

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

CÂMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE DA GLICOPROTEÍNA
S1 DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA EM *PICHIA*
*PASTORIS***

Mariana Costa Mello Gonçalves

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro - 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

CÂMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE DA GLICOPROTEÍNA
S1 DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA EM *PICHIA*
*PASTORIS***

Mariana Costa Mello Gonçalves

Orientador: Prof. Dr. Hélio José Montassier

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro – 2009

Gonçalves, Mariana Costa Mello
G635c Clonagem e expressão do gene da glicoproteína S1 do Vírus da
Bronquite Infecciosa em *Pichia pastoris* / Mariana Costa Mello
Gonçalves - - Jaboticabal, 2009
xiii, 63 f.; il.; 28 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Hélio José Montassier
Banca examinadora: José Moacir Marin, Camillo Del Cistia
Andrade
Bibliografia

1. Biotecnologia- clonagem e expressão. 2. *Pichia pastoris*. 3. VBI.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8: 616.988.73

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MARIANA COSTA MELLO GONÇALVES -

nascida em 10 de janeiro de 1985, em São Paulo, SP, graduou-se em Ciências Biológicas, modalidade Licenciatura, pela Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, câmpus de Jaboticabal, em 30 de novembro de 2006.

“No fim tudo dá certo. Se não deu certo, é porque ainda não chegou ao fim.”
(Fernando Sabino)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todos os problemas que pareciam sem solução, por todas as expectativas não confirmadas, por todas as tentativas que pareceram tempo perdido...só o Senhor sabe o caminho para me fazer crescer e aprender cada vez mais.

A família que Deus me deu, obrigada pela compreensão e apoio, todo o esforço é por vocês.

Ao Prof^o Hélio José Montassier, obrigada pelo exemplo, a forma mais sublime de ensinar.

A banca examinadora : **Prof^o Dr^o José Moacir Marin e Dr^o Camillo Del Cistia Andrade**, obrigada pelas correções e sugestões que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

A Prof^a Dr^a Adolorata Ap. Bianco Carvalho e Prof^a Dr^a Maria Inês T. Ferro, membros da banca do exame de qualificação, obrigada pela contribuição e atenção.

Aos meus anjos sem asas: Rosketa, Jagunça, Migalha, Rafa, Zeni, Aline, Pedrinho, Lucas: que bom que vocês existem e sempre estão ao meu lado.

A família Imunovir: Aliandra, Aline, Camila, Cíntia, Maria de Fátima, obrigada por não terem me deixado desistir quando eu não via outra saída, é uma honra conviver com vocês!

A Maria de Lourdes, obrigada por todas as técnicas ensinadas, principalmente as de como viver melhor.

Aos funcionários e professores do Departamento de Patologia Veterinária, obrigada por toda a colaboração e boa vontade.

Aos funcionários da sessão de Pós-Graduação, obrigada pelas orientações sempre dadas de forma tão gentil.

Aos funcionários da Biblioteca da Unesp, câmpus Jaboticabal, obrigada pelas informações e correções.

A **Merial** pelos ovos fornecidos.

A **Capes**, obrigada pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Glicoproteína S.....	3
2.2 Diagnóstico da Bronquite Infecciosa	6
2.3 Controle da Infecção pelo VBI.....	8
2.4 Sistema <i>Pichia pastoris</i> para clonagem e expressão de proteínas heterólogas.....	9
2.4.1 Vetores de expressão para o sistema <i>P. pastoris</i>	10
2.4.2 Promotor pFLD1	12
2.4.3 Condições de cultivo	13
2.4.4 Secreção de proteínas heterólogas.....	14
III. OBJETIVOS	15
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Propagação Viral.....	16
4.2 Oligonucleotídeos iniciadores.....	16
4.3 Extração do RNA viral	17
4.4 Clonagem do gene da glicoproteína S1 em <i>E. coli</i> DH10b.....	17
4.5 Expressão da proteína recombinante S1 em <i>P. pastoris</i> linhagem GS115.....	19
4.5.1 Linhagem de <i>P. pastoris</i>	19
4.5.2 Linearização e purificação do plasmídeo recombinante	20
4.5.3 Eletroporação em <i>P. pastoris</i>	20
4.5.4 Indução da expressão da glicoproteína S1 do VBI.....	21
4.6 Separação das proteínas do extrato bruto da levedura recombinante	21
4.7 Análise da proteína S1 expressa por SDS e Western blotting	22
4.8 Delineamento experimental para determinar o perfil de crescimento na fase de pré indução.....	23
4.9 Delineamento experimental para determinar o perfil de crescimento na fase de indução.....	24
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Extração de RNA e amplificação do cDNA.....	26
5.2 Otimização da amplificação do gene da glicoproteína S1	27
5.3 Pré-clonagem do gene da glicoproteína S1 com o vetor pGem T Easy em células de <i>Escherichia coli</i>	28
5.4 Clonagem do gene da glicoproteína S1 com o vetor pFLD α em células de <i>Escherichia coli</i> DH10b	29
5.5 Sequenciamento do inserto gênico extraído dos clones bacterianos transformados	32
5.6 Expressão do gene da glicoproteína S1 em <i>P. pastoris</i> GS115.....	35

5.7 Extração e quantificação do extrato protéico total intracelular e extracelular das células de leveduras transformadas pelo vetor pFLD α	36
5.8 Análise dos extratos protéicos totais intracelulares e extracelulares pelas técnicas de SDS-PAGE e Western Blotting.....	37
5.9 Perfil de crescimento da levedura <i>P. pastoris</i> durante a fase de pré-indução.....	38
5.10 Perfil de crescimento da levedura <i>P. pastoris</i> durante a fase de indução	40
VI.CONCLUSÕES.....	47
VII.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
VIII APÊNDICES	56
8.1 Soluções estoque.....	57
8.1.1 YNB 17%.....	57
8.1.2 Biotina 2%	57
8.1.3 Histidina 0,4%	57
8.1.4 Dextrose (D-Glicose) 20%.....	57
8.1.5 Metanol 50%	57
8.1.6 Glicerol 10%.....	57
8.1.7 Ampicilina [20mg/mL]	58
8.1.8 Tampão Fosfato de Potássio 1M, pH 6,0	58
8.1.9 Sorbitol 1M	58
8.1.10 Sulfato de Amônio 10%.....	58
8.1.11 Tampão de lise para <i>Pichia pastoris</i>	58
8.2 Meios de cultura	59
8.2.1 Meio LB Sólido com ampicilina.....	59
8.2.2 Meio LB Líquido com ampicilina.....	59
8.2.3 Meio YPD Líquido.....	59
8.2.4 Meio YPD Sólido	60
8.2.5 Meio YPDS Líquido com zeocina	60
8.2.6 Meio YPDS Sólido com zeocina.....	61
8.2.7 Meio MGA	61
8.2.8 Meio MMA	62
8.2.9 Meio BMGH.....	62
8.2.10 Meio BMMH.....	63

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 01: Principais componentes do vetor pFLD α (Invitrogen) e suas funções.....11

Tabela 02. Quantidade de proteína total obtida pelo método de Bradford (em mg/L), após indução da expressão da glicoproteína recombinante S1, expressa intracelularmente e secretada no sobrenadante da cultura após 24h, 48h, 72h e 96h de indução de expressão em meios de composição definida (MMA) e complexa (BMMH).....43

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 01: Esquema do Vírus da Bronquite Infecciosa das galinhas.....	4
Figura 02: O caminho do metanol em <i>P. pastoris</i> . 1-álcool oxidase, 2-catalase, 3-formaldeído desidrogenase, 4-fomato desidrogenase, 5-diidroxiacetona sintase, 6-diidroxiacetona quinase, 7-frutose-1,6-bifosfato aldolase, 8-frutose 1,6-difosfatase.....	10
Figura 03: Mapa do vetor pFLD α (Invitrogen).....	11
Figura 04. Mapa do vetor pGem-T Easy (Promega) utilizado para a clonagem do gene da glicoproteína S1 em células de <i>E. coli</i>	18
Figura 05: Amplificação do gene da glicoproteína S1 a partir da extração de RNA de suspensão viral da estirpe M41 do VBI após reação de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos.....	26
Figura 06: Quantificação em gel de agarose do produto amplificado após purificação, utilizando o padrão Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).....	27
Figura 07 Gradiente de temperaturas para otimização da amplificação do gene codificador da glicoproteína S1 do VBI.....	28
Figura 08: DNA plasmidial amplificado após reação de PCR com combinação de oligonucleotídeos do gene da glicoproteína S1 do VBI e do vetor pGem-T Easy (Promega).....	29
Figura 09: DNA plasmidial extraído de células de <i>E. coli</i> utilizando o Kit Wizar Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).....	30

Figura 10: Dna plasmidial extraído de células de <i>E. coli</i> após reação de digestão com as enzimas Sac II e Pml I	30
Figura 11: Quantificação do material necessário para a clonagem no vetor pFLD α	31
Figura 12. Visualização dos “scores” dos nucleotídeos seqüenciados do clone de <i>E.coli</i> obtidos através do BLAST no site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi	33
Figura 13 Alinhamento entre a seqüência nucleotídica completa do gene da nucleoproteína do novo isolado de campo no Brasil IBVPR05 do VBI clonado no vetor pGEM- T Easy (Query) com o mesmo gene da estirpe de referência M41 do VBI depositado no Gene Bank (Sbjct) e identificado sob o número de acesso DQ834384.....	34
Figura 14: Quantificação em gel de agarose do vetor pFLD α ligado ao gene da glicoproteína S1 após linearização com a enzima Cla I (Invitrogen).....	36
FIGURA 15: Análise nas técnicas de SDS-Page(A) e Western-Blotting (B), da proteína recombinante S1 expressa em <i>Pichia pastoris</i>	38
Figura 16: Avaliação do perfil de crescimento da levedura <i>Pichia pastoris</i> GS 115 contendo apenas o vetor pFLD α , sem o gene da glicoproteína S1, na fase de enriquecimento de biomassa em meios de composição mínima (A) e de composição complexa (B).....	40
Figura 17: Avaliação do perfil de crescimento da levedura <i>Pichia pastoris</i> GS 115 contendo apenas o vetor pFLD α (GS115+pFLD α) e da levedura contendo o inserto gênico da glicoproteína S1 do VBI (GS115+pFLD α + S1) durante o processo de indução	

que inclui a fase de suplementação com glicerol (0-36 horas) e indução da expressão com metanol (0-96 horas), em meio de composição mínima (A) e complexa (B).....42

FIGURA 18: Análise na técnica de Western Blotting da proteína recombinante S1, fração intracelular, expressa em *Pichia pastoris* após cultivo em meio de composição definida.....45

LISTA DE ABREVIATURAS

AOX: Álcool oxidase

BI: Bronquite Infecciosa

BMGH: Buffered Glycerol Complex Medium with Histidine

BMMH: Buffered Methanol Complex Medium with Histidine

DHAS: Diidroxiacetona sintase

E. coli: *Escherichia coli*

ELISA: Enzyme Linked Imunossorbent assay

FLD: Formaldeído desidrogenase

HVR: Regiões hipervariáveis

LCA: Líquido cório alantóide

MCS: Sítio de clonagem múltipla

MGA: Minimal Glycerol with Ammonium Sulfate Medium

MMA: Minimal Methanol with Ammonium Sulfate Medium

MUT⁺: Methanol utilization plus

ORF: Open Reading Frame

PBS: Salina tamponada com fosfato

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PMSF: Phenylmethysulfonyl fluoride

RT: Transcrição reversa

SPF: Specific Pathogen Free

VBI: Vírus da Bronquite Infecciosa

VN: Vírus neutralização

YNB: Yeast Nitrogen Base with ammonium sulfate and without amino acids

YPD: Yeast Extract Peptone Dextrose Medium

YPDS: Yeast Extract Peptone Dextrose Medium with Sorbitol

Clonagem e expressão do gene da glicoproteína S1 do Vírus da Bronquite Infecciosa em *Pichia pastoris*

RESUMO: A glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa (VBI) além de ser altamente variável é responsável pela adsorção com os receptores das células hospedeiras e pela indução de anticorpos vírus-neutralizantes e inibidores da hemaglutinação em galinhas. A disponibilidade desse tipo de proteína pode contribuir com o imunodiagnóstico e com a imunoprofilaxia da bronquite infecciosa aviária. O presente estudo foi conduzido com a finalidade de fazer a clonagem e a expressão do gene da glicoproteína S1 derivada da estirpe M41 do VBI no sistema constituído pelo vetor pFLD α – *Pichia pastoris*. O cDNA completo do gene S1 foi preparado a partir do RNA extraído do líquido alantóide infectado com a estirpe M41 do VBI e o amplicon obtido pela PCR foi clonado no vetor de expressão pFLD α . O plasmídeo foi linearizado e usado na transformação da linhagem GS115 de *Pichia pastoris* por eletroporação. Foi avaliada a influência da composição do meio de cultura sobre a produção de biomassa e a expressão da proteína recombinante S1 durante a fase de indução. A produção da proteína S1 recombinante foi detectada somente no compartimento intracelular, embora o vetor pFLD α seja capaz de direcionar a síntese de uma proteína heteróloga para a via secretora. A proteína recombinante foi caracterizada imunoquimicamente como uma banda de aproximadamente 90 kDa e com reatividade específica para os anticorpos monoclonais anti-poli-histidina. Concluindo, o sistema hospedeiro de células da levedura *P. pastoris* com o vetor pFLD α usado nesse estudo comprovou ser um método eficaz para a produção no compartimento intracelular da proteína recombinante S1 da estirpe M41 do VBI, com potencial para futura utilização em técnicas de imuno-diagnóstico da bronquite infecciosa aviária.

Palavras-chave: Clonagem, expressão, *Pichia pastoris*, VBI, Glicoproteína S1.

Cloning and expression of the S1 glycoprotein gene of infectious bronchitis virus in *Pichia pastoris*

SUMMARY: The glycoprotein (S1) of infectious bronchitis virus (IBV) has been shown to be highly variable and responsible for attachment to the receptor in host cellular membrane, induction of neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibodies in chickens. Thus, the availability of such protein can contribute to the immuno-diagnosis and immunoprophylaxis of avian infectious bronchitis. The present study was carried out aiming to clone and to express the gene of S1 glycoprotein from M41 strain of IBV in the system constituted by pFLD α vector – *Pichia pastoris*. Full length cDNA of IBV S1 glycoprotein was prepared from RNA extracted from infected allantoic fluid and the amplicon generated by PCR was cloned into yeast expression vector pFLD α to construct the plasmid of pFLD α - S1 - IBV. This plasmid was linearized and then transformed in *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. The recombinant yeast clones were cultivated and selected. The influence of media composition on biomass and in the production of recombinant S1 during induction phase was studied. The production of recombinant S1 protein was detected only in the intra-cellular compartment, though the pFLD α vector would direct the synthesis for the secretor pathway. The recombinant protein was characterized by SDS-PAGE and Western-Blotting as a band of a molecular weight of approximately 90 kDa with specific reactivity against anti-Histidina monoclonal antibodies. The use of complex media promotes an increase in biomass, but no soluble S1 recombinant protein was produced. Concluding, the yeast system composed by pFLD α - *P. pastoris* was efficient to express intra-cellularly the recombinant S1 protein of M41 strain of IBV which has a potential to be used in the immuno-diagnosis of avian infectious bronchitis.

Keywords: Cloning, expression, *Pichia pastoris*, VBI, S1 Glicoprotein.

I. INTRODUÇÃO

A bronquite infecciosa das galinhas é uma doença aguda e altamente contagiosa que acomete aves da espécie *Gallus gallus*, caracterizada primariamente por sintomas e lesões no trato respiratório e genito-urinário. Essa enfermidade tem um significativo impacto econômico pela perda na produção, pouco ganho de peso das aves, diminuição na qualidade dos ovos, aumento da mortalidade, além de gastos com medicamentos para controlar infecções bacterianas secundárias.

O vírus da bronquite infecciosa (VBI), patógeno causador da Bronquite Infecciosa, dissemina-se com rapidez e facilidade entre as espécies de aves susceptíveis. Esse vírus possui elevada variabilidade genética e antigênica em decorrência das mutações e recombinações. No campo, isso leva a um isolamento contínuo de novas estirpes variantes desse vírus, causando a quebra da imunidade conferida pelas estirpes vacinais. Seu genoma é formado por RNA de fita simples, não segmentado, de polaridade positiva e com aproximadamente 27,6 Kb para codificar três proteínas principais: a nucleoproteína (N), a glicoproteína da matriz (M) e a glicoproteína (S) que é composta por duas subunidades, S1 e S2.

A proteína S1 do Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (VBI) é a principal indutora da resposta imune-protetora contra a infecção pelo vírus e é um dos principais alvos antigênicos de testes de imunodiagnóstico que são destinados à identificação e caracterização de amostras do VBI. Já foram produzidas preparações da proteína S1 recombinante utilizando batatas transgênicas, adenovírus, baculovírus e poxvírus. A possibilidade de fazer a clonagem, a expressão e a caracterização da glicoproteína S1 do VBI, abre perspectivas interessantes com grande potencial de ser aplicada no imunodiagnóstico da infecção causada por esse vírus, ou no monitoramento da imunidade humoral induzida após a administração de vacinas contra a bronquite infecciosa.

As células da levedura *Pichia pastoris* constituem-se em um dos sistemas hospedeiros mais utilizados e bem sucedidos para a expressão de proteínas heterólogas, seja no âmbito acadêmico ou industrial. Uma grande vantagem dessa levedura está relacionada ao fato de ela combinar a capacidade de crescer em meio mínimo a altas densidades celulares com baixos níveis de secreção de proteínas endógenas, e a habilidade de secretar proteínas heterólogas eficientemente simplificando sua recuperação. Ademais, este sistema consegue processar a maioria das modificações pós traducionais requeridas por proteínas maiores ou de composição mais complexa, tais como dobramento das cadeias polipeptídicas, processamento proteolítico, formação de pontes dissulfeto e glicosilação, conservando as características antigênicas das proteínas possibilitando sua aplicação em ensaios diagnósticos e vacinas.

Recentemente esta levedura foi usada como um eficiente sistema para a produção de diversas proteínas virais como a glicoproteína Tipo 1 do herpesvírus bovino, o antígeno nuclear do vírus da Hepatite B e C, a proteína Gag do vírus da Imunodeficiência adquirida tipo 1 (HIV-1), a glicoproteína de envelope do vírus da dengue tipo 2 e a proteína VP2 do vírus da doença infecciosa da bursa

Em vista da importância em patologia e sanidade avícola do VBI, da carência de meios mais rápidos, precisos e acessíveis de diagnóstico laboratorial da infecção por ele causada, propôs-se a clonagem e expressão da proteína S1 em células de leveduras *Pichia pastoris*, que pode se constituir em uma alternativa interessante e eficiente para a geração de um importante antígeno, de potencial aplicação como é a proteína S1.

II. REVISÃO DE LITERATURA

A bronquite infecciosa foi descrita pela primeira vez por SCHALK & HAWN (1931) na cidade Dakota do Norte, EUA, espalhando-se rapidamente por todo o país (COOK et al, 1996). No Brasil, foi diagnosticada pela primeira vez no ano de 1957 no estado de Minas Gerais (HIPOLITO, 1957).

A importância econômica dessa doença decorre da diminuição na produção e qualidade interna e externa dos ovos, diminuição da eclodibilidade, diminuição do ganho de peso e aumento da mortalidade, além dos gastos com medicamentos para debelar infecções bacterianas secundárias. (PENA et al, 2005).

O agente etiológico da bronquite infecciosa é o Vírus da Bronquite Infecciosa (VBI), que pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae* e está classificado no gênero *Coronavírus*. É um vírus pleomórfico, embora predominem as formas esféricas. Seu genoma é formado por RNA de fita simples, não segmentada, de polaridade positiva e com aproximadamente 27,6 Kb (PENA et al., 2005). Codifica a produção das proteínas estruturais mais importantes: a nucleoproteína (N) de capsídeo, com cerca de 52 a 54 kDa; a glicoproteína de membrana (M) com cerca de 27 kDa e a glicoproteína de superfície do envelope viral (S) a qual é clivada pós traducionalmente em S1 (84 kDa) e S2 (82 kDa), além de uma pequena proteína E (LAI & CAVANAGH, 1997; MONEIN et al., 2006).

2.1. Glicoproteína S

Foi demonstrado que o gene da glicoproteína S consiste de aproximadamente 3400 a 3500 nucleotídeos e codifica uma proteína de 1145 a 1157 resíduos de aminoácidos. Esta proteína é clivada após a tradução em S1, com 520 a 532 resíduos de aminoácidos, compreendendo desde a extremidade aminoterminal para uma região mais central da molécula e, em S2 com 625 resíduos de aminoácidos, que se distribui desde essa região mediana do polipeptídeo S até a extremidade carboxi-terminal dessa mesma molécula (NIESTERS et.al., 1986).

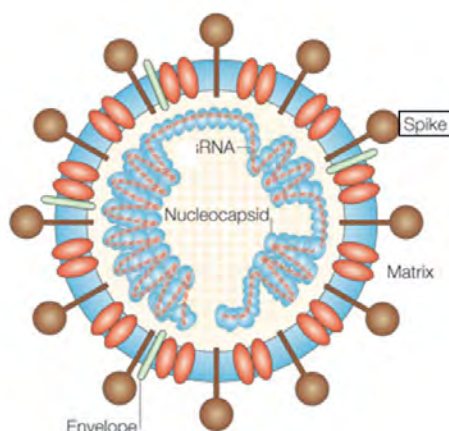


Figura 01: Esquema do Vírus da Bronquite Infecciosa das galinhas.

Essas glicoproteínas encontram-se intimamente associadas com o envelope viral, sendo que a subunidade S2 fixa essa molécula na camada lipídica do envelope, enquanto a subunidade S1 está mais exposta na superfície viral e é responsável pela interação com receptores específicos presentes na superfície de células alvo da infecção pelo VBI para que ocorra a adsorção viral a tais células. As unidades S1 não estão fortemente associadas a S2 e há pontes dissulfeto intrapeptídicas, mas não interpeptídicas (CAVANAGH, 1993; CAVANAGH, 1995).

A unidade S1 pode ser removida por meio de tratamento com uréia, o que resulta na perda de infectividade e da atividade de hemaglutinação, como consequência da falha do vírus para adsorver-se às células alvo (CAVANAGH & DAVIS, 1986). Em síntese, foi verificado que a glicoproteína S1 possui um papel crucial em dois processos que são muito relevantes para a indústria avícola e se constituem nas principais funções biológicas da mesma. Primeiramente, porque é a principal indutora da resposta imune-protetora contra a infecção pelo VBI, constituindo-se em um dos principais alvos antigênicos nos testes de imuno-diagnóstico que são destinados à identificação e caracterização de amostras desse mesmo vírus (PENA et al., 2005; KOCH et al., 1990).

Ainda, nesse contexto, a glicoproteína S1 é a principal responsável pela geração de anticorpos vírus neutralizantes tendo sido demonstrado que a administração da

forma purificada dessa proteína foi capaz de estimular um estado de proteção contra o desafio com estirpe virulenta do VBI (WANG et al., 2002). Desse modo, foi constatado que essa glicoproteína pode ser usada na formulação de vacinas contra o VBI.

A propósito, as vacinas vivas e inativadas, por seu turno, que têm sido usadas para controlar a bronquite infecciosa apresentam algumas desvantagens, sobretudo por dependerem para a sua produção da propagação em ovos embrionados SPF ("specific pathogen free"), um sistema oneroso e com grandes restrições. Além disso, vacinas inativadas mostram-se bastantes seguras, mas tem um maior custo de produção e são menos efetivas do que as vacinas vivas, enquanto que estas últimas podem propiciar o surgimento de novas variantes do VBI (ZHOU et al., 2003), principalmente como resultado de pequenas mudanças de aminoácidos na glicoproteína S1 decorrentes de mutações, ou de recombinações (MONEIM et al., 2006; IGNJATOVIC & SAPATS, 2005; JOHNSON et al., 2003; SONG et al., 1998;).

Ademais, com o auxílio de técnicas de indução de mutantes do VBI com determinados anticorpos monoclonais neutralizantes contra esse vírus, foram mapeados os principais sítios antigênicos nessa glicoproteína. Dessa forma, foi verificado que a glicoproteína S apresenta oito sítios antigênicos mais importantes, sendo que seis estão presentes na subunidade S1, e são identificados por S1- A/B/C; que se encontram sobrepostos e S1-D, S1-E e S1-F. Já, na subunidade S2, localizam-se mais dois sítios antigênicos S2-G e S2-H. Foi relatado, também, que esses sítios antigênicos, com exceção de S1-F e S2-H, podem induzir a produção de anticorpos vírus-neutralizantes, sendo, portanto, críticos na definição dos diferentes sorotipos do VBI (CAVANAGH et al., 1984).

Em suma, deve ser destacado também que a glicoproteína S1 está envolvida com a infectividade viral e contém os principais epítomos vírus-neutralizantes, os quais são constituídos por determinadas seqüências de aminoácidos que conferem a especificidade de sorotipo a cada estirpe do VBI e, ainda, apresenta sítios responsáveis pela atividade hemaglutinante desse mesmo vírus (LAI e CAVANAGH, 1997; CAVANAGH, 1995). A glicoproteína S1 se caracteriza ainda por apresentar uma variabilidade acentuada em determinadas seqüências de aminoácidos de sua estrutura,

fenômeno este que foi identificado quando se fez a comparação dessas proteínas provenientes de diferentes estirpes européias e também de algumas estirpes pertencentes ao sorotipo Massachusetts (Mass) do VBI. Tais seqüências são denominadas de regiões hipervariáveis (HVR), tendo sido mapeadas 3 dessas regiões para a glicoproteína S1: a região HVR I, que é delimitada pelos resíduos 56-69 de aminoácidos, a região HVR II, compreendida entre os resíduos 117-131 de aminoácidos e a região HVR III, que se estende do resíduo 250 ao 386 de aminoácidos. Vários estudos têm demonstrado que todas essas três regiões estão diretamente associadas na interação com anticorpos vírus-neutralizantes e, por conseguinte constituem os determinantes sorotipo-específicos apresentados pelas diferentes estirpes do VBI (CAVANAGH, et al., 1984)

2.2- Diagnóstico da Bronquite Infecciosa

A variabilidade antigênica do VBI juntamente com os diferentes tropismos teciduais demonstrados por estirpes desse mesmo vírus, dificultam o diagnóstico e o controle da infecção por este patógeno (VILLEGAS, 1997). Dessa forma, para se alcançar um controle mais efetivo da bronquite infecciosa é necessário que seja feito um rápido e correto diagnóstico, notadamente uma identificação e caracterização mais precisa de seu agente etiológico. É imprescindível para isso o desenvolvimento de métodos rápidos, específicos e sensíveis de detecção e classificação das estirpes virais através de técnicas destinadas a otimização do sorodiagnóstico e do monitoramento da imunidade pós-vacinal contra o VBI ou da caracterização antigênica de novos isolados desse mesmo vírus.

Na busca de um maior aprimoramento das técnicas de diagnóstico laboratorial, sabe-se que o uso de anticorpos monoclonais e a aplicação das técnicas moleculares se constituem nos métodos mais avançados para este fim (PENA et al, 2005).

Ainda, no tocante aos métodos de sorodiagnóstico verifica-se que há vários procedimentos para serem aplicados, destacando-se os ensaios imunoenzimáticos em fase sólida (ELISA) que fornecem dados importantes sobre os níveis de anticorpos produzidos por aves infectadas ou vacinadas com o VBI. Em vista disso, a

disponibilidade de um polipeptídeo recombinante da glicoproteína S1 teria contribuições relevantes para o uso como antígeno na técnica de ELISA, e também na produção de anticorpos monoclonais direcionados contra fragmentos específicos da proteína S1 que podem detectar e distinguir estirpes do VBI (HU et al., 2007).

A técnica convencional para diagnosticar o VBI depende diretamente do isolamento viral em ovos embrionados SPF (GELB et al., 1991) ou em culturas celulares, seguido da identificação por meio da reação de vírus-neutralização (VN) (COOK, 1984).

Os métodos sorológicos mais utilizados no diagnóstico da BI são o teste de vírus-neutralização, de inibição de hemaglutinação e o ELISA que é realizado com anticorpos monoclonais ou policlonais (IGNJATOVIC & ASHTON, 1996).

Por outro lado, deve-se salientar que o diagnóstico rápido da infecção pelo VBI e a determinação do estado de imunidade contra esse mesmo vírus em um plantel de aves, são aspectos críticos para se conseguir uma melhor condição de controle da BI. Para tanto, foi comprovado que os testes sorológicos e, dentre estes, os ensaios imunoenzimáticos, quando realizados com reagentes e padrões apropriados, indicam com elevada acurácia, as concentrações de anticorpos específicos anti - VBI, podendo contribuir de forma relevante na avaliação e no monitoramento do estado imunitário em criações com grande número de aves (MARQUARDT et al., 1981; SNYDER et al., 1983).

Atualmente a suspensão purificada do VBI por ultra - centrifugação em gradiente de sacarose é rotineiramente usada para ser adsorvida, na primeira etapa da reação, ao suporte sólido (superfície da cavidade da microplaca), dentro do desenho dos atuais kits comerciais de ELISA. A purificação de partículas do VBI requer, por sua vez, a propagação freqüente desse vírus em sistemas de células eucarióticas, no caso específico desse vírus, em ovos embrionados SPF. Em adição a isso, os imuno-reagentes mais eficientes e confiáveis para serem usados nos ensaios imunoenzimáticos, exigem a utilização de preparações altamente purificadas desse vírus. Isso torna bastante difícil e oneroso os procedimentos para purificação de um vírus envelopado e com elevada labilidade de conservação da estrutura nativa dos seus mais

importantes antígenos; especialmente as glicoproteínas das espículas de superfície, como é o VBI (NDIFUNA et al., 1998, WANG et al., 2002).

Dentre os vários testes sorológicos para o VBI, o ELISA tem-se mostrado o mais sensível e o mais amplamente usado para o monitoramento dos plantéis avícolas, especialmente nas criações industriais de maior porte. Uma vez que o ELISA não é um ensaio sorotipo-específico para o VBI (MARQUADT et al., 1981), ele se torna apropriado para avaliar as respostas imunes induzidas por vacinas preparadas com diferentes sorotipos do VBI. O uso de kits comerciais de ELISA para a detecção de anticorpos é rotineiramente adotado em várias partes do mundo e, inclusive, no Brasil. Considerando-se que as microplacas dos kits comerciais de ELISA são adsorvidas com partículas virais inteiras do VBI, esses ensaios detectam anticorpos contra todos os principais antígenos desse vírus e já é reconhecido que a glicoproteína S1 é diretamente responsável pela interação com anticorpos vírus-neutralizantes e inibidores da hemaglutinação (KUSTERS et al., 1990). Dessa forma, se for possível revestir as cavidades das microplacas de ELISA apenas com a glicoproteína S1, os anticorpos detectados nessa reação poderiam apresentar uma maior correlação com aqueles que exercem atividade vírus-neutralizante, o que proporcionaria algumas informações adicionais biologicamente relevantes quando da aplicação desse tipo de técnica imunológica.

2.3 Controle da infecção pelo VBI

O controle da BI está principalmente fundamentado no uso de vacinas formuladas com estirpes "vivas" e atenuadas do VBI, ou ainda com estirpes inativadas associadas a adjuvantes oleosos. No entanto, a BI permanece, em vários países, inclusive no Brasil, como um dos problemas mais proeminentes para a sanidade avícola, mesmo com a ampla utilização das vacinas acima mencionadas, indicando a importância e a necessidade de que sejam procuradas algumas novas alternativas de preparações imunogênicas mais eficazes para fazer frente aos mecanismos de evasão desse vírus que não raro conduzem a ruptura do estado de imunidade conferido por essas vacinas nos hospedeiros imunizados. Assim, surtos de infecção pelo VBI

continuam ocorrendo em aves vacinadas, devido à baixa proteção cruzada conferida pelas estirpes vacinais em relação às variantes de campo, que constantemente estão surgindo em plantéis de aves comerciais (COOK, 1984; DAVELAAR et al, 1984; GELB et al, 1991; JIA et al., 1995; KING, 1988).

2.4- Sistema *Pichia pastoris* para clonagem e expressão de proteínas heterólogas

A base conceitual do sistema de expressão de *P.pastoris* vem da observação que algumas enzimas necessárias para o metabolismo do metanol estão presentes em níveis substanciais somente quando as células crescem em meio contendo metanol (EGLI et al., 1980). Estudos bioquímicos mostraram que a utilização de metanol requer um novo caminho metabólico envolvendo algumas enzimas únicas. A enzima álcool oxidase (AOX) catalisa o primeiro passo no caminho de utilização do metanol, a oxidação deste a formaldeído e peróxido de hidrogênio. AOX é armazenada dentro de peroxissomos somente com catalase, que degrada o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A porção formaldeído gerada pela AOX sai do peroxissomo e é mais oxidada para formar dióxido de carbono por duas desidrogenases citoplasmáticas, reações que são a fonte de energia das células crescendo em metanol. O formaldeído restante é assimilado para formar constituintes celulares por um caminho cíclico que se inicia com a condensação do formaldeído com xilulose-5-monofosfato, uma reação catalisada por uma terceira enzima peroxissomal a diidroxiacetona sintase (DHAS). Os produtos dessa reação, gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona saem do peroxissomo e entram em um caminho citoplasmático que regenera a xilulose-5-monofosfato. Duas das enzimas do caminho do metanol, AOX e DHAS estão presentes em altos níveis no crescimento celular em metanol mas não são detectáveis em células crescendo em outras fontes de carbono (glicose, glicerol, etanol). AOX constitui mais de 30% do total de proteínas solúveis da levedura (COUDERC et al., 1980; HARTNER & CLIEDER, 2006). As vias de processamento do metanol são mostradas na figura 02.

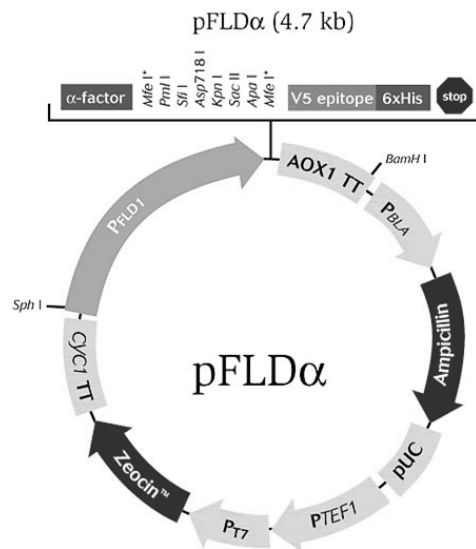


Figura 03: Mapa do vetor pFLDα (Invitrogen).

Tabela 01: Principais componentes do vetor pFLDα (Invitrogen) e suas funções.

Componente	Função
Promotor FLD1	Fragmento de 597 pb contendo o promotor FLD1 que permite a indução por metanol ou metilamina e alto nível de expressão do gene de interesse em <i>P. pastoris</i> . Direciona a integração do plasmídeo no locus FLD1.
Sinal de secreção fator-α	Codifica o sinal de secreção nativo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> que permite eficiente secreção de muitas proteínas.
MCS	Sítio de clonagem múltipla. Permite a inserção do gene de interesse no vetor.
Epítipo V5	Permite a detecção da proteína recombinante de fusão com o anticorpo Anti-V5 ou Anti-V5-HRP.
Cauda C-terminal poli histidina	Permite a purificação da proteína recombinante de fusão em resina quelante-metal como as ProBond. Também é um epítipo para o Anticorpo Anti-His e Anti-His-HRP.

Região AOX1 TT	Terminação da transcrição nativa e sinal de poliadenilação do gene AOX1 (aproximadamente 260pb) que permite eficiente processamento do RNAm, incluindo poliadenilação para maior estabilidade .
Promotor TEF1	Promotor de transcrição do gene de elongação fator 1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> que direciona expressão do gene de resistência a Zeocina em <i>P. pastoris</i>
Promotor T7	Promotor sintético procariótico que direciona a expressão constitutiva do gene de resistência a Zeocina em <i>E. coli</i> .
Gene resistência a Zeocina (Sh ble)	Permite seleção de transformantes em <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i> .
Região de terminação da transcrição CYC1	Extremidade 3' do Gene CYC1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> que permite eficiente processamento do RNAm do gene de resistência a Zeocina e aumenta sua estabilidade.
Origem pUC	Permite replicação e manutenção do plasmídeo em <i>E. coli</i>

2.4.2- Promotor FLD1

Embora o promotor AOX1 tenha sido usado com sucesso para expressar numerosos genes heterólogos há circunstâncias em que este promotor não é adequado. Por exemplo, o uso de metanol para induzir expressão gênica pode não ser apropriado para a produção de itens alimentícios. Além disso, o metanol é inflamável, e é necessário em grandes quantidades para fermentação em larga escala. Com isso, promotores que não são induzidos por metanol são atrativos para a expressão de certos genes sendo eles GAP, FLD1, PEX8 e YPT1 (CEREGHINO & CREGG, 2000).

O promotor do gene que codifica a formaldeído desidrogenase (FLD) utiliza o promotor de uma enzima chave no metabolismo de certas aminas metiladas como fonte de nitrogênio e metanol como fonte de carbono. O promotor FLD1 pode ser induzido por metanol como fonte de carbono (e sulfato de amônia como fonte de N) ou metilamina

como fonte de N (e glicose como fonte de C). O promotor FLD1 oferece a flexibilidade de induzir altos níveis de expressão usando metanol ou metilamina, uma fonte de N barata e não tóxica (SHEN et al, 1998).

2.4.3- Condições de cultivo

A *P. pastoris* é pouco fermentadora, o que representa uma maior vantagem em relação à levedura *S. cerevisiae*. Em culturas com alta densidade celular, o etanol (um dos produtos da fermentação) rapidamente atinge níveis tóxicos que limitam o crescimento e a produção de proteínas heterólogas. Com essa preferência pelo crescimento respiratório *P. pastoris* pode ser cultivada em densidades extremamente altas ($500 \text{ OD}_{600} \text{U mL}^{-1}$) em ambiente controlado. O crescimento fermentativo é especialmente importante para proteínas secretadas onde a concentração do produto no meio é diretamente proporcional à concentração de células na cultura. Outro aspecto positivo é que o nível de transcrição iniciado do promotor AOX1 pode ser 3-5 vezes maior em células crescendo em metanol. Assim, em proteínas expressas intracelularmente, o produto é significativamente maior em culturas de células fermentadoras. Além disso, o metabolismo do metanol utiliza oxigênio a altas taxas, e a expressão de genes heterólogos é negativamente afetada pela limitação de oxigênio. Somente em ambiente controlado de fermentação é possível monitorar e ajustar os níveis de oxigênio no meio de cultura. Embora algumas proteínas heterólogas tenham sido bem expressas em culturas “shake-flasks”, níveis de expressão são tipicamente baixos quando comparados a culturas fermentadoras. Para otimizar a expressão de proteínas heterólogas, protocolos foram desenvolvidos. Em geral, as linhagens crescem inicialmente em meio definido contendo glicerol como fonte de carbono. Durante esse tempo há acúmulo de biomassa mas a expressão do gene heterólogo é reprimida. Após a retirada do glicerol, uma fase de transição é iniciada. Finalmente, o metanol ou uma mistura de glicerol+metanol é adicionado à cultura para induzir a expressão. As condições de crescimento de *P. pastoris* são ideais para produção em larga escala porque os componentes do meio são baratos e definidos, consistindo de fontes puras de carbono, biotina, sais e água. Esse meio é livre de ingredientes não definidos que

podem ser fonte de pirógenos ou toxinas e assim é compatível com a produção de fármacos humanos. Além disso, o baixo pH do meio e a presença do metanol dificultam a contaminação por outros microorganismos (CEREGHINO & CREGG, 2000).

2.4.4- Secreção de proteínas heterólogas

A maior vantagem da *P. pastoris* sobre os sistemas de expressão bacterianos é que as leveduras têm o potencial de realizar muitas modificações pós-traducionais tipicamente associadas com eucariotos superiores como o processamento de seqüências sinal, dobramentos, formação de pontes dissulfeto, adição de certos tipos de lipídios e glicosilação O e N-ligada.

Proteínas heterólogas expressas em *P. pastoris* podem ser produzidas intra e extracelularmente. Devido ao fato de que a levedura secreta apenas baixos níveis de proteínas endógenas, as proteínas secretadas constituem a vasta maioria do total de proteína no meio. Além disso, direcionar a proteína heteróloga para o meio pode servir como um primeiro passo na purificação. Contudo, devido a estabilidade da proteína e dobramentos necessários, a opção de secreção é normalmente reservada a proteínas heterólogas que são normalmente secretadas por seus hospedeiros nativos. Usando vetores selecionados, pesquisadores podem clonar um gene 'in frame' com seqüências contendo o sinal nativo, o peptídeo α -MF de *S. cerevisiae*, ou o sinal PHO1 (*P. pastoris* Acid Phosphatase). Embora diferentes seqüências sinal de secreção, incluindo o sinal de secreção nativo presente em proteínas heterólogas, estejam sendo usados com sucesso, os rendimentos têm sido variáveis. O peptídeo fator α de *S. cerevisiae* têm sido usado com muito sucesso para a secreção de proteínas heterólogas. A seqüência sinal consiste de 19 aminoácidos (pré) seguido por 66 resíduos (pró) contendo sítios de glicosilação N-ligados e um sítio de processamento da endopeptidase Kex2. A seqüência sinal prepro α -MF *S. cerevisiae* é o sinal mais amplamente usado. Em alguns casos ele é melhor sinal de secreção que a seqüência líder da proteína heteróloga nativa. (KURJAN & HERSKOWITZ, 1982; BRAKE et al., 1984)

III. OBJETIVOS

3.1. Desenvolver e estabelecer um sistema hospedeiro heterólogo constituído por células de leveduras da espécie *Pichia pastoris* para a expressão o gene da glicoproteína S1 da estirpe M41 do vírus da bronquite infecciosa aviária, obtido a partir do produto amplificado de toda a *open reading frame* (ORF) desse mesmo gene por RT-PCR a partir do RNA genômico viral.

3.2. Caracterizar imunoquimicamente a proteína S1 recombinante expressa em leveduras da espécie *Picchia pastoris*.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Propagação Viral

A estirpe M41 foi multiplicada na cavidade córion-alantóide de ovos embrionados, livres de patógenos específicos SPF, com 9 a 11 dias de idade. Após 36 h de inoculação, estes ovos foram resfriados a 4 °C, por um período mínimo de 4 h. Após decorrido esse tempo, o líquido cório-alantóide (LCA) foi colhido e centrifugado a 2500 xg a 4°C por 30 min, ocorrendo assim a clarificação da suspensão viral. O volume total obtido foi separado em alíquotas de 2 mL e armazenado a - 70°C.

4.2- Oligonucleotídeos Iniciadores

Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificar toda a “*open reading frame*” (ORF) do gene codificador da glicoproteína S1, que no caso da estirpe M41 do VBI perfaz um total de 1541 pb. Para isso consultou-se a sequência de nucleotídeos do VBI cadastrado sob n-º de acesso M21883 do *GeneBank*. Com auxílio de programas computacionais como “*Gene Runner*” (versão 3.05, *Hastings Software, Inc.*) e “*BioEdit Sequence Alingment*” Editor (versão 7.0.4.1, 1997-2005 Tom Hall) as características físico-químicas e desempenho da técnica de PCR foram analisadas. Os iniciadores obtidos então foram: *Forward*: 5'- CACGTGATGTTGGTAACACCTCTTTT-3' com o sítio de restrição para a enzima *Pml I* incluído, e *Reverse* 5'- CCGCGGAGAACGTCTAAAACGACG - 3', com o sítio de restrição para a enzima *Sac II* incluído. Com isso pode-se amplificar toda a região de interesse, obtendo-se um fragmento de 1613 pb. A inserção dos sítios de restrição das enzimas *Pml I* e *Sac II* foram necessários para a retirada do gene de interesse do vetor de clonagem pGem T- Easy (Promega) e sua inserção no vetor de expressão pFLDα (Invitrogen).

4.3- Extração do RNA viral

A extração do RNA da estirpe M41 do VBI foi realizada a partir de suspensão de líquido alantóide infectado e através dos procedimentos do *kit* comercial Trizol LS Reagent (Invitrogen®), seguindo-se as recomendações do fabricante.

4.4- Clonagem do gene da glicoproteína S1 do VBI em *E. coli* DH10b

Primeiramente foi preparado o cDNA a partir do RNA genômico, tendo sido aplicada a técnica de RT (transcrição reversa) e de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Para tanto, incubou-se dNTP (0,5 mM), *Randon Primers* (0,15 µg/l) e o RNA previamente extraído a 25°C por 10 min. Acrescentou-se, em seguida, o tampão apropriado da enzima transcriptase reversa [Tris-HCl 50 mM, pH 8,3 ; HCl 75mM, MgCl₂ 3mM] incubando-se por 2 min a 42°C. Após esse procedimento foi acrescentada a enzima transcriptase reversa (*Superscript* da Invitrogen). A reação total foi encubada a 42°C por 60 min, e por fim, a 70 °C por 15 min em um Termociclador TECHNE PROGENE ® (Techne Incorporat, Duxfod CAMBRIDGE, UK). Segui-se a reação de PCR onde o cDNA obtido foi amplificado com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores previamente elaborados (item 4.2) e a enzima Taq DNA polimerase “High Fidelity” (Invitrogen).

O produto amplificado (1613 pb) foi purificado através da utilização do “kit” comercial GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amershan), de acordo com as especificações do fabricante, para depois ser ligado ao vetor pGEM-TEasy (Promega) (Figura 04), segundo as recomendações do fabricante. O plasmídeo recombinante obtido foi utilizado para a transformação de células de *E. coli* da linhagem DH10b previamente tornadas competentes, por choque térmico sendo que os transformantes foram selecionados em meio 2x LB Sólido com 50 µg/ml de ampicilina, e as placas foram recobertas com uma camada de X-Gal. Com isso pode-se distinguir os clones que foram transformados com o plasmídeo integro, contendo o vetor e o gene da glicoproteína S1, sendo que estes formaram colônias de coloração branca nas placas.

Foram extraídas as amostras de DNA plasmidial dos clones previamente coletados e estocados em meio LB 2x com ampicilina (item 8.2.2) utilizando-se o kit

comercial “Wizard Plus SV Minipreps Dna Purification System” (Promega). Após a extração do DNA dos clones bacterianos foi feita a confirmação da presença de plasmídeos contendo o inserto do gene S1 do VBI, por meio da técnica de PCR com combinações de oligonucleotídeos iniciadores, bem como se fez a determinação da quantidade de DNA, em espectrofotômetro UV, nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm (SAMBROOK, et al. 1989).

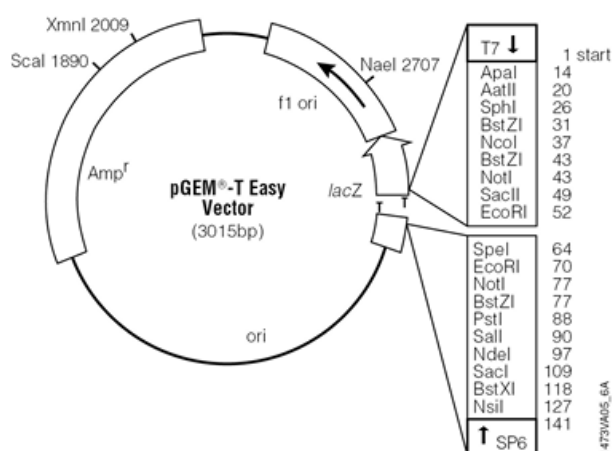


Figura 04. Mapa do vetor pGem-T E asy (Promega) utilizado para a clonagem do gene da glicoproteína S1 em células de *E. coli*

Após isso o DNA extraído foi incubado com as enzimas *Pml I* (Biolabs) e *Sac II* (Biolabs) a 37°C por 1 hora conforme recomendações do fabricante. Após purificação utilizando o Kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (Amershan) foi ligado ao vetor de expressão pFLDα (Figura 03), sendo o plasmídeo recombinante obtido foi utilizado na transformação de *E.coli* DH10b. Os clones transformantes foram selecionados em meio 2x LB Sólido com ampicilina (item 8.2.1) e foram utilizados para extração de DNA. Ao final dessa etapa, preparações de DNA plasmidial obtidas a partir dos clones transformantes foram analisadas por eletroforese em gel de agarose para a confirmação da presença e do tamanho correto do fragmento a ser expresso.

Além disso, as amostras de DNA plasmidial obtidas foram submetidas à reação de seqüenciamento, utilizando-se 2µl de “Big Dye Terminator” (Perkin Elmer), 2µl de

tampão [2,5X] (Tris-HCl 200mM, pH 9,0 e MgCl₂ 5Mm), 10 pmoles/μl de cada um dos iniciadores do vetor de expressão sendo os oligonucleotídeos: sense AOX(-) (5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3') e antisense Fator α (5' TACTATTGCCAGCATTGCTGC 3') do vetor pFLDα, 100ng de DNA e água destilada grau Milli-Q, previamente esterilizada (q.s.p) 10μl. As amplificações foram realizadas em placas de 96 poços conforme o programa recomendado pelo fabricante. Após amplificação, o produto da reação de PCR, "cycle-sequencing", foi purificado por meio da adição de isopropanol. Ao final, as placas foram mantidas à temperatura ambiente, por 20 min, para a secagem das amostras.

A reação de seqüenciamento do DNA foi realizada no aparelho ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster-City, CA, USA). A seqüência de nucleotídeos foi compilada e analisada usando-se o programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994) e para comparar a similaridade de cada um dos clones analisados com a estirpe M41 do VBI, foi empregada a seqüência do gene S depositada no GenBank citada anteriormente.

4.5- Expressão da proteína recombinante S1 em *Pichia pastoris* linhagem GS 115

4.5.1- Linhagem de *Pichia pastoris*

A linhagem de expressão usada no estudo foi a *P. pastoris* GS115 transformada com o plasmídeo pFLDα (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contendo o gene da glicoproteína S1 do Vírus da Bronquite Infecciosa (Gene bank M21883) previamente clonado em células de *E. coli* DH 10b. GS115 é uma linhagem his 4⁻ e necessita de suplementação com histidina no meio para crescer. pFLDα contém o promotor da formaldeído desidrogenase, uma enzima envolvida na metabolização do metanol, além da seqüência líder fator-α de *Saccharomyces cerevisiae* para secreção do produto recombinante. Clones transformados foram selecionados com o gene de resistência à Zeocina. Todos os transformantes gerados apresentam o fenótipo MUT⁺ (methanol

utilization plus) considerando-se que a integração do cassete de expressão não interfere na orf da álcool oxidase.

4.5.2 - Linearização e purificação do plasmídeo recombinante

Após a clonagem do gene de interesse em células de *E. coli* DH10b, o plasmídeo recombinante obtido foi linearizado com a enzima Cla I (Invitrogen) segundo recomendações do fabricante. A esta digestão seguiu-se a precipitação e purificação do DNA utilizando-se acetato de amônio 7,5M e etanol. Após isso o material foi quantificado em gel de agarose com Low Mass e em espectrofotômetro. O DNA obtido foi utilizado para a eletroporação de células de *P. pastoris* GS115.

4.5.3.- Eletroporação em *Pichia pastoris*

Inicialmente as células de *P. pastoris* foram preparadas para a eletroporação. Para isso, as células da linhagem GS115 foram crescidas em 10 mL de meio YPD líquido (item 8.2.3) por 16-18 horas a 30°C, sob agitação de 250 rpm (pré-inóculo). Foram inoculados 5mL do pré-inóculo em 100 mL de meio YPD líquido que permaneceram a 30°C sob agitação de 250 rpm até ser obtida uma densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 1,3-1,5. Posteriormente as células foram centrifugadas a 1500xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ressuscitado com 30 mL de água gelada estéril. Após isso, as células foram centrifugadas novamente a 1500xg, 4°C, e o sobrenadante descartado e novamente ressuscitado em 30 mL de água estéril gelada. A solução foi centrifugada a 1500xg, 4°C por 5 minutos. Posteriormente as células foram ressuscitadas em 10 mL de Sorbitol 1M (item 8.1.9) gelado. A solução de células foi mantida em gelo por 5 minutos e novamente centrifugada a 1500xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuscitadas em 0,2 mL de Sorbitol 1M gelado. Tais células não podem ser estocadas.

O equipamento utilizado para a eletroporação foi o Gene Pulser II (Biorad) sendo as condições ideais para a eletroporação: capacitância de 25 µF, resistência mínima de 200Ω, voltagem de 1,5KV. O procedimento de preparo da reação foi feito em gelo, no interior do fluxo laminar onde foi separado um microtubo de 1,5mL contendo 120 µL das

células previamente tornadas competentes onde foram adicionados 20µg de DNA linearizado previamente purificado ressuspendido em água deionizada. A solução foi homogenizada e transferida para um cuvetta específica, Gene Pulser Cuvette (Biorad) e que permaneceu no gelo por 5 minutos. Após a eletroporação a cuvetta foi levada para o fluxo laminar onde foi adicionado 1mL de Sorbitol 1M gelado. A reação foi homogenizada e transferida para um tubo falcon de 15 mL que foi incubado sem agitação a 30°C por 1 hora. Após isso, foi adicionado 1 mL de meio YPD sem antibiótico e a cultura permaneceu em estufa por 1 hora a 30°C sob agitação de 200 rpm. Após isso, foram plaqueados de 50 a 200 µL de cultura em meio YPDS sólido (item 8.2.6). As placas foram mantidas em estufa a 30°C por 2-3 dias. As colônias formadas foram coletadas com palito de dente estéril e armazenadas em placas de 96 cavidades tipo Cluster contendo 400µL de meio YPDS líquido (item 8.2.5). Após agitação de 250 rpm por 16-18 horas a 30°C, foi adicionado 200µL de glicerol 80% estéril em cada poço e a placa foi armazenada a -80°C.

4.5.4 - Indução da expressão da glicoproteína S1 do VBI

Todos os cultivos foram iniciados com um pré-inóculo em 5mL de YPD (item 8.2.3) sob agitação de 250 rpm, 30°C por 16-18 horas.

Após isso a cultura foi centrifugada e as células ressuspendidas em meio mínimo com glicerol MGA (item 8.2.7) onde permaneceram sob agitação por 36 horas para acúmulo de biomassa. A indução da expressão do gene de interesse deu-se após a centrifugação e ressuspensão da cultura em meio MMA (item 8.2.8) onde permaneceu sob agitação por 96 horas.

4.6- Separação das proteínas do extrato bruto da levedura recombinante

Inicialmente as culturas foram centrifugadas por 3 minutos a 14000g para a separação do sobrenadante e das células.

Para a extração das proteínas intracelulares totais as células foram ressuspendidas em tampão de lise (item 8.1.11) e centrifugadas a 3000g, 4°C por 10 minutos. Após isso as células foram novamente ressuspendidas em 2mL de tampão de

lise e foi adicionado igual volume de “glass beads”. As culturas foram agitadas em vórtex por 60 minutos permanecendo um minuto em vórtex e um minuto no gelo. A lise foi sucedida por uma centrifugação a 12000g, 4°C, 10 minutos. O sobrenadante colhido foi submetido a análise imunológica.

As proteínas secretadas presentes no sobrenadante da cultura foram concentradas usando Polietileno glicol (PEG) 8000 e NaCl. Inicialmente o volume do sobrenadante foi medido e sob agitação suave foi adicionado 2,7% do volume em massa de NaCl e 8,7% de PEG 8000. Após dissolução completa do PEG e do NaCl o sobrenadante permaneceu sob agitação por 1h a 4°C. Após isso foram incubados em geladeira por 16-18 horas. As proteínas foram peletadas após centrifugação a 10000g, 4°C, 30 minutos. O “pellet” formado foi ressuspensionado em 200µL de tampão TEN (0,1M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0) pH 7,4 e foram conservados com adição de 25 µL de PMSF 10mM.

As proteínas extraídas da fração intracelular e do sobrenadante concentrado foram dosadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976)

4.7 - Análise da Proteína S1 Expressa por Eletroforese de gel de poliacrilamida SDS e Western blotting

As amostras foram solubilizadas em tampão contendo 62,5mM Tris-HCl, pH6,8, 1% SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 1% de 2-mercaptoetanol, fervidas por 5 minutos e aplicadas em 2 géis de poliacrilamida com concentração de 9% no gel de separação. A separação eletroforética pela técnica de PAGE-SDS foi realizada, usando-se um sistema de tampão descontínuo. As bandas polipeptídicas foram, ao final, detectadas, em um dos géis, através da coloração com Coomassie Blue.

Os polipeptídeos previamente separados pela eletroforese no gel de poliacrilamida foram eletrotransferidos em cuba úmida para uma membrana de PVDF, usando-se um tampão de transferência contendo 50mM de Tris, 384mM de glicina e 20% (v/v) de metanol pH 8,3, sendo o processo realizado a 90V por 45 minutos. Após o fim da transferência, a eficiência da mesma foi verificada corando-se a membrana com 0,1% Ponceau S dissolvido em ácido acético 1%, descorando-se a seguir com água

destilada. Em seguida, a membrana foi submetida a lavagens com água deionizada e bloqueada com 10 mL de PBS (salina tamponada com fosfato; 0,01 M tampão fosfato; 2,7 mM KCl₂; 137 mM NaCl; pH 7,4); 5% de leite em pó desnatado e 0,02% Tween-20, sob agitação suave por uma hora, a temperatura ambiente. Procedeu-se, na fase seguinte, a reação com anticorpos monoclonais anti-poli histidina na diluição 1:500, na presença de PBS 0,01M 5% e 0,02% Tween-20, sob agitação suave por uma hora. Após este passo, foram realizadas lavagens subseqüentes com PBS (Tampão salina saturado em fosfato) e PBST (Tampão salina saturado em fosfato + 1% Tween).

O conjugado imunoenzimático de peroxidase com o anticorpo de coelho anti IgG de camundongo foi utilizado para revelação do complexo antígeno-anticorpo, na diluição 1:500 em PBS-LPD 5%. Após a incubação por uma hora, a membrana foi novamente lavada com PBS e PBST e a reação de desenvolvimento da cor se desenvolveu com a mistura do cromógeno mais substrato específico (FAST DAB SIGMA) contendo dietil-amino-etil-benzidina (0,7mg) e peróxido de hidrogênio - uréia (1,6mg). Para interrupção da reação de degradação enzimática, a membrana foi lavada com água deionizada e posteriormente dessecada em temperatura ambiente; ao final foi guardada em local escuro.

4.8- Delineamento experimental para determinar o perfil de crescimento na pré-indução:

Para a análise da cinética de crescimento da linhagem GS115 na fase de acúmulo da biomassa (pré-indução), as leveduras da espécie *P. pastoris* foram transformadas por eletroporação apenas com o vetor pFLD α sendo que este foi previamente linearizado com a enzima ClaI conforme recomendações do fabricante. Os transformantes foram selecionados pelo crescimento em meio sólido YPDS com Zeocina (item 8.2.6). Dois clones foram cultivados simultaneamente para a análise. Inicialmente cresceram em 5mL de YPD (item 8.2.3), a 30°C, 250 rpm, 16-18 horas. As culturas foram centrifugadas e ressuspensos em 50 mL dos meios a serem avaliados sendo três deles de composição mínima: MGA-1 (0,17% YNB, 4×10^{-5} % Biotina, 1%

Glicerol, 0,5% Sulfato de amônio, 0,004% Histidina), MGA-2 (0,34% YNB, 4×10^{-5} % Biotina, 1% Glicerol, 0,5% Sulfato de amônio, 0,004% Histidina), MGA-3 (item 8.2.7) (1,34% YNB, 0,02% Biotina, 2% Glicerol, 0,5% Sulfato de amônio, 0,004% Histidina); e um de composição complexa BMGH (item 8.2.9) (1% Extrato de levedura, 2% Peptona, 100mM Tampão Fosfato pH 6,0, 1,34% YNB, 4×10^{-5} % Biotina, 1% Glicerol, 0,004% Histidina) . As culturas foram colocadas em erlenmeyers de 250 mL e mantidas em agitação de 250 rpm, 30°C. Para avaliar o crescimento dos clones de leveduras transformados foram realizadas medições da densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) nos intervalos de 0h, 6h, 12h, 18h, 24h, 36h, 48h, 60h e 72h.

4.9- Delineamento experimental para determinar o perfil de crescimento na fase de indução

Os clones anteriormente avaliadas, contendo apenas o vetor pFLD α foram novamente cultivados e além deles um outro clone de *P. pastoris* transformado com o vetor pFLD α contendo o inserto do gene da glicoproteína S1 do VBI . Inicialmente foram cultivados em YPD (item 8.2.3) nas mesmas condições descritas anteriormente. Durante a pré indução foram cultivados em volumes de 25 mL contidos em erlenmeyers de 250 mL por 36h. Foram realizadas leituras da DO_{600} nos intervalos de 0h, 12h, 18h, 24h e 36h. Após isso as células foram centrifugadas e ressuspensas em 50 mL dos meios de indução MMA (item 8.2.8) (1,34% YNB, 0,02% Biotina, 1% Metanol, 1% Sulfato de amônio, 0,004% Histidina) e BMMH (item 8.2.10) (1% Extrato de levedura, 2% Peptona, 100mM Tampão Fosfato pH 6,0, 1,34% YNB, 4×10^{-5} % Biotina, 0,5% Metanol, 0,004% Histidina) em erlenmeyers de 250 mL cobertos com uma camada de gaze. Foram realizadas leituras da DO_{600} com 0h, 24h, 48h, 72h e 96h de cultivo. A cada 24h foi realizada a separação de proteínas de 50 mL de cultura do clone transformado com o vetor pFLD α contendo o gene de glicoproteína S1 para a avaliação do intervalo de maior expressão da proteína recombinante

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As técnicas moleculares de clonagem e expressão de proteínas heterólogas em sistemas de procariotos e eucariotos são alternativas para a produção de antígenos isolados e, ainda, podem contribuir na diminuição dos custos de produção dos imunoenaios. Nesse contexto, a literatura mostra possibilidades do uso de sistemas de clonagem e expressão cada um com suas vantagens e desvantagens, e principalmente, apropriados ou não para a expressão de um determinado antígeno viral. Para tanto existem sistemas constituídos por procariotos, como a *E.coli*, ou por eucariotos, como as leveduras *Saccharomyces spp.*, *Picchia spp.*, acrescentando-se ainda, a possibilidade de serem usados vetores virais como Poxvírus, Baculovírus juntamente com células animais em culturas *in vitro* (CHANG, et.al., 1998). Foi demonstrado também que as leveduras *S. cerevisiae* e *P. pastoris* foram utilizadas na expressão da proteína N desse mesmo vírus (GIBERTONI et al, 2005; SLIBINSKAS et.al. 2004).

Uma limitação importante para tornar disponíveis reagentes ideais para serem usados em testes sorológicos aplicados ao diagnóstico de patógenos virais é a necessidade de serem produzidas preparações purificadas de vírus, o que requer a propagação de grandes volumes desses microrganismos e o seu processamento por técnicas demoradas, trabalhosas e muito onerosas, tal como se configura a purificação de massa antigênica viral por meio de ultra-centrifugação em gradiente de sacarose (LOA et al, 2004; NDIFUNA et al, 1998). A clonagem molecular e a expressão se constituem em um dos mais importantes métodos para se fazer a preparação de grandes quantidades de antígenos virais altamente purificados. Há dentro desse contexto a possibilidade de serem usados vários sistemas de clonagem, na dependência dos vetores plasmidiais escolhidos e das células hospedeiras, isto é, se procariotos, como a *E. coli*, ou eucariotos como as leveduras dos gêneros *Saccharomyces* ou *Picchia*, acrescentando-se ainda, a possibilidade de serem usados vetores virais como Poxvírus, Baculovírus para serem replicados em células eucarióticas apropriadas. (CHEN et al, 2000; DAS & SCHULTZ, 1987). Para a expressão da proteína S1 do VBI, sabe-se que já foram utilizados os sistemas

constituídos por batatas transgênicas (ZHOU et al., 2003), adenovírus (JOHNSON et al., 2003), baculovírus (SONG et al., 1998) e poxvírus (WANG et al., 2002).

5.1- Extração de RNA e amplificação do cDNA

Os produtos obtidos nos procedimentos de extração do RNA viral genômico e na técnica de RT e amplificados na PCR estão documentados na figura 05, onde constam os resultados da PCR com iniciadores Sense e Antisense, tendo sido obtida amplificação do fragmento correspondente ao gene codificador da proteína S1 do VBI com tamanho esperado, isto é, 1613 pb. A dimensão do fragmento amplificado foi comparada a um padrão de tamanho molecular de DNA 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) aplicado na primeira canaleta do gel onde foram aplicadas as amostras a serem analisadas em corrida eletroforética.

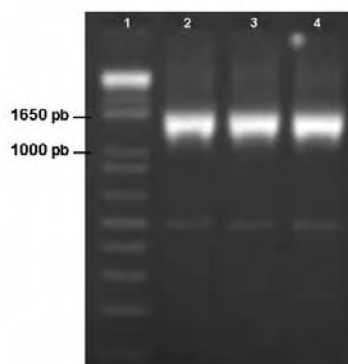


Figura 05: Amplificação do gene da glicoproteína S1 a partir da extração de RNA de suspensão viral da estirpe M41 do VBI após reação de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos. Canaletas: (01) Marcador 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen); (2), (3), (4): produto amplificado com oligonucleotídeos específicos.

O fragmento gênico alvo foi, depois de purificado com o Kit “GFX DNA and Gel Band Purification” (Amershan), quantificado por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose, utilizando-se um padrão de quantificação de DNA, o “Low DNA Mass

Ladder” (Invitrogen) conforme demonstrado na figura 06. A preparação continha uma concentração de aproximadamente 150ng/μl de DNA, conforme confirmado em quantificação no espectrofotômetro.

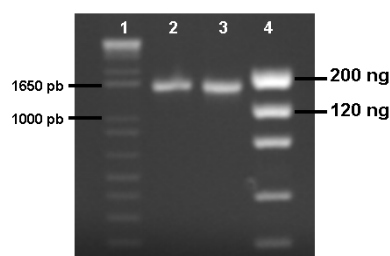


Figura 06: Quantificação em gel de agarose do produto amplificado após purificação, utilizando o padrão Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). Canaletas: (1): Marcador 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen); (2), (3): DNA purificado após amplificação a partir do RNA viral com oligonucleotídeos específicos; (4) Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

5.2- Otimização da amplificação do gene da glicoproteína S1

Para se obter um melhor resultado na amplificação do gene da glicoproteína S1 foi realizada uma reação de PCR com gradiente de temperatura para a confirmação da temperatura adequada de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores. A reação foi feita no Termociclador TECHNE PROGENE® (Techne Incorporat, Duxford, CAMBRIDGE, UK), com um gradiente das seguintes temperaturas: 46°C; 46,3°C; 46,9°C; 47,7°C; 48,8°C; 50,3°C; 52,0°C; 53,4°C; 54,5°C; 55,3°C; 55,8°C e 56°C. Através da confirmação por gel de agarose mostrado na figura 07 verificou-se que a melhor temperatura para amplificação do inserto gênico foi 56°C sendo esta a ideal para o pareamento dos oligonucleotídeos e amplificação do fragmento no tamanho esperado de 1613 pb.

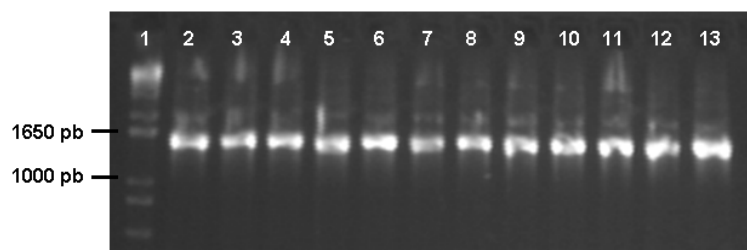


Figura 07: Gradiente de temperaturas para otimização da amplificação do gene codificador da glicoproteína S1 do VBI. Canaletas: (1) Marcador 1Kb plus DNA Ladder; (2) 46,0°C; (3) 46,3°C; (4) 46,9°C ;(5) 47,7°C; (6) 48,8°C; (7) 50,3°C; (8) 52,0°C; (9) 53,4°C; (10) 54,5°C; (11)55,3°C; (12) 55,8°C; (13)56,0°C.

5.3 - Pré-clonagem do gene da glicoproteína S1 com o vetor pGem-T Easy (Promega) em células de *E. coli* DH10b:

Após a otimização da amplificação e purificação do fragmento gênico da glicoproteína S1, foi realizada a ligação do inserto ao vetor de clonagem pGem-T Easy (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante, onde foi utilizado 1µl de cDNA (aproximadamente 150 ng). A reação foi mantida a 4°C por 16 horas e posteriormente utilizada para transformação de células de *E.coli* DH10b, previamente tornadas competentes, através de choque térmico para possibilitar a clonagem do inserto. Foram obtidas aproximadamente 15 colônias transformadas, selecionadas em meio LB com ampicilina (item 8.2.1) e X-Gal e estocadas em microtubos contendo meio LB (item 8.2.2) e glicerol 80%.

Alguns clones transformantes foram selecionados para a confirmação da presença do fragmento gênico de interesse e a correta posição de inserção através da combinação dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene da glicoproteína S1 e para o vetor pGem-T Easy. Foram utilizadas as seguintes combinações de primers: Sense do inserto e Antisense do inserto (Tamanho esperado:1613pb), Sense do inserto e Antisense do vetor (Tamanho esperado: 1691pb), Sense do vetor e Antisense do inserto (Tamanho esperado: 1712 pb), Sense do vetor e Antisense do vetor (Tamanho esperado:1790 pb). O produto obtido após a extração de DNA

plasmidial utilizando o Kit “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega) e reação de PCR analisado em gel de agarose está mostrado na figura 08. Conforme evidenciado nas canaletas 2, 3, 4 e 5 obteve-se um clone com a amplificação nos tamanhos esperados, portanto, contendo o gene de glicoproteína S1 na correta posição de inserção no vetor de clonagem.

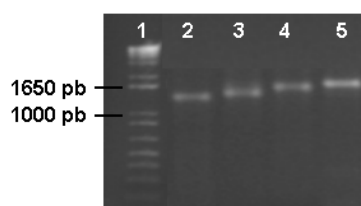


Figura 08: DNA plasmidial amplificado após reação de PCR com combinação de oligonucleotídeos do gene da glicoproteína S1 do VBI e do vetor pGem-T Easy (Promega). Canaletas: (1) Marcador 1 Kb plus DNA Ladder; (2) Inseto-Inseto: 1613pb; (3) Inseto-Vetor: 1691pb; (4) Vetor-Inseto: 1712pb; (5) Vetor-Vetor: 1790pb.

5.4- Clonagem do gene da glicoproteína S1 com o vetor pFLD α (Invitrogen) em células de *E. coli* DH10b:

Após a confirmação da presença e correta orientação do inserto de interesse no vetor pGem-T Easy através da reação de amplificação com combinação de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o inserto e para o vetor, foi realizada a extração do DNA plasmidial das células de *E. coli* transformadas utilizando o Kit “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega). O material extraído foi avaliado em gel de agarose e quantificado em espectrofotômetro sendo obtidas aproximadamente 300 ng/ μ L de DNA conforme evidenciado na figura 09.

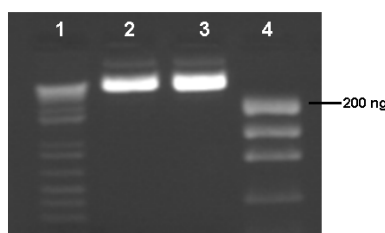


Figura 09: DNA plasmidial extraído de células de *E. coli* utilizando o Kit Wizar Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Canaletas: (1) Marcador 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen); (2), (3) : DNA plasmidial; (4) Low DNA Mass Ladder.

Obtida a confirmação da presença do inserto através da reação de PCR com os oligonucleotídeos específicos e amplificação do fragmento gênico no tamanho esperado foi realizada uma reação de digestão do material com as enzimas Pml I e Sac II (Biolabs) segundo as recomendações do fabricante utilizando 5 μ L do material anteriormente extraído (aproximadamente 1,5 μ g de DNA). Os sítios de restrição foram adicionados aos primers confeccionados para o gene da glicoproteína S1 e não estavam contidos no vetor pGem-T Easy (Promega). Com isso, apenas o gene da glicoproteína S1 previamente clonado foi retirado do vetor pGem-T Easy para ser posteriormente ligado ao vetor de expressão pFLD α (Invitrogen). O fragmento obtido apresentou o tamanho esperado de 1613 pb, o que pode ser constatado após corrida em gel de agarose mostrada na figura 10. O material digerido apresentou concentração de aproximadamente 100 ng/mL.

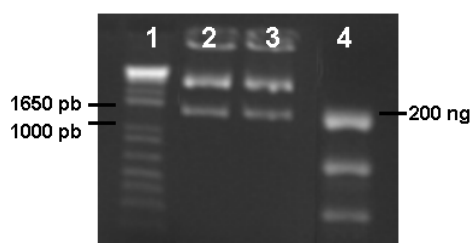


Figura 10: Dna plasmidial extraído de células de *E. coli* após reação de digestão com as enzimas Sac II e Pml I (Biolabs). Canaletas: (1) Marcador 1 Kb plus DNA Ladder; (2),(3): Material digerido; (4) Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

Após isso foi realizada a abertura do vetor com as mesmas enzimas para se obter a condição adequada de ligação do inserto gênico ao vetor de expressão. Todo o material previamente digerido foi purificado utilizando o Kit “GFX PCR Dna and Gel Band Purification” (Amershan), e quantificado em gel de agarose utilizando o marcador Low Mass sendo obtida uma concentração de aproximadamente 120 ng conforme ilustrado na figura 11.

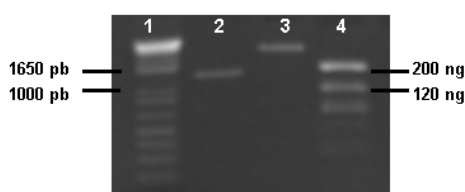


Figura 11: Quantificação do material necessário para a clonagem no vetor pFLD α . Canaletas: (1) Marcador 1 Kb plus DNA Ladder; (2) Gene da glicoproteína S1 após digestão com as enzimas Pml I e Sac II (Biolabs) para sua retirada do vetor pGEm-T Easy e purificação com o Kit “GFX PCR Dna and Gel Band Purification” (Amershan); (3) Vetor pFLD α (Invitrogen) após digestão com as enzimas Pml I e Sac II (Biolabs) e purificação com o Kit “GFX PCR Dna and Gel Band Purification” (Amershan); (4) Low DNA Mass Ladder.

Posteriormente foi então realizada a ligação do gene ao vetor pFLD α (Invitrogen) segundo as recomendações do fabricante, para a clonagem do inserto em células de *E. coli* DH10b. Foram utilizados 4 μ L do vetor previamente quantificado e 3 μ L do produto amplificado do gene da glicoproteína S1, também previamente quantificado. Seguiu-se a transformação das células de *E. coli* DH10b por choque térmico, e a seleção dos transformantes deu-se em meio LB sólido com ampicilina (item 8.2.1). Foram obtidas aproximadamente 12 colônias transformantes, estocadas em meio LB com ampicilina (item 8.2.2) e glicerol a -80°C.

Dois clones foram selecionados para serem submetidos à extração de DNA com o Kit “Wizard Plus SV Minipreps Dna Purification System” (Promega). O material extraído foi submetido a análise para confirmação da presença do inserto através da

reação de PCR com os oligonucleotídeos específicos para o gene da glicoproteína S1 e digestão com as enzimas PmlI e Sac II (Biolabs). Após a confirmação da presença do inserto e da correta orientação deste no vetor pFLD α , o material foi enviado para análise por sequenciamento.

5.5 - Sequenciamento do inserto gênico extraído dos clones bacterianos transformados

Após a clonagem e extração do DNA plasmidial dos clones transformantes de *E.coli* DH10b, realizou-se o seqüenciamento do inserto, e a análise das seqüências foi feita, utilizando o programa "BLAST 2 sequences" <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>, onde foi possível constatar a homologia existente entre a seqüência de nucleotídeos da glicoproteína S1 da estirpe M41 do VBI disponível no "GeneBank" sob o número de acesso M21883 com os do inserto nos clones bacterianos. Esse seqüenciamento demonstrou que o ATG encontra-se na fase correta de leitura. O e-value obtido no Blast foi de 0.0, e a porcentagem de identidade alcançou 100%.

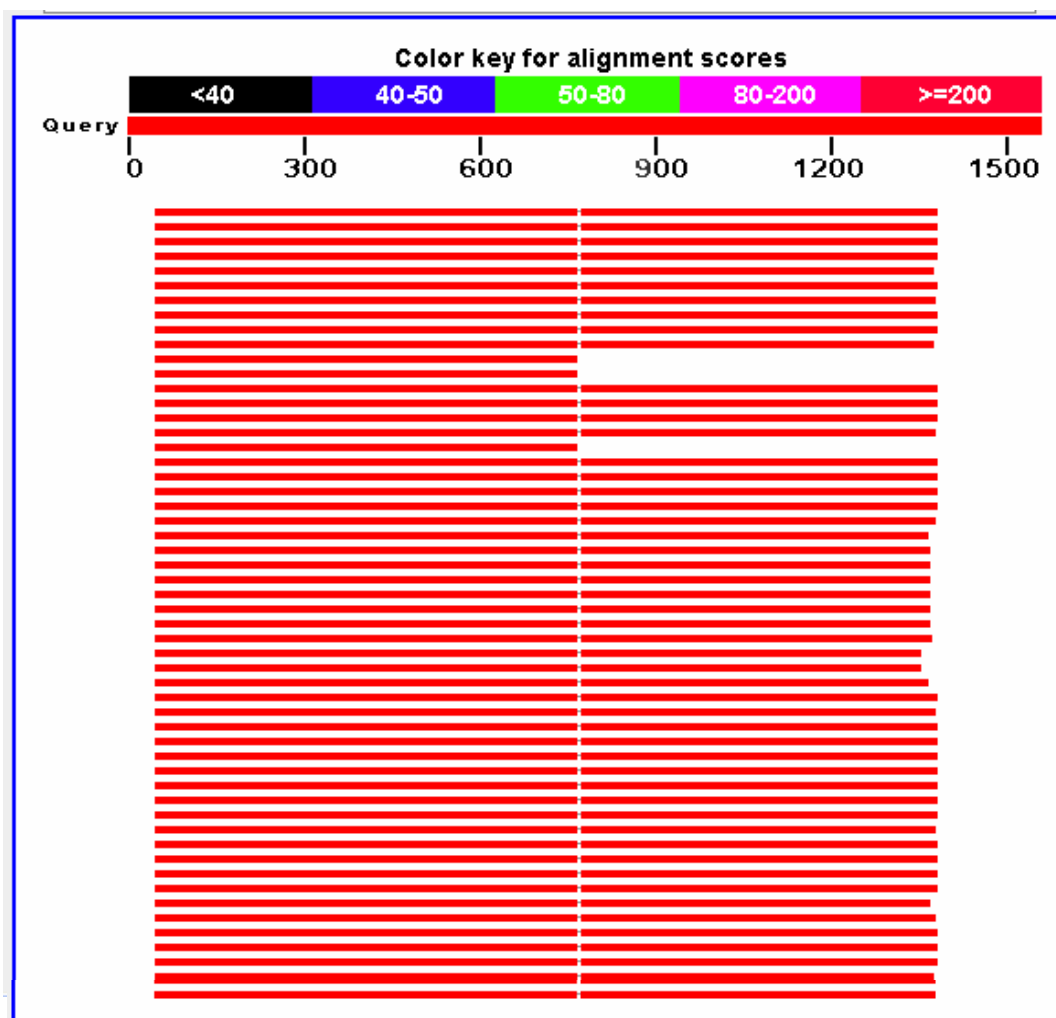


Figura 12. Visualização dos “scores” dos nucleotídeos seqüenciados do clone de *E.coli* obtidos através do BLAST no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>

Query	49	GATGTTGGTAACACCTCTTTTACTAGTGA	108
Sbjct	20374	GATGTTGGTAACACCTCTTTTACTAGTGA	20433
Query	109	GTATGACAGTAGTTCCTTACGTTTACTACTACCAAAAGTGCCCTTTAGACCACCTAATGGTTG	168
Sbjct	20434	GTATGACAGTAGTTCCTTACGTTTACTACTACCAAAAGTGCCCTTTAGACCACCTAATGGTTG	20493
Query	169	GCATTTACACGGGGGTGCTTATGCGGTAGTTAATATTTCTAGCGAATCTAATAATGCAGG	228
Sbjct	20494	GCATTTACACGGGGGTGCTTATGCGGTAGTTAATATTTCTAGCGAATCTAATAATGCAGG	20553
Query	229	CTCTTCACCTGGGTGTAATTGTTGGTACTATTTCATGGTGGTCTGTTGTTAATGCTTCTTC	288
Sbjct	20554	CTCTTCACCTGGGTGTAATTGTTGGTACTATTTCATGGTGGTCTGTTGTTAATGCTTCTTC	20613
Query	289	TATAGCTATGACGGCACCGTCATCAGGTATGGCTTGGCTAGCAGTCAGTTTTGTACTGC	348
Sbjct	20614	TATAGCTATGACGGCACCGTCATCAGGTATGGCTTGGCTAGCAGTCAGTTTTGTACTGC	20673
Query	349	ACACTGTAACTTTTAGATACTACAGTGTGTTGTACACATTGTTATAAATATGATGGGTG	408
Sbjct	20674	ACACTGTAACTTTTAGATACTACAGTGTGTTGTACACATTGTTATAAATATGATGGGTG	20733
Query	409	TCCTATAACTGGCATGCTTCAAAAGAATTTTTACGTGTTTCTGCTATGAAAAATGGCCA	468
Sbjct	20734	TCCTATAACTGGCATGCTTCAAAAGAATTTTTACGTGTTTCTGCTATGAAAAATGGCCA	20793
Query	469	GCTTTTCTATAAATTTAACAGTTAGTGTAGCTAAGTACCCTACTTTTAAATCATTTCAAGT	528
Sbjct	20794	GCTTTTCTATAAATTTAACAGTTAGTGTAGCTAAGTACCCTACTTTTAAATCATTTCAAGT	20853
Query	529	TGTTAATAATTTAACATCCGTATATTTAAATGGTGATCTTGTTTACACCTCTAATGAGAC	588
Sbjct	20854	TGTTAATAATTTAACATCCGTATATTTAAATGGTGATCTTGTTTACACCTCTAATGAGAC	20913
Query	349	ACACTGTAACTTTTAGATACTACAGTGTGTTGTACACATTGTTATAAATATGATGGGTG	408
Sbjct	20674	ACACTGTAACTTTTAGATACTACAGTGTGTTGTACACATTGTTATAAATATGATGGGTG	20733
Query	409	TCCTATAACTGGCATGCTTCAAAAGAATTTTTACGTGTTTCTGCTATGAAAAATGGCCA	468
Sbjct	20734	TCCTATAACTGGCATGCTTCAAAAGAATTTTTACGTGTTTCTGCTATGAAAAATGGCCA	20793
Query	469	GCTTTTCTATAAATTTAACAGTTAGTGTAGCTAAGTACCCTACTTTTAAATCATTTCAAGT	528
Sbjct	20794	GCTTTTCTATAAATTTAACAGTTAGTGTAGCTAAGTACCCTACTTTTAAATCATTTCAAGT	20853
Query	529	TGTTAATAATTTAACATCCGTATATTTAAATGGTGATCTTGTTTACACCTCTAATGAGAC	588
Sbjct	20854	TGTTAATAATTTAACATCCGTATATTTAAATGGTGATCTTGTTTACACCTCTAATGAGAC	20913
Query	589	CACAGATGTTACATCTGCAGGTGTTTATTTTAAAGCTGGTGGACCTATAACTTATAAAGT	648
Sbjct	20914	CACAGATGTTACATCTGCAGGTGTTTATTTTAAAGCTGGTGGACCTATAACTTATAAAGT	20973
Query	649	TATGAGAGAAGTTAAAGCCCTGGCTTATTTTGTAAATGGTACTGCACAAGATGTTATTTT	708
Sbjct	20974	TATGAGAGAAGTTAAAGCCCTGGCTTATTTTGTAAATGGTACTGCACAAGATGTTATTTT	21033
Query	709	GTGTGATGGATCACCTAGAGGCTTGTAGCATGCCAGTATAAATAGTGGCAATTTTTCAGA	768
Sbjct	21034	GTGTGATGGATCACCTAGAGGCTTGTAGCATGCCAGTATAAATAGTGGCAATTTTTCAGA	21093
Query	1	ATGGCTTGTGGTTTAAATTCAGTTTCAAGTTGCTTACGGTCTCTTCAAGGTGGTT	60
Sbjct	21387	ATGGCTTGTGGTTTAAATTCAGTTTCAAGTTGCTTACGGTCTCTTCAAGGTGGTT	21446
Query	61	GCAAGCAATCTGTCTTTAGTGGTAGAGCAACTTGTGTTATGCTTATTTCATATGGAGGTC	120
Sbjct	21447	GCAAGCAATCTGTCTTTAGTGGTAGAGCAACTTGTGTTATGCTTATTTCATATGGAGGTC	21506
Query	121	CTTCGCTGTAAAGGTGTTTATTCAGGTGAGTTAGATCTTAAATTTGAATGTGGACTGT	180
Sbjct	21507	CTTCGCTGTAAAGGTGTTTATTCAGGTGAGTTAGATCTTAAATTTGAATGTGGACTGT	21566
Query	181	TAGTTTATGTTACTAAGAGCGGTGGCTCTCGTATACAAACAGCCACTGAACCGCCAGTTA	240
Sbjct	21567	TAGTTTATGTTACTAAGAGCGGTGGCTCTCGTATACAAACAGCCACTGAACCGCCAGTTA	21626
Query	241	TAACTCGACACAATTATAATAATATTACTTTAAATACCTTGTGTTGATTATAATATATATG	300
Sbjct	21627	TAACTCGACACAATTATAATAATATTACTTTAAATACCTTGTGTTGATTATAATATATATG	21686
Query	301	GCAGAACTGGCCAAAGGTTTTATTACTAATGTAACCGACTCAGCTGTTAGTTATAAATTATC	360
Sbjct	21687	GCAGAACTGGCCAAAGGTTTTATTACTAATGTAACCGACTCAGCTGTTAGTTATAAATTATC	21746
Query	361	TAGCAGACCGAGGTTTGGCTATTTTAGATACATCTGGTTCCATAGACATCTTTGTTGTAC	420
Sbjct	21747	TAGCAGACCGAGGTTTGGCTATTTTAGATACATCTGGTTCCATAGACATCTTTGTTGTAC	21806
Query	421	AAGGTGAATATGGTCTTACTTATTATAAGGTTAACCTTGCAGAGATGTCAACGACGAGT	480
Sbjct	21807	AAGGTGAATATGGTCTTACTTATTATAAGGTTAACCTTGCAGAGATGTCAACGACGAGT	21866
Query	481	TTGTAGTTTCTGGTGGTAAATTAGTAGGTATTCTTACTTCACGTAATGAGACTGGTTCTC	540
Sbjct	21867	TTGTAGTTTCTGGTGGTAAATTAGTAGGTATTCTTACTTCACGTAATGAGACTGGTTCTC	21926
Query	541	AGCTTCTTGAGAACCAAGTTTTACATTAAATCACTAATGGAACACGTCGTTTTAGACGTT	600
Sbjct	21927	AGCTTCTTGAGAACCAAGTTTTACATTAAATCACTAATGGAACACGTCGTTTTAGACGTT	21986

Figura 13. Alinhamento entre a sequência nucleotídica completa do gene da nucleoproteína do novo isolado de campo no Brasil IBVPR05 do VBI clonado no vetor pGEM- T Easy (Query) com o mesmo gene da estirpe de referência M41 do VBI depositado no Gene Bank (Sbjct) e identificado sob o número de acesso DQ834384

Até o momento são reconhecidas as inúmeras estratégias frequentemente mais usadas de clonagem de genes codificadores de uma gama de diferentes proteínas com o auxílio dos mais diversos vetores plasmidiais e usando como hospedeiros principalmente as células bacterianas, particularmente a *E. coli*. Esses sistemas de clonagem revelaram o seu enorme potencial de aplicação por serem mais acessíveis e comuns na produção de proteínas recombinantes heterólogas. (WALSH, 1998)

O gene codificador da glicoproteína S1 foi anteriormente clonado com sucesso em células bacterianas e expresso em sistemas utilizando vetores plasmidiais e virais, como células de batatas (ZHOU et al., 2003), baculovírus (SONG et al, 1998) e adenovírus (JOHNSON et al, 2003) A proteína recombinante S1 expressa em células de batatas transgênicas foi clonada, após a amplificação, com oligonucleotídeos específicos contendo sítios para enzimas de restrição como adotado neste estudo. Houve adequada amplificação do fragmento de interesse sendo obtida homologia de 99,7% para a estirpe M41 (ZHOU et al, 2003), demonstrando o sucesso do procedimento anteriormente adotado. Tal metodologia também já foi utilizada para a clonagem de outras estirpes desse mesmo vírus (SONG et al, 1998, JOHNSON et al, 2003) e foi adotada neste trabalho para facilitar a retirada do inserto gênico de interesse do vetor de clonagem e sua inserção no vetor de expressão pFLD α .

Com relação aos sistemas de expressão sabe-se que atualmente encontram-se diversas possibilidades de vetores produzidos para a levedura *P. pastoris*. O vetor adotado neste trabalho, o pFLD α apresenta como vantagem sobre os demais a codificação de uma cauda de poli-histidina. Tal etiqueta facilita a detecção da proteína recombinante com o uso de anticorpos monoclonais anti-histidina e também facilita a purificação da proteína recombinante obtida.

5.6 – Expressão do gene da glicoproteína S1 em células de leveduras *Pichia pastoris* GS115

Após a confirmação da correta orientação do inserto no vetor pFLD α e da elevada homologia com a seqüência nativa da glicoproteína S1 da estirpe M41 do VBI

foi iniciada a expressão da proteína recombinante. Inicialmente foi extraído o DNA plasmidial dos clones bacterianos cujo DNA já havia sido extraído e foi utilizado na reação de sequenciamento. Este foi submetido à reação de linearização com a digestão pela enzima Cla I (Invitrogen) para posterior transformação das células de leveduras. Pode-se observar que o material digerido apresentou-se superior no gel pela maior lentidão na corrida eletroforética.

Após a linearização do vetor o material foi purificado e quantificado segundo o marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) e apresentou concentração de aproximadamente 120 ng/μL conforme mostrado na figura 14.

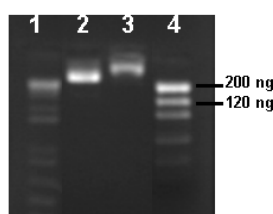


Figura 14: Quantificação em gel de agarose do vetor pFLD α ligado ao gene da glicoproteína S1 após linearização com a enzima Cla I (Invitrogen). Canaletas: (1) 1 KB Plus DNA Ladder; (2) Vetor pFLD α ligado ao gene da glicoproteína S1 extraído de células de *E. coli*; (3) Vetor pFLD α ligado ao gene da glicoproteína S1 extraído de células de *E. coli*; submetido à reação de digestão com a enzima Cla I (Invitrogen); (4) Marcador Low DNA Mass Ladder.

Posteriormente foram preparadas as células competentes e foi realizada a eletroporação das leveduras *P. pastoris* GS 115, utilizando-se neste procedimento 20μL do DNA previamente preparado. Foi obtido um grande número de colônias transformantes que foram armazenadas em uma placa de 96 poços tipo Cluster.

5.7 – Extração e quantificação do extrato protéico total intracelular e extracelular das células de leveduras transformadas pelo vetor pFLD α - S1

Após cultivo e indução da expressão em meios de composição mínima (item 4.5.4) e em pequena escala, foi realizada a análise bioquímica e imunoquímica das proteínas totais intracelulares e secretadas no compartimento extracelular. Foi observado que as maiores concentrações ocorreram na fração intracelular, sendo iguais a 0,60mg/mL, enquanto que na fração solúvel obtida no compartimento extracelular, após concentração com PEG, as concentrações foram muito reduzidas e iguais a 0,29mg/mL.

5.8 – Análise dos Extratos Protéicos totais intracelular e extracelular pelas técnicas de SDS-PAGE e Western Blotting

A análise pelas técnicas de SDS-PAGE do extrato bruto da levedura submetida ao processo de indução com metanol em meio de composição mínima, após 96 horas de indução, demonstrou a presença de uma banda com peso molecular estimado de 90 kDa, juntamente com várias outras frações protéicas da própria levedura. Para ajudar na comparação e identificação da banda referente à proteína S1 recombinante foi aplicada amostra de VBI concentrado com PEG, onde se pode observar com clareza a banda da proteína S1 viral com cerca de 90 kDa. Os resultados do Western-Blotting também revelaram a presença de uma única banda intensamente marcada pelos anticorpos monoclonais anti-histidina no tamanho esperado, indicando que foi expressa a proteína S1 recombinante com a cauda de poli-histidina, conforme demonstrado na figura 15. No entanto, o sistema adotado para a expressão da proteína S1 utilizando a linhagem GS115 e o vetor de secreção pFLD α não permitiu a detecção da proteína recombinante no sobrenadante das culturas de leveduras recombinantes propagadas em pequeno volume, nem em meios mínimos, onde apesar da evidência do sucesso da integração do cassete de expressão e indução da expressão dada pelo ensaio de Western Blotting, nem em meio complexo onde as quantidades de biomassa foram superiores.

A despeito de a proteína recombinante obtida não ter sido secretada, conforme se esperava para o vetor, a presença desse polipeptídeo recombinante no extrato da

fração intracelular juntamente com a sua reatividade, detectadas no Western-blotting caracteriza uma potencial aplicação em técnicas de imunodiagnóstico da infecção ou vacinação com o VBI.

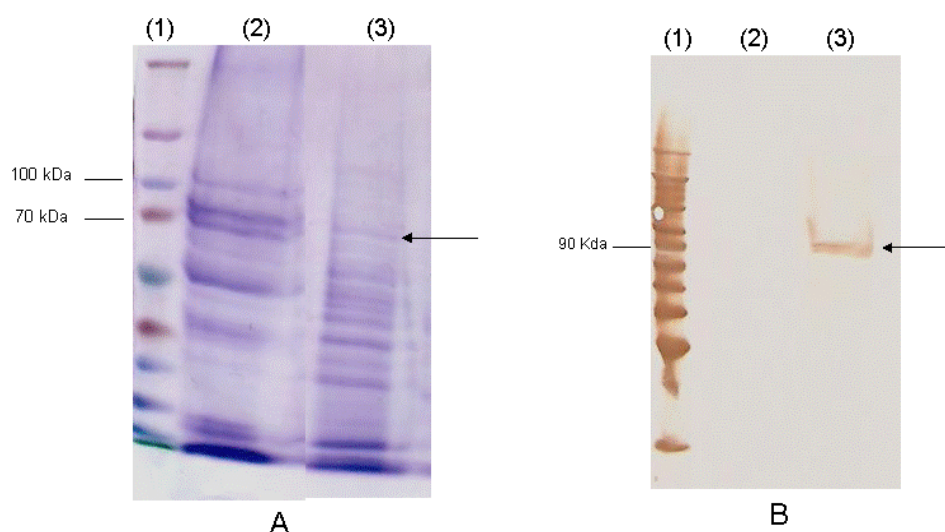


FIGURA 15: Análise nas técnicas de SDS-Page(A) e Western-Blotting (B), da proteína recombinante S1 expressa em *Pichia pastoris*. Canaletas (1) Marcador de peso molecular, (2) LCA M41 concentrado, (3)Proteína recombinante S1.

5.9 – Perfil de crescimento da levedura *Pichia pastoris* GS115 durante a fase de pré-indução

Como a proteína recombinante S1 foi obtida somente na fração intracelular do extrato protéico obtido após 96 h da indução de expressão nas células transformadas pelo vetor pFLD α -S1 de *P. pastoris*, foi avaliada a influência de alguns fatores sobre o crescimento e a expressão de proteínas heterólogas por essas leveduras.

Assim foi determinado o perfil de crescimento da linhagem GS115 recombinante de *P. pastoris* durante o período que antecede a indução da expressão do gene de

interesse, utilizando como única fonte de carbono o glicerol, com o objetivo de identificar o melhor intervalo de manutenção das culturas nestas condições para se pudesse iniciar a indução da expressão, o qual deveria ser coincidente com um momento de máximo de crescimento e, por conseguinte de mais elevada densidade óptica da cultura desse microrganismo. As leveduras utilizadas foram transformadas apenas com o vetor pFLD α , sem o inserto do gene S1, para que pudessem ser avaliados a influência de dois possíveis fatores separadamente, isto é, a presença do vetor pFLD α e deste juntamente com o inserto do gene S1 e, nesse último caso, do produto protéico expresso, sobre o crescimento da levedura transformada, em diferentes meios de maior ou menor seletividade.

Para tanto, foram comparados, na análise acima, quatro meios de cultura, três de composição definida (MGA) e um de composição mais complexa (BMGH), sendo feitas para avaliação da cinética de crescimento as leituras da DO₆₀₀ das culturas nos intervalos: 0h, 6h, 12h, 18h, 24h, 36h, 48h e 72h, de forma que pudesse ser determinado o período de obtenção da maior biomassa possível, o qual se constituiria no intervalo de tempo ideal para a interrupção da suplementação com glicerol e início do processo de indução com a adição do metanol. Os resultados obtidos revelaram que para o meio complexo, já a partir de 6h, houve diferença significativa da DO₆₀₀ no desenvolvimento das culturas, a qual foi se acentuando até o intervalo de 36 h, enquanto que as leveduras transformadas somente pelo vetor, apresentaram nos meios mínimos e nesse mesmo período, uma redução drástica no crescimento, com exceção de uma ligeira mudança na tendência de crescimento para o meio MGA-3 (figura 16). Tal comportamento pode ser justificado pela adaptação das culturas após transferência de um pré inoculo em meio complexo para o meio de composição mínima. O intervalo de 36 horas foi então inicialmente definido como o ideal para o início da indução, pois neste a DO₆₀₀ dos tratamentos atingiu o valor máximo, dentre todos os intervalos avaliados (figura 16).

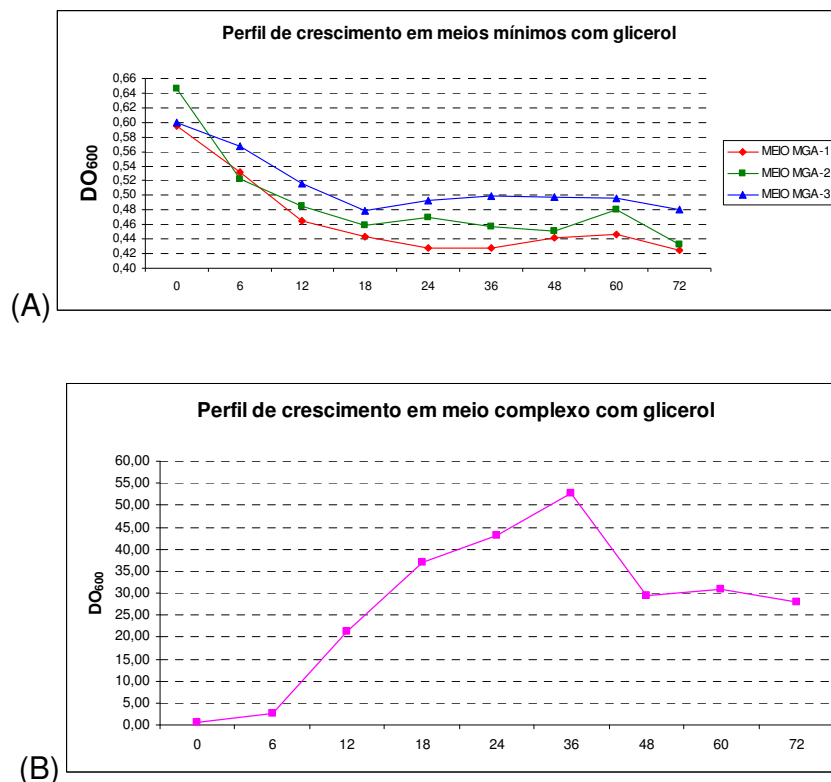


Figura 16: Avaliação do perfil de crescimento da levedura *Pichia pastoris* GS 115 contendo apenas o vetor pFLD α , sem o gene da glicoproteína S1, na fase de enriquecimento de biomassa em meios de composição mínima (A) e de composição complexa (B).

5.10 – Perfil de crescimento da levedura *Pichia pastoris* GS115 durante a fase de indução

Após a avaliação do perfil de crescimento das leveduras nos meios de composição mínima e complexa e determinação do melhor intervalo para manutenção da cultura no período que antecede a indução, foi realizada análise do crescimento das leveduras contendo apenas o vetor (GS115+pFLD α) durante a indução da expressão onde a única fonte de carbono é o metanol (item 4.9). Além disso, analisou-se o melhor período para a obtenção da proteína recombinante através da avaliação, em intervalos definidos, das proteínas da levedura transformada com o vetor contendo o inserto do gene da glicoproteína S1 (GS115+pFLD α + gene S1). As leveduras foram submetidas a

cultivo no meio mais complexo (BMGH/BMMH) e também no meio mínimo (MGA/MMA). Ao final dessa avaliação da cinética de crescimento, foi observado um pior desempenho das culturas da linhagem GS115+pFLD α + gene S1 em relação à cultura dessa mesma linhagem GS115+pFLD α sem o inserto do gene S1, ficando, assim, evidenciado um possível efeito da instabilidade genômica após a integração do plasmídeo recombinante, além de um possível efeito deletério da expressão da proteína recombinante S1 sobre a fisiologia celular (figuras 16 e 17).

Durante o monitoramento da cinética do crescimento da linhagem recombinante de *P. pastoris*, foram realizadas coletas da proteína bruta total intracelular e secretada nos intervalos de 24h, 48h, 72 e 96h para analisar o período de maior rendimento da secreção da proteína recombinante das leveduras cultivadas em meio mínimo e complexo. O extrato das proteínas brutas obtidas após dosagem foram submetidos a análise pela técnica de SDS-PAGE e Western blotting e somente o extrato obtido da fração intracelular das leveduras cultivadas em meio de composição mínima após 96h de indução foi marcado por anticorpos monoclonais anti-poli-histidina, que nesse compartimento ocorreu a expressão da proteína recombinante S1 no tamanho esperado de aproximadamente 90kDa (figura 18).

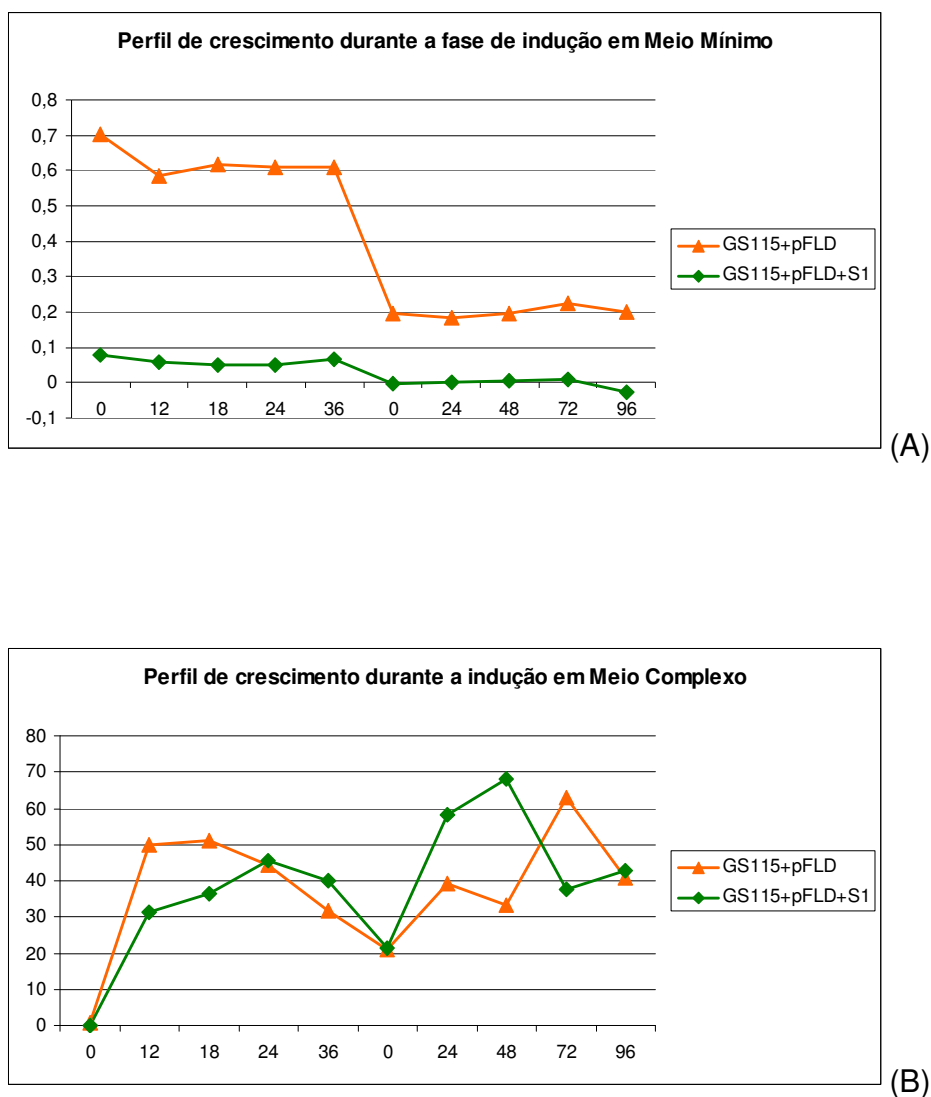


Figura 17: Avaliação do perfil de crescimento da levedura *Pichia pastoris* GS 115 contendo apenas o vetor pFLD α (GS115+pFLD α) e da levedura contendo o inserto gênico da glicoproteína S1 do VBI (GS115+pFLD α + S1) durante o processo de indução que inclui a fase de suplementação com glicerol (0-36 horas) e indução da expressão com metanol (0-96 horas), em meio de composição mínima (A) e complexa (B).

Tabela 02. Quantidade de proteína total obtida pelo método de Bradford (em mg/mL), após indução da expressão da glicoproteína recombinante S1, expressa intracelularmente e secretada no sobrenadante da cultura após 24h, 48h, 72h e 96h de indução de expressão em meios de composição definida (MMA) e complexa (BMMH).

Meio Mínimo				
Tempo de indução				
	24h	48h	72h	96h
Intracelular	0,209	0,100	0,260	0,603
Secretada	0	0	0	0
Meio complexo				
Tempo de indução				
	24h	48h	72h	96h
Intracelular	4,331	3,132	4,096	5,006
Secretada	1,204	2,511	0,979	0,002

Embora o meio de composição complexa tenha se mostrado mais eficiente com relação à obtenção de biomassa e tenha proporcionado valores significativamente superiores na dosagem de proteínas tanto na fração intracelular como no sobrenadante das culturas conforme ilustrado na tabela 02, somente as proteínas extraídas da fração intracelular de células cultivadas em meio de composição definida após 96 horas de indução foram marcadas pelos anticorpos monoclonais anti-histidina (figura 18) no ensaio de Western Blotting. Embora a quantidade de proteínas obtida após indução em meios de composição definida não tenha ultrapassado 0,6 mg/mL e a biomassa obtida tenha sido inferior, pode-se supor que o processo de indução da expressão do gene heterólogo foi mais eficiente, proporcionando a produção da proteína S1 recombinante.

Em vista de que a proteína S1 recombinante não foi encontrada sob a forma secretada no sobrenadante das culturas de *P. pastoris* recombinantes submetidas à indução da expressão gênica com metanol, pode-se supor que o volume de cultivo da linhagem recombinante em meio mínimo não tenha sido suficiente para a detecção da proteína recombinante na fração solúvel do sobrenadante da cultura, fazendo-se necessário o cultivo em volumes maiores para a obtenção de quantidades significativas do produto de interesse. Por outro lado, a produção de grandes quantidades de proteína heteróloga em frascos colocados sob agitação orbital em incubadoras apropriadas é difícil devido a limitações de volume, transferência de oxigênio, adição de substrato e impossibilidade de monitorar esses fatores eficientemente (PATRICK et al, 2005). Deve-se considerar, também, que, nessas condições de cultura, o consumo de metanol é limitado pela capacidade de transferência de oxigênio, e a indução da expressão pode sofrer restrições pelo menor consumo de metanol, o que poderia atuar negativamente sobre o processo de expressão pelas células de levedura (KHATRI & HOFFMAN, 2005; ZHANG et al., 2000).

Além disso, a ausência de um sinal da proteína recombinante sob a forma secretada pode ser consequência de um outro problema, que é a retenção de parte do produto protéico no interior do retículo endoplasmático das células transformadas (HOHENBLUM et al, 2004). Nessas circunstâncias, foi verificado que após o início da indução com metanol as células da levedura *P. pastoris* acumulam a proteína recombinante e após aproximadamente 20 horas começam a liberar o produto para o sobrenadante (HOHENBLUM et al, 2003), o que não foi observado em nosso sistema que, mesmo depois desse intervalo de tempo, não produziu a proteína S1 sob a forma secretada no sobrenadante da cultura da levedura recombinante. A propósito e no sentido de reforçar a hipótese acima, foi relatada a ocorrência desse tipo de retenção intracelular de proteínas recombinantes não processadas em protocolos de expressão por meio do sistema *P. pastoris* da enzima lipase de *Rhizopus oryzae* (ROL) (RESINA et al., 2005), do tripsinogênio humano (GASSER et al., 2007) e de fragmentos de anticorpos scFv (GASSER et al., 2006).

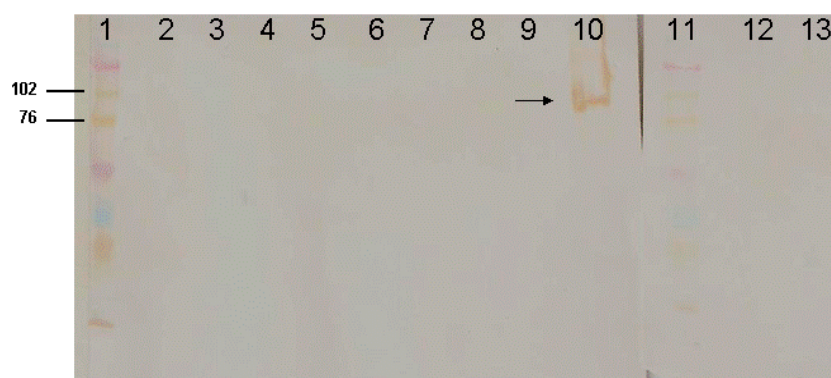


Figura 18 Análise na técnica de Western Blotting da proteína recombinante S1, fração intracelular, expressa em *Pichia pastoris* após cultivo em meio de composição definida. Canaletas (1) Marcador de peso molecular, (2) 6h indução, (3)12h de indução, (4)24h de indução, (5) 36h de indução, (6)48h de indução, (7)60h de indução, (8) 72h de indução, (9) 84h de indução, (10) 96h de indução, (11) Marcador de peso molecular, (12) 108 h de indução, (13) 120h de indução.

Todos esses fenômenos acima descritos, podem ser explicados também por um elevado estresse celular a que são submetidas as células de leveduras recombinantes, quando uma alta taxa de acúmulo de polipeptídeos não é acompanhada por uma elevada taxa de processamento, o que forçaria a proteínas ficar retida no meio intracelular (GASSER et al., 2006). Essa resposta é denominada UPR (*unfolded protein response*) e foi descrita para *P. pastoris* por HOHENBLUM et al. (2004) durante a expressão de tripsinogênio. Taxas limitadas de diferentes estágios de processamento de proteínas (dobramentos, translocação na membrana, processamento da sequência sinal, formação de pontes dissulfeto, glicosilação) podem induzir a UPR em leveduras (GASSER et al., 2006; MATTANOVICH et al., 2004). De forma que, uma consequência potencial das limitações de processamento do retículo endoplasmático é a resposta de estresse associada com a degradação das proteínas (ERAD) (MATTANOVICH et al., 2004). O processo é detectado em proteínas não processadas e redirecionadas para o

citossol, onde tais proteínas sofrem degradação proteossomal. WERNER et al (1996) e HILLER et al (1996) mostraram que durante a ERAD os substratos retrotransportados para o citossol são conjugados com ubiquitina e direcionados para uma via de degradação (MATTANOVICH et al., 2004).

Além disso, observou-se que para obter a secreção da proteína recombinante do coronavírus SARS foram necessárias pequenas modificações na sequência do inserto nativo através de PCR “over-lap”, para que houvesse diminuição do teor de bases adenina e timina no gene (LU et al, 2006). Dessa forma foi obtida uma proteína recombinante expressa no sobrenadante das culturas utilizando a linhagem GS115 e o vetor pPIC9K. Considerando-se a homologia existente entre tais vírus pode-se supor que seja necessária uma modificação na sequência da glicoproteína S1 do VBI através de um procedimento semelhante para possibilitar sua expressão no sistema *P. pastoris*, vetor pFLD α no sobrenadante das culturas.

Constata-se, assim, que o sistema adotado nesse estudo para a expressão da glicoproteína S1 utilizando a linhagem GS115 de *Picchia pastoris* e o vetor de secreção pFLD α não permitiu a detecção da proteína recombinante no sobrenadante das culturas de leveduras recombinantes propagadas em pequeno volume, nem em meios de composição mínima, apesar da evidência do sucesso da integração do cassete de expressão e da indução da expressão demonstrada pelo ensaio de Western blotting, nem em meios de composição mais complexa, onde as quantidades de biomassa produzida foram superiores.

Ainda, deve ser ressaltado que, a despeito de a proteína S1 recombinante obtida não ter sido secretada, conforme esperava-se para esse vetor, a presença desse polipeptídeo recombinante no extrato da fração intracelular juntamente com a demonstração de sua reatividade, detectadas no Western-blotting caracteriza uma potencial aplicação em técnicas de imunodiagnóstico da infecção ou vacinação com o VBI.

VI. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho foi possível concluir que:

6.1 O par de oligonucleotídeos iniciadores desenhados especificamente para esse estudo, permitiu a amplificação de toda a ORF do gene S1 da estirpe M41 do VBI por meio das técnicas de RT-PCR realizada a partir do RNA genômico desse vírus.

6.2 O processo de clonagem inicial foi bem sucedido e possibilitou que fossem isolados, um grande número de clones bacterianos transformantes e portadores do inserto gênico de interesse em posição correta de leitura e com sequência de nucleotídeos homóloga a do gene S1 da estirpe M41 do VBI.

6.3 O procedimento de subclonagem em células de leveduras da espécie *P. pastoris* do vetor contendo o gene codificador do polipeptídeo S1 do VBI e que foi obtido a partir do RNA genômico viral, foi realizado de forma apropriada e permitiu a obtenção de clones de leveduras transformantes que, após a indução, levou a expressão no compartimento intra-celular da proteína S1 com a etiqueta de poli-histidina e com propriedades imunoquímicas muito similares às da proteína S1 da própria estirpe M 41 do VBI.

6.4 O sistema hospedeiro de células da levedura *P. pastoris* com o vetor pFLD α usado para a clonagem e expressão de proteínas heterólogas, a despeito não ter produzido a proteína recombinante sob a forma solúvel, como era esperado, comprovou ser um método eficaz para a produção da proteína recombinante S1 da estirpe M41 do VBI, não impedindo inferir sobre o potencial da sua futura utilização em técnicas de imuno-diagnóstico da bronquite infecciosa das galinhas.

VII. REFERÊNCIAS

BIOEDIT. **BioEdit Sequence Alingment Editor** (versão 7.0.4.1, 1997-2005 Tom Hall).

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteiun using the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, n. 72, p. 248-254, 1976.

BRAKE, A. J.; MEFFYEWATHER, J. P.; COIT, D. G.; HEBERLEIN, U. A.; MASIARZ, F. R.; MULLENBACH, G. T.; URDEA, M. S.; VALENZUELA, P.;BARR, P. J. Alpha-factor directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae* **Proceedings of the National Academy of Science**, New Yourk, n. 81, p. 4642-4646, 1984.

CAVANAGH, D. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein. **Journal of General Virology**, London, n. 64, p. 2577-2583, 1993.

CAVANAGH, D. Coronavirus Surface glycoprotein. In: CAVANAGH, D. (Ed.). **The coronaviridae**. New York: Plenum, 1995, p. 73-133.

CAVANAGH, D.; DAVIS, P. I. Coronavirus IBV: Removal of spike glycopolypeptide S1 by urea abolishes infectivity and haemagglutination by not attachment to cells. **Journal of General Virology**, London, n. 67, p. 1443-1448, 1986.

CAVANAGH, D.;DARBYSHIRE, J. H.; DAVIS, P.; PETERS, R. W. Induction of humoral neutralizing and haemagglutination inhibiting antibody by spike protein of avian infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 13, p 573-583, 1984.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology, Review**, Amsterdam, n. 24, p. 45-66, 2000

CHEN, C. M.; CHENG, W. T. K.; CHANG, Y. C.; CHANG, T. J.; CHEN, H. L. Growth enhancement of fowls by dietary administration of recombinant yeast cultures containing enriched growth hormone. **Life Sciences**, Amsterdam, n.67, p. 2103-2115, 2000.

COOK, J. K. A. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. **Avian Pathology**, Huntingdon, n. 13, p. 733-741, 1984

COOK, J. K. A.; ORBELL, S. J.; WOODS, M. A.; HUGGINS, M. B. A survey of the presence of a new infectious bronchitis virus designated 4/91 (793B). **Veterinary Record**, London, n.138, p. 178-180, 1996.

COURDERC, R.; BARATTI, J. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris* purification and properties of alcohol oxidase. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, n.22, p. 2279-2289, 1980.

DAS, R. C.; SCHULTZ, J. L. Secretion of heterologous proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Progress**, New York, n.3, p. 43-48, 1987.

DAVELAAR, F. G.; KOUWENHOVEN, B.; BURGER, A. G. Occurrence and significance of infectious bronchitis variant strains in egg and broiler production in the Netherlands. **Veterinary Quarterly**, Washington, n. 6, p. 114-120, 1984.

EGLI, T.; VAN DIJKEN, J. P.; VEENHUIS, M.; HARDER, W.; FIECHTER, A. Methanol metabolism in yeasts regulation of the synthesis of catabolic enzymes. **Archives of Microbiology**, Berlin, n. 124, p. 115-121, 1980.

GASSER, B.; MAURER, M.; GACH, J.; KUNERT, R.; MATTANOVICH, D. Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 94, n. 2, p. 353-361, 2006.

GASSER, B.; MAURER, M.; RAUTIO, J.; SAUER, M.; BHATTACHARYYA, A.; SALOHEIMO, M.; PEMTTILA, M.; MATTANOVICH, D. Monitoring of transcriptional regulation in *Pichia pastoris* under protein production conditions. **BMC Genomics**, London, v. 8, n. 179, 2007.

GELB, Jr., J.; WOLFF, J. B.; MORAN, C. A. Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. **Avian Disease**, Amherst, v. 35, n. 1, p. 82-87, 1991.

GIBERTONI, A. M.; MONTASSIER, M. F. S.; SENA, J. A. D.; GIVISIEZ, P. E. N.; FURUYAMA, C. R. A. G.; MONTASSIER, H. J. Development and Application of a *Saccharomyces cerevisiae*-Expressed Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies against Infectious Bronchitis Virus. **Journal of Clinical. Microbiology**, Washington, v. 43, n. 4, p. 1982-1984, 2005

HARTNER, F. S., GLIEDER, A. Regulation of methanol utilization pathway genes in yeasts. **Microbial Cell Factories, Review.**, London, v. 5, n. 39, 2006.

HASTINGS SOFTWARE, **Gene Runner** (versão 3.05)

HILLER, M. M.; FINGER, A.; SCHWEIGER, M.; WOLF, D.H. ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. **Science**, Washington, n. 273, p. 1725-1758, 1996.

HIPOLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n.10, p.131-163, 1957.

HOHENBLUM, H.; BORTH, N.; MATTANOVICH, D. Assessing viability and cell-associated product of recombinant protein producing *Pichia pastoris* with flow cytometry. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, n. 102, p. 281-290, 2003.

HOHENBLUM, H.; GASSER, B.; MAURER, M.; BORTH, N.; MATTANOVICH, D. Effects of gene dosage, promoter, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 85, n. 4, p. 367-375, 2004.

HU, J. Q.; LI, Y. F.; GUO, J. Q.; SHEN, H. G.; ZHANG, D. Y.; ZHOU, J. Y. Production and characterization of monoclonal antibodies to ^{poly100}S1 protein of Avian Infectious Bronchitis Virus. **Zoonoses and Public Health**, Washington, n. 54, p. 69-77, 2007.

IGNJATOVIC, J.; ASHTON, F. Detection and differentiation of avian infectious bronchitis viruses using a monoclonal antibody-based ELISA. **Avian Pathology**, Huntingdon, n. 25, p. 721-736, 1996.

IGNJATOVIC, J.; SAPATS, S. Identification of previously unknown antigenic epitopes on the S and N proteins of avian infectious bronchitis virus. **Archives of Virology**, New York, v. 150, n. 9, p. 1813-1831, 2005.

JIA, W.; KARACA, K.; PARRISH, C. R.; NAQI, S. A. A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. **Virology**, New York, v. 140, n. 2, p. 259-271, 1995.

JOHNSON, M. A.; POOLEY, C.; IGNJATOVIC, J.; TYACK, S. G. A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus. **Vaccine**, London, n. 21, p. 2730-2736, 2003.

KHATRI, N. K.; HOFFMAN, F. Impact of methanol concentration on secreted protein production in oxygen-limited cultures of recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 93, n. 5, p. 871-879, 2005.

KING, D. J. Identification of recent infectious bronchitis virus isolates that are serologically different from current vaccine strains. **Avian Disease**, Amherst, v. 32, p. 362-364, 1988.

KOCH, G.; HARTOG, L.; KANT, A.; ROOZELAAR, D. J. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biologic functions. **Journal of General Virology**, London, n. 71, p. 1929-1935, 1990.

KURJAN, J. E.; HERSKOWITZ, I. Structure of a yeast pheromone gene (MF alpha) A putative alpha factor precursor contains four tandem copies of mature alpha factor. **Cell**, Cambridge, n. 30, p. 933-943, 1982.

KUSTERS, J. G., JAGER, E. J., NIESTERS, H. G. M., VAN DER, B. A. M.; Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Vaccine**, London, n. 8, p. 605-608, 1990.

LAI, M. M.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in Virus Research**, New York, n. 4, p. 81-100, 1997.

LOA, C. C.; LIN, T. L.; WU, C. C.; BRYAN, T. A.; HOOPER, T.; SCHRADER, D. Expression and purification of turkey coronavirus nucleocapsid protein in *Escherichia coli*. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, n. 116, p. 161-167, 2004.

LU, H.; YANG, G.; FEI, X.; GUO, H.; TAN, Y.; CHEN, H.; GUO, A. Modification of SARS-CoV S1 gene render expression in *Pichia pastoris*. **Virus Genes**, Berlin, n. 33, p. 329-335, 2006.

MARQUARDT, W. W.; SNYDER, D. B.; SCHLOTTHOBER, B. A. Detection and quantification of antibodies to infectious bronchitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. **Avian Disease**, Amherst, n. 25, p. 713 – 722, 1981.

MATTANOVICH, D.; GASSER, B.; HOHENBLUM, H.; SAUER, M. Stress in recombinant protein producing yeasts. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, n. 113, p. 121-135, 2004.

MONEIM, A. S. A.; KADY, M. F.; LADMAN, B. S.; GELB, J. J. S1 gene sequence analysis of a nephropathogenic strain of avian infectious bronchitis virus in Egypt. **Virology Journal**, London, v. 3, n. 78, 2006.

NDIFUNA, A.; WATER, A. K.; ZHOU, M.; COLLISON, E. W. Recombinant nucleocapsid protein is potentially an inexpensive effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. **Journal of Virological Methods**, New York, n. 70, p. 37-44, 1998.

NIESTERS, H. G. M.; LENSTRA, J. A.; SPAAN, W. J. M.; ZIJDERVELD, A. J.; BLEUMINK-PLUYM, N. M. C.; HONG, F.; VAN SCHARRENBURG, G. J. M.; HORZINEK, M. C.; VAN DER ZEIJST, B. A. M. The peplomer protein sequence of the m41 strain of coronavirus IBV and its comparison with beuadette strains. **Virus Research**, Amsterdam, v. 5, p. 253-263, 1986.

PATRICK, S. M.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, Davis, n. 22, p. 219-270, 2005.

PENA, L. J.; SANTOS, B. M.; ROBERTI, R. P.; MARIN, S. Y. Bronquite infecciosa das galinhas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 397-404, 2005.

RESINA, D.; COS, O.; FERRER, P.; VALERO, F. Developing high cell density fed-batch cultivation strategies for heterologous protein production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated FLD1 promoter. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 91, n. 6, p. 760-767, 2005.

SAMBROOK, J.; ROUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual, 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.

SCHALK, A. F.; HAWN, M. C. An apparently new respiratory disease of baby chicks. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, n. 78, p. 413–422, 1931.

SHEN, S.; SULTER, G.; JEFFRIES, T. W.; CREGG, J. M. A strong nitrogen source regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. **Gene**, New York, n. 216, p. 93-102, 1998.

SLIBINSKAS, R.; SAMUEL, D.; GEDVILAITE, A.; STANIULIST, J.; SASNAUSKASK. Synthesis of the measles virus nucleoprotein in yeast *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 115-124, 2004.

SNYDER, D. B.; MARQUARDT, W. W.; MALLINSON, E. T.; SAVAGE, P. K.; ALLEN, D. C. Rapid serological profiling by enzyme – linked immunosorbent assay III. Simultaneous measurements of antibody titers to infectious bronchitis , infectious bursal disease, and Newcastle disease viruses in a single serum dilution. **Avian Disease**, Amherst, n. 25, p. 213-222, 1983.

SONG, C. S.; LEE, Y. J.; LEE, C. W.; SUNG, H. W.; KIM, J. H.; MO, J. P.; IZUMIYA, Y.; JANG, H. K.; MIKAMI, T. Induction of protective immunity in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus S1 glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus. **Journal of General Virology**, London, n. 79, p. 719-723, 1998.

VILLEGAS, P. Control de reacciones respiratorias. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE AVICULTURA, 16, 1997, México. **Anais**: p. 388-391.

WALSH, G. **Biopharmaceuticals**: biochemistry and biotechnology. London: Wiley, 1998, p. 94-95.

WANG, X.; SCHNITZLEIN, W. M.; TRIPATHY, D. N.; GIRSHICK, T., KHAN, M. I. Construction and immunogenicity studies of recombinant fowl poxvirus containing the S1 gene of massachussets 41 strain of infectious bronchitis virus. **Avian disease**, Amherst, v. 46, n. 4, p. 831-838, 2002.

WERNER, E. D.; BRODSKY, J. L.; MCCRACKEN, A. A. Proteasome-dependent endoplasmatic reticulum-associated protein degradation: An unconventional route to a familiar fate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, n. 93, p. 13797-13801, 1996.

ZHANG, W.; BEVINS, M. A.; PLANTZ, B. A.; SMITH, L. A.; MEAGHER, M. M. Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, Serotype A. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 70, n. 1, 2000.

ZHOU, J. Y.; WU, J. X.; CHENG, L. Q.; ZHENG, X. J.; GONG, H., SHANG, S. B.; ZHOU, E. M. Expression of immunogenic S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus in transgenic potatoes. **Journal of Virology**, Washington, n.77, p. 9090-9093, 2003.

APÊNDICE

8.1- Soluções estoque

8.1.1- Yeast Nitrogen Base with ammonium sulfate and without amino acids (YNB) 17% (Invitrogen):

Dissolver 170g de YNB em 1000mL de água Mili-Q. Filtrar a solução em capela de fluxo laminar para ocorrer a completa esterilização. Estocar a 4°C por até um ano.

8.1.2 - Biotina 2% (Invitrogen):

Dissolver 20g de biotina em 1000mL de água Mili-Q. Filtrar a solução em capela de fluxo laminar para ocorrer a completa esterilização. Estocar a 4°C por até um ano.

8.1.3 - Histidina 0,4% (Invitrogen) :

Dissolver 4g de histidina 1000mL de água Mili-Q. Se necessário, aquecer para dissolver completamente (até 50°C). Filtrar a solução em capela de fluxo laminar para ocorrer a completa esterilização. Estocar a 4°C por até um ano.

8.1.4 - Dextrose (D-Glicose) 20% :

Dissolver 200g de Dextrose em 1000mL de água Mili-Q. Filtrar a solução em capela de fluxo laminar para ocorrer a completa esterilização. Estocar a 4°C por até um ano.

8.1.5 - Metanol 50% :

Misturar 500mL de metanol em 500 mL de água Mili-Q . Filtrar a solução em capela de fluxo laminar para ocorrer a completa esterilização. Estocar a 4°C por até dois meses.

8.1.6- Glicerol 10%

Misturar 100 mL de Glicerol com 900 mL de água Mili-Q. Autoclavar a 121°C por 30 minutos. Estocar a temperatura ambiente por até um ano.

8.1.7- Ampicilina [20mg/mL] :

Dissolver 23,64 mg de ampicilina (pureza 846 µg/mg) em 1mL de água Mili-Q. Se necessário adicionar hidróxido de sódio para diluir completamente a ampicilina. Filtrar a solução em capela de fluxo laminar e estocar a -20°C.

8.1.8 - Tampão Fosfato de Potássio 1M, pH 6,0:

Misturar 132 mL de K₂HPO₄ 1M com 868mL de KH₂PO₄ 1M e acertar o pH até 6,0 ±0,1(usar ácido fosfórico ou hidróxido de potássio para ajustar o pH). Autoclavar a 121°C por 30 minutos e estocar a temperatura ambiente por até um ano.

8.1.9 - Sorbitol 1M:

Dissolver 182,17g de Sorbitol em 1000mL de água Mili-Q. Após a dissolução completa autoclavar a 121 °C por 30 minutos. Estocar a 4°C.

8.1.10 - Sulfato de amônio 10% :

Dissolver 100g de sulfato de amônio em 1000mL de água Mili-Q. Após a dissolução completa filtrar a solução em capela de fluxo laminar e estocar a 4°C.

8.1.11- Tampão de lise para *Pichia pastoris*

50 mM Fosfato de sódio Monobásico, pH 7,4

1mM PMSF (fenilmetilsulfonil fluorida)

1mM EDTA

5% Glicerol

Dissolver o fosfato de sódio, o EDTA e o glicerol em água deionizada. Ajustar o pH até 6,0 usando hidróxido de sódio. Adicionar o PMSF ou outros inibidores de proteases. Estocar a 4°C.

8.2- Meios de Cultura

8.2.1 - Meio LB (Luria-Bertani) (Sambrook & Russel, 1989) sólido com ampicilina a [50µg/mL]:

Composição para 1000mL:

LB40g
 Ágar15g
 Ampicilina (20mg/mL) (item 8.1.7).....250µL
 Água destilada1000mL

Dissolver o LB em aproximadamente 700mL de água destilada. Após a dissolução completa acertar o volume para 1000 mL, adicionar o ágar e autoclavar a 121°C por 30 minutos. Após a esterilização e o resfriamento adicionar a ampicilina e distribuir o meio em placas de Petri. Estocar a 4°C.

8.2.2 - Meio LB (Sambrook & Russel, 1989) líquido com ampicilina a [50µg/mL]:

Composição para 1000mL:

LB40g
 Ampicilina (20mg/mL).(item 8.1.7).....250µL
 Água destilada1000mL

Dissolver o LB em aproximadamente 700mL de água destilada. Após a dissolução completa acertar o volume para 1000 mL e autoclavar a 121°C por 30 minutos. Após a esterilização e o resfriamento adicionar a ampicilina em capela de fluxo laminar. Estocar a 4°C.

8.2.3 - Meio YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) Líquido:

Composição para 1000mL:

Extrato de levedura (Yeast extract).....10g
 Peptona (Peptone)20g
 Dextrose 20% .(item 8.1.4).....100mL

Água destilada900mL

Dissolver os componentes sólidos em aproximadamente 700mL de água destilada. Após a dissolução completa acertar o volume para 900mL e autoclavar a 121°C por 30 minutos. Após a esterilização e o resfriamento adicionar a glicose 20% em capela de fluxo laminar. Estocar a 4°C.

8.2.4- Meio YPD Sólido:

Composição para 1000mL:

Extrato de levedura (Yeast extract)10g

Peptona (Peptone)20g

Ágar20g

Dextrose 20% .(item 8.1.4)100mL

Água destilada900mL

Dissolver os componentes sólidos em aproximadamente 700mL de água destilada. Após a dissolução completa acertar o volume para 900mL, adicionar o ágar e autoclavar a 121°C por 30 minutos. Após a esterilização e o resfriamento adicionar a glicose 20% em capela de fluxo laminar e distribuir o volume em placas de Petri. Estocar a 4°C.

8.2.5 - Meio YPDS (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium with Sorbitol) líquido com antibiótico Zeocina (Invitrogen):

Composição para 1000mL:

Extrato de levedura (Yeast extract)10g

Peptona (Peptone)20g

Sorbitol182,2g

Dextrose 20% .(item 8.1.4)100mL

Zeocina (100mg/mL)250 µL

Água destilada900mL

Dissolver os componentes sólidos em aproximadamente 700mL de água destilada. Após a dissolução completa acertar o volume para 900mL e autoclavar a 121°C por 30

minutos. Após a esterilização e o resfriamento adicionar a glicose 20% e a Zeocina em capela de fluxo laminar. Estocar a 4°C.

8.2.6 - Meio YPDS Sólido com antibiótico Zeocina (Invitrogen):

Composição para 1000mL:

Extrato de levedura (Yeast extract)	10g
Peptona (Peptone)	20g
Sorbitol	182,2g
Ágar	20g
Dextrose 20% (item 8.1.4)	100mL
Zeocina (100mg/mL)	250µL
Água destilada	900mL

Dissolver os componentes sólidos em aproximadamente 700mL de água destilada. Após a dissolução completa acertar o volume para 900mL e adicionar o ágar. Autoclavar a 121°C por 30 minutos. Após a esterilização e o resfriamento adicionar a glicose 20% e a Zeocina em capela de fluxo laminar. Distribuir o volume em placas de Petri e estocar a 4°C.

8.2.7 - Meio MGA (Minimal Glicerol with Ammonium Sulfate Medium):

Composição para 1000mL:

YNB 17% (item 8.1.1)	79 mL
Biotina 2% (item 8.1.2)	10 mL
Glicerol 10% (item 8.1.6)	200mL
Sulfato de amônio 10% (item 8.1.10)	100mL
Histidina 0,4% (item 8.1.3)	10 mL
Água destilada	601 mL

Autoclavar a água a 121°C por 30 minutos. Em capela de fluxo laminar adicionar os demais componentes previamente esterilizados. Estocar a 4°C.

8.2.8- Meio MMA (Minimal Methanol with Ammonium Sulfate Medium):

Composição para 1000mL:

YNB 17% (item 8.1.1)	79 mL
Biotina 2% (item 8.1.2)	10 mL
Metanol 50% (item 8.1.5)	20mL
Sulfato de amônio 10% (item 8.1.10)	100mL
Histidina 0,4% (item 8.1.3)	10 mL
Água destilada	781 mL

Autoclavar a água a 121°C por 30 minutos. Em capela de fluxo laminar adicionar os demais componentes previamente esterilizados. Estocar a 4°C.

8.2.9 - Meio BMGH (Buffered Glycerol Complex Medium with Histidine):

Composição para 1000mL:

Extrato de levedura (Yeast Extract)	10g
Peptona	20g
Tampão fosfato de potássio 1M (item 8.1.8)	100mL
YNB 17% (item 8.1.1)	79mL
Biotina 2% (item 8.1.2)	0,02 mL
Glicerol 10% (item 8.1.6)	100mL
Histidina 0,4% (item 8.1.3)	10 mL
Água destilada	711 mL

Dissolver o extrato de levedura e a peptona em 711 mL de água destilada e autoclavar a 121°C por 30 minutos. Após o resfriamento adicionar os demais componentes previamente esterilizados em capela de fluxo laminar. Estocar a 4°C.

8.2.10 - BMMH (Buffered Glycerol Complex Medium with Histidine):

Composição para 1000mL:

Extrato de levedura (Yeast Extract)	10g
Peptona	20g
Tampão fosfato de potássio 1M (item 8.1.8)	100mL
YNB 17% (item 8.1.1)	79mL
Biotina 2% (item 8.1.2)	0,02 mL
Metanol 50% (item 8.1.5)	10mL
Histidina 0,4% (item 8.1.3)	10 mL
Água destilada	801 mL

Dissolver o extrato de levedura e a peptona em 801 mL de água destilada e autoclavar a 121°C por 30 minutos. Após o resfriamento adicionar os demais componentes previamente esterilizados em capela de fluxo laminar. Estocar a 4°C.