digestão dos plasmídeos pGEM®-T Easy (PROMEGA) e pQE-30 (QIAGEN)

- 17,2 µL da construção pGEM®-T Easy + BSOLV-CP
- 2 µL tampão React® 2
- 0,2 µL de cada enzima de restrição (total de 0,4 µL)
- Incubar a reação por 2 h a 37 °C

Subclonagem do gene BSOLV-CP em vetor de expressão PQE-30 (QIAGEN)

- 5 µL de 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase
- 1 µL pQE-30 digerido
- 3 µL inserto BSOLV-CP digerido
- 1 µL T4 DNA Ligase
- Incubar a reação por 16 h a 16 °C

Preparação de células competentes de *Escherichia coli*

-Inocular uma única colônia de *E. coli* em 10 mL de meio CG e cultivar por 16 h a 37 °C sob agitação. Inocular 2 mL desta cultura em 100 mL de meio CG em um Erlenmeyer de 1 L. Incubar a 37 °C sob agitação até OD₅₉₀ de 0,375.

-Colocar a cultura em tubo de polipropileno e deixar em banho de gelo por 10 minutos. Centrifugar por 7 minutos a 1600 g a 4 °C. Suspende o precipitado em 10 mL de solução de CaCl₂ gelada. Manter as células suspensas em banho de gelo por 30 minutos e centrifugar a 1100 g a 4 °C. Ressuspender completamente o precipitado em 2 mL de solução de CaCl₂ e alíquotar volumes de 100 µL em tubos de polipropileno. Congelar imediatamente a -70 °C.

ANEXO F
ESQUEMATIZAÇÃO DO RESULTADO DA REAÇÃO SOROLÓGICA DE DOT-BLOT
UTILIZANDO-SE O AS-BSMysV

	A	B	C	D	E	F
BSMysV-Pur1000g e AS-BSMysV bruto	●	●	●	●	●	●
BSMysV-Pur1000g e AS-BSMysV adsorvido em 'Mysore'	●	●	●	○	○	○
BSMysV-Pur1000g e AS-BSMysV adsorvido em <i>Musa sp. sadia</i>	●	●	●	●	●	●
Extrato bruto de 'Mysore' 1:10 e AS-BSMysV bruto	●	○	○	○	○	○
Extrato bruto de 'Mysore' 1:20 e AS-BSMysV bruto	X	X	X	X	X	X
Extrato bruto de 'Terra-anã' 1:10 e AS-BSMysV bruto	○	X	X	X	X	X
Extrato bruto de 'Terra-anã' 1:20 e AS-BSMysV bruto	○	○	X	X	X	X
Extrato bruto de <i>Musa sp. sadia</i> 1:10 e AS-BSMysV bruto	○	○	○	○	○	○
Extrato bruto de <i>Musa sp. sadia</i> 1:20 e AS-BSMysV bruto	○	○	X	X	X	X
Extrato bruto de 'Mysore' 1:10 e AS-BSMysV adsorvido em 'Mysore'	●	●	●	●	●	●
Extrato bruto de 'Mysore' 1:20 e AS-BSMysV adsorvido em 'Mysore'	●	●	●	●	○	○
Extrato bruto de 'Terra-anã' 1:10 e AS-BSMysV adsorvido em 'Mysore'	●	●	○	○	○	○
Extrato bruto de 'Terra-anã' 1:20 e AS-BSMysV adsorvido em 'Mysore'	●	●	○	X	X	X
Extrato bruto de <i>Musa sp. sadia</i> 1:10 e AS-BSMysV adsorvido em 'Mysore'	●	●	○	X	X	X
Extrato bruto de <i>Musa sp. sadia</i> 1:20 e AS-BSMysV adsorvido em 'Mysore'	●	●	○	X	X	X
Extrato bruto de 'Mysore' 1:10 e AS-BSMysV adsorvido em <i>Musa sp. sadia</i>	●	○	○	●	X	X
Extrato bruto de 'Mysore' 1:20 e AS-BSMysV adsorvido em <i>Musa sp. sadia</i>	○	X	X	X	X	X
Extrato bruto de 'Terra-anã' 1:10 e AS-BSMysV adsorvido em <i>Musa sp. sadia</i>	○	○	○	○	○	○
Extrato bruto de 'Terra-anã' 1:20 e AS-BSMysV adsorvido em <i>Musa sp. sadia</i>	○	○	X	X	X	X
Extrato bruto de <i>Musa sp. sadia</i> 1:10 e AS-BSMysV adsorvido em <i>Musa sp. sadia</i>	○	○	○	○	○	X
Extrato bruto de <i>Musa sp. sadia</i> 1:20 e AS-BSMysV adsorvido em <i>Musa sp. sadia</i>	○	○	○	X	X	X

Esquematização do resultado da reação sorológica de Dot-Blot utilizando-se o AS-BSMysV nas concentrações de 1:10 (A), 1:50 (B), 1:100 (C), 1:250 (D), 1:500 (E) e 1:1000 (F). O símbolo ● representa reação positiva intensa; ○ reação positiva pouco intensa; e X reação negativa.



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
TRABALHANDO POR VOCÊ

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](#)