

CONSTRUÇÃO DO VETOR DE TRANSFERÊNCIA PARA O BACULOVÍRUS *Bombyx mori* NPV (pBlueCath)

Andressa Mathias¹; José Luiz Caldas Wolff²

Estudante do Curso de Ciências Biológicas/Modalidade Médica; e-mail: dre_biomed@hotmail.com¹
Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: jwolff2006@yahoo.com.br²

Área do Conhecimento: Biologia Molecular

Palavras-chaves: Baculovírus; *Bombyx mori* Nucleopolihedrovirus; Vetor de Transferência; Catepsina.

INTRODUÇÃO

Os baculovirus (vírus patogênicos a insetos) têm sido amplamente utilizados como sistema de expressão gênica para a produção de proteínas heterólogas a nível comercial. Isto porque permitem o processamento pós-traducional característico de proteínas de células eucarióticas, são de simples manipulação e apresentam a capacidade de acomodar grandes inserções. O *BmNPV* (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus) trata-se de um baculovirus que infecta larvas do bicho-da-seda (*Bombyx mori*). É constituído por 128.413pb e 143 genes (Gomi, S. *et al*, 1999). O *BmNPV* trata-se de uma alternativa econômica para a síntese de biomoléculas de interesse comercial em larga escala, porém tem presente em seu genoma o gene da catepsina. A expressão dessa protease aumenta a degradação de proteínas, principalmente nos estágios mais tardios de infecção. Essa degradação é considerada um grande problema quando se tem por objetivo a produção de proteínas de interesse comercial. Pesquisas recentes realizadas no Japão (SUZUKI *et. al*, 1997) mostram que a construção de um vetor usando o *BmNPV* com inativação do gene da catepsina pode até duplicar a expressão de proteínas exógenas, sendo evitada a degradação de tais produtos mesmo nos estágios mais tardios de infecção ou durante a purificação. Assim, para que o *BmNPV* possa ser utilizado como um sistema de expressão mais eficiente, esse gene deve ser inativado em seu genoma. A primeira etapa para a construção de um baculovírus recombinante é o preparo de um vetor de transferência (pBlueCath). Este vetor trata-se de um plasmídeo que contém o gene Lac-Z (e a região promotora desse gene: Hsp-70) flanqueado por fragmentos de DNA viral clonados a partir do locus do gene da catepsina.

OBJETIVOS

Propõe-se a construção de um vetor de transferência pBlueCath, etapa fundamental para a produção de um *BmNPV* recombinante (com inativação do gene da catepsina) possibilitando assim a produção mais eficiente de proteínas exógenas em larvas de bicho-da-seda.

METODOLOGIA

O DNA viral utilizado - *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (*BmNPV*) -, foi extraído de larvas infectadas a partir de processos já descritos na literatura (O'Reilly *et al.*, 1992). A confirmação de sua origem foi feita a partir de Reação em Cadeia da Polimerase (CHARLIEU, 1994) e reações de sequenciamento (Sanger *et al.*, 1977) com os primers universais para o locus do gene que codifica a poliedrina – uma proteína muito conservada no genoma dos Baculovírus do gênero Nucleopolyhedrovírus. A partir do

genoma viral foram desenhados dois conjuntos de primers para a síntese (por PCR) de dois fragmentos correspondentes ao gene da chitinase e da catépsina (amplicon 5' e amplicon 3', respectivamente). Às seqüências dos primers forward e reverse utilizados para a síntese do amplicon 5' foram adicionados pares de bases equivalentes ao sítio de reconhecimento das endonucleases *Bgl*III e *Bam*HI, respectivamente. Já o par de oligonucleotídeos utilizado para a síntese do amplicon 3' foi desenhado de forma a apresentar o sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *Xba*I. A síntese dos fragmentos selecionados se deu por Reação em Cadeia da Polimerase de acordo com procedimentos padrões (CHARLIEU, 1994). Para isso, foi utilizado como molde o DNA genômico do baculovírus (*Bm*NPV) e os dois conjuntos de primers desenhados. Uma vez sintetizados, os fragmentos foram purificados com o kit Omega (Bio-Tek – E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kit) através do protocolo que acompanha o kit. Para garantir a digestão das extremidades dos fragmentos, os mesmos foram clonados em um plasmídeo comercial (pCR2.1. – Invitrogen) através do protocolo fornecido com o kit de clonagem. Resumidamente, é feita uma reação de ligação com o plasmídeo, o fragmento a ser clonado e a enzima de ligação (T4 ligase) com respectivo tampão. A ligação é então utilizada na transformação bacteriana, na qual o plasmídeo é inserido a bactérias competentes (*E.coli*) através de choque térmico. É feito plaqueamento desse material transformado (em meio sólido com IPTG, X-GAL e Ampicilina). Após encubação são selecionadas colônias bacterianas de coloração branca (as de coloração azul indicam a não inserção do fragmento ao plasmídeo), para inoculação em meio líquido LB (com ampicilina). Após turvação do meio, é feita extração alcalina (fenol/clorofórmio) dos plasmídeos recombinantes. Esses plasmídeos são então utilizados em reações de digestão com as enzimas correspondentes (amplicon 5': *Bam*HI/*Bgl*III; amplicon 3': *Xba*I). Os fragmentos são então purificados em gel de agarose utilizando-se o Kit de purificação de gel GFX (Amersham) a partir de procedimentos descritos no protocolo fornecido juntamente com o kit. O amplicon 3' foi utilizado para a construção do pBlue-Cath-3'. Para tanto, o plasmídeo pBlueLacZ (que contém a região promotora Hsp70 e o gene LacZ flanqueado pelos sítios das enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*I) foi previamente digerido com a endonuclease *Xba*I (Gibco). Foi então tratado com a enzima Ciap (que mantém o plasmídeo na forma linear) e purificado em gel de agarose utilizando-se o Kit de purificação de gel GFX (Amersham). A partir de procedimentos descritos na literatura (SAMBROOK *et al.*, 1989), o amplicon 3' (obtido pela digestão com *Xba*I) foi clonado no plasmídeo pBlueLacZ linearizado. Para tanto, foi feita reação de ligação com o plasmídeo linearizado, o amplicon 3' e a enzima T4 ligase com respectivo tampão. O material foi utilizado na transformação bacteriana e após crescimento, as colônias azuis foram selecionadas para a extração alcalina (fenol/clorofórmio) do plasmídeo recombinante pBlue-Cath-3'. Através de PCR com os primers e mesmas condições utilizados na síntese do amplicon 3', foi confirmada a presença desse fragmento no plasmídeo recombinante. Porém não basta a inserção do amplicon, mas é necessário que esta seja feita na mesma orientação em que o fragmento aparece no genoma viral. Foi feito PCR diagnóstico com o primer T7 (que anela no plasmídeo) e o primer Forward da síntese do amplicon 3'. Essa segunda reação é vista como um indicativo da direção da inserção do fragmento ao plasmídeo. Sendo a confirmação dada através de seqüenciamento, utilizando-se o método de interrupção de cadeia (Sanger *et al.*, 1977), através do kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing (PE Applied Biosystems) de acordo com o protocolo fornecido. Reação realizada com o Primer T7. Após confirmação da inserção e orientação do amplicon 3' ao pBlueLacZ, o pBlue-Cath-3' foi linearizado com a endonuclease *Bam*HI (New England), recebeu tratamento com a enzima Ciap e foi

purificado em gel de agarose utilizando-se o Kit de purificação de gel GFX (Amersham). Este plasmídeo foi então utilizado para a clonagem do amplicon 5', sendo a metodologia semelhante à descrita (SAMBROOK *et al.*, 1989). Primeiramente, foi feita a reação de ligação com a enzima T4 ligase. O material proveniente da ligação foi utilizado na transformação bacteriana. Após o crescimento em placa de meio LB sólido, as colônias azuis foram selecionadas para extração plasmidial (fenol/clorofórmio) e confirmação da presença de ambos os amplicons (por Reação em Cadeia da Polimerase) e orientação do amplicon 5' (por seqüenciamento com o primer T3 ou M13 Reverso).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

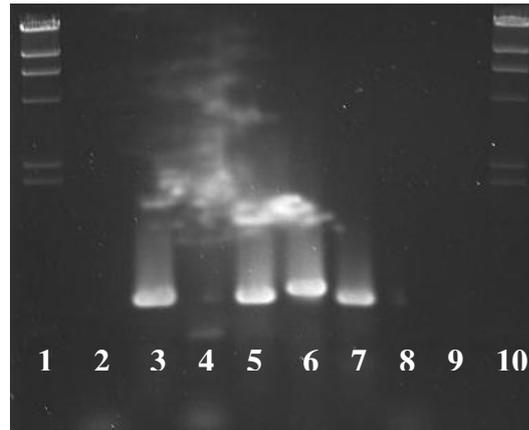


Figura: Reação em Cadeia da Polimerase com o pBlue-Cath como DNA molde das reações feitas em duplicata com os Primers usados na síntese dos amplicon 5' e 3'. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8%. (1;10) Marcador padrão (λ); (2) Não amplificação com os Primers BamHI/BglII para a colônia 1; (3) Amplicon 3' (XbaI) presente na colônia 1; (4) Não amplificação com os Primers BamHI/BglII para a colônia 2; (5) Amplicon 3' (XbaI) presente na colônia 2; (6) Amplicon 5' (BamHI/BglII) presente na colônia 3; (7) Amplicon 3' (XbaI) presente na colônia 3; (8) Não amplificação com os Primers BamHI/BglII para a colônia 4; (9) Não amplificação com os Primers XbaI para a colônia 4.

Os amplicons foram obtidos sem grandes dificuldades após o desenho correto dos primers a partir da análise cuidadosa do genoma do *BmNPV*. Foram estabelecidas as condições adequadas da Reação em Cadeia da Polimerase para a amplificação dos dois fragmentos. Estes, após síntese, tiveram a digestão de suas extremidades garantida devido à clonagem no plasmídeo comercial pCR2.1. Assim foi garantida a possibilidade de ligação dos fragmentos ao plasmídeo previamente digerido com as endonucleases de restrição correspondentes. O pBlue-Cath-3' foi construído e as colônias positivas (por PCR) para o amplicon 3' foram selecionadas para a confirmação da orientação da inserção por seqüenciamento. Após a confirmação, deu-se início à segunda etapa do projeto que consiste na clonagem do amplicon 5' no pBlue-Cath-3' resultando na construção do vetor de transferência para o *BmNPV*, o plasmídeo denominado pBlueCath. Após a transformação bacteriana e o crescimento das colônias na placa contendo meio sólido, foi feita extração alcalina dos plasmídeos. Esse material foi então utilizado como molde da Reação em Cadeia da Polimerase, feita em duplicata para a

confirmação da presença de ambos os fragmentos. Porém, apenas um plasmídeo apresentou resultado positivo para o amplicon 5' e 3' (Figura). Este plasmídeo foi submetido a uma nova PCR (PCR diagnóstico) para uma indicação da orientação da inserção, porém os resultados não foram significativos. Assim, para a confirmação da orientação é necessário que seja feita reação de seqüenciamento com o Primer M13 Rev (-26).

CONCLUSÕES

Por PCR foi possível confirmar que uma das colônias bacterianas obtidas apresenta o plasmídeo com as duas inserções. Apesar disso, a construção de um vetor de transferência não depende apenas da inserção dos fragmentos, mas também de sua correta orientação (assim como é encontrado no DNA viral) para que seja possível a recombinação homóloga que resulte no vírus recombinante. Sendo assim, para a conclusão deste projeto, resta apenas o seqüenciamento do pBlueCath com o primer M13 Rev (-26) para garantir a orientação da inserção do amplicon 5' no plasmídeo. Uma vez construído, este plasmídeo poderá ser co-transfectado em cultura celular adequada para a recombinação homóloga, resultando em um vírus recombinante que poderá ser utilizado na produção mais eficiente de proteínas exógenas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GOMI, S.; MAJIMA, K.; MAEDA, S. **Sequence analysis of the genome of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus**. Journal of General Virology, v. 80, p.1323-1337, 1999.

O'REILLY, D.R.; MILLER, L.K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**. Salt Lake City, UT: W.H. Freeman, 1992. 347p.

SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**. Proc Natl Acad Sci, USA, 1977.

SUZUKI, T.; KANAYA, T.; OKAZAKI, H.; OGAWA, K.; USAMI, A.; WATANABE, H.; OKUDA, K.K.; YAMAKAWA, M.; SATO, H.; MORI, H.; TAKAHASHI, S.; ODA, K. **Efficient protein production using a Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus lacking the cysteine proteinase gene**. Journal of General Virology, v.78, p.3073-3080, 1997.