



TADAITI OZATO JUNIOR

Caracterização Biofísica e Produção de Antissoro
Policlonal contra a Capa Proteica Recombinante
do *Southern bean mosaic virus*.

Tese apresentada para obtenção
do Título de Doutor em
Genética, do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências
Exatas da Universidade Estadual
Paulista – IBILCE/UNESP

Ozato Junior, Tadaiti

Caracterização biofísica e produção de antissoro policlonal contra a capa proteica recombinante *do Southern bean mosaic virus* / Tadaiti Ozato Junior. – São José do Rio Preto; [s.n.], 2011.

81 f. ; 30 cm.

Orientador: José Osmar Gaspar

Tese (doutorado) – Universidade estadual paulista, Instituto de Biociências, Letra e Ciências Exatas

1. Fitopatologia. 2. Vírus de plantas. 3. Sorologia. 4. Espectroscopia de infravermelho. 5. Vírus do mosaico do feijão. I. Gaspar, José Osmar. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 581.2

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fitovirologia, departamento de Zoologia-Botânica do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE), Universidade Estadual Paulista (UNESP), com auxílio-bolsa CAPES.

Tadaiti Ozato Junior

Caracterização Biofísica e Produção de Antissoro Policlonal contra Capa Proteica Recombinante do *Southern bean mosaic virus*.

Tese apresentanda para obtenção do título de Doutor em genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Osmar Gaspar
Professor Adjunto Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Júlio César Borges
Professor Assistente Doutor
USP – São Carlos

Prof. Dr. Jorge Alberto Marques Rezende
Professor Titular
USP – Piracicaba

Prof. Dr. Marinônio Lopez Cornelio
Professor Adjunto Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Roberto da Silva
Professor Adjunto Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 24 de fevereiro de 2011.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial ao meu orientador Prof. Dr. José Osmar Gaspar pela oportunidade, orientação, imensa paciência e exemplo de profissionalismo.

Aos membros participantes da banca examinadora: Prof. Dr. José Osmar Gaspar, Prof. Dr. Prof. Dr. Júlio César Borges, Prof. Dr. Marinônio Lopez Cornelio, Prof. Dr. Jorge Alberto Marques Rezende e ao Prof. Dr. Dr. Roberto da Silva

Aos professores da pós-graduação em Genética que me ajudaram muito e colaboraram para o meu crescimento acadêmico.

À coordenadora da pós em genética Profa. Dra. Lilian Madi Ravazzi e à vice-coordenadora Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos.

À direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto pelo fornecimento de recursos materiais.

Aos funcionários do IBILCE que de forma direta ou indireta me ajudaram na realização deste trabalho.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Lívia José Regatieri, Ricardo Barros Mariutti, Luana Gonçalves Garcia e Vinicius dos Santos Santana que me ajudaram nos afazeres do laboratório e me aguentaram nas horas mais difíceis da minha pesquisa.

À Priscila Belintani que por meio dela pude conhecer muitas dessas pessoas e que me deu a oportunidade de iniciar nessa pesquisa. Minha eterna orientadora.

Aos meus amigos sempre fiéis que sempre estiveram ao meu lado durante todo esse tempo e me auxiliaram nas horas mais difíceis com a amizade e opiniões.

À CAPES pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento deste trabalho.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Tadaiti Ozato e Sonia Regina Ozato, a minha irmã Thamy Ozato que são as pessoas mais importantes da minha vida e que são o motivo de eu estar aqui, pois sem vocês nada disso seria possível.

A minha segunda família: Os Nagoshi, em especial ao meu tio Nagoshi e a minha tia Iraci que também sempre acreditaram em mim e me deram apoio nessa caminhada.

Aos meus amigos quase irmãos,

Newton Kenji Nagoshi, Daniel Kiyoshi Nagoshi, Pedro Paulo de Campos Leme, Mauricio Antônio Pereira, Luis Fernando Estuqui, Lisandra Marques Gava, Julio César Borges e a Livia José Regatieri por me apoiarem com suas amizades preciosas, pois sempre que precisei vocês estavam ao meu lado para me apoiar.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Osmar Gaspar,

Que me deu a oportunidade de pesquisar, me mostrando novos rumos e possibilidades. Obrigado professor por me deixar livre para fazer as minhas opções. O senhor representa o que é ser Orientador!

Obrigado a todos!

Vocês são muito especiais e valiosos na minha vida.

Vencemos juntos mais essa etapa!

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
INTRODUÇÃO.....	10
OBJETIVOS.....	30
ARTIGOS	30
ARTIGO - 1.....	30
ARTIGO - 2.....	50
CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

Resumo

A expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli* produz proteínas que se acumulam como agregados insolúveis conhecidos como corpos de inclusão (CI). As proteínas na forma de CI são biologicamente ativas e com estrutura semelhante à proteína nativa quando a expressão é induzida a baixa temperatura. Estas características e a facilidade em purificar os CIs podem representar uma possibilidade de utilização dos CIs como antígenos para a produção de anticorpos policlonais. O gene da proteína capsidial (CP) do *Southern bean mosaic virus* (SBMV), um Sobemovirus, foi clonado no vetor pET 28a e a proteína expressa em *E. coli* a 25 ° C. Uma análise comparativa entre a CP recombinante presente na forma de corpos de inclusão e a proteína nativa presente nas partículas virais purificadas foi realizada utilizando a técnica de espectroscopia de infravermelho (FT-IR). Os conteúdos de estruturas secundárias identificados diferiram nos percentuais de folha- β enquanto os percentuais hélices- α foram preservados. Uma estrutura tridimensional foi gerada por modelagem molecular por homologia e comparada com os dados obtidos nas análises de FT-IR. Os percentuais obtidos por FT-IR da CP nativa foram condizentes com os dados gerados por modelagem molecular por homologia. Mesmo com algumas diferenças nos conteúdos de folha- β da CP recombinante foi possível verificar um estado conformacional semelhante à proteína nativa. Os corpos de inclusão contendo a proteína recombinante expressa foram utilizados como antígenos para a imunização de coelhos. O antissoro obtido mostrou ser específico e compatível a um antissoro previamente preparado com partículas virais purificadas do SBMV na detecção do vírus em extratos de feijoeiros infectados utilizando imunoensaios por Western blot, PTA-ELISA, Dot Blot e Tissue Printing.

Dessa forma, o uso dos CIs contendo proteínas virais recombinantes para a imunização em coelhos é uma abordagem nova, fácil e muito promissora na produção de antissoro policlonal para diagnósticos virais.

Abstract

The production of recombinant proteins in *Escherichia coli* yields proteins that accumulate as insoluble aggregates known as inclusion bodies (IBs). Biologically active with native-like structure is trapped inside IBs when the expression is induced at low temperature. These features, and the facility to purify the IBs, can represent a possibility to use the IBs as an antigen for the production of polyclonal antibodies. The coat protein gene of *Southern bean mosaic virus*, a *Sobemovirus*, was cloned in the vector pET 28a and expressed in *Escherichia coli* at 25 °C. The inclusion bodies containing the recombinant protein were isolated and purified. A comparative analysis between recombinant protein present in the form of inclusion bodies and native coat protein present in the purified virus particles was performed using Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The secondary structure contents identified differences in the percentage of β -sheets while α -helices content was much preserved. The three-dimensional structure was generated using molecular modeling and was compared to the data obtained from FT-IR analysis. The percentages obtained from FT-IR analyses of the native CP were consistent with the structure generated through homology molecular modeling. Nevertheless, some differences were present on the content of β -sheets structure of the recombinant CP indicating that the protein conformational state is found in a native like condition. The IBs containing the expressed protein were used as an antigen to immunize rabbits. The antiserum obtained showed to be specific and comparable to one previously prepared with purified SBMV particles, in the virus detection in leaf extracts of infected bean plants using Western blot, PTA-ELISA, Dot Blot and Tissue Printing assays. So, the use of IBs containing recombinant viral proteins to immunize rabbits is a new, easy and very promising approach in the production of polyclonal antibodies for virus diagnosis.

1. Introdução

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), leguminosa comum da família das fabáceas (Leguminosae) (Cronquist, 1981), constitui uma das culturas mais importantes existentes, sendo consumida por todo o mundo, devido principalmente ao seu valor nutritivo. A cultura do feijão no Brasil assume um grande valor social, pois constitui a base da alimentação da população, sendo fonte de proteína vegetal de baixo custo. Dados da última safra (2009/2010) mostram que o Brasil produziu cerca de 3,32 milhões de toneladas de feijão com a estimativa de 3,46 milhões de toneladas para esse ano, sendo a região norte/nordeste a maior produtora (CONAB, 2011).

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

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

Geminiviridae), levando à possibilidade de possíveis problemas futuros para a cultura do feijoeiro (Bianchini, A. Comunicação pessoal).

1.1. Gênero *Sobemovirus*

A. Propriedades Biológicas

O nome *Sobemovirus* é originado das iniciais da espécie tipo do gênero ***Southern bean mosaic virus*** e o gênero compreende 13 espécies definitivas, sendo elas: *Blueberry shoestring virus* (BSSV), *Cocksfoot mottle virus* (CoMV), *Lucerne transient streak virus* (LTSV), *Rice yellow mottle virus* (RYMV), *Ryegrass mottle virus* (RGMoV), *Sesbania mosaic virus* (SeMV), *Solanum nodiflorum mottle virus* (SNMoV), *Southern bean mosaic virus* (SBMV), *Southern cowpea mosaic virus* (SCPMV), *Sowbane mosaic virus* (SoMV), *Subterranean clover mottle virus* (SCMoV), *Turnip rosette virus* (TRoV) e *Velvet tobacco mottle virus* (VTMoV) (Hull & Fargette, 2005). As espécies SBMV e SCPMV eram a princípio consideradas como isolados do SBMV (respectivamente isolados feijão e caupí) (Fauquet & Mayo, 1999). Há ainda quatro possíveis espécies no gênero, cujas características são similares aos sobemovírus, mas que necessitam de informações adicionais para serem incluídas. São elas: *Cocksfoot mild mosaic virus* (CMMV), *Cynosurus mottle virus* (CnMoV), *Ginger chlorotic fleck virus* (GCFV) e *Rottboellia mottle virus* (RoMoV) (Hull & Fargette, 2005).

A maioria das espécies dos sobemovirus apresentam distribuição geográfica limitada, mas algumas espécies são encontradas em várias partes do mundo (Hull, 1988). Os sobemovírus infectam plantas tanto mono quanto dicotiledôneas, mas a gama de hospedeiras de cada espécie é relativamente restrita. Os sintomas induzidos são principalmente mosaico e mosqueado e, em geral, causam infecção sistêmica invadindo quase que todos os diferentes tipos de tecidos das plantas hospedeiras (Hull, 1988). São transmitidos mecanicamente, por vetores e por sementes. Para a maioria das espécies

(CoMV, RYMV, SNMoV, SBMV, SCPMV, TRoV) a transmissão é feita por coleópteros enquanto o BSSV é transmitido por afídeos, o VTMoV por mirídios e o SoMV por dípteros, homópteros e hemípteros (Hull, 1988; Tamm & Truve, 2000).

B. Organização do Genoma

Os *Sobemovirus* possuem partículas isométricas (28-30nm) contendo RNA genômico de 4-4,5kb com polaridade positiva e proteína capsidial com massa molecular de 29-30 kDa (Shepherd, 1971; Sehgal, 1981). Uma pequena proteína denominada de proteína ligada ao genoma viral (“viral genome linked-protein”, VPg) é covalentemente ligada à extremidade 5' do RNA enquanto a extremidade 3' é destituída de cauda poliadenilada (Ghosh et al., 1979). Existe também, um RNA subgenômico de aproximadamente 1,0 Kb responsável pela tradução da proteína capsidial (Rutgers et al., 1980; Ghosh et al., 1981).

O genoma dos *Sobemovirus* possui quatro cadeias abertas de leitura (“Open reading frame”, ORF) (Figura 1). Todos os sobemovirus seqüenciados contêm uma pequena ORF1 na extremidade 5'-terminal do genoma, que codifica a possível proteína do movimento célula-a-célula, e uma ORF4 na extremidade 3'-terminal que codifica a proteína capsidial. Com base nas diferenças de organização na parte central do genoma (que codifica uma poliproteína), os *Sobemovirus* podem ser divididos em dois grupos: aqueles semelhantes ao SCPMV e aqueles semelhantes ao CoMV. A poliproteína do SCPMV é codificada por uma longa e contínua ORF2, contendo também uma região codificadora interna, ORF3. Organização semelhante do genoma já foi descrita para o isolado Arkansas do SBMV (SBMV-Ark) (Lee & Anderson, 1998), isolado “Ivory Coast” do RYMV (RYMV-CI) (Yassi et al., 1994) e LTSV (Feffries et al., GenBank U31286).

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

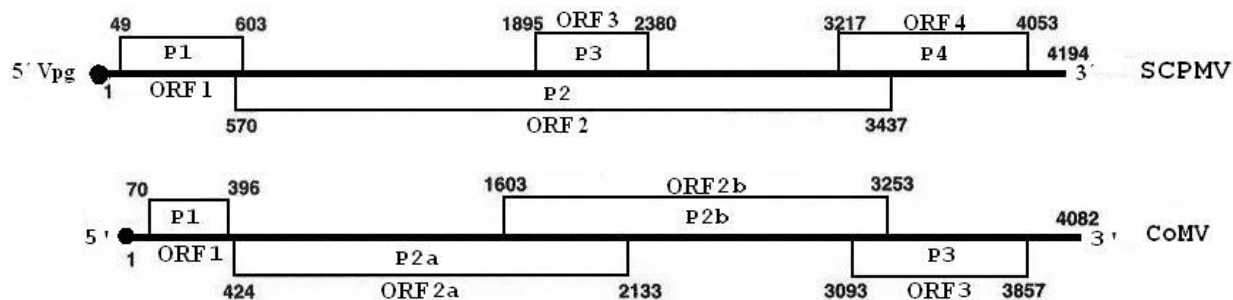


Figura 1: Organização genômica do *Southern caupi mosaic virus* (SCPMV) e *Cocksfoot mottle vírus* (CoMV); (●): VPg, proteína covalentemente ligada à extremidade 5'-terminal (Tamm & Truve, 2000).

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

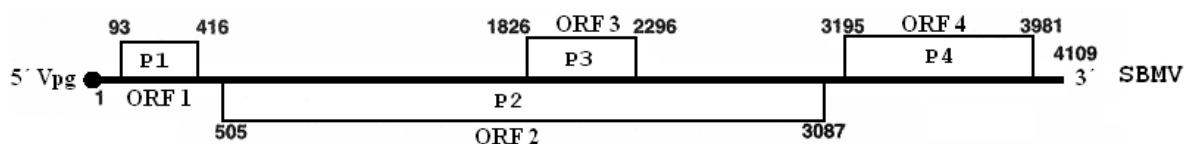


Figura 2: Organização do genômica do *Southern bean mosaic virus* descrito por Hull & Fargette (2005), (●): VPg, proteína covalentemente ligada à extremidade 5'-terminal Othman & Hull (1995).

Diferentemente do SBMV, o isolado SBMV-Ark contém quatro ORFs que se sobrepõem, tornando-o mais similar em organização genômica (mas não em seqüência de aminoácidos de suas proteínas) ao SCPMV (Lee & Anderson, 1998). Foi proposto

que essa diferença na organização genômica entre o SBMV e SMBV-Ark resulta ou de mutações ou de erro no seqüenciamento do SBMV.

Meier & Truve em 2007 ressequenciaram a parte central dos genomas do SBMV (isolado Colombiano), SCPMV (isolado Wisconsin), LTSV (Isolado Canadense) e RGMoV (isolado Japonês) encontrando pequenas alterações no seqüenciamento em relação àqueles já publicados para esses vírus. Em todos os casos, revisão das seqüências genômicas revelou a presença de um códon de terminação na ORF2, logo após o sinal de mudança de fase (“frameshift”) ribossomal -1 formando a ORF2a. Por outro lado, a junção da ORF3 com a porção C-terminal da ORF2 (prévia polimerase) forma a ORF2b. Por este estudo, todos os sobemovírus teriam então uma estrutura genômica similar ao CoMV (Figura 3), produzindo a proteína P1-movimento célula-a-célula (ORF1), a protease-VPg (ORF2a), a polimerase (ORF2b) e a proteína capsidial (ORF4).

No Brasil, o SBMV foi detectado pela primeira vez no Distrito Federal (SBMV-DF) (Cupertino et al., 1982) e, posteriormente, mas ainda nos anos 80, foi também encontrado no Estado de São Paulo (SBMV-SP) (A.S. Costa. Dados não publicados). Mais recentemente, um isolado do SBMV foi encontrado no Estado do Paraná (Gasparin et al., 2005). No entanto, devido à facilidade de transmissão do SBMV (Seghal, 1981; Hull, 1988), pode-se aventar que a distribuição geográfica do vírus pelo Brasil seja mais ampla. Algumas propriedades moleculares foram determinadas para o isolado SBMV-SP: (a) as partículas virais apresentam diâmetro de 28-30 nm e a proteína capsidial possui massa molecular de 30 kDa; (b) das partículas virais foram extraídos RNAs de vários tamanhos, sendo o de 4,2 Kb o RNA genômico e o de 1,0 Kb supostamente um RNA subgenômico que codifica a proteína capsidial (Moreira & Gaspar, 2002).

A região 5'-terminal do SBMV-SP foi caracterizada (Espinha et al., 2004) evidenciando uma região não codificadora, com 92 nucleotídeos (nt), precedendo o códon de iniciação da ORF1. Na região não codificadora foi detectado um segmento parcialmente complementar ao RNA ribossomal 18S. A ORF1 codifica uma proteína de 147 aminoácidos com massa molecular estimada de 17080 Da. A extremidade 3'-terminal da ORF1 do SBMV-SP sobrepõe a extremidade 5'-terminal da ORF2 em 34 nucleotídeos. A região 3'-terminal foi também caracterizada (Espinha et al., 2005) mostrando a ORF4 (proteína capsidial) contendo 801 nt (incluindo o códon de terminação UGA) com sequência deduzida de 266 aminoácidos e massa molecular estimada de 28.800 Da. Sessenta e um aminoácidos terminais da ORF2 estão sobrepostos na ORF4. A sequência da ORF4 do SBMV-SP apresentou identidade de nucleotídeos e aminoácidos de, respectivamente, 91% e 93% com o isolado Arkansas (SBMV-Ark) descrito nos EUA, indicando serem isolados muito proximamente relacionados. Mais recentemente, o genoma completo do SBMV-SP foi determinado através do seqüenciamento da ORF2 e os domínios para serino protease, VPg e polimerase (poliproteína) foram identificados (Ozato Jr. et al., 2009). Concluiu-se que a organização genômica do SBMV-SP (Figura 4) é semelhante àquela do CoMV, corroborando a proposta de Meier & Truve (2007) de que todos os sobemovírus apresentam o mesmo padrão de organização genômica.

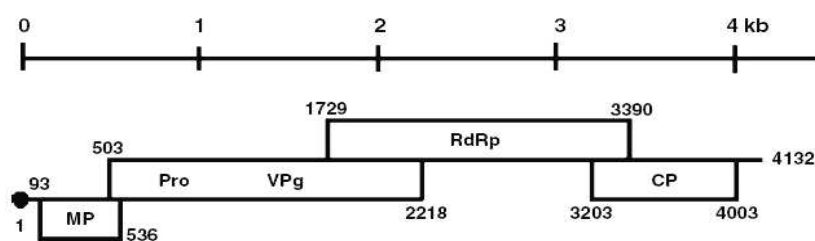


Figura 4. Organização genômica do SBMV-SP. MP, proteína do movimento; Pro, protease; VPg, proteína ligada ao genoma; RdRp, polimerase; CP, capa proteica (Ozato Jr. et al., 2009).

C. Produtos Gênicos e suas Possíveis Funções

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

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

C.1. Proteína P1.

Todos os *Sobemovirus* caracterizados codificam uma pequena proteína a partir da ORF1, mas estas apresentam seqüências e massas moleculares diferentes (11,7 a 24,3 kDa) e não são relacionadas com qualquer outra proteína conhecida. Análises de mutantes incapazes de produzir P1 ou mutantes produtores de proteínas truncadas indicaram que a P1 do RYMV ou SCPMV não é necessária para a replicação viral, porém é necessária para o movimento célula-a-célula e movimento sistêmico (Bonneau et al., 1998; Sivakumaran et al., 1998). Proteína P1 recombinante do CoMV foi capaz de interagir com RNA de fita única (ssRNA) numa maneira independente da seqüência (Tamm & Truve, 2000). Assim, levando-se em conta que nenhum outro produto gênico dos sobemovírus estaria relacionado com o movimento célula-para-célula ou movimento sistêmico do vírus, é proposto que a proteína P1 representa a proteína do movimento dos *Sobemovirus*. Foi também descrito que a proteína P1 do RYMV funciona como supressora do mecanismo de silenciamento gênico (“post transcriptional gene silencing”, PTGS) (Voinnet et al., 1999).

C.2. Poliproteína

Os *Sobemovirus* caracterizados codificam uma proteína com massa molecular de cerca de 100 kDa. As estruturas genômicas do SBMV, SBMV-Ark, SCPMV, RYMV e LTSV permitem a síntese desta proteína a partir de uma única ORF contínua. Por outro lado, a metade C-terminal da poliproteína do CoMV e RYMV é codificada por uma ORF2b separada e é traduzida como parte da poliproteína pelo mecanismo de mudança de fase (“frameshift”) ribossomal -1 (Mäkinen et al., 1995). A tradução da poliproteína dos *Sobemovirus* não é iniciada a partir de RNA subgenômico (nunca detectado em tecidos infectados), mas sim a partir do próprio RNA genômico. Assim, as ORFs 1 e 2 são traduzidas a partir de seus respectivos códons de iniciação AUG. Produtos de

tamanho esperado de ambas as ORFs foram observados após tradução dos RNAs genômicos do SCPMV (Sivakumaran & Hacker, 1998) e do CoMV (Tamm et al., 1999). Na poliproteína dos sobemovírus, pelo menos três domínios funcionais podem ser encontrados: um para serino protease, um para VPg e um para RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (Gorbalenya et al., 1988; Lee & Anderson, 1998; Mäkinen et al., 1995; Othman & Hull, 1995; Ryabov et al., 1996; Wu et al., 1987; Yassi et al., 1994). Não é ainda conhecido se estas são as únicas funções da poliproteína.

C.2.A. Serino Protease

A possível protease é similar às cisteína proteases encontradas nos picornavírus (Família *Picornaviridae*) e é característica de todos os *Sobemovirus*, polerovírus (Família *Luteoviridae*), *Pea enation mosaic virus* (PEMV, Gênero *Enamovirus*) e *Mushroom bacilliform virus* (MBV, Gênero *Barnavirus*). O motivo serino protease está localizado no terço N-terminal da poliproteína codificada pela ORF2 do SBMV, SBMV-Ark, SCPMV, RYMV e LTSV e é codificada pela ORF2a no caso do CoMV (Gorbalenya et al., 1988). O possível sítio catalítico H-D-S (Histidina, posição 181-Ácido Aspártico, posição 216-Serina, posição 284) encontrado no SCPMV é também conservado no SeMV e outros *Sobemovirus* (Lokesh et al., 2001). Mais recentemente, foi demonstrado que a serino protease do SeMV possui atividade proteolítica atuando em *cis* e *trans*, além de possuir possíveis hélices que estariam associadas à ligação com membranas (Satheshkumar et al., 2004). Com exceção do LTSV, todos os produtos da ORF2 dos *Sobemovirus* mostraram a presença de tais hélices sugerindo que elas podem ter função de ligação às membranas. Em muitos vírus de RNA de polaridade positiva, foi observado que a replicação e montagem das partículas virais ocorrem em associação com membranas (Carette et al., 2002; den Boon et al., 2001).

C.2.B. Proteína ligada ao genoma (“viral genome-linked protein”, VPg)

Uma proteína de 12 kDa foi descrita como covalentemente ligada à região 5'-terminal do genoma do SBMV (Ghosh et al., 1981) e uma de 10 kDa ligada ao genoma do SCPMV (Mang et al., 1982). A posição da região codificadora da VPg no genoma dos sobemovírus difere daquela que é característica de muitas famílias de vírus de RNA, incluindo-se *Picornaviridae* e *Comoviridae*, isto é, VPg-Protease-RdRp (Koonin & Dolja, 1991). No caso dos sobemovírus a sequência dentro da poliproteína é Protease-VPg-RdRp, similar ao também encontrado no *Potato leaf-roll virus* (Gênero *Potavirus*), PEMV e MBV (Revill et al., 1999; van der Wilk et al., 1989; Wobus et al., 1998).

Em todas as espécies de vírus desse gênero, as proteínas VPg possuem uma sequência conservada de aminoácidos (WAD ou WGD; W: Triptofano, A: Alanina, D, Ácido aspártico; G: Glicina) seguida de uma região rica em D ou E (E: Ácido glutâmico) (Mäkinen et al., 1995), sendo que este motivo é a única sequência conservada entre as proteínas VPg dos *Sobemovirus* (van der Wilk et al., 1997; 1998).

C.2.C. RNA polimerase dependente de RNA (RpRd)

A região C-terminal da poliproteína dos espécies virais desse gênero codifica uma possível RdRp com base na presença do motivo GDD e de motivos conservados que a este circundam e que são característicos das RNA polimerases dependentes de RNA (Koonin, 1991; Koonin & Dolja, 1993). As possíveis RdRp dos *Sobemovirus* mostram extensivas similaridades com RdRp de vários outros vírus de RNA de polaridade positiva, tais como polerovírus, enamovírus e barnavírus (Tamm & Tuve, 2000).

Relativamente pouco é conhecido sobre os sinais de replicação necessários para o início da síntese das fitas de polaridade positiva e negativa dos sobemovírus.

Seqüências similares foram encontradas na porção inicial da região 5'-terminal de vários *Sobemovirus*, variando de ACAAAA, ACAAA e CACAAAA (Hacker & Sivakumaran, 1997; Lee & Anderson, 1998; Yassi et al., 1994). Estes resultados indicam que RNA genômicos e subgenômicos dos sobemovírus iniciam com seqüências muito similares e que provavelmente são importantes para a replicação viral. Seqüências similares foram também encontradas na região 5'-terminal do RNA genômico e subgenômico do *Red clover necrotic mosaic virus* (Gênero *Dianthovírus*, Família *Tombusviridae*) (Xiong & Lonmel, 1989; Zavriev et al., 1996) e MBV (Revil et al., 1994). A conservação desta seqüência na porção inicial da região 5'-terminal dos RNA genômicos e subgenômicos de diversos vírus pertencentes a diferentes gêneros e famílias sugerem que ela (ou sua seqüência complementar na fita de polaridade negativa) pode ter importante função na síntese do RNA viral. Entretanto, o papel dessas seqüências ainda não foi testado em laboratório.

C.3. Proteína P3

Os genomas do SCPMV, SBMV-Ark, RYMV e LTSV possuem uma pequena ORF3 incluída dentro da ORF2 numa cadeia aberta de leitura -1. É possível que a ORF3 seja traduzida por um mecanismo de mudança de fase ("frameshift") ribossomal -1 similar àquele proposto para a ORF2b do CoMV, mas isso ainda não foi testado experimentalmente (Mäkinen et al, 1995; Tamm et al., 1999). Se verdadeiro, o produto de tradução *in vitro* de 70 kDa do SCPMV poderia representar uma proteína de fusão entre a ORF2 e a ORF3, uma vez que a massa molecular calculada para a proteína de fusão da ORF2-ORF3 do SCPMV seria 65,8 kDa (Tamm et al., 1999). Assim, o mecanismo de tradução, bem como a função ou funções desta ORF são, até o presente, desconhecidas.

C.4. Proteína Capsidial

As proteínas da capa dos *Sobemovirus* são codificadas pelas ORFs localizadas nas ORFs 3'-terminais, seja a ORF4 no caso dos genomas do tipo SCPMV ou ORF3 para o tipo CoMV (Hull & Fargette, 2005). No genoma do SCPMV o sítio de ligação da proteína capsidial é localizado na região codificadora da protease na ORF2 (Wu et al., 1987). Nos *Sobemovirus*, esta é a região mais conservada dentro da ORF2. Entretanto, estes dados não demonstram diretamente que a ligação da proteína capsidial nesta região serve para a montagem das partículas do SCPMV (Hacker, 1995).

Estudos com diversos *Sobemovirus* têm indicado que a proteína capsidial é essencial tanto para o movimento célula-a-célula como para o movimento sistêmico do vírus (Brugidou et al., 1995; Sivakumaran et al., 1998). Além disso, evidência direta que a proteína capsidial determina a gama de hospedeiras sistêmicas dos *Sobemovirus* foi obtida pela caracterização de um mutante de quebra de resistência do SBMV-Ark, o SBMV-S (Lee & Anderson, 1998). O SBMV-S é capaz de infectar sistemicamente cultivares de feijão onde o tipo selvagem SBMV-Ark infecta apenas localmente. Análises do genoma indicaram 7 diferenças nas seqüências dos genomas mas apenas 4 mudanças na seqüência de aminoácidos deduzidos. Três dessas mudanças foram identificadas na proteína capsidial podendo ter um efeito na interação RNA-proteína capsidial, necessária para a correta montagem e desmontagem das partículas e, desse modo, determinar o movimento a longa distância do vírus na planta hospedeira.

1.2. Identificação da infecção viral na Planta

A identificação precisa do agente causal de uma doença é requisito importante para a recomendação de medidas de controle. A identificação das viroses vegetais, os sinais do patógeno não podem ser observados sem o auxílio de um microscópio eletrônico (exceto no caso de inclusões citoplasmáticas). Assim, diversas técnicas

indiretas foram desenvolvidas para a identificação dos vírus de plantas. (Gary et al., 1998)

Um teste diagnóstico ideal proporciona resultados rápidos e precisos, a um custo reduzido, entretanto a rapidez e precisão do testes geralmente são inversamente ao seu custo. Testes biológicos são geralmente precisos e de custo reduzido, porém levam um grande intervalo de tempo para a diagnose (2 a 3 semanas). Os testes sorológicos e moleculares, diferentemente proporcionam respostas rápidas (4 a 24 horas) e muito precisas, porém o custo é bem mais elevado do que os métodos biológicos. (Edwardson et al., 1988)

Os testes mais amplamente utilizados para a diagnósticos das viroses vegetais podem ser divididos em 3 grupos:

1.2.a. Biológicos: são testes que são baseados nas propriedades biológicas dos fitovírus, tais como a morfologia e gama de hospedeiras.

1.2.b. Sorológicos: constituem a ferramenta mais comumente utilizada para a identificação rápida, simples e precisa da grande maioria dos vírus de planta, em que utilizam-se da interação entre anticorpo e antígeno viral, podendo este ser a proteína capsidial do vírus ou qualquer outra proteína viral não estrutural.

1.2.c. Moleculares: baseiam-se na detecção do ácido nucleico viral por diversas técnicas, entre as mais empregadas na detecção de viroses vegetais são a reação em cadeia da polimerase (PCR) e hibridização de ácidos nucleicos entre outras. (Zerbini et al., 2006)

Além da detecção e diagnose dos fitovírus, é de grande importância o conhecimento sobre a replicação dos vírus de plantas. Tem aumentado sobremaneira nos últimos anos, notadamente com o auxílio das novas técnicas da biologia molecular, propiciando um grande avanço na compreensão da estrutura do genoma viral e de sua

replicação. Obviamente, entretanto, muito mais conhecimento há que ser obtido para que se possam entender os efeitos da infecção viral sobre a planta hospedeira. Aspectos importantes como, por exemplo, onde ocorrem, nas células e tecidos, as interações vírus/planta, sobre a função das inclusões induzidas por vírus, sobre o papel da associação entre certos vírus com organelas citoplasmáticas.

Uma estratégia importante nesses estudos é a obtenção de antissoros específicos para as proteínas estruturais e não estruturais que permitiriam sua utilização, por exemplo, na imunolocalização dessas proteínas em células e tecidos. Além do que os anticorpos produzidos se de boa qualidade podem ser utilizados para métodos diagnósticos e caracterização em plantas infectadas (Matthews, 1991).

Os métodos sorológicos constituem a ferramenta mais comunmente utilizada para a identificação rápida, simples e precisa da grande maioria dos vírus de plantas. A maior limitação para o uso da sorologia é a disponibilidade de antissoros de boa qualidade. A obtenção desses antissoros depende da purificação das partículas virais, um processo longo e trabalhoso, que pode levar a resultados insatisfatórios caso componentes da planta não sejam totalmente eliminados (Zerbini et al., 2006). Devido a esses possíveis problemas. Uma estratégia alternativa que vem sendo utilizada ultimamente é a expressão de tais proteínas, sejam estruturais ou não, em *Escherichia coli* e que, após purificação, são utilizadas na imunização de coelhos para obtenção de antissoros específicos. Nos últimos anos esses reagentes alternativos para patógenos foram produzidos por clonagem do fragmento de genes específicos, como a capa protéica viral ou outros genes (Mutasa-Gottgens et al., 2000). O potencial de aplicação destes reagentes em fitopatologia está sendo agora melhor explorado. A expressão das proteínas capsidiais virais (CPs) expressas em *E. coli*, seguida de purificação e produção de antissoro policlonal foi relatada em um número de vírus de plantas diferentes.

1.3. Expressão de Proteínas Heterólogas em Bactérias

Nas últimas duas décadas sistemas de expressão de proteínas em procariotos, particularmente em *Escherichia coli*, têm sido explorada para a produção, em escala industrial, de uma variedade de proteínas com propriedades terapêuticas (Panda, 2003). As células procarióticas (*E. coli*) são normalmente preferidas para a expressão de proteínas heterólogas pelo fato de oferecerem algumas vantagens como (1) fonte de carbono de baixo custo para o crescimento, (2) rápido acúmulo de biomassa, (3) possibilidade de uso em processo de fermentação com alta densidade de células, (4) possibilidade de produção de proteínas em larga escala. Entretanto, a falta de componentes para modificações pós-tradução e a produção de proteínas inativas devido à formação de corpos de inclusão, oferecem um significativo desafio no uso destes sistemas de expressão.

Um variável número de protocolos está à disposição, os quais descrevem várias estratégias para a conversão de proteínas inativas, expressadas como corpos de inclusão insolúveis, em frações solúveis e biologicamente ativas (Sahdev et al., 2008). De modo geral, estas estratégias podem ser subdivididas em três grupos: (1) aquelas em que os fatores que influenciam a formação da fração insolúvel são modificados, (2) aquelas onde as proteínas expressas são renaturadas a partir dos corpos de inclusão e (3) aquelas em que a proteína de interesse é expressa na forma solúvel através da produção de proteínas fusionadas. Todas estas estratégias apresentam vantagens e desvantagens, porém aqui nesse trabalho será dado maior destaque àquela onde as proteínas expressas estão em corpos de inclusão.

Altos níveis de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* em geral resultam no acúmulo dessas proteínas *in vivo* como agregados insolúveis (Kane & Hartley, 1988; Fahnert et al., 2004). Tais proteínas em corpos de inclusão são

destituídas de atividade biológica e necessitam de elaborados protocolos para solubilização, renaturação e purificação no sentido de recuperar produtos funcionalmente ativos (Rudolph & Lilie, 1996; Vallejo & Rinas, 2004). Em geral, os corpos de inclusão são solubilizados pelo uso de altas concentrações de agentes desnaturantes tais como uréia e cloridrato de guanidina, juntos com um agente redutor como β -mercaptoetanol (Clarck, 1998; Lilie et al., 1998). As proteínas solubilizadas dessa forma são então renaturadas pela lenta remoção do agente desnaturante na presença de agentes oxidantes (Fischer et al., 1993). A solubilização das proteínas dos corpos de inclusão por agentes desnaturantes resulta na perda da estrutura secundária levando à exposição da superfície hidrofóbica (Dill & Shortle, 1991). Tal perda da estrutura secundária durante a solubilização e a interação entre as moléculas proteicas desnaturadas durante a renaturação, resultam na agregação dessas moléculas e são consideradas como a principal razão para a pobre recuperação de proteínas biologicamente ativas a partir dos corpos de inclusão, muitas vezes atingindo apenas 15-25% da produção total de proteínas (Datar et al., 1993). Assim sendo, o maior desafio nesta área tem sido converter eficientemente estas proteínas insolúveis e inativas em produtos solúveis e corretamente renaturados (Clarck, 2001; Panda, 2003).

Embora a expressão de proteínas na forma de corpos de inclusão seja às vezes considerada indesejável, sua formação pode ser vantajosa, uma vez que seu isolamento a partir do homogeneizado celular é uma conveniente e efetiva maneira de purificar uma proteína de interesse. As maiores vantagens associadas com a formação dos corpos de inclusão são (1) a expressão de altos níveis de proteína, cerca de 30% das proteínas totais da célula, (2) a fácil purificação devido ao tamanho e densidade quando comparados com os componentes celulares, (3) menor degradação da proteína expressada, (4) resistência ao ataque proteolítico por proteases celulares e (5)

homogeneidade da proteína de interesse. Por essas razões, as proteínas recombinantes expressadas em corpos de inclusão em *E. coli* têm sido as mais largamente utilizadas na produção comercial de proteínas (Walsh, 2003).

Há dois importantes aspectos a serem considerados na recuperação de proteínas biologicamente ativas a partir dos corpos de inclusão: a solubilização dos agregados proteicos e a renaturação da proteína solubilizada em uma forma biologicamente ativa. À luz de informações mais recentes sobre a estrutura da proteína recombinante nos corpos de inclusão, bem como de suas propriedades físico-químicas, novas metodologias de solubilização, que não utilizam agentes desnaturantes, têm sido descritas levando à recuperação de proteínas biologicamente ativas a partir dos corpos de inclusão.

1.4. Características dos Corpos de Inclusão

Os corpos de inclusão são partículas esféricas (Figura 5) de agregados proteicos encontrados tanto no citoplasma como no espaço periplásmico da bactéria *E. coli* durante a expressão de altas concentrações de proteínas heterólogas (Bowden et al., 1991). O diâmetro dos corpos de inclusão varia de 0,5 a 1,3 μm e os agregados proteicos têm tanto natureza amorfa como paracristalina dependendo de sua localização (Taylor et al., 1986). Possuem maior densidade ($\sim 1,3 \text{ mg.ml}^{-1}$) quando comparados com componentes celulares sendo, então, facilmente separados por centrifugação após o rompimento das células bacterianas (Georgiou & Valax, 1999). Apesar de serem densos, os corpos de inclusão são altamente hidratados, possuem arquitetura porosa (Carrio et al., 2000) e contêm poucos contaminantes, tais como proteínas, componentes ribossomais ou fragmentos de DNA/RNA (Rinas et al., 1992; Valax & Georgiou, 1993).

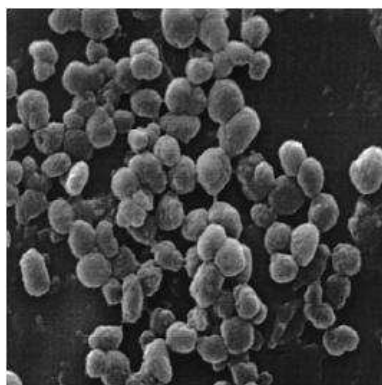


Figura 5. Micrografia eletrônica de varredura mostrando corpos de inclusão, produzidos em *E. coli* expressando o gene para o hormônio de crescimento humano. O diâmetro dos corpos varia de 0,5 a 0,8 μm . Adaptado de Singh e Panda (2005).

Os corpos de inclusão freqüentemente contêm somente a proteína recombinante e o estado de agregação mostra ser reversível (Carrio & Villaverde, 2001, 2002). Tem sido sugerido que os corpos de inclusão são estruturas dinâmicas formadas por um equilíbrio não balanceado entre agregados e proteínas solúveis (Villaverde & Carrio, 2003). Há também um crescente corpo de informação indicando que a produção dos corpos de inclusão ocorre como resultado do acúmulo celular da proteína recombinante em estado parcialmente nativo, e que sofre agregação através de ligações hidrofóbicas não-covalentes ou interações iônicas ou uma combinação de ambas (Speed et al., 1996; Kreisberg et al., 2002). Características significantes dos agregados de proteínas recombinantes nos corpos de inclusão são: a existência de estrutura secundária semelhante à nativa (“native-like”) e a resistência à degradação proteolítica (Przybycien et al., 1994; Umetsu et al., 2004).

Como os corpos de inclusão possuem alta densidade eles podem ser facilmente separados por centrifugação após lise das células bacterianas. Centrifugação em gradiente de sacarose pode também ser usada, para se obter preparações bem puras de corpos de inclusão (Bowden et al., 1991). Por outro lado, corpos de inclusão também podem ser obtidos puros por lavagem do lisado celular com detergentes, baixa concentração de sais e uréia (Taylor et al., 1986; Khan et al., 1998; Lilie et al., 1998).

Com processos adequados de isolamento e lavagens, uma preparação de corpos de inclusão pode ser obtida a partir de *E. coli*, com mais de 95% de pureza (Khan et al., 1998).

A renaturação das proteínas obtidas em estado desnaturante, a partir de corpos de inclusão, é um processo laborioso que requer muitas etapas operacionais e, na maioria das vezes, resulta em recuperação muito pequena de proteína renaturada (Sørensen & Mortensen, 2005). Além disso, na literatura foi descrito que os corpos de inclusão, formados em bactérias crescendo a baixas temperaturas (inferiores a 25 °C ao invés de 37 °C), possuem uma alta concentração de proteínas enoveladas corretamente, isto é, em estado nativo e que podem ser extraídas em condições não desnaturantes e em estado biologicamente ativo. Estes corpos de inclusão possuem características diferentes daquelas dos corpos de inclusão produzidos a 37 °C e foram denominados “corpos de inclusão não clássicos” (Jevsevar et al., 2005). A extração de proteínas propriamente enoveladas em condições não desnaturantes, a partir dos corpos de inclusão não clássicos, constitui então uma estratégia de grande interesse.

1.5. Antissoro Policlonal.

Os antissoros policlonais produzidos em cobaias a partir de CPs isoladas de vírus purificados ou a partir de CPs recombinantes pela expressão em *E. coli* são utilizados para detecção de vírus de plantas por testes serológicos tais como ELISA, *Western blot*, *Dot blot*, entre outras técnicas. No entanto, nem todos os antissoros policlonais produzidos funcionam bem para todos os tipos de testes sorológicos, sendo alguns antissoros válidos somente para *Western*, mas não para ELISA por exemplo. Isso se deve ao fato de que no processo de produção e purificação dessas proteínas a conformação nativa possivelmente não foi conservada (Mutasa-Gottgens et al., 2000).

As células do sistema imune reconhecem melhor os epitopos do que (determinantes antigênicos) os antígenos inteiros. Os epitopos são as regiões de um antígeno que são ligadas por receptores de membrana de antígenos específicos em linfócitos ou a anticorpos secretados (Goldsby, 2002). As células T reconhecem os epitopos de célula T, que normalmente são peptídeos lineares derivados de antígenos protéicos e apresentados por moléculas de MHC. As Células B e anticorpos reconhecem os epitopos de célula-B, que pode ser completa, pequenos componentes químicos de macromoléculas maiores tais como, nucleotídeos, lipídios, proteínas e glicanos. Os epitopos de macromoléculas, especialmente proteínas, são classificados em duas categorias diferentes. A primeira actegoria é denominada de epítapos lineares, que são segmentos compostos de uma cadeia contínua de resíduos ao longo da cadeia polimérica, já a segunda classificação é denominada epítapos conformacionais, que são constituídas por vários segmentos sequenciais descontínuos que são reunidos pelo dobramento do antígeno em sua estrutura original (Goldsby et al., 2002; Barlow et al., 1986). Como a base molecular do imunoreconhecimento e da resposta imune, os dois tipos de epitopos fornecem valiosas informações que são úteis para o diagnóstico (Matsuo et al, 2005; Tegoni et al, 1999). Apesar disso, 90% dos epitopos das células B das proteínas nativas são conformacionais e não lineares.

A partir dessa preocupação com a conformação nativa das proteínas se faz necessários métodos de análise para a verificação da estrutura secundária das proteínas utilizadas como antígenos.

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral verificar através de análises de espectroscopia de infravermelho o conteúdo de estruturas secundárias da CP recombinante do SBMV expressa em *E. coli* presente em corpos de inclusão. Uma vez determinada a estrutura similar a nativa, objetivou-se então a utilização dos corpos de inclusão como antígenos na produção de antissoro policlonal com intuito de detectar o vírus em plantas infectadas através de testes sorológicos tais como *Western blot*, *dot blot*, *tissue blot* e ELISA.

3. Artigos Produzidos

3.1. Submetido à revista *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* em 31 de janeiro de 2011.

Structural analysis of the recombinant coat protein of *Southern bean mosaic virus* in the form of inclusion bodies by Fourier transformed infrared spectroscopy
Tadaiti Ozato Junior ^{a*}, Ricardo Barros Mariutti ^a, Marinônio Lopes Cornélio ^b, Valmir Fadel ^b, José Osmar Gaspar ^a.

^a Department of Zoology and Botany, São Paulo State University (UNESP), CEP 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil.

^b Department of Physics, São Paulo State University (UNESP), CEP 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil.

* Corresponding author: tadaitjr@yahoo.com.br

Telephone/Fax: +55 17 3221 2394/+55 17 3221 2247

Abstract

Southern bean mosaic virus is a plant virus belonging to the genus *Sobemovirus*. The icosahedral capsid has a $T = 3$ quasi-symmetry and 180 copies of the coat protein. The coat protein (CP) has the topology of a jelly roll β -sandwich, and its conformation is very similar to those of other sobemoviruses. This protein is encoded by the Open reading frame 4. The coat protein gene was cloned into the vector pET 28 a and expressed a His-tagged coat protein in *Escherichia coli*. The inclusion bodies containing the recombinant protein were isolated and purified. A comparative analysis between recombinant protein present in the form of inclusion bodies and native coat protein present in the purified virus particles was performed using Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The secondary structure contents identified differences in the

percentage of β -sheets while α -helices content was much preserved. The three-dimensional structure was generated using molecular modeling and was compared to the data obtained from FT-IR analysis. The percentages obtained from FT-IR analyses of the native CP were consistent with the structure generated through homology molecular modeling. Nevertheless, some differences were present on the content of β -sheets structure of the recombinant CP indicating that the protein conformational state is found in a native like condition.

Key words: *Southern bean mosaic virus*; coat protein; Fourier transform infrared spectroscopy; homology molecular modeling; inclusion bodies, protein expression

1. Introduction

Southern bean mosaic virus (SBMV) is the type species of the genus *Sobemovirus*, with genomic RNA (gRNA) of 4.0–4.5 kb, and a subgenomic RNA (sgRNA) of ~ 1.0 kb [1]. The 5'-terminus of the RNA has a genome-linked protein (VPg), and the 3' end lacks a poly (A) tail [2]. The SBMV genome RNA organization has 4 open reading frames (ORF) and the coat protein (CP) gene (ORF 4) is encoded by a sgRNA at 3'-end of the genome [3, 4]. Virions of sobemoviruses are approximately 30 nm in diameter. They have a single tightly packed capsid layer with 180 copies of the coat protein (CP) assembled on a $T = 3$ icosahedral lattice. The CPs of subunits is chemically identical but structurally different. The monomers have the topology of a jelly roll β -sandwich, which is common to most nonenveloped icosahedral viruses and the CP presents a molecular mass of approximately 29kDa. Along with structural function in the formation of capsid, the CP is also required for cell-to-cell and long-distance movement [4]. Recombinant CPs produced in bacterial cells have been shown

to be suitable alternatives to the use of purified virus [5-7]. Recombinant proteins expressed in *Escherichia coli* are often preferred because they are more stable, abundant and can be easily purified [8], however bacterially expressed proteins generally accumulate as insoluble aggregates known as inclusion bodies (IBs) [9; 10]. The formation of IBs upon over expression of heterologous proteins in *E. coli* is a common event and the belief that IBs are intracellular deposits of misfolded, biologically inactive proteins, they have been considered to be a bottleneck in protein production [11, 12]. Nevertheless, the view of inclusion bodies has been changing, researches have reported the presence of biologically active proteins inside IBs [9-12] and the presence of residual native-like structures detected by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) has been reported [15,16].

In this study, we describe the purification of IBs of recombinant CP produced in *E. coli* BL21 (DE3)-RIL and structural analysis using FT-IR and molecular homology modeling, to compare the recombinant CP in the form of IB with the native CP from purified SBMV. The secondary content structures obtained from FT-IR showed a difference at β -sheet motifs. The molecular homology modeling reinforces the experimental data obtained for native CP, allowing us to suggest that the proteins under IB condition presents a native-like structure.

2. Materials and Methods

2.1. SBMV Purification and Viral RNA isolation

The São Paulo isolate of SBMV was purified from infected leaves of *Phaseolus vulgaris* cv. Jalo as previously obtained [17]. The virus was stored in 2mL phosphate-buffered saline containing 150mM NaCl, at a pH of 7.0. The viral RNA was extracted

from purified virus particles using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions.

2.2. *Bacterial Strains*

Escherichia coli TOP10 (Invitrogen) was employed for the amplification of recombinant plasmids, and *E. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RIL (STRATAGENE) was used for recombinant expression of SBMV coat protein. Competent *E. coli* cells were prepared according to Sambrook et al. [18].

2.3. *Cloning*

The first strand of cDNA corresponding to the CP gene of SBMV was synthesized using viral RNA as template with Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) and the anti-sense primer. The primers used for the cloning of SBMV CP were designed using the nucleotide sequence of the SBMV São Paulo isolate published in the GenBank database (Accession No DQ 875594) contained two restriction sites: *Eco*RI (primer sense) and *Xho*I (primer anti-sense) (underline). The forward and reverse primers used to amplify CP gene were, respectively, 5'- CGA ATT CAT GGC GAA GAG G-3' and 5'-CTC GAG TCA GTT GTT TAA GGC CAA GGC-3'. The PCR was performed using *Taq* Polymerase (Invitrogen) under the following conditions: 5 min denaturation cycle at 94°C, followed by 35 cycles at 94°C (1 min), 55°C (1 min), 72°C (2 min), and a final extension at 72°C (10 min). The PCR product was analyzed using 1.0% agarose gel, and was then extracted from the agarose gel using the DNA extraction kit (Fermentas). The DNA was ligated into pTZ57 R/T plasmid vector using the InsTAclone™ PCR cloning kit (Fermentas) following the manufacturer's procedures. The sequence was checked by sequencing using standard M13 forward primer. The recombinant vector (pTZ57 R/T-CP) was digested with *Eco*RI and *Xho*I (New England Biolabs) separated on a 1.0% agarose gel and also extracted from the

agarose gel using DNA extraction kit (Fermentas). The resulting fragment was cloned into pET28a (Novagen) digest with the same two enzymes and purified from agarose gel 1.0%. The digested fragment insert from pTZ57 R/T-CP was ligated into the linearized vector pET28a with T4 ligase (Promega) at 4°C and left overnight. The resulting recombinant vector pET28a-CP was transformed into competent *E. coli* strain Top-10 (Invitrogen) and amplified.

2.4. Expression of recombinant CP in *E. coli*.

Competent *E. coli* strains BL21-Codon Plus (DE3)-RIL were transformed using the resulting recombinant vector (pET 28a-CP). Transformed cells were selected on agar plates containing 34µg/ml chloramphenicol (Sigma) and 30µg/ml kanamycin (Sigma) for the selection of *E. coli*. A single colony selected by PCR screening was used to inoculate a pre-culture with 5mL Luria-Bertani (LB) medium (with the same concentrations of kanamycin and chloramphenicol used previously) at 25°C and left overnight. This pre-culture was used to inoculate a 250mL LB medium with 34µg/ml chloramphenicol and 30µg/ml kanamycin, and the culture grew at 25°C until the optical density reached 0.6 at OD_{600nm}. Expression of recombinant protein was induced by adding 1mM of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) during 4 hours at 25°C. Cells were harvested through centrifugation at 5000 x g for 20 minutes at 4°C. The pellet was stored at -70°C. Samples of non-induced cells and 4-hour induced cells were collected for SDS-PAGE analysis of expression.

2.5. Inclusion body purification

The stored pellet was thawed on ice bath and resuspended in a cell lysis buffer (10mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride - PMSF, 10% glycerol (v/v) and 10mM β-mercaptoethanol, pH 8.0). The suspension was sonicated repeatedly for 5 minutes (20 seconds of sonication followed by 20 seconds of colling)

on ice using a Virsonic tip sonicator (Virtis). The suspension was centrifuged at 10,000 xg for 30 minutes at 4°C, and the supernatant was discarded. The cell pellet was resuspended with 50mL of an IB wash buffer (10mM Tris-HCl, 500mM NaCl and 2% w/v sodium deoxycholate, pH 8.0) and centrifuged at 10,000 x g for 15min at 4°C. This process was repeated six times. The pellet was resuspended in the IB wash buffer without sodium deoxycholate and centrifuged at 10,000 xg for 15 min at 4°C. This washing was performed twice. After this process, the pellet was resuspended with 50mL of cold water and centrifuged at 10,000 xg for 15 min at 4°C. This process was repeated twice. The pellet was then resuspended in 10mL of water. The suspension was centrifuged through a 30% (w/v) sucrose cushion in water (5mL) at 148,000 x g for 2 hours. The white pellet was resuspended in 5mL of phosphate-buffered saline containing 150mM NaCl, at a pH of 7.0.

2.6. *Western blot analysis*

The identification of the expressed protein was completed using a western blot analysis. The PageRuler™ prestained protein ladder (Fermentas) was used as a molecular weight marker. Purified IB from SDS-PAGE was transferred to the nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences) using a Mini Trans-Blot® electrophoretic transfer cell (Bio-Rad) and a transfer buffer (39mM glycine, 48mM Tris-base, 0.037% SDS, and 20% methanol). The membrane was incubated in the blocking buffer (3% BSA in phosphate-buffered saline), with gentle shaking at 25°C overnight. Then, it was incubated with 1:3000 dilution of primary antibody monoclonal mouse anti-polyHistidine (Sigma). The membrane was washed with phosphate-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (PBST) three times. It was then incubated in a 1:30,000 of secondary antibody goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase (Sigma), for 1 hour at 25°C. After washing the membrane three times with

PBST, colorimetric detection was completed using BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) and NBT (Nitroblue tetrazolium, Sigma) as substrates. The reaction was stopped by rinsing the membrane in distilled water.

2.7. Analysis with FT-IR spectroscopy

Infrared spectra were obtained at 25°C with a Nexus-670 spectrometer (Nicolet-USA) equipped with a DTGS detector. The absorption spectrum was a result of 256 scans with 4cm⁻¹ of resolution. The protein sample was deposited between calcium fluoride (CaF₂) windows using a 6µm spacer. During the FT-IR analysis, the influence of the buffer signal was factored in by subtracting it from the sample before examining the amide I band. The structure of the amide I band was analyzed using second derivatives and curve fitting adjustment [19, 20], and the Gaussian profile was used in order to determine the secondary structure composition. These calculations were completed using the Grams/32 software package.

2.8. Homology molecular modeling

A 3D homology model of a SBMV capsid subunit was built using MODELLER [21], and the primary structure used for the model was obtained from an amino acid sequence of SBMV published in the GenBank database (Accession Number AAQ19971). The template structures were selected from the PDB using the BLAST protein blast database [22] with default parameters. The highest sequence identity was observed for a T3 recombinant capsid of *Sesbania mosaic virus* coat protein, and its X-ray structure at 3.6Å resolution (PDB code: 1X33) was used as template, along with a less identical but 2.8Å resolution X-ray structure of Southern Bean Mosaic Virus capsid protein (PDB code: 4SBV). The stereochemical quality of the model was checked with PROCHECK [23]. The secondary structure content of the model was assigned using the DSSP algorithm [24].

3. Results and Discussion

3.1. *Expression of recombinant coat protein and identification using Western blot*

An efficient known expression system in *E. coli* was used based on strong bacteriophage T7 promoter, and the CP gene was subcloned into pET 28 a with N-terminal (6xHis). The induction of expression was performed at a low temperature (25°C), and it produced a recombinant CP with a molecular weight of approximately 33kDa (29kDa for CP plus 3kDa from pET28 a) which data were verified by SDS-PAGE (Figure 1). This molecular weight is in agreement with predicted by the Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server [25]. The highest level of protein expression was observed after optimization of cultivation (4h of induction with 1mM of IPTG). Different concentrations of inductor (0.1–2mM IPTG) had no influence on the expression intensity (data not shown). SDS-PAGE performed on total cell proteins as well as on soluble and insoluble fractions showed that the recombinant coat proteins were mainly present as IBs in the insoluble fraction (data not shown). The Western blot immunodetection using the commercial anti-polyhistidine monoclonal antibody was carried out to confirm the identity of the recombinant protein expressed. It was possible to identify the recombinant protein in cell extracts of 4 hours of induction with IPTG and purified inclusion body. The predicted band of 33kDa of recombinant CP (lane 2 and 3) were visualized, as shown in figure 2. The washing process of inclusion bodies was efficient, since it showed a level of purity as shown in Figure 1 (lane 3).

3.2. *Virus purification and protein quantification*

Using the virus purification procedures described in previously work [17], highly purified virions were obtained from infected leaves and the predicted band of

approximately 29kDa of CP was verified as shown in figure 1 in the lane 4. The yield of purified SBMV was about 0.4 mg/mL. The inclusion body CP proteins were expressed at a concentration (0.50 mg/mL), and were measured using the Qubit™ Fluorometer (Invitrogen).

3.3. *Homology molecular modeling*

In order to check the structural integrity of the expressed protein, a model was built to compare secondary structure content with spectroscopy experimental data. The capsid of SBMV is assembled as a sobemovirus, and has a T=3 quasi-symmetry in which the trimeric subunit have the monomers in three slightly distinct environments, with each one having a classical jelly-roll β -sandwich topology (figure 3) [26]. These monomers, denoted by A, B and C, reveal structural differences, most of which occur at the N-terminal. This region, denoted by N-terminal arm, is structured in the monomer denoted by C, but is disordered in the other two (A and B). For this reason, a model of the complete trimer was calculated, and the secondary structure content (table 1) evaluated from it. The model presents a good overall stereochemical quality with 100% residues within the allowed regions of the Ramachandran plot. Besides that, the homology molecular modeling content, shown at table 1, is consistent with FT-IR component analysis (table 2) at native CP.

3.4. *Infrared studies and conformational analysis*

The secondary structure comparison between the recombinant CP in the form of inclusion bodies and the purified SBMV CP was performed through second derivatives analysis and curve fitting adjustments. We also analyzed the amide I band, which offers valuable information about protein secondary structures [27]. A total of ten peaks were indicated on both spectra (Figures 4 and 5). Eight out of ten assignments obtained by second derivative analysis were employed to evaluate the content of secondary structure

(figures 4 and 5): aggregates (1620 cm^{-1}), β -sheet (1632 cm^{-1}), random (1642 cm^{-1}), α -helix (1650 and 1656 cm^{-1}), turns/loops (1664 and 1676 cm^{-1}) and anti-parallel β -sheet (1690 cm^{-1}) [28]. The curve fitting adjustment with Gaussian curve profiles are shown in Figures 6 and 7.

The data on the integration of the ten bands containing information of the secondary structure is presented in table 2. Comparing the curve fitting areas that represent the secondary content, we found that some aggregates are present in both states. At native condition the aggregate may be a result of the interaction between the trimeric subunits. An increment of the aggregate content is found in the form of inclusion bodies, while decrement of β -sheet structures is perceptible. This suggests an interrelation between the β -sheet motifs and aggregates [29, 30]. At the native conformation the β -sheet structures are held by native hydrogen bonds, an intramolecular interaction (i.e. within a single polypeptide chain), while within inclusion bodies the rise of aggregation is caused by intermolecular interaction (i.e. between two polypeptide chains) formed by non-native hydrogen bonds [31]. The amounts of secondary content related to β -sheet and β -turn decreased of approximately 50%, while aggregate increased at the same proportion according to table 2. The α -helix content at both condition for CP are the same, indicating that α -helix structure is not taking part on the process of inclusion bodies formation.

4. Conclusion

The expression of recombinant coat protein in *E. coli* at a low temperature (25°C) allowed the production of inclusion bodies containing native-like folded proteins. It was demonstrated using FT-IR technique and compared with molecular homology modeling on the description of native state. Accordingly, the inclusion bodies

containing native-like folded CP can be used as antigen source for the production of polyclonal antibodies, becoming the procedures faster and more efficient. A paper describing the production of a polyclonal antiserum to the coat protein of SBMV in inclusion bodies will be published elsewhere.

Acknowledgements

This study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

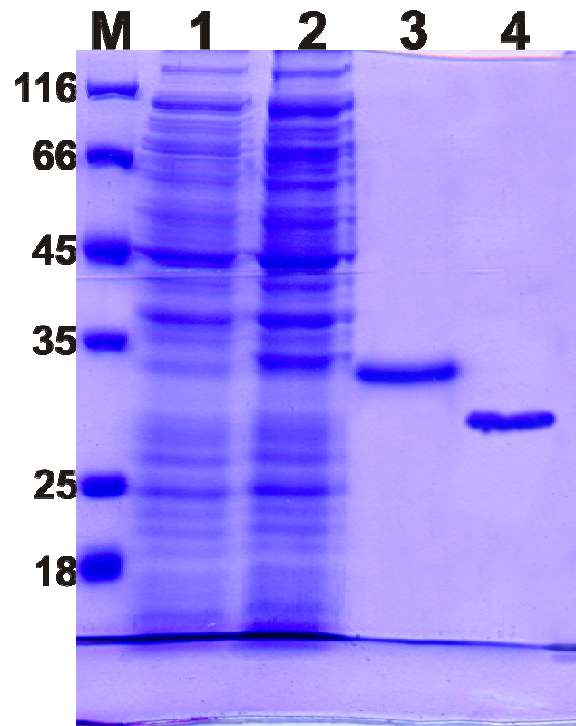


Figure 1: Polyacrylamide Gel SDS-PAGE 12% showing the time of expression, purification of inclusion bodies and virus purification. **(M)** Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas); **(1)** extract of cells without induction **(2)** extract of cells with 1mM of IPTG after 4 hours of induction **(3)** Purified Inclusion bodies (His-tagged recombinant CP). **(4)** native CP from purified virions.

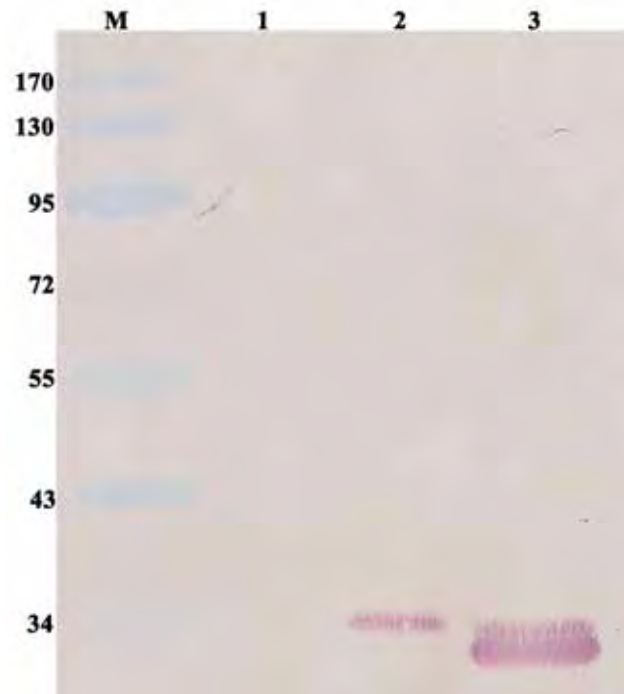


Figure 2: Western blot of identical gel to that of Figure 1 and immune response with monoclonal antibody anti-polyhistidine. **(M)** PageRuler™ prestained protein ladder. **(1)** extract of cells without induction **(2)** extract of cells with 1mM of IPTG after 4 hours of induction; **(3)** Purified Inclusion bodies (His-tagged recombinant CP) **(4)** native CP from purified virions.



Figure 3: Homology model cartoon of T=3 quasisymmetric unit of SBMV. The monomer A (segment 68-266) is in light gray, B (segment 68-266) in medium gray and C (segment 43-266) in black.

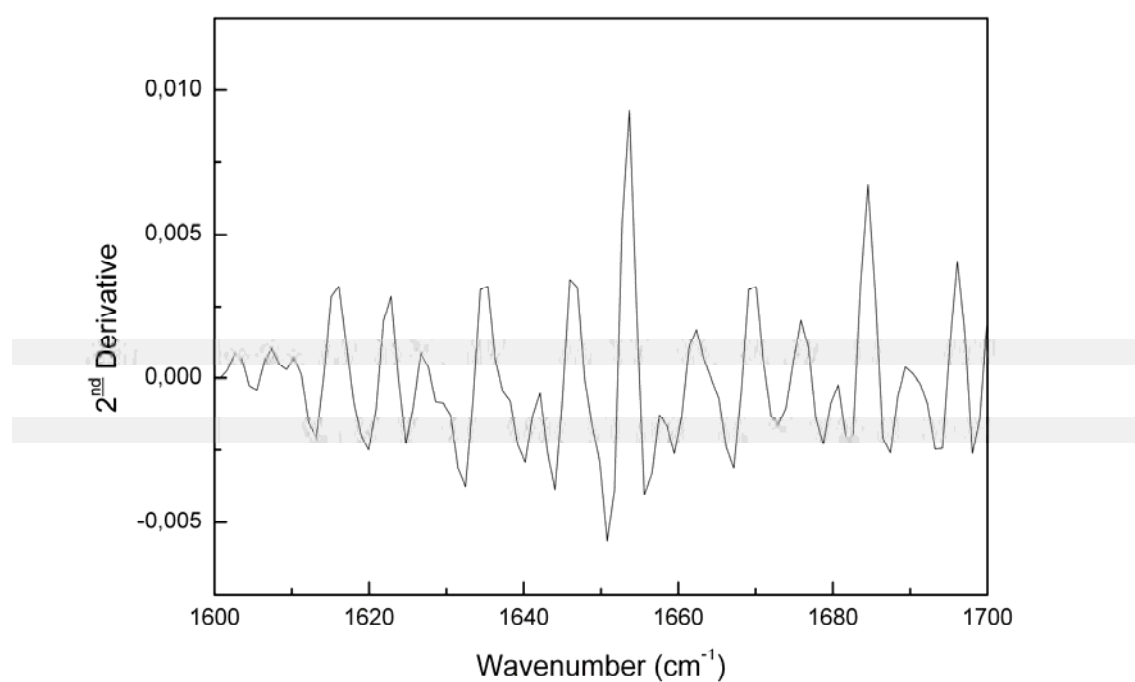


Figure 4: Second derivative on the amide I region of the absorption spectrum of recombinant CP of inclusion body.

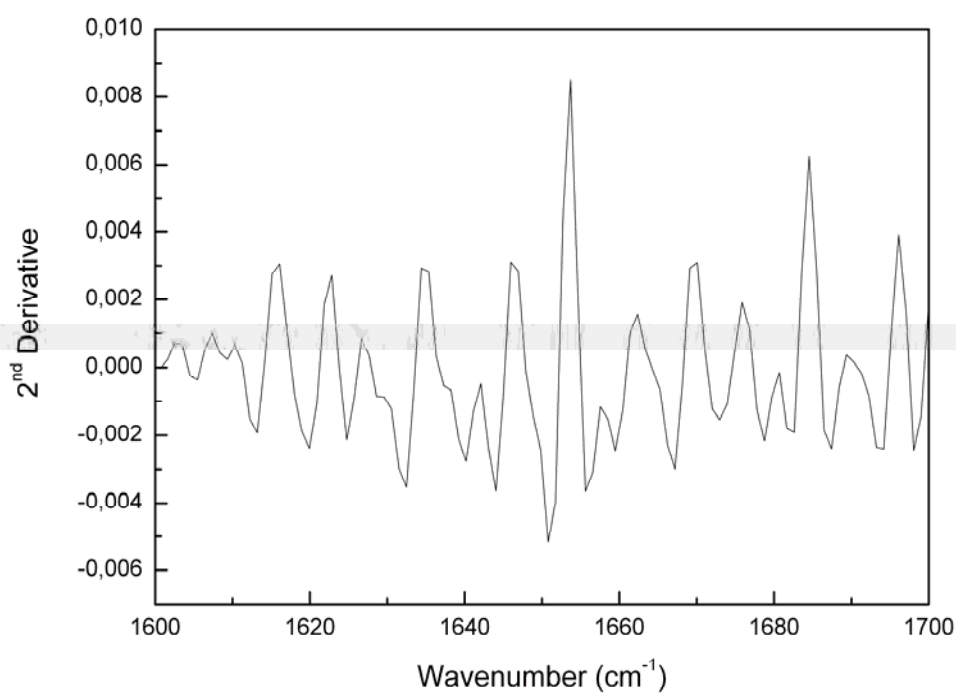


Figure 5: Second derivative on the amide I region of the absorption spectrum of native CP.

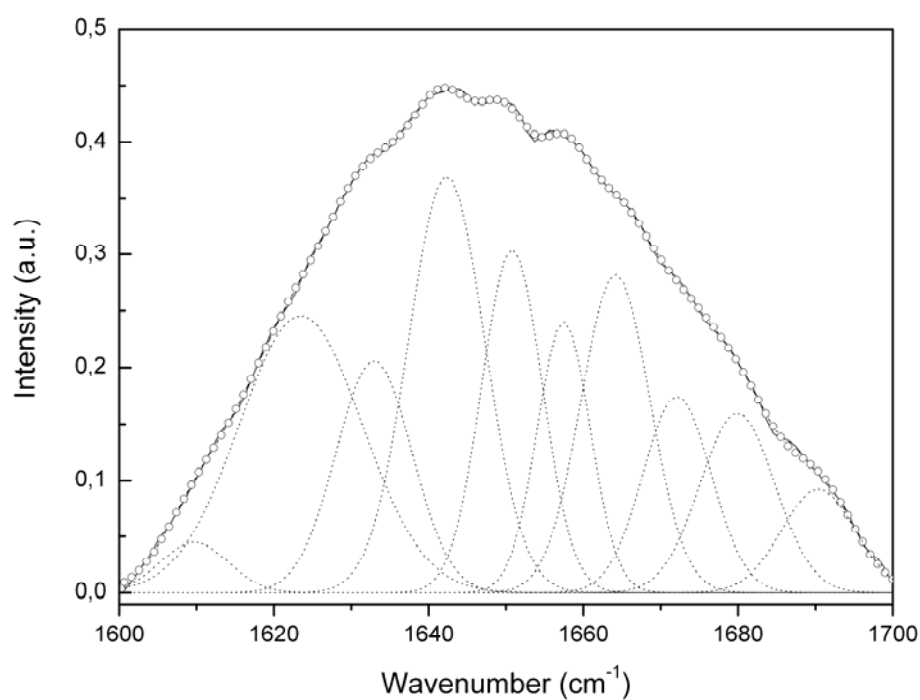


Figure 6: FT-IR spectrum of the amide I band of recombinant CP. The experimental spectrum is shown as solid line, overlaid by the sum (white circle) of 10 Gaussian line shape transitions shown underneath (dotted lines). The ten central transitions were assigned to contributions from secondary structure motifs.

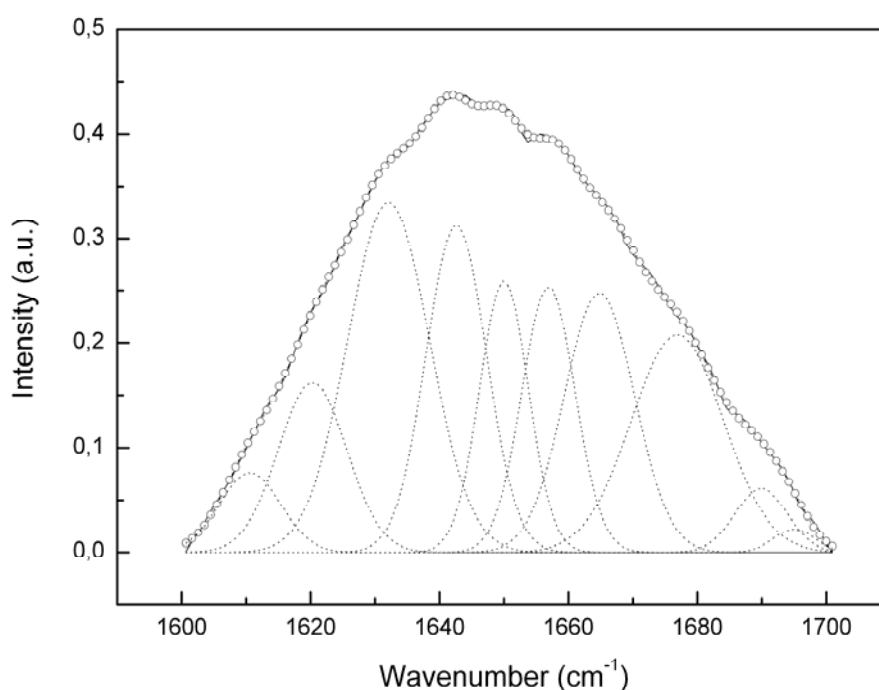


Figure 7: FT-IR spectrum of the amide I band of native CP. The experimental spectrum is shown as solid line, overlaid by the sum (white circle) of 10 Gaussian line shape transitions shown underneath (dotted lines). The ten central transitions were assigned to contributions from secondary structure motifs.

Secondary structure type	Homology molecular modeling analysis
Aggregate (%)	---
α -Helix (%)	17
β -sheet (%)	31
β -turn (%)	13
Random coil/turns (%)	19

Table 1: Secondary structure content estimates of native CP and recombinant IB CP from homology molecular modeling.

Secondary structure type	FTIR component analysis	
	Native CP	Recombinant CP
Aggregate (%)	8	19
α -Helix (%)	19	19
β -sheet (%)	36	16.5
β -turn (%)	13	7.5
Random coil/turns (%)	14	17

Table 2: Secondary structure content estimates of native CP and recombinant IB CP from FT-IR.

5. References

- [1] T. Rutgers, T. Salerno-Rife, P. Kaesberg, Messenger RNA for the coat protein of *Southern bean mosaic virus*. *Virology*, 74, (1980) 506-509.
- [2] A. Gosh, R. Dasgupta, T. Salerno-Rife, T. Rutgers, P. Kaesberg, *Southern bean mosaic virus* has a 5'-linked protein but lacks 3'-terminal poly(A). *Nucleic Acid Res.*, 7, (1979) 2137-2146.
- [3] T. Tamm, E. Truve, Sobemoviruses. *J. Virol.*, 74, (2000) 6231-6241.
- [4] R. Hull, D. Farquette, Genus *Sobemovirus*. In: *Virus Taxonomy: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, California, USA, (2005) 885-890.
- [5] S. Dea, L. Wilson, D. Therrien, E. Cornaglia, Competitive ELIS A for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant *E. coli* – expressed nucleocapsid protein as antigen. *J. Virol. Methods* 87 (2000) 109-122.
- [6] A. M. Vaira, M. Vecchiati, V. Masenga, G. P. Accotto, A polyclonal antiserum against recombinant viral protein combines specificity and versatility. *J. Virol. Methods* 56 (1996) 209-219.
- [7] K. Treder, J. Lewosz, Production of antibodies against Potato leafroll virus coat protein expressed in *Escherichia coli* as an antigen. *Proceedings of 'The 11th EAPR Virology Section Meeting'*, Trest, Czech Republic, (2001) 62-64.
- [8] M. Uhlen, T. Moks, Gene fusions for purpose of expression: an introduction. *Methods Enzymol* 185 (1990) 129–143.
- [9] J. F. Kane and D. L. Hartley, Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*, *Trends Biotechnol.* 6 (1988) 95-101.

- [10] B. Fahnert, H. Lilie, P. Neubauer, Inclusion bodies: Formation and utilisation. *Adv. Biochem. Eng Biotechnol*, 89 (2004) 93–142.
- [11] S. Peternel, S. Jevsevar, M. Bele, V. Gaberc-Porekar, V. Menart, New properties of inclusion bodies with implications for biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem*, 49 (2008) 239-246.
- [12] S. Jevsevar, V. Gaberc-Porekar, I. Fonda, B. Podobnik, J. Grdadolnik, V. Menart, Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. *Biotechnol Prog*, 21 (2005) 632-639.
- [13] E. Garcia-Fruitos, M. M. Carrio, A. Aris, A. Villaverde: Folding of a misfolding-prone beta-galactosidase in absence of DnaK. *Biotechnol Bioeng*, 90 (2005) 869-875.
- [14] E. Garcia-Fruitos, N. Gonzalez-Montalban, M. Morell, A. Vera, R. M. Ferraz, A. Aris, Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microb Cell Fact* (2005) 4-27.
- [15] D. Ami, A. Natalello, G. Taylor, G. Tonon, D. S. Maria, Structural analysis of protein inclusion bodies by Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1764 (2006) 793-799.
- [16] K. Oberg, B. A. Chrnyk, R. Wetzel, A. L. Fink, Native like secondary structure in interleukin-1 beta inclusion bodies by attenuated total reflectance FTIR. *Biochemistry*, 33 (1994) 2628-2634.
- [17] A. E. Moreira, J. O. Gaspar, Propriedades moleculares de um isolado brasileiro do *Southern bean mosaic virus*. *Fitopatol Bras*, 27 (2002) 292-297.
- [18] J. Sambrook, E. F. Fritsh, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Wiley, Cold Spring, Harbor NY, 1989.
- [19] H. Susi, D. M. Byler, FTIR study of proteins with parallel β chains, *Arch. Biochem. Biophys.* 258 (1987) 465-469.

- [20] D. M. Byler, H. Susi, Examination of secondary structure of proteins by deconvoluted FTIR spectra, *Biopolymers* 25 (1986) 469-487.
- [21] A. Sali, T.L. Blundell, Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol.* 234 (3), (1993) 779-815.
- [22] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403-410.
- [23] R. A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, *J. App. Cryst.* 26 (1993) 283.
- [24] W. Kabsch, C. Sander, Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22 (1983) 2577-2637.
- [25] Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; ***Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server***; (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Human Press (2005) 571-607.
- [26] P. Plevka, K. Tars, A. Zeltins, I. Balke, E. Truve, L. Liljas, The three-dimensional structure of *Reygrass mottle virus* at 2.9 Å resolution. *Virology*, 369 (2007) 364-374.
- [27] J. Grdadolnik, Y. Marechal, Bovine Serum Albumin Observed by Infrared Spectrometry. II. Hydration Mechanisms and Interaction Configurations of Embedded H₂O Molecules, *Biopolymers, Biopolymers (Biospectroscopy)*, 62 (2001) 54–67.
- [28] C. Drees, C. A. O. Stürmer, H. M. Möller, G. Fritz, Expression and purification of neurolin immunoglobulin domain 2 from *Carrasius auratus* (goldfish) in *Escherichia coli*, *Protein Expression and Purification*, 59 (2008) 47-54.

- [29] S. M. Doglia, D. Ami, A. Natalello, P. Gatti-Lafranconi, M. Lotti, Fourier transform infrared spectroscopy analysis of the conformational quality of recombinant proteins within inclusion bodies, *Biotechnol. J.*, 3 (2008) 193-201.
- [30] A. Dong, T. W. Randolph, J. F. Carpenter, Entrapping Intermediates of Thermal Aggregation in α -Helical Proteins with Low Concentration of Guanidine Hydrochloride 36 (2000) 27689-27693.
- [31] F. Meersman, L. Smeller, K. Heremans Comparative Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study of Cold-, Pressure-, and Heat-Induced Unfolding and Aggregation of Myoglobin 82 (2002) 2635-2644.

3.2.

Production of polyclonal antibodies using as an antigen inclusion bodies produced in *Escherichia coli* expressing the coat protein gene of *Southern bean mosaic virus*

Tadaiti Ozato Junior¹, Jorge Alberto Marques Rezende² and José Osmar Gaspar¹

Authors' address: ¹Department of Zoology and Botany, São Paulo State University (UNESP), CEP 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil;

² Department of Phytopathology and Nematology, University of São Paulo (USP), CEP 13418-900 Piracicaba, SP, Brazil.

Key words: Protein expression, recombinant protein, antibodies, inclusion bodies, serology

Abstract

The production of recombinant proteins in *Escherichia coli* yields proteins that accumulate as insoluble aggregates known as inclusion bodies (IBs). The proteins are biologically active, and possess a native-like structure. They are trapped inside IBs when the expression is induced at low temperatures. These features, along with the ease in purifying the IBs, suggest the possibility of using IBs as an antigen for the production of polyclonal antibodies. In this study, the coat protein gene of the *Southern bean mosaic virus*, a *Sobemovirus*, was cloned in the vector pET 28a (+) and expressed in *Escherichia coli* at 25 °C. After they were purified, the IBs containing the expressed protein were used as an antigen to immunize rabbits. The antiserum obtained was specific and comparable to one previously prepared with purified SBMV particles in the virus detection in leaf extracts of infected bean plants using Western blot, PTA-ELISA, Dot Blot and Tissue Printing assays. Therefore, the use of IBs containing recombinant

viral proteins to immunize rabbits is a new, easy and very promising approach in the production of polyclonal antibodies for virus diagnosis.

1. Introduction

Expression of recombinant proteins produced in bacteria such as *Escherichia coli* generally yields proteins that accumulate as insoluble aggregates known as inclusion bodies (IBs) (Kane and Hartley 1988; Fahnert et al. 2004). The IBs usually occur in the cytoplasm of *E. coli* cells (Carrio and Villaverde 1998). They are relatively homogenous in composition and are largely (about 90%) formed by the recombinant protein itself (Rinas and Bailey 1992). For a long time, IBs were considered to be deposits of misfolded, biologically inactive target proteins. It was thought that elaborate and time-consuming solubilization, refolding, and purification procedures were needed to recover functionally active products (Singh and Panda 2005). However, in the last few years, the understanding of IBs has been changing, and several groups have reported that the proteins inside the IBs are biologically active, with native-like structures (Peternel et al. 2008). These features, as well as the ease in purifying the IBs, suggest that it is possible to use the IBs as an antigen for the production of polyclonal antibodies. The time to obtain the recombinant proteins with native-like structure, and therefore with the epitopes exposed, would be shortened to only a few days of work.

In this study, this hypothesis was tested in order to obtain antibodies for the coat protein of the *Southern bean mosaic virus* (SBMV), a member of the *Sobemovirus* group. The SBMV is characterized by isometric particles (30nm), which encapsidate a single-stranded positive-sense genomic RNA (gRNA) of approximately 4.0 – 4.5kb and a subgenomic RNA (sgRNA) of approximately 1.0kb (Rutgers et al. 1980). The organization of the SBMV genome RNA has 4 open reading frames (ORF) and the coat

protein (CP) gene (ORF 4) is encoded by a sgRNA at 3'-end of the genome (Ozato Jr. et al. 2009; Hull et al. 2005). Viral CPs are known to be responsible for the immune reactions to virus particles used as immunogens (Matthews 1991). To avoid labor-intensive purification methods, recombinant bacterially expressed CPs have been shown to be an important alternative to the production of polyclonal antiserum for detection purposes (Dea et al. 2000; Vaira et al. 1996; Treder and Lewosz 2001). In this study, the cloning of the CP gene of the SBMV in a prokaryotic vector and its expression in *Escherichia coli* are described. The IBs formed from the overproduction of recombinant CP in *E. coli* were purified and used to raise antibodies in rabbits. This polyclonal antiserum was evaluated for immunodiagnosis using Plate Trapped Antigen - ELISA (PTA-ELISA), Western Blot, and Tissue and Dot Blot techniques, and was compared to a polyclonal antiserum obtained for purified SBMV virions.

2. Materials and Methods

2.1. SBMV Purification and Viral RNA isolation

The São Paulo isolate of the SBMV (SBMV-SP) was purified from infected leaves of *Phaseolus vulgaris* cv. Jalo, following Moreira and Gaspar (2002). The virus was stored in 2mL of phosphate-buffered saline containing 150mM NaCl, at a pH of 7.0. The viral RNA was extracted from purified virus particles using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions.

2.2 Bacterial Strains

Escherichia coli TOP10 (Invitrogen) was employed for the amplification of recombinant plasmids, and *E. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RIL (STRATAGENE) was used for recombinant expression of SBMV coat protein. Competent *E. coli* cells were prepared following Sambrook et al. (1989).

2.3. Cloning and Expression of Recombinant SBMV CP in *E. coli*

The first strand of cDNA corresponding to the CP gene of the SBMV was synthesized using viral RNA as a template with Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) and the anti-sense primer. The primers used for the cloning of SBMV-SP CP were designed using the nucleotide sequence of the SBMV-SP published in the GenBank database (Accession No DQ 875594), and contain two restriction sites: *Eco*RI (primer sense) and *Xho*I (primer anti-sense) (underline). In order to amplify the CP gene, the forward primer 5'-CGA ATT CAT GGC GAA GAG G-3' and the reverse primer 5'-CTC GAG TCA GTT GTT TAA GGC CAA GGC-3' were used. The PCR was performed using *Taq* Polymerase (Invitrogen) under the following conditions: a 5-min denaturation cycle at 94°C, followed by 35 cycles at 94°C (1 min), 55°C (1 min), 72°C (2 min), and a final extension at 72°C (10 min). The PCR product was analyzed using 1.0% agarose gel, and was then extracted from the agarose gel using the DNA extraction kit (Fermentas). The DNA was ligated into pTZ57 R/T plasmid vector using the InsTAcloneTM PCR cloning kit (Fermentas), following the manufacturer's procedures. The sequence was checked by sequencing using standard M13 forward primer. The recombinant vector (pTZ57 R/T-CP) was digested with *Eco*RI and *Xho*I (New England Biolabs). It was separated in a 1.0% agarose gel and extracted using a DNA extraction kit (Fermentas). The resulting fragment was cloned into pET28a (+) (Novagen) digest with the same two enzymes and purified from agarose gel. The digested fragment insert was ligated into the linearized vector pET28a with T4 ligase (Promega) at 4°C, and left overnight. The resulting recombinant vector pET28a-CP was transformed into a competent Top 10 *E. coli* strain (Invitrogen) for vector multiplication.

Competent *E. coli* strains [BL21-Codon Plus (DE3)-RIL] were transformed using the resulting recombinant vector (pET 28a-CP), and the transformed cells were selected on agar plates containing 34µg/ml chloramphenicol (Sigma) and 30µg/ml kanamycin (Sigma). A single colony selected by PCR screening was used to inoculate a pre-culture with a 5mL Luria-Bertani (LB) medium (with the same concentrations of kanamycin and chloramphenicol used previously) at 25°C and left overnight. This pre-culture was used to inoculate a 250mL LB medium with 34µg/ml chloramphenicol and 30µg/ml kanamycin, and the culture grew at 25°C until the optical density reached 0.6 at OD_{600nm}. Expression of recombinant protein was induced by adding 1mM of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) and then incubating the protein for 4 hours at 25°C. Cells were harvested through centrifugation at 5000 x g for 20 minutes at 4°C. The pellet was stored at -70°C. Samples of non-induced cells and 4-hour induced cells were collected for SDS-PAGE analysis of expression.

2.4. Inclusion body purification

The stored pellet was thawed in an ice bath and resuspended in a cell lysis buffer (10mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride - PMSF, 10% glycerol (v/v) and 10mM β-mercaptoethanol, pH 8.0). The suspension was sonicated repeatedly for 5 minutes (20s of sonication followed by 20 seconds of colling) on ice using a Virsonic tip sonicator (Virtis). The suspension was centrifuged at 10,000 x g for 30 minutes at 4°C, and the supernatant was discarded. The cell pellet was resuspended with 50mL of an IB wash buffer (10mM Tris-HCl, 500mM NaCl and 2% w/v sodium deoxycholate, pH 8.0) and centrifuged at 10,000 x g for 15min at 4°C. This process was repeated six times. The pellet was resuspended in the IB wash buffer without sodium deoxycholate and centrifuged at 10,000 x g for 15 min at 4°C. This washing was performed twice. After this process, the pellet was resuspended with 50mL of cold

water and centrifuged at 10,000 x g for 15 min at 4°C. This process was repeated twice. The pellet was then resuspended in 10mL of water. The suspension was centrifuged through a 20% (w/v) sucrose cushion in water (5mL) at 148,000 x g for 2h. The white pellet was resuspended in 5mL of phosphate-buffered saline containing 150mM NaCl, at a pH of 7.0.

2.5. Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS (SDS-PAGE)

A 1ml aliquot of cultured bacteria cells was pelleted using centrifugation for 1 min, was resuspended in 100µl of the sampling buffer (50mM Tris-HCl pH 6.8, 100mM DTT, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue and 10% glycerol) and was boiled for 4 min prior to being added to the gel. The process was repeated, and the aliquots were then loaded on 12% polyacrylamide gel containing SDS (Laemmli 1970). Coomassie Brilliant Blue R250 was used to visualize the separated proteins.

2.6. Expression Analysis by Western blot

The SDS-PAGE separated proteins were transferred to the nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences) using a Mini Trans-Blot® electrophoretic transfer cell (Bio-Rad) and a transfer buffer (39mM glycine, 48mM Tris-base, 0.037% SDS, and 20% methanol). The membrane was incubated in the blocking buffer (3% BSA in phosphate-buffered saline), with gentle shaking at 25°C overnight. The membrane was then incubated with 1:3000 dilution of primary antibody monoclonal mouse anti-polyHistidine (Sigma). The membrane was washed three times with a phosphate-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (PBST). It was then incubated in a 1:30,000 dilution of secondary antibody goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase (Sigma) for 1h at 25°C. After washing the membrane three times with PBST, colorimetric detection was completed using BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-

phosphate) and NBT (Nitroblue tetrazolium, Sigma) as substrates. The reaction was stopped when the membrane was rinsed in distilled water.

2.7. Polyclonal antibodies production

The IBs containing recombinant SBMV-CP were used for preparing antibodies in New Zealand white rabbits. The rabbits were first immunized subcutaneously with 500µg of IBs emulsified with an equal volume of Freund's complete adjuvant. Three booster injections were given with 250µg of IBs in Freund's incomplete adjuvant at one-week intervals, and the antiserum was collected 7 days after the last booster was administered. Blood samples were taken from the marginal vein of the rabbit ear and centrifuged at 5,000 x g. The serum fractions were collected and stored at -20°C until needed. This antiserum will be henceforth referred to as anti-IB-CP. A previously obtained antiserum for purified virus particles (anti-SBMV) was used for comparison in all evaluation tests.

2.8. Sample Preparation

Samples of infected and healthy leaves (0.1g) were ground with liquid nitrogen using a pestle and mortar. The samples were resuspended in 1mL of an extraction buffer (10mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride – PMSF and 10mM β-mercaptoethanol, pH 8.0), and were then centrifuged at 10000 x g for 10 min to obtain the crude plant sap. Total protein from the plant sap was clarified using precipitation with cold acetone for 60 min at -20°C. After three washes with cold acetone and centrifugation as explained above, the pellet was resuspended in PBS and vortexed thoroughly to dissolve the protein pellet. These samples were used for Western Blot analysis and Dot Blot immunoassays.

2.9. Tissue blot and dot blot immunoassays

Tissue blots immunoassays (TBIA) of SBMV-infected and separate uninfected bean plants were prepared on small pieces of nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). Fresh sections of stems were cut with a razor blade and gently printed onto the membranes. After air-drying, they were incubated in the blocking buffer (3% BSA in phosphate-buffered saline) with gentle shaking at 25°C overnight. They were then incubated with 1:1000 dilution of either anti-IB-CP or anti-SBMV. The membrane was washed three times with phosphate-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (PBST). Incubation with the secondary antibodies and revelation with the NBT/BCIP substrate were performed as described for Western blotting. The reactions were stopped when the membrane was rinsed in distilled water. Positive reactions appeared as dark purple spots, and the blots were photographed under a binocular microscope at 40x magnification.

For Dot Blot Immunoassays (DBIA), extracts of infected and healthy leaves were prepared as described above in the sample preparation section. Dots of 2µl of protein solution were blotted on pieces of nitrocellulose membrane, and detections were conducted as described for TBIA. To determine the anti-IB-CP titration, serial dilutions from 1:1000 to 1:64000 and purified SBMV virions (50ng/µl) were used.

2.10. Plate Trapped Antigen - ELISA (PTA-ELISA)

The ELISA experiments were performed using healthy and SBMV-infected leaves, as well as purified SBMV virions. One gram of leaves was ground with 10mL of coating buffer (15mM Na₂CO₃ and 35mM NaHCO₃, pH 9.6), and the purified virus sample was diluted in a coating buffer in the final concentration of 0.1mg/mL. The microtiter plate was first coated with samples and then incubated at 4°C overnight. The plates were washed three times with PBS-T. After the plates were washed, the samples

were incubated for 2h with 100 μ L of the antisera, which were diluted (1:1000 and 1:2000) in PBS-TPB (PBS-T with 2% of polyvinylpyrrolidone and 0.2% of BSA). A mouse anti-rabbit alkaline phosphatase conjugate (Sigma-Aldrich) (diluted 1:40,000 in PBS-TPB) was added and incubated for 2h at 37°C. The plates were developed with 0.6mg/ml of p-nitrophenyl phosphate in a 10% diethanolamine buffer, pH 9.8. Absorbance was measured at 405nm 1h after the addition of the substrate.

3. Results and Discussion

3.1. Expression of recombinant coat protein and identification using Western blot

The SBMV coat protein gene was cloned into the well-known bacterial expression vector pET 28a (+) with a strong T7 promoter adding an N-terminal His-Tag to the expressed recombinant protein. The induction of expression was performed at a low temperature (25°C), allowing for the production of inclusion bodies with recombinant proteins with better conformational quality (Vera et al. 2007). After 4h of induction with IPTG, the expressed SBMV-CP became visible, with a molecular weight of approximately 33kDa (Figure 1A, lane 2). The purified IBs were largely formed by the recombinant coat protein, and with few contaminants (lane 3). Western blot immunodetection using a commercial anti-polyhistidine monoclonal antiserum confirmed the identity of the recombinant coat protein expressed, which carried a 6x-His-tag (Figure 1B, lanes 2 and 3).

3.2. Antiserum production

The preservation of secondary structures is essential for the production of high-quality polyclonal antiserum so that the conformational epitopes in the recombinant protein can be maintained. The conformational quality of the recombinant SBMV coat protein within inclusion bodies was determined through the use of Fourier transform

infrared spectroscopy, and the analysis indicated that the protein conformational state is found in a native-like condition (data not shown - to be published elsewhere). The inclusion bodies containing recombinant CP were used as an antigen for the production of polyclonal antiserum.

3.3. Assessment of antibody production

The specificity and sensitivity of the antiserum obtained was assessed against purified SBMV particles in dot-blot immunoassays. Antiserum for SBMV virions that had been obtained previously was used for comparison. Titration tests of the anti-IB-CP indicated that it was effective in detecting 100ng of virus particles up to a dilution of 1:4000, while the anti-SBMV could be diluted up to 1:16000 (highest dilution tested) to detect the same amount of virus particles (Figure 2). At a dilution of 1:1000, the anti-IB-CP was effective in detecting 12ng of virus particles, while the anti-SBMV at the same dilution detected 3ng (Figure 3). These results indicate that the immunization was successful, and that the anti-IB-CP is less effective than the anti-SBMV, but that it is still very useful for detecting SBMV virus particles.

3.3. Western blot, PTA-ELISA and Tissue blot

Both antisera were used in immunoassays to verify their feasibility in detecting SBMV in infected plant tissues. According to Western blot analysis, the anti-IB-CP was as effective as the anti-SBMV in detecting the virus in extracts of infected leaves, and neither reacted with extracts of healthy plants (Figure 4). Interestingly, if crude anti-IB-CP was used, all of the PTA-ELISA tests performed produced negative results (Table 1). However, when the anti-IB-CP was pre-adsorbed with extracts of healthy leaves, PTA-ELISA resulted in detection of the virus in infected bean plants. These results suggest that the antibodies against bacterial proteins having homology with proteins from bean plants. The non-specific reactions may be able to be corrected through pre-

absorption with healthy sap (Jain et al, 2005). In tissue blotting experiments, the anti-IB-CP and anti-SBMV produced a strong specific reaction with SBMV-infected bean plants and a clear background with healthy plants (Figure 5). This procedure is very economical and easy to perform, with efficient sample preparation that allows for the plant material to be processed directly in the field for a large number of samples with great quality of detection (Aparicio et al. 2009).

4. Conclusion.

The coat protein gene of the *Southern bean mosaic virus* expressed in *E. coli* yielded a recombinant protein with native-like structure enclosed in inclusion bodies (IBs), which were easily purified and used as an antigen to immunize rabbits. Through the use of Western blot, PTA-ELISA, Dot Blot and Tissue Printing assays the antiserum obtained showed to be specific and comparable to that prepared with purified SBMV particles in the virus detection in leaf extracts of infected bean plants. Therefore, the use of IBs containing recombinant viral proteins as an antigen to immunize rabbits is a new, easy and very promising approach in the production of polyclonal antibodies for virus diagnosis.

Figures and Table

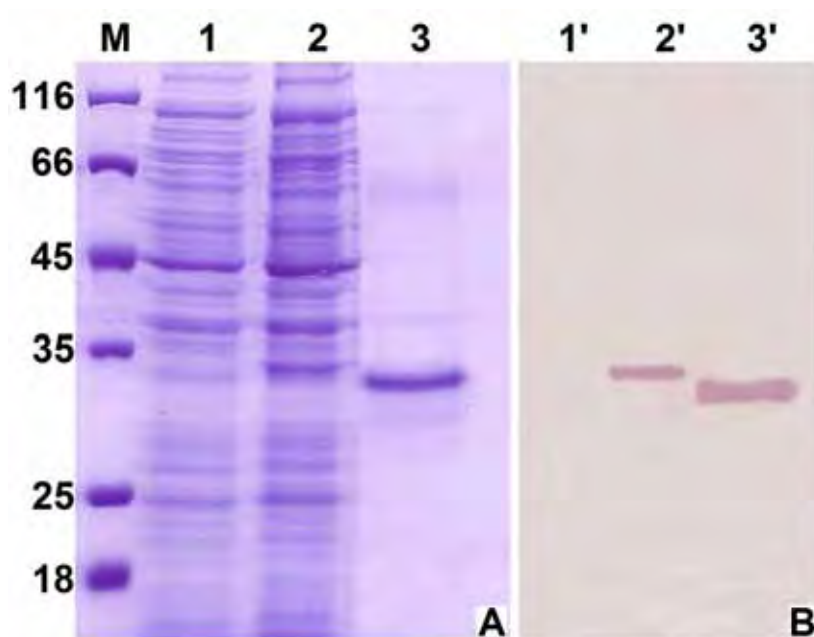


Figure 1: (A) SDS-PAGE analysis of the bacterially expressed proteins stained with Coomassie brilliant blue. M: molecular weight protein standards. 1: Bacterial extract prior to induction with IPTG. 2: 4 hours after induction. 3: Inclusion bodies after the last washing with water. (B) Western blot of a similar gel tested with anti-histidine antiserum.

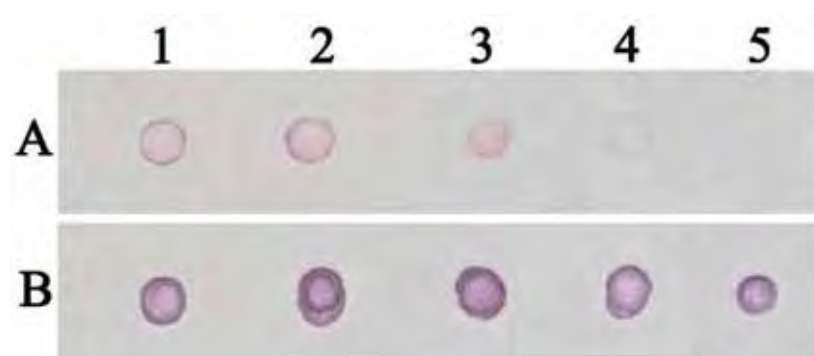


Figure 2. Titration tests by Dot-blot with anti-IB-CP (panel A) and anti-SBMV-CP (panel B). Purified SBMV particles were used as an antigen (100 ng per dot). The numbers 1 to 5 represent serial dilution of the antisera (1:1000 to 1:16000).

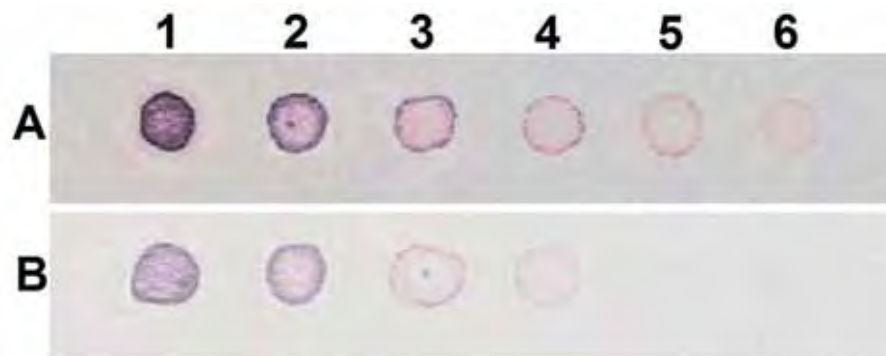


Figure 3. Detection of different concentrations of purified SBMV particles by Dot Blot assay. Panel A, anti-SBMV (1:1000). Panel B, anti-IB-CP (1:1000). The numbers 1 to 6 represent serial dilution of the SBMV particles (100 ng to 3 ng per dot).

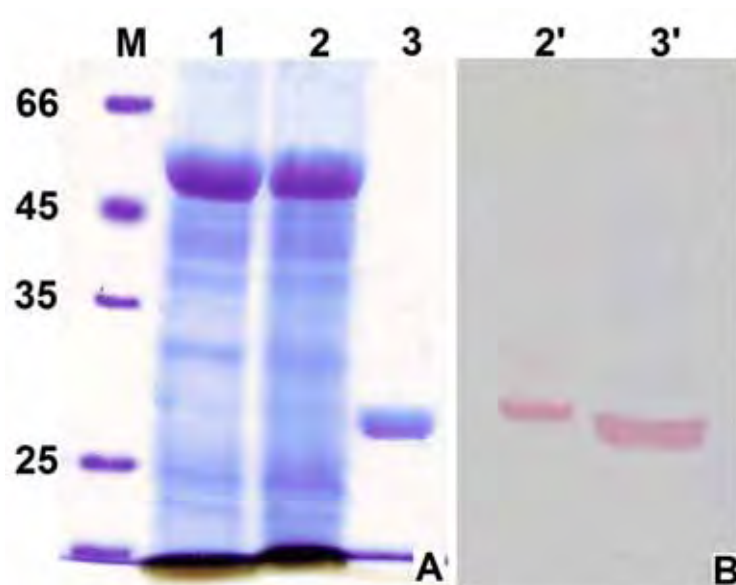


Figure 4. (A) SDS-PAGE analysis of leaf extracts stained with Coomassie brilliant blue. M: molecular weight protein standards. 1: Leaf extract from healthy bean plant. 2: Leaf extract from SBMV-infected bean plant 3: Purified SBMV particles. (B) Western blot of a similar gel tested with anti-IB-CP antiserum.

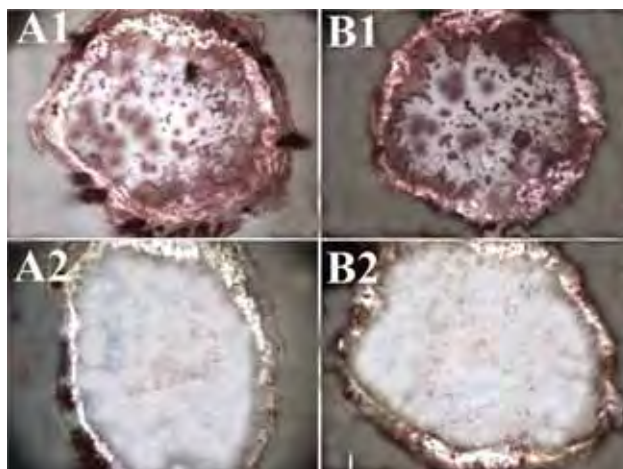


Figure 5. Tissue printing immunoassay of healthy and SBMV-infected bean plants using the antisera anti-IB-CP (A1, A2) and anti-SBMV (B1, B2). A1/B1 indicates SBMV-infected stem sections. A2/B2 indicates stem sections of healthy bean plants.

Table 1. PTA –ELISA results using polyclonal antibodies anti-IBCP and anti-SBMV

Sample	Pre-adsorbed anti-IBCP		Crude antisera anti- IBCP 1:2000	Anti-SBMV	
	1:1000	1:2000		1:1000	1:2000
Infected bean with SBMV	0,064	0,046	0,147	0,168	0,148
Healthy bean	0,018	0,008	0,146	0,037	0,015

5. References

- Aparicio F, Soler S, Galipienso L, Nuez F, Pallás V and Lopez C. (2009): Immunodiagnosis of *Parietaria mottle virus* in Tomato Crops Using a Polyclonal Antiserum against its Coat Protein Expressed in a Bacterial System J Phytopathol, **157**, 511–513.
- Carrió M M., Corchero J L and Villaverde A. (1998): Dynamics of in vivo protein aggregation: building inclusion bodies in recombinant bacteria, *FEMS Microbiol. Lett.* **169** (1), 9–15.
- Dea S, Wilson L, Therrien D, Cornaglia E. (2000): Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant *E. coli* – expressed nucleocapsid protein as antigen. J. Virol. Methods **87**, 109-122.
- Fahnert B, Lilie, H., Neubauer P. (2004): Inclusion bodies: Formation and utilization. Adv. Biochem. Eng Biotechnol. **89**, 93–142.
- Hull R. and Farquette D. (2005): Genus *Sobemovirus*. In: Virus Taxonomy: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, California, USA, 885-890.
- Jain R K, Pandey A M, Krishnareddy M, Mandal B.(2005): Immunodiagnosis of groundnut and watermelon bud necrosis viruses using polyclonal antiserum to recombinant nucleocapsid protein of *Groundnut bud necrosis virus*. J Virol Methods **130**, 162–164.
- Kane J F and Hartley D L. (1988): Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. Trends Biotechnol. **6**, 95-101.
- Laemmli U K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685.
- Matthews R E F. (1991): Plant Virology, 3rd ed. Academic Press, London.

- Moreira A E, Gaspar J O. (2002): Propriedades moleculares de um isolado brasileiro do *Southern bean mosaic virus*. Fitopatol Bras, **27**, 292-297.
- Ozato Jr. T, Gaspar J O, Belintani P. (2009): Completion of the nucleotide sequence of a Brazilian isolate of *Southern bean mosaic virus*. J. Phytopathology, **157 (9)**, 573-575.
- Peternel S, Jevsevar S, Bele M, Gaberc-Porekar V, Menart V. (2008): New properties of inclusion bodies with implications for biotechnology. Biotechnol Appl Biochem. **49**, 239-246.
- Rinas U and Bailey J E. (1992): Protein compositional analysis of inclusion bodies produced in recombinant *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **37**, 609-61.
- Rutgers T, Salerno-Rife T, Kaesberg P. (1980): Messenger RNA for the coat protein of *Southern bean mosaic virus*. Virology, **74**, 506-509.
- Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Wiley, Cold Spring, Harbor NY.
- Singh A M and Panda A K. (2005): Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. J Bioscience Bioeng. **99**, 303-10.
- Treder K and Lewosz J. (2001): Production of antibodies against Potato leafroll virus coat protein expressed in *Escherichia coli* as an antigen. Proceedings of 'The 11th EAPR Virology Section Meeting', Trest, Czech Republic, 62-64.
- Vaira A M, Vecchiati M, Masenga V, Accotto G P. (1996): A polyclonal antiserum against recombinant viral protein combines specificity and versatility. J. Virol. Methods **56**, 209-219.

Vera A, Gonzalez-Montalban N, Aris A, Villaverde A. (2007): The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnol Bioeng*, **96**, 1101-1106.

4. Conclusão Geral

A expressão da CP recombinante do SBMV em *E. coli* a baixas temperaturas (25°C) permitiu a produção de corpos de inclusão contendo proteínas capsidiais recombinantes com conformação semelhante as proteínas capsidiais nativas, confirmado por FT-IR. A utilização dos corpos de inclusão como antígeno demonstrou ser útil na produção de antissoro policlonal (anti-IB-CP) eficiente para os testes sorológicos em que houve a detecção do SBMV em plantas infectadas e do vírus purificado e a não reação com as amostras de plantas sadias. Portanto a utilização dos IB contendo proteínas recombinantes virais para a imunização de coelhos é uma abordagem nova e muito promissora na produção de anticorpos policlonais para diagnoses virais em plantas.

5. Referências Bibliográficas

BARLOW, D. J.; EDWARDS, M.S.; THORNTON, J. M. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature*, v. 322 (6081). p. 747-748, 1986.

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

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

BOWDEN, G. A. & PAREDES, A. M., GEORGIOU, G. Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Bio/Technology*, v. 9, p.725-730, 1991,.

BRUGIDOU, C.; HOLT, C.; NGON A YASSI, M.; ZHANG, S.; BEACHY, R.; FAUQUET, C. Synthesis of an infectious full-length cDNA clone of *Rice yellow mottle virus* and mutagenesis of the coat protein. *Virology*, v. 206, p. 108-115, 1995.

CARETTE, J. E.; VAN LENT, J.; MAC FARLANE, S. A.; WELLINK, J. VAN KAMMEN, A. Cowpea mosaic virus 32-and 60 kilodalton replication proteins target and change the morphology of endoplasmatic reticulum membranes. *Journal of Virology*, v. 76 (12), p. 2313-2320, 2002.

CARRIO, M. M., CUBARSI, R.; VILLAYERDE, A. Fine architecture of bacterial inclusion bodies. FEBS Letter v. 471, p. 7-11, 2000.

CLARCK, E.D. Refolding of recombinant proteins. Current Opinion in Biotechnology v. 9, p. 157-163, 1998.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), 2011. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/>> Acesso em: 20 de janeiro de 2011.

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

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

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

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

DATAR, R. V.; CARTWRIGHT, T.; ROSEN, C. G. Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. Bio/Technology 11: 349-357, 1993.

DEN BOON, J. A.; CHEN, J. AHLQUIST, P. Identification of sequences in *Brome mosaic virus* replicase protein 1a that mediate association with endoplasmatic reticulum membranes. *Journal of Virology*, v. 75 (24), p. 12370-12381, 2001.

Dill, K.A. & Shortle, D. Denatured states of proteins. *Annual Review of Biochemistry* v. 60, p.795-825, 1991.

EDWARDSON, J. R.; CHRISTIE, R. G., PURCIFICFULL, D. E.; PETERSEN, M. A., Inclusions in diagnosing plant virus diseases. In: Matthews, R. E. F. (Ed). *Diagnosis of Plant viruses*. Boca Raton: Florida, CRC Press, 1993.

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

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

FAHNERT, B., LILE, H.; NEUBAUER, P. Inclusion bodies: formation and utilization. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 89: 93-142. 2004.

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

FISCHER, B., SUMMER, I. & GOODENOUGH, P. Isolation, renaturation and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *E. coli* as inclusion bodies. *Biotechnology and Bioengineering* v.41, p. 3-13, 1993.

GAMEZ, R. Lãs enfermedades virales como factores limitantes em la produccion de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) em América latina. *Fitopatologia*, v. 12, p. 24-26, 1977.

GASPARIN, M. D. G. Detecção e caracterização parcial de um isolado do Vírus do Mosaico do Feijoeiro do Sul do Paraná. Maringá, 2002. 41f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Maringá.

GEORGIU, G. & VALAX, P. Isolating inclusion bodies from bacteria. *Methods in Enzymology* 309: 48-58, 1999.

Goldsby, R.A., Kindt, T. J., Kuby J., Osborne B. A.: *Immunology*. Fifth edition. New York: W. H. Freeman; 2002.

GORBALENYA, A. E.; KOONIN, E.V.; BISOV, V. M.; DONCHENKO, A. P. Sobemovirus genome appears to encode a serine protease related to cysteine proteases of picornaviruses. *FEBS Letter*, v. 236, p. 287-290, 1988.

GOSH, A.; DASGUPTA, R.; SALERNO-RIFE, T.; RUTGERS, T.; KAESBERG, P. *Southern bean mosaic virus* has a 5'-linked protein but lacks 3' terminal poly(A). *Nucleic Acids Research*, v. 7, p. 2137-2146, 1979.

GOSH, A.; RUTGERS, T.; AMNG, K. Q.; KAESBERG, P. Characterization of coat protein mRNA of *Southern bean mosaic virus* and its relationship to the genomic RNA. *Journal of Virology*, v. 39, p. 87-92, 1981

HACKER, D. L. Identification of coat protein binding site on *Southern bean mosaic virus* RNA. *Virology*, v. 207, p. 562-565, 1995.

HACKER, D. L.; SIVAKUMARAN, K., Mapping and expression of *Southern bean mosaic virus* genomic and subgenomic RNAs. *Virology*, v. 234, p. 317-327, 1997.

HULL, R. The Sobemovirus group. In: *The Plant Viruses. Polyhedral virions with monopartite genomes* (Koenig R., ed.), Plenum Press, v.3, p. 113-146, 1988.

HULL, R. & FARGUETTE, D. Genus *Sobemovirus*. In: *Virus Taxonomy: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, California, USA, 2005.

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

JEVSEVAR, S.; GABERC-POREKAR, V.; FONDA, I.; PODOBNIK, B.; GRDADOLNIK, J.; MENART, V. Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. *Biotechnology Progress* v. 21, p. 632-639, 2005.

KANE, J. F. & HARTLEY, D. L. Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. Trends in Biotechnology v. 6, p. 95-101, 1988.

KHAN, R.H.; APPARAO, K.B.C.; ESHWARI, A.N.S.; TOTEY, S.M.; PANDA, A.K. Solubilization of recombinant ovine growth hormone with retention of native-like secondary structure and its refolding from inclusion bodies of *Escherichia coli*. Biotechnology Progress v. 14, p. 722-728, 1998.

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

KOONIN, E. V. The phylogeny of RNA-dependent RNA-polymerases positive-strand RNA viruses, Journal of General Virology, v. 72, p. 2197-2206, 1991.

KOONIN, E., V. AND DOLJA, V., V. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, v 28, p. 375-430, 1993.

KREISBERG, J. F., BETTS, S. D., HAASE-PETTINGELL, C.; KING, J. The interdigitated beta-helix domain of the P22 tail-spike protein acts as a molecular clamp in trimer stabilization. Protein Science v. 11, p. 820-830, 2002.

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

LILIE, H.; SCHWARZ, E.; RUDOLPH, R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. Current Opinion in Biotechnology v. 9, p. 497-501, 1998.

LOKESH, G. L.; GOPINATH K., SATHESHKUMAR P. S.; SAVITRI H. S. Complete nucleotide sequence of *Sesbania mosaic virus*: a new virus species of the genus Sobemovirus. Archives of Virology, v. 146, p. 209-223, 2001.

MÄKINEN, K., TAMM, T., NAESS, V., TRUVE, E. PUURAND, U. MUNTHE, T. AND SAARNA, M. Characterization of *Cocksfoot mottle virus* genomic RNA and sequence comparisons with related viruses. Journal of General Virology, v. 76, p. 2817-2825, 1995.

MANG, K. Q.; GOSH, A.; KAESBERG. P. A comparative study of the cowpea and bean strains of *Southern bean mosaic virus*. Virology, v. 116, p264-274, 1982.

MATSUO, H.; KOHNO, K.; NIIHARA, H.; MORITA, E. Specific IgE Determination to Epitope Peptides of {omega}-5 Gliadin and HighMolecular Weight Glutenin Subunit Is a Useful Tool for Diagnosis of Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis. J Immunol 2005, v. 175(12), p. 8116-8122.

MATTHEWS, R. E. F., (1991): Plant Virology, 3rd ed. Academic Press, London.

MEIER, M. & TRUVE, E. Sobemoviruses possess a common CfMV-like genomic organization. Archives of Virology, v. 152, p. 635-640, 2007.

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

MOORIS-KRSINICH, B. A. M. AND HULL, R. Translation of *Turnip rosette virus* RNA in rabbit reticulocyte lysate and wheat germ extract. Virology, v. 114, p. 98-112, 1981.

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

MUTASA-GOTTGENS, E. S.; CHWARSZCZYNSKA, D. M.; HALSEY, K.; ASHER M. J. C., Specific polyclonal antibodies for the obligate plant parasite Polymyxa a target recombinant DNA approach. Plant Pathol. V. 49, p. 276-287, 2000.

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

Ozato Jr, T., Gaspar, J.O. & Belintani, P. Completion of the nucleotide sequence of a Brazilian isolate of Southern bean mosaic vírus. Journal of Phytopathology, v. 157 (9), p. 573-575, 2009.

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

PRZYBYCIEN, T.M., DUNN, J.P., VALAX, P. & GEORGION, G. Secondary structure characterization of β -lactamase inclusion bodies. *Protein Engineering*, v. 7, p. 131-136, 1994.

REVIL, P. A.; DAVIDSON, A. D. AND WEIGHT, P. J. The nucleotide sequence and genome organization of *Mushroom bacilliform virus*: a single-stranded RNA virus of *Agaricus bisporus* (Lange). *Virology*, v. 202, p. 904-911, 1994.

RINAS, U. & BAILY, J.E. Protein composition analysis of inclusion bodies produced in recombinant *E. coli*. *Applied Environmental Microbiology* v. 59, p. 561-566, 1992.

RUDOLPH, R. & LILIE, H. *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB Journal* v. 10, p. 49-56, 1996.

RUTGERS, T.; SALERNO-RIFE, T.; KAESBERG, P. Messenger RNA for the coat protein of *Southern bean mosaic virus*. *Virology*, v. 104, p.506-509, 1980

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

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

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

SATHESHKUMAR, P. S.; LOKESH, G. L.; SAVITRI. H. S., Polyprotein processing: cis and trans proteolytic activities of *Sesbania mosaic virus* serine protease. *Virology*, v. 318 (1), p. 429-438, 2004.

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

SHEPHERD, R. J., Southern bean mosaic virus. In: *Description of Plant Viruses*. Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists Kew, Surrey, England, n° 57, 1971.

SINGH A M AND PANDA A K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Bioscience Bioeng.* v. 99, p. 303-10, 2005

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

SPEED, M.A., WANG, D.I.; KING, J. Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition. *Nature Biotechnology* v. 14, p. 1283-1287, 1996.

SØRENSEN, H. P. & MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* v. 4, p. 1-8, 2005

TAMM, T; MÄKINEN, K. AND TRUVE, E. Identification of genes encoding for the *Cocksfoot mottle virus* proteins, *Archives of Virology*, v. 144, p. 1557-1567, 1999.

TAMM, T. AND TRUVE, E. Sobemoviruses. *Journal of Virology*, v. 74, p. 6231-6241, 2000.

TEGONI, M.; SPINELLI, S.; VERHOEYEN, M.; DAVIS, P.; CAMBILLAU, C. Crystal structure of a ternary complex between human chorionic gonadotropin (hCG) and two Fv fragments specific for the alpha and beta-subunits. *J Mol Biol* 1999, v. 289(5), p.1375-1385.

UMETSU, M., TSUMOTO, K., ASHISH, K., NITTA, S., TANAKA, Y., ADSCHIRI, T. & KUMAGAI, I. Structural characteristics and refolding of in vitro aggregated hyperthermophilic archaeon proteins. *FEBS Letter*. V. 557, p. 49-56, 2004.

VALLEJO, L.F. & RINAS, U. Strategy for recovery of active protein through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories* v. 3, p. 2-12, 2004.

TAYLOR, G.; HOARE, M.; GRAY, D.R.; MARSTON, F.A.O. Size and density of protein inclusion bodies. *Bio/Technology* v. 4, p. 553-557, 1986.

VALAX, P. & GEORGION, G. Molecular characterization of β -lactamase inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. 1. Composition. *Biotechnology Progress* v. 9, p.539-547, 1993.

VAN DER WILK, F.; HUISMAN, M. J.; CORNELISSEN, B. J.; HUTTINGA, H. AND GOLDBACH, R. Nucleotide sequence and organization of *Potato leafroll virus* genomic RNA. *FEBS Letter*, v. 245, p. 51-56, 1989.

VAN DER WILK, F.; VERBEEK, M.; DULLEMANS, A. M. AND VAN DEN HEUVEL, J. F. J. M. The genome linked-protein of potato leafroll virus is located downstream of the putative protease domain of the ORF 1 product. *Virology*, v. 234, p. 300-303, 1997.

VAN DER WILK, F.; VERBEEK, M.; DULLEMANS, A.; VAN DEN HEUVEL, J. F. J. M.; The genome-linked protein (VPg) of Southern bean mosaic virus is encoded by the ORF2. *Virus Genes*, v. 17, p. 21-24, 1998.

VILLAVERDE, A. & CARRIO, M. M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters* v. 25, p. 1385-1395, 2003.

VOINNET, O.; PINTO, Y. M. AND BAULACOMBE, D. C. Supression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of National Academy of the Science*, v. 96, p. 14147-14152, 1999.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks-2003. *Nature Biotechnology* v. 21, p. 865-870, 2003.

WEBBER, K. A.; SEHGAL, O. P. Subgenomic RNAs in virions of *Southern bean mosaic virus*. *Phytopathology*, v. 72, p. 909-913, 1982.

WOBUS, C. E.; SKAF, J. S.; SCHULTZ, M. AND DE ZOETEN, G. A. Sequencing genomic localization and initial characterization of the VPg of *Pea enation mosaic anamovirus*. *Journal of General Virology*, v. 79, p. 2023-2025, 1998.

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

XIONG, Z. AND LOMMEL, S. A. The complete nucleotide sequence and genome organization of *Red clover necrotic mosaic virus* RNA-1. *Virology*, v. 171, p. 543-554, 1989.

YASSI, M. N.; RITZENTHALER, C.; BRUGIDOU, C., FAUQUET, C. AND BEACHY, R. N. Nucleotide sequence and genome characterization of *Rice yellow mottle virus* RNA. *Journal of General Virology*, v.75, p. 249-257, 1994.

ZAVRIEV, S. K.; HICKEY, C. M. AND LOMMEL, S. A. Mapping of the *Red clover necrotic mosaic virus* subgenomic RNA. *Virology*, v. 216, p. 407-410, 1996.

ZERBINI JR., F. M., DE CARVALHO, M. G. E ZAMBOLIM, E. M. (2002)
Introdução à virologia. Viçosa: UFV, 2006