

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**CLONAGEM, EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CAPSIDIAL DE *Grapevine Virus B*
(GVB) E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS E MONOCLONAIS**

Dissertação de Mestrado

LEONARA PATRÍCIA DALL' ONDER

Porto Alegre

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**CLONAGEM, EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CAPSIDIAL DE *Grapevine Virus B*
(GVB) E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS E MONOCLONAIS**

Leonara Patrícia Dall' Onder

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior

Co-orientadora: Dr^a. Sandra Estrazulas Farias

Porto Alegre

Abril, 2008

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul - UFRGS, com apoio financeiro do CNPq, PRONEX, FINEP e FAPERGS.

“Todos nós temos uma terrível e inevitável hora final, quando é preciso escolher entre as coisas pelas quais vivemos ou aquelas pelas quais morremos”.

Barão Opperheim

Dedico

Em memória de minha amada mãe Leoneide Gemma Giacomelli Dall Onder, pelo amor, carinho, confiança, dedicação e principalmente pela orientação que deu à minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior pela orientação e oportunidade;

À Dra. Sandra Estrazulas Farias e Dra. Aoi Masuda pela colaboração e pelos conhecimentos repassados;

Ao professor Nickel pela oportunidade de iniciar esta nova etapa da minha vida;

Ao professor Carlos Alexandre pelo apoio;

Aos colegas do laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal e outros laboratórios: Fernanda Klein, Paula, Caroline Andrade, Carolina Weber, Luiz Fernando, Juliana Fin, Kiyoko, Ana Paula, Isis Abel, Alessandra e Clotilde entre outros; obrigado pelo convívio e cooperação, em especial a minha amiga Maria Lucia pela ajuda durante meus experimentos;

À minha falecida mãe, que mesmo não estando presente, sempre me serviu de estímulo e exemplo;

À minha tia Zelinda por todo o apoio emocional e espiritual, paciência e preocupação com minha saúde, ao meu irmão Sandro e minha cunhada Ana pela paciência e palavras de apoio, à minha tia Cleci pela constante presença e apoio, a todos os meus parentes e amigos que sempre mesmo não ao meu lado torceram pelo meu sucesso.

Ao meu amor Jader Antônio Soares pela paciência, amor e palavras de carinho dedicado por todo este tempo.

Às minhas eternas companheiras de quatro patas, minhas gatas e minha pequena cadela pela paciência e companhia.

Ao meu falecido pai Hermes e irmão Renato pela presença em minha vida.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aos colegas de outros laboratórios do Centro de Biotecnologia.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A Deus por ter me ajudado a superar todos os obstáculos da vida e concluir mais esta etapa.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	6
ÍNDICE.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	14
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivos Gerais.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Reagentes.....	22
3.2 Soluções e tampões.....	22
3.2.1 Tampões para eletroforese	22
3.2.2 Tampões e soluções para Western-blot	23
3.2.3 Soluções e tampões para ELISA	24
3.2.4 Soluções para extração de DNA plasmidial	24
3.2.5. Soluções de lise celular	24
3.2.6 Tampão de eluição	25
3.2.7 Tampão de extração de videira (pH 8,2)	25
3.2.8 Meio de cultura para hibridomas	26
3.3 Marcadores de massa molecular	26
3.4 Meios de cultura para bactérias	26
3.5 Antibióticos.....	27
3.6 Enzimas.....	27
3.7 Vetores e Primers para clonagem.....	28
3.8 Linhagem de <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	29
3.9 Animais.....	29
3.9.1 Camundongos	29
3.9.2 Coelho	29

3.10	Clonagem da rGVB	29
3.11	Transformação de células competentes por eletroporação.....	30
3.12	Extração de DNA plasmidial	31
3.13	Análise quantitativa e qualitativa do DNA plasmidial	32
3.14	Seqüenciamentos do clone	32
3.15	Expressão	33
3.16	Solubilização dos corpúsculos de inclusão (CI)	34
3.17	Purificação da proteína recombinante (rGVB)	34
3.18	Imunizações.....	35
3.18.1	Coelho	35
3.18.2	Camundongos	35
3.19	Obtenção de células para fusão.....	36
3.20	Fusões celulares	36
3.21	Clonagem por diluição limitante	37
3.22	Western blot.....	37
3.22.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida	37
3.22.2	Transferência.....	38
3.22.3	Ensaio imunoenzimático.....	38
3.22.4	Dot-Blot.....	39
3.22.5	ELISA Indireto	40
3.23	Extrato de videira	41
4	RESULTADOS	42
4.1	Clonagem	42
4.2	Seqüenciamento	43
4.3	Expressão	46
4.4	Western blot.....	47
4.5	Solubilização dos corpúsculos de inclusão (CIs)	48
4.6	Purificação	49
4.7	Produção de anticorpos policlonais	51
4.8	Titulação do antisoro policlonal de coelho.....	52
4.9	Produção de anticorpos monoclonais	53
4.10	Isotipagem do anticorpo monoclonal.....	54

4.11	Reconhecimento da proteína nativa	55
5	DISCUSSÃO.....	58
6	CONCLUSÕES	64
7	PERSPECTIVAS	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2E11	mAb anti-GVB1a
APS	persulfato de amônio
BCIP	butilcarbamato de 3-iodo-2-propinilo
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar ao RNA
CP	proteína capsial
D.O.	densidade óptica
DME	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxiribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
ELISA	ensaio imunoenzimático ligado a enzimas
EtBr	brometo de etídio
HAT	meio de cultura para seleção de hibridomas com hipoxantina, aminopterina e timidina
His-tag	cauda de histidina
HT	meio de cultura com hipoxantina e timidina
IgG	imunoglobulina G
IPTG	isopropil B-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	quilodalton
LB	meio Luria-Bertani
mAb	anticorpo monoclonal
MP	proteína de movimento
mRNA	RNA mensageiro
NBT	azul de nitro tetrazolio
OPD	o-fenilenodiamino dihidrocloro
ORF	seqüência aberta de leitura (<i>open reading frame</i>)
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida

pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
PEG	polietilenoglicol
<i>primer</i>	oligonucleotídeo iniciador
rGVB	proteína recombinante anti capsídio viral de <i>Grapevine virus B</i>
rGVB1a	proteína expressa em <i>E. coli</i> BL 21 (DE3) RP
RNA	ácido ribonucléico
SDS	dodecil-sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SP2/0	mieloma de camundongo não produtor de imunoglobulina
TEMED	N,N,N',N' tetrametilenadiazina
TPCK	1-cloro-3-(4-tosil-amido)-4-fenil-2-butanona- <i>N</i> -tosil-L-fenilalanina clorometil cetona
Tris	tris (hidroximetil) aminometano

RESUMO

GVB é um patógeno agrícola composto por RNA de fita simples de senso positivo, com extremidades 3' poliadeniladas e tem seu diagnóstico feito por testes biológicos, imunológicos e moleculares. Juntamente com outros vírus, causa a síndrome do “complexo rugoso”, que impede a pega da enxertia, destruindo o floema e matando a planta precocemente. A produção de anticorpos contra uma proteína do capsídeo e o desenvolvimento de teste imunológico são os objetivos deste trabalho. A clonagem da região codificante da proteína do capsídeo do *Grapevine Virus B* foi obtida por PCR, utilizando *primers* específicos para região codificante e com sítios de restrição para endonucleases *Bam*HI e *Nde*I, obtendo-se um amplicon de 594 pb. Este fragmento foi clonado no vetor de expressão pET19b e transformado em *Escherichia coli* BL21 Codon Plus (DE3) RP (Stratagene). Para a expressão da proteína rGVB1a (24 kDa com cauda de histidina), estabeleceu-se uma indução de 1 mM de IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside), mantida sob agitação a 25^oC por 18 horas. A expressão foi analisada por SDS-PAGE 13% e a presença da rGVB1a foi confirmada por Western blot, usando anticorpo monoclonal anti-histidina. A rGVB1a expressada foi purificada por cromatografia de afinidade a cauda de histidina em resina sepharose-Ni²⁺. A proteína purificada foi utilizada para imunizar um coelho e sete lotes de três camundongos para obtenção de soro policlonal e monoclonal contra a proteína recombinante. A fusão de células de linfócitos B com mielomas SP2/0 foi realizada, obtendo-se um hibridoma produtor de anticorpo IgG2a que em

testes de ELISA e Western blot reconhecem a proteína recombinante. Adicionalmente, testes de Western blot utilizando extrato total de plantas sintomáticas e assintomáticas foram realizados para verificar se estes soros reconheciam a proteína nativa.

ABSTRACT

GVB is an agricultural pathogen composed by a single-stranded positive sense RNA with poliadenilated 3' end and its diagnosis is based on biological, immunological and molecular tests. Together with another virus, it causes the rugose wood complex disease which prevents grafting, destroying the phloem and killing the plant early. The objectives of this work are the production of antibodies against the coat protein and the development of an immunological test. Cloning of a coat protein coding gene from *Grapevine Virus B* was performed by PCR, using specific primers for the coding region with restriction sites for *Bam*HI and *Nde*I endonucleases, obtaining an amplicon of 594 bp. This fragment was cloned into the pET19b expression vector and transformed with *Escherichia coli* BL21 Codon Plus (DE3) RP (Stratagene). For expression of rGVB1a protein (24 kDa with histidine tail) a protocol with 1 mM IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside), and shaking for 18 hours at 25°C was established. The expression was analyzed by SDS-PAGE 13% and the presence of rGVB1a was confirmed by Western-blot, using an anti-histidine monoclonal antibody. rGVB1a expressed was purified by histidine tail Ni²⁺ Sepharose affinity chromatography. Purified protein was used to immunize a rabbit and seven lots of mice to obtain policlonal serum and monoclonal antibody against the recombinant protein. Cell fusions of lymphocyte B and SP2/0 were performed and a hybridoma producer of IgG2a antibody was obtained. This hybridoma recognized the recombinant protein in ELISA and Western blot tests. Additionally, Western blot using the extract of symptomatic and

asymptomatic plants were developed to investigate if these serum recognize the native protein.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo da videira é realizado pela multiplicação vegetativa (estaquia, ou enxertia), o que deixa os vinhedos expostos às doenças causadas por patógenos que podem ser difundidos pelo material de propagação (KUNH & FAJARDO, 2007).

O complexo rugoso da videira pode ser formado por diversos vírus que causam modificações no lenho. Membros do gênero *Vitivirus* ou *Foveavirus* da família *Flexiviridae* são suspeitos de estarem envolvidos individualmente no complexo rugoso da videira (MOSKOVITZ *et al.*, 2007).

Segundo Bonavia *et al.* (1996) o complexo rugoso é formado por quatro participantes diferentes, entre eles: *Grapevine virus B*, GVB (intumescimento dos ramos); *Grapevine virus A*, GVA (acanaladura do lenho de Krober); *Rupestris stem pitting-associated virus*, RSPaV (caneluras do tronco de Rupestris) e um quarto vírus não identificado denominado acanaladura do lenho LN33. Estas viroses comumente ocorrem em conjunto, mas podem ocorrer de forma isolada.

O intumescimento dos ramos da videira ("Grapevine Corky Bark"), considerado de origem viral, foi descrito pela primeira vez em 1954 na Califórnia com o nome de "Grapevine Rough Bark" e posteriormente, denominado "Grapevine Corky Bark". Em 1996 o genoma de um isolado italiano de GVB foi completamente seqüenciado (SHI *et al.*, 2004). No Brasil a doença foi descrita em São Paulo, no Rio Grande do Sul e no Vale do São Francisco (PE/BA) (KUNH & FAJARDO, 2007). O *Grapevine virus B* está envolvida na etiologia dessa doença

economicamente importante e difundida mundialmente (GOSZCZYNSKI *et al.*, 1997). Esse vírus, que era classificado como *Trichovirus*, foi recentemente transferido para o novo gênero dos *Vitivirus*, juntamente com os vírus GVA, GVC e GVD isolados de videiras afetadas pelo complexo rugoso da videira (KUHN & FAJARDO, 2007).

O GVB é transmissível pela via mecânica (como através de enxertia) para uma gama de hospedeiros herbáceos, a maioria *Nicotiana* spp (KUHN & FAJARDO, 2007). Por outro lado, Bonavia *et al.* (1996) relatam não ser fácil à transmissão direta por via mecânica de videiras que crescem no campo, embora seja possível. Como relatado para outros vírus associados ao floema que atacam videiras, a transmissão do GVB é obtida com maior sucesso quando as plantas são inoculadas *in vitro*.

Existem provas experimentais de transmissão controlada do GVB por diversas espécies de cochonilhas brancas dos gêneros *Pseudococcus* e *Planococcus* (NICKEL *et al.*, 2002). Em 2006, Kuniyuki *et al.* realizaram experimentos para comprovar a infecção de dois isolados de GVB por uma nova espécie de cochonilha branca, a *Pseudococcus longispinus*.

Os sintomas são facilmente observados e se caracterizam pelo intumescimento dos entrenós do ramo do ano, com fendilhamento longitudinal do tecido afetado (figura 1). Em alguns cultivares viníferos pode ser observado o avermelhamento das folhas, que se evidencia no outono, enquanto que na planta sadia as folhas permanecem com a coloração normal. Outro sintoma associado à presença do vírus é o engrossamento na região da enxertia (KUHN & FAJARDO, 2007).



Figura 1 - Folha de LN33 (*Vitis* sp.), indicadora de GVB, demonstrando os sintomas de infecção por GVB que são: intumescimento dos ramos, enrolamento e avermelhamento da folha.

A severidade da doença varia bastante, pois alguns cultivares reagem fortemente à infecção, e outros não apresentam sintomas definidos ou não os exibem (MOREIRA *et al*, 2004). Segundo Tanne *et al*, (1990) a perda da produção de uva é proporcional à severidade dos sintomas e dependendo do porta-enxerto, a redução em relação à planta sadia pode ser próxima a 100% .

Não se dispõem de dados experimentais definitivos sobre os danos causados, mas tem-se constatado nas regiões vitícolas do Rio Grande do Sul, de Santa Catarina e do Paraná que o vírus afeta severamente cultivares americanos como a Isabel, Niágara Rosada e Niágara Branca. Nos cultivares de *Vitis vinifera* o *Grapevine virus B* associado ao sintoma de engrossamento na região da enxertia, causa a morte de mudas nos primeiros 2-3 anos de desenvolvimento (KUHN & FAJARDO, 2007).

O *Grapevine virus B* é especificamente associado ao intumescimento dos ramos. O vírus é formado por partículas com 700-800 nm de comprimento, e a subunidade da capa protéica possui massa molecular entre 21,6 a 23 kDa (NICKEL *et al.*, 2002). Seu genoma, que já foi completamente seqüenciado, é constituído de ssRNA de senso positivo, contendo cinco importantes regiões codificantes, que são: ORF1, que codifica um polipeptídio de 194 kDa com características de uma proteína associada a replicação; a ORF2, que codifica uma proteína de 20 kDa sem homologia com outras proteínas; a ORF3, que codifica uma suposta proteína de movimento; a ORF4, que codifica a proteína da capa protéica (CP); e a ORF5, que codifica para uma proteína que exhibe seqüência similar à proteína de ligação ao RNA (MOSKOVITZ *et al.*, 2007). A figura 2 mostra a representação esquemática da organização do genoma do GVB.

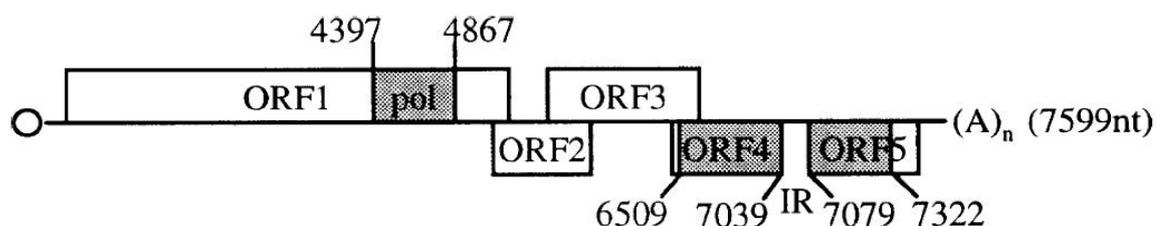


Figura 2 - Organização genômica do GVB mostrando as cinco ORFs: ORF1 que codifica para um polipeptídio de 194 kDa; ORF2 codifica uma proteína de 20 kDa; ORF3 codifica uma suposta proteína de movimento; ORF4 codifica a proteína da capa protéica (CP); e ORF5 codifica uma proteína que exhibe seqüência similar à proteína de ligação ao RNA (Fonte: SHI *et al.*, 2004).

O estudo das proteínas traduzidas pelas cinco regiões codificantes caracteriza os agentes causais das principais doenças do Grapevine. O gene de CP (proteína capsidial) de um isolado de GVB, identificado em videiras (*Vitis labrusca* L. e *V. vinifera* L.) por enxertia em LN33, foi anteriormente caracterizado (NICKEL *et al.*, 2002).

As alterações individuais podem ser distinguidas baseadas em diferentes reações das indicadoras *Vitis*, mas não no campo, devido à ausência de especificidade e caracterização consistente dos sintomas (BONAVIA, *et al.*, 1996). Este vírus tem um significativo impacto em áreas livres da doença. Com o crescimento dos vinhedos e da produção de vinho, estudos sobre como pode ser diagnosticada a doença e identificado o agente causador são muito mais importantes nos primeiros anos de vida da planta, evitando gastos desnecessários e a indesejada propagação dos patógenos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- 1- Clonagem e expressão da proteína capsidial de GVB em vetor de expressão pET19b;
- 2- Desenvolvimento de anticorpos monoclonais e policlonais contra a forma nativa e recombinante da proteína do capsídio viral de GVB.

2.2 Objetivos Específicos

- 1- Sub-clonagem do cDNA da proteína capsidial do GVB em vetor de expressão procarioto;
- 2- Expressão em sistema heterólogo e purificação da proteína recombinante (rGVB);
- 3- Imunização de camundongos e coelho com rGVB;
- 4- Verificar a resposta imunológica induzida por rGVB em camundongos e coelho;
- 5- Produção de um anticorpo monoclonal contra a proteína recombinante que reconheça a proteína nativa e possa ser utilizado para desenvolvimento de um teste diagnóstico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

- Merck: ácido acético, bicarbonato de sódio, citrato de sódio, cloreto de cobalto, etanol absoluto, glicerol, metanol;
- Bio-Rad: padrão de massa molecular amplo para SDS-PAGE;
- Cultilab: soro fetal bovino;
- Pharmacia: proteína A sepharose;
- BioAgency: membrana de nitrocelulose 0,45 µm;
- Nestlé: leite em pó desnatado Molico;
- Reagen: bicarbonato de sódio e cloreto de sódio;
- Sigma: adjuvante completo de Freund, adjuvante incompleto de Freund, acrilamida, albumina sérica bovina tipo V, azul de bromofenol, bisacrilamida, Coomassie G-250, DMSO, fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico, glicina, leupeptina, pepstatina, TPCK, OPD, PEG-3500, TEMED, Trizma base, SDS, Conjugado anti-IgG de camundongo (peroxidase e fosfatase) e Conjugado anti-IgG de coelho (peroxidase e fosfatase), meios: DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco), HAT e HT.

3.2 Soluções e tampões

3.2.1 Tampões para eletroforese

A. Tampões para gel de agarose

- TAE 1X - 24,2 g de Tris-base, 5,71 mL de ácido acético glacial, 10 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0) e água destilada q.s.p 1 litro;
- Tampão de amostra - azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%.

B. Tampões para gel de poliacrilamida:

- Tampão de corrida pH 8,3: Tris-base 0,3%, glicina anidra 1,44% e SDS 0,01% ajustar pH 8,3 e água destilada q.s.p 1 litro;
- Tampão de amostra com redução (5x): Tris-HCl (pH 8,0) 62,5 mM, SDS 2%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0,001% e uréia 10 M;
- Coomassie-blue G-250: Coomassie G-250 0,1%, metanol 25%, ácido acético 5%;
- Solução de acrilamida: acrilamida 30% e bisacrilamida 0,8% em água destilada.
- Solução de APS 10% em H₂O;
- Solução de SDS 10% em H₂O;
- Tampão tris-HCl 1 M pH 6.8;
- Tampão tris-HCl 1 M pH 8.8;
- Temed 0,1%.

3.2.2 Tampões e soluções para Western-blot

- Tampão de transferência: NaHCO₃ 13 mM, metanol 20%, pH 9,9;
- Tampão PBS: NaCl 150 mM, NaH₂PO₄ 25 mM, pH 7,5;
- Tampão de revelação fosfatase (TRF): Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM;
- NBT: 0,05 g em 1 mL de DMF 70%;
- BCIP: 0,05 g em DMF 100%;

- Corante negro de amido: negro de amido 0,5%, ácido acético 10% e metanol 45% em H₂O;
- Glicerol para estoque de soro: glicerol 90% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2;
- Solução de bloqueio 5%: 5 g de leite Molico em 100 mL de PBS;
- Solução de Ponceau: Ponceau S 2%, ácido tricloroacético (TCA) 30%, ácido sulfossalicílico 30% em água destilada.

3.2.3 Soluções e tampões para ELISA

Solução de adsorção:

- Tampão carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9,0;

Solução de revelação:

- Tampão citrato-fosfato 0,1 M em pH 5,0;
- OPD 3,4 mg/10 mL de tampão citrato-fosfato;
- H₂O₂ a 30%.

Bloqueador da reação de revelação: H₂SO₄ 12,5%.

3.2.4 Soluções para extração de DNA plasmidial

- Solução I – Glicose 50 mM, Tris-HCl (pH 8,0) 25 mM, EDTA (pH 8,0) 10 mM;
- Solução II – NaOH 0,2 N e SDS 1%;
- Solução III – 60 mL acetato de potássio 5 M, 11,5 mL de ácido acético glacial, água destilada q.s.p 100 mL.

3.2.5 Soluções de lise celular

Solução de 8 M de uréia:

- 48,048 g de uréia em 100 mL de água.

Solução de 6 M de Guanidina

- 6 M de hidrocloreto de guanidina;
- 20 mM de Tris HCl pH 8,0;
- 500 mM de NaCl;
- 5 mM de imidazol;
- 1 mM de β -mercaptoetanol;
- água destilada q.s.p para 100 mL.

3.2.6 Tampão de eluição

- 6 M de hidrocloreto de guanidina;
- 20 mM de Tris HCl pH 8.0;
- 500 mM de NaCl;
- 50 mM de imidazol;
- 1 mM de β -mercaptoetanol;
- água destilada q.s.p para 100 mL.

3.2.7 Tampão de extração de proteínas de videira (pH 8,2)

- 60,5 g de Tris HCl pH 8.0;
- 8 g de NaCl;
- 0,5 mL de Tween 20;
- 20 g de PVP;
- 10 g de PEG 8000;
- água para completar 1 L.

3.2.8 Meio de cultura para hibridomas

- DME-O: Meio DME sem suplementos;
- DME-10%: Meio DME com 10% Soro Fetal Bovino;
- PEG: 8,1% de PEG 3350 em 3 mL de DME-O;
- HT 100X: hipoxantina 13,6 mg/mL, Timidina 3,8 mg/mL, NaOH 1 M em água ultra pura;
- Sulfato de Gentamicina 80 mg (Shering-Plough);
- Corante Azul de Tripan 0,3%.

3.3 Marcadores de massa molecular

- Marcador de massa molecular DNA Lambda *HindIII*: DNA de fago lambda *gt118* (Amersham Pharmacia Biotech) digerido com endonuclease de restrição *HindIII* (Amersham Pharmacia Biotech);
- Marcador de massa molecular pré-corado: Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas).

3.4 Meios de cultura para bactérias

- LB líquido: NaCl 0,5%, extrato de levedura 0,5% e triptona 1%, pH 7,5;
- LB sólido: LB líquido acrescido de 1,5% de ágar bacteriológico;
- SOC: triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,05%, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, glicose 20% na concentração final de 20 mM;

- SOB: triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,05%, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM.

Todos os componentes foram dissolvidos em água destilada e autoclavados a 121°C por 15 minutos e mantidos à temperatura ambiente até o uso.

- Placas de cultura: LB sólido foi fundido, o antibiótico de interesse foi adicionado e o meio foi distribuído em placas de Petri estéreis sob fluxo laminar. Após a solidificação do meio, as placas foram acondicionadas a 4°C.

3.5 Antibióticos

- Ampicilina: 50 mg/mL (concentração de estoque); 100 µg/mL (concentração de uso).

3.6 Enzimas

Todas as reações foram feitas de acordo com as especificações dos fabricantes.

- Endonuclease de Restrição: *Bam*HI (Invitrogen), *Nde*I (Invitrogen), *Eco*RI (CenBiot);

- DNA Polimerase: Taq DNA Polimerase (CenBiot);

- Enzima de ligação: *T4*-DNA-ligase (Fermentas).

3.7 Vetores e Primers para clonagem

- pGEM-T Easy (Promega, USA) utilizado como vetor de clonagem;
- pET19b (Novagen) foi utilizado como vetor de expressão (Figura 3);
- *Primers* para clonagem em vetor de expressão pET19b:

senso 5' atggaaaatatatatcccggatgg 3'

antisenso 5' aaaaacatattggaaaatatatcccggatgg 3'

- *Primers* para seqüenciamento do clone de rGVB:

T7 promoter 5' taatacgactcactataggg 3'

T7 terminator 5' tatgctagtattgctcag 3'

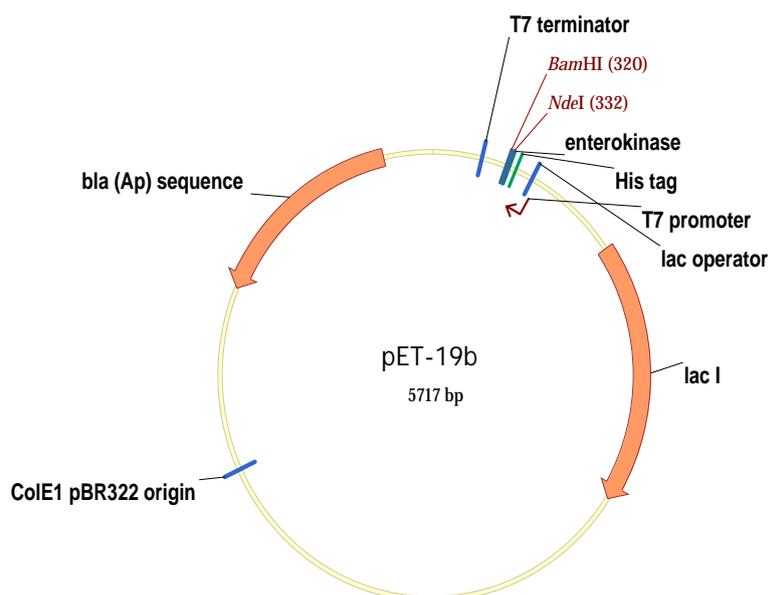


Figura 3 – Representação esquemática do vetor de expressão pET19b, demonstrando os sítios de clivagem *Bam*HI e *Nde*I para inserção da região codificadora correspondente à ORF4, mantendo-se a seqüência codificadora da cauda de histidina.

3.8 Linhagens de *Escherichia coli* (*E. coli*)

- XL1-BLUE (Stratagene);
- AD494 (DE) pLyS (Novagen);
- BL21 Codon Plus (DE3) RP (Stratagene).

3.9 Animais

3.9.1 Camundongos

Para as imunizações foram utilizados camundongos BALB/c, fêmeas de 60 dias, mantidas no biotério do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul.

3.9.2 Coelho

Um coelho da raça Nova Zelândia macho de 90 dias mantido no coelhário da Faculdade de Veterinária da UFRGS, foi utilizado para imunização.

3.10 Clonagem da rGVB

Neste trabalho foram projetados *primers* para que a construção pGEM-Teasy–GVB fosse clonada no vetor de expressão pET19b, utilizando como enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*. A partir da construção pGEM-Teasy-GVB foi realizado um PCR com Taq DNA Polimerase. Diferentes condições de reação foram testadas e a que resultou na amplificação do inserto de 594 pb está

descrita na Tabela 1. O inserto amplificado foi purificado segundo protocolo Sephaglass™ Band Prep Kit (Pharmacia Biotech). O produto de amplificação obtido foi hidrolisado, juntamente com o vetor, com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*. Para a ligação, o inserto e o vetor, numa proporção 3:1, foram ligados com a enzima T4 DNA Ligase. A reação foi mantida a 16°C por 18 horas originando a construção pET19b-GVB.

Tabela 1: Condições estabelecidas para PCR

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tempo (min)</i>
1	94	5
2	94	0,5
3	52	0,5
4	72	1
5	Voltar a etapa 2 34X	
6	72	5

3.11 Transformação de células competentes por eletroporação

As bactérias *E.coli* AD494 (DE) pLyS e BL21 Codon Plus (DE3) RP foram transformadas com a construção resultante (pET19b-GVB) pelo método de eletroporação de acordo com Sambrook *et al* (1989) com modificações. Em uma cubeta de eletroporação, foram misturados 40 µl de células competentes e 2 µL da reação de ligação. Após um pulso elétrico de 25 µF (2500 V), 1 mL de meio

SOC foi adicionado às células e posteriormente centrifugado por 5 minutos a 11.200 g a temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e o sedimento foi ressuspenso em 200 μ L de meio SOC, sendo então distribuído em placas de meio de cultura LB contendo ampicilina para seleção das colônias bacterianas transformantes. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

3.12 Extração de DNA plasmidial

Das colônias bacterianas transformantes obtidas, uma colônia isolada foi inoculada em 1,5 mL de LB contendo ampicilina (50 mg/mL) e crescida por 16 horas a 37°C sob agitação constante. A cultura foi centrifugada a 14.000 g por 30 segundos e o precipitado de células foi ressuspenso em 100 μ L de solução I e incubado por 5 minutos no gelo. Foram adicionados 200 μ L de solução II seguido da homogenização da suspensão por inversão do tubo e incubação por 5 minutos no gelo. Posteriormente foram adicionados 150 μ L de solução III e incubado por 20 minutos. A suspensão foi centrifugada a 14.000 g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para novos tubos, acrescido de fenol-clorofórmio (1:1) e centrifugado novamente a 14.000 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos para precipitação do DNA com 1 mL de etanol absoluto gelado e 40 μ L de acetato de sódio 3 M. A suspensão foi mantida a -20°C por 2 horas, centrifugada a 12.000 g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. O sedimento foi ressuspenso em 37 μ L de água ultra pura e 3 μ L de RNaseA (Fermentas) 10 mg/mL e incubado por 1 hora a 37°C para digestão do RNA.

3.13 Análise quantitativa e qualitativa do DNA plasmidial

A concentração e pureza do DNA obtido da extração plasmidial foram determinadas por espectrofotometria, pela relação entre as leituras nos comprimentos de onda 260 nm/280 nm.

A análise quantitativa do DNA plasmidial foi baseada na comparação entre o tamanho do fragmento gerado e o marcador de massa molecular lambda *HindIII*.

3.14 Seqüenciamentos do clone

O plasmídeo recombinante pET19b-GVB foi submetido ao seqüenciamento para verificar se o inserto encontrava-se em fase e clonado na região determinada. Os *primers* utilizados foram T7 promoter e T7 terminator (item 3.7), que flanqueiam a região de inserção.

Foram utilizados 50 ng/ μ L de DNA purificado e adicionou-se 0,5 μ L dos *primers* de seqüenciamento (item 3.7) na concentração de 2,5 pmol e água para um volume final de 6 μ L. A amostra foi preparada para seqüenciamento no Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul, laboratório de Biologia Molecular Vegetal. O seqüenciamento foi realizado utilizando o aparelho Mega BASE ABI Prism 3100.

3.15 Expressão

As bactérias *E. coli* linhagem AD494 DE pLysS (Novagen) e BL21 Codon Plus (DE3) RP foram transformadas por eletroporação (conforme item 3.11) para inserção do plasmídeo recombinante pET19b-GVB. As bactérias transformadas foram plaqueadas em placa contendo ágar LB e antibiótico ampicilina (50 mg/mL) e incubadas por 18 horas em estufa a 37°C. Uma colônia isolada, de cada transformante, foi inoculada em 25 mL de meio SOB contendo ampicilina (100 µg.mL⁻¹) e crescida 18 horas a 37°C sob agitação de 180 rpm. Após o cultivo, as células foram coletadas por centrifugação a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em meio novo com antibiótico e usadas para inocular 500 mL de meio SOB. Estes frascos foram incubados a 37°C sob agitação de 180 rpm até alcançar densidade ótica de 0,8 no comprimento de onda de 600 nm. Para indução da expressão da proteína, foi adicionado isopropiltio-β-D-galactosídeo (IPTG) na concentração final de 1 mM e o cultivo incubado por 18 horas a 25°C. As células cultivadas foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sedimento ressuspensas em tampão fosfato de sódio 10 mM, acrescido de 300 mM de NaCl, pH 6,5. Para lisar as células, essas foram congeladas e descongeladas 3 vezes e sonicadas 5 vezes com ultra-som por 30 s, com intervalos de 1 minuto e amplitude de 40 Mhz. A linhagem BL21 Codon Plus (DE3) RP foi prensada utilizando a prensa francesa antes de ser sonicada. As frações solúvel e insolúvel foram separadas por centrifugação a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e testadas por ensaios imunoenzimáticos, sendo armazenadas a -20°C até o uso.

3.16 Solubilização dos corpúsculos de inclusão (CI)

Os CI foram tratados com dois agentes desnaturantes, hidrocloreto de guanidina (GuHCl) 6 M ou uréia 8 M (item 3.2.5), e incubados por 1 hora a 4°C, sendo em seguida centrifugados por 15 minutos a 1000 g. Após cada tratamento desnaturante o sobrenadante solubilizado produzido foi analisado por SDS-PAGE 13 % (LEAL *et al.*, 2006).

3.17 Purificação da proteína recombinante (rGVB)

Após a solubilização, o sobrenadante do lisado das células com pET19b-GVB foi submetido à cromatografia de afinidade por níquel em resina sepharose-Ni²⁺ (GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 60 mM, pH 7,4. Após a aplicação da amostra, seguiu-se um teste de eluição onde utilizou-se um gradiente de imidazol de 50 mM, 100 mM e 500 mM, para verificar qual concentração de imidazol eluiria a proteína. As frações que apresentaram maior densidade óptica a 280 nm foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 13% e Western blot e foram dialisadas em PBS.

Após confirmar a solubilização da proteína no gradiente de 50 mM de imidazol, realizou-se uma nova cromatografia utilizando apenas o tampão de eluição de 50 mM de imidazol para obtenção da proteína GVB1a eluída, que foi então dialisada em PBS por 24 horas.

3.18 Imunizações

3.18.1 Coelho

O coelho recebeu por via subcutânea uma primeira inoculação de 100 µg de GVB1a emulsificado em igual volume de adjuvante completo de Freund. Em intervalos de sete dias foram administradas mais sete inoculações do antígeno emulsificado em adjuvante incompleto de Freund. Cinco dias após a primeira imunização e após cada dose o soro era coletado e testado por ELISA para a detecção de anticorpos específicos contra o respectivo antígeno.

3.18.2 Camundongos

Os camundongos receberam por via intraperitoneal uma primeira inoculação de 40 µg de GVB1a emulsificado na proporção 1:1 com adjuvante completo de Freund. Após, com intervalos de sete dias, receberam mais sete inoculações do antígeno emulsificado em adjuvante incompleto de Freund. Cinco dias após a primeira inoculação e após cada dose o soro era coletado e testado por ELISA para a detecção de anticorpos específicos contra o respectivo antígeno.

O animal cujo soro apresentou, no teste de ELISA, densidade ótica a 280 nm duas vezes acima do controle positivo recebeu um reforço intraperitoneal de 40 µg de antígeno. Três dias após foi sacrificado para obtenção de células esplênicas para realização da fusão celular.

3.19 Obtenção de células para fusão

Foi utilizado o mieloma SP2/0-G14 (SHULMAN *et al.*, 1978), sendo este descongelado três dias antes da fusão e mantido em crescimento a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. O meio de cultura foi DME, ao qual se adicionou bicarbonato de sódio 3,7 g/L, gentamicina 50 mg/L e 10% de soro fetal bovino. O repique foi realizado um dia antes da fusão.

3.20 Fusões celulares

As fusões celulares foram realizadas segundo a técnica descrita por Kohler & Milstein, (1975) com modificações. Após sacrificar o camundongo por deslocamento cervical, esse foi lavado em etanol 70%, seco em papel toalha e transferido para a capela de fluxo laminar. A seguir, o baço foi removido para obtenção das células esplênicas, que foram lavadas três vezes e ressuspensas usando meio DME-0.

As células SP2/0-G14 foram coletadas, lavadas duas vezes e ressuspensas em meio DME-0, para misturar com os esplenócitos na proporção 1:10. Esta mistura foi centrifugada por 6 minutos a 120 g, o sedimento obtido recebeu 1 mL de PEG 3350 diluído em meio DME-0, adicionado gota a gota. Após agitar gentilmente por 1 minuto, o sedimento foi diluído 10 vezes com meio DME-0 adicionado lentamente por aproximadamente 9 minutos. As células assim tratadas ficaram em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente, após foram centrifugadas por 6 minutos a 120 g. As células foram ressuspensas em meio

HAT-SFB 10% em um volume adequado para uma densidade de 1×10^6 /mL. As células foram plaqueadas em micro placas (0,1 mL/poço) e incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. No dia seguinte foi adicionado a cada poço 100 µL de meio HAT-SFB 10%. No sexto dia foi realizada a troca parcial de meio (removidos aproximadamente 100 µL/poço e adicionados 100 µL/poço de meio DME-HT-SFB 10%) e no décimo dia foi realizado o primeiro teste de ELISA.

3.21 Clonagem por diluição limitante

Foram utilizadas placas com “Feeder-layer” de macrófagos de camundongos BALB/c fêmeas de 60 dias para clonagem do hibridoma positivo (2E9) (DE LIMA *et al.*, 2002). As células foram ressuspensas em DME-HT-SFB 10% e centrifugadas por 6 minutos a 120 g, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 10 mL de DME-HT-SFB 10% para contagem celular em câmara de Neubauer. Foram realizadas duas diluições, uma na concentração de 10 cel/ mL e outra de 5 cel/ mL, que foram plaqueadas sobre a “Feeder-layer” permanecendo em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 8 dias.

3.22 Western blot

3.22.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A separação da proteína foi feita em gel de poliacrilamida de 18 cm x 14 cm e 0.75 mm de espessura com concentração de 13% e empilhamento de 5%.

As amostras protéicas para SDS-PAGE foram preparadas com tampão Tris 250 mM pH 6,8, 2% SDS, 0,025% azul de bromofenol, 5% de glicerol, 1,0% de β -mercaptoetanol e 5 M uréia e fervidas por 5 minutos. Foi aplicado 100 μ g de antígeno em gel contendo um poço de 6,3 centímetros flanqueado por dois poços de 0,5 centímetro, sendo aplicado em um desses 2 μ L de padrão de massa molecular “Broad” (Bio-Rad), pré-corado para SDS-PAGE. A corrida foi efetuada a 4°C com 15 mA no gel de empilhamento e 35 mA no gel de separação.

Para análise dos resultados por SDS-PAGE, o gel foi corado com Coomassie por 1 hora e depois descorado por fervura por 5 minutos com água destilada.

3.22.2 Transferência

A transferência da proteína do gel para membrana de nitrocelulose 0,45 μ m foi efetuada por uma hora a 4°C e 70 V, em tampão de transferência (DUNM, 1986).

3.22.3 Ensaio imunoenzimático

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau para visualização e marcação das bandas. Em seguida a membrana foi lavada com PBS 1X, três vezes por 1 minuto. A região correspondente ao poço do antígeno foi cortada em tiras de 5 mm, que foram bloqueadas por uma hora com blotto 5%, em agitação a temperatura ambiente. Em seguida, as tiras foram

incubadas por 18 horas com diferentes anticorpos: anticorpo monoclonal 2E11, anticorpo policlonal de camundongo e de coelho (produzidos no laboratório de imunologia aplicada à sanidade animal) e anticorpo primário anti-histidina (1:100 / Sigma) em concentrações diferenciadas, diluídos em blotto 5%. Após cada tira foi lavada três vezes por 10 minutos com blotto 5% e incubadas com conjugado anti-IgG de camundongo-fosfatase e anti-IgG de coelho-fosfatase diluídos 1/ 5000 em blotto 5%, por 90 minutos a temperatura ambiente, posteriormente lavadas três vezes com PBS 1X por 10 minutos e reveladas usando-se solução reveladora de fosfatase (item 3.2.2).

3.22.4 Dot-Blot

Para a imunodeteção e quantificação por *dot blot* do anticorpo monoclonal 2E11, a proteína recombinante (aproximadamente 0,5 µg) foi aplicada em membrana de nitrocelulose 0,45 µm. Após secar por 30 minutos em temperatura ambiente, a membrana foi bloqueada com solução de bloqueio por 1 hora e incubada por 18 horas com diluições seriadas do 2E11 diluído em blotto 5%. A seguir foram lavadas três vezes por 10 minutos com blotto 5% e incubadas com conjugado anti-IgG de camundongo-fosfatase diluído 1/ 5000 em blotto 5% por 90 minutos a temperatura ambiente, posteriormente lavadas três vezes com PBS 1X por 10 minutos e reveladas usando solução reveladora de fosfatase (item 3.2.2).

3.22.5 ELISA Indireto

O ensaio foi realizado de acordo com Elzein & Crowter, (1978), sendo as placas de polietileno sensibilizadas com 100 ng/ poço de antígeno por 16 horas a 4°C em tampão carbonato-bicarbonato. Depois de sensibilizadas, foram lavadas por três vezes com PBS 1X para remoção do excesso de antígeno, e bloqueadas com blotto 5% durante 1 hora a 37°C. Após o bloqueio, foram testadas diversas condições tais como a adição de 100 µL (diluídas em solução de bloqueio ou pura) de:

- Anticorpo primário anti-histidina (1:100);
- Anticorpo policlonal de coelho ou de camundongo anti-rGVB1a (1:100);
- Anticorpo monoclonal 2E11 anti-rGVB1a (1:25);
- Sobrenadante de cultura dos híbridos produzidos no laboratório (item 3.20);
- Extrato de videira (item 3.23);

Todas foram incubadas por 1 hora a 37°C, sendo ao final das incubações, lavadas por três vezes com solução de bloqueio e incubadas novamente com 100 µL por poço do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo ou de coelho conjugado a peroxidase durante 1 hora a 37°C. Ao final desta incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS. A reação foi revelada pela adição de 100 µL de uma solução de OPD e 5 µL de H₂O₂ 30% em 10 mL tampão fosfato-citrato 0,1 M pH 5,0 durante 20 minutos, e interrompida pela adição de H₂SO₄ 12,5%. As leituras das absorbâncias foram realizadas em leitor de microplacas (Versamax-Molecular Devices), com filtro de 492 nm.

3.23 Isotipagem do anticorpo monoclonal

A isotipagem foi realizada através do kit SIGMA (Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents), por ELISA indireto mediado por antígeno, com anti-soros específicos para as classes IgA e IgM e as sub-classes IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 utilizando-se 100 uL dos sobrenadante das culturas contendo o anticorpo monoclonal.

3.24 Extrato de videira

Extratos de pecíolo e ramificações das folhas de videiras com sintomas de avermelhamento das folhas e leve intumescimento do pecíolo, que foram visualmente consideradas sintomáticas para GVB, e folhas de plantas consideradas assintomáticas foram preparados segundo Fajardo *et al.* (2003), com modificações. Foram isolados pecíolos de folhas em ambas as condições (assintomáticas e sintomáticas), pesados e macerados com nitrogênio líquido. O macerado resultante foi ressuspenso na proporção 1:3 (um grama de pecíolo para 3 mL de tampão) com tampão de extração (3.2.7), homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 120 g. O sobrenadante resultante foi transferido para novos tubos e armazenado a -20°C até o uso.

4 RESULTADOS

4.1 Clonagem

O amplicon de 594 pb obtido na reação de PCR do pGEM-Teasy-GVB (Figura 4 plasmídeo cedido pelo CNPUV) foi corretamente amplificado após padronização do PCR. Em seguida o amplicon referente à ORF4, que codifica para a proteína capsial de GVB, foi clonado ao vetor de expressão pET19b entre os sítios de clivagem *NdeI* e *BamHI*, mantendo a seqüência codificadora da cauda de histidina presente no vetor (Figura 5). Os cinco clones de rGVB foram analisados por clivagem e PCR e o plasmídeo resultante foi inserido em células competentes de duas linhagens de *E. coli*, BL21 (DE3) RP e AD494 (DE3), transformadas por eletroporação.

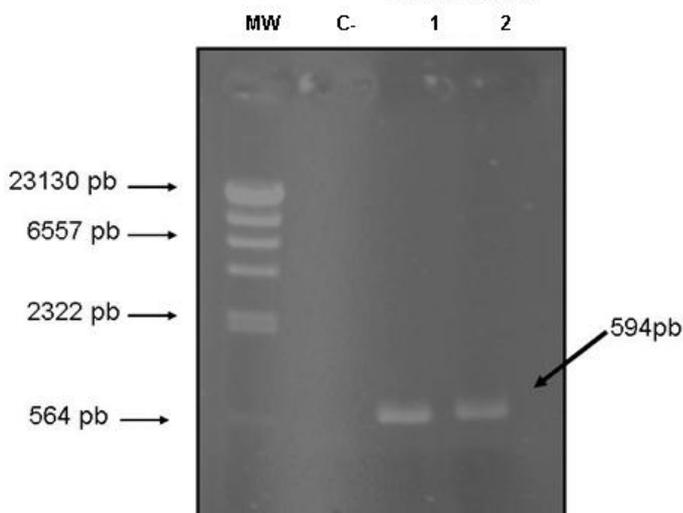


Figura 4 – PCR realizado para confirmar a presença do plasmídeo pET19b-GVB. MW, marcador de massa molecular; C-, controle negativo do PCR; 1 e 2, amplicon com 594 pb.

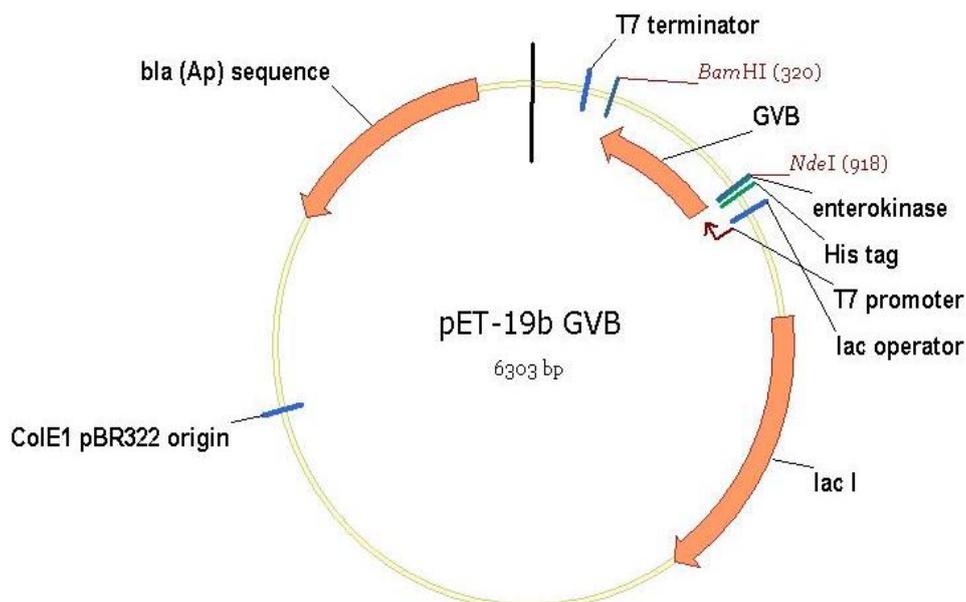


Figura 5 – Representação esquemática do plasmídeo pET19b-GVB. A seta interna representa o inserto correspondente à região codificadora da proteína capsial de GVB, que está inserida entre o sítio de clivagem *NdeI* e *BamHI*.

4.2 Seqüenciamento

O DNA plasmidial extraído dos cinco clones que amplificaram na análise dos transformantes foi seqüenciado nos dois sentidos, utilizando os *primers* T7 promoter e T7 reverse, que flanqueiam o inserto. Apenas o clone denominado rGVB1a, da construção plasmidial presente em *E. coli* BL21 (DE3) RP transformada por eletroforese, apresentou a seqüência correta (Figura 6). As seqüências completas referentes à ORF4 obtidas no BLAST (NCBI) foram alinhadas ao seqüenciamento obtido utilizando os programas BioEdit versão 7.0 e Clustal W. Foi possível assim identificar as bases correspondentes ao DNA plasmidial e à região do vetor que flanqueia o inserto, incluindo a seqüência

codificadora da cauda de histidina. O inserto utilizado para clonar apresentou 594 pb, que é o tamanho correspondente à ORF4 que codifica para a proteína capsidial.

Comparando-se a seqüência nucleotídica obtida com as demais seqüências de diferentes isolados de GVB e dos demais vírus através do Blast X e BioEdit versão 7.0, obteve-se uma árvore filogenética que revelou a homologia entre os diversos isolados de GVB (Figura 7).

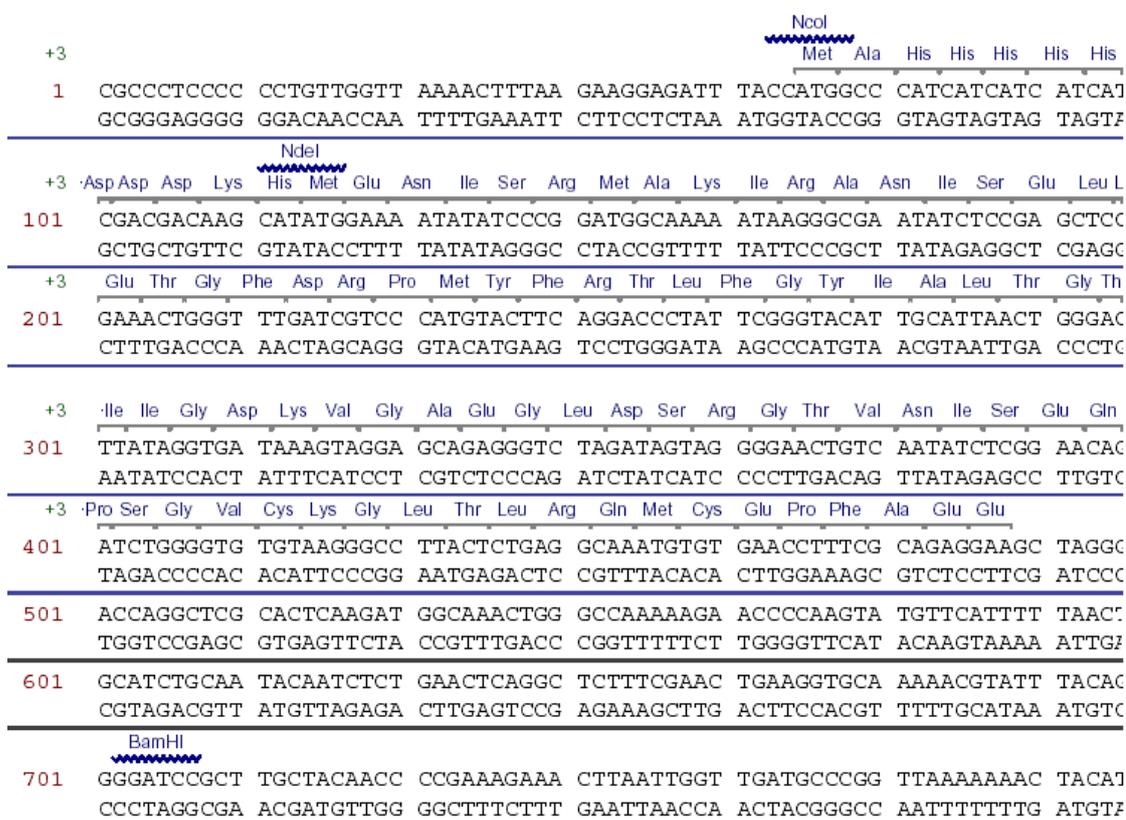


Figura 6 – Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do clone rGVB1a expresso em BL21 (DE3) RP. Este clone codifica a proteína do capsídio viral de GVB, ou ORF4.

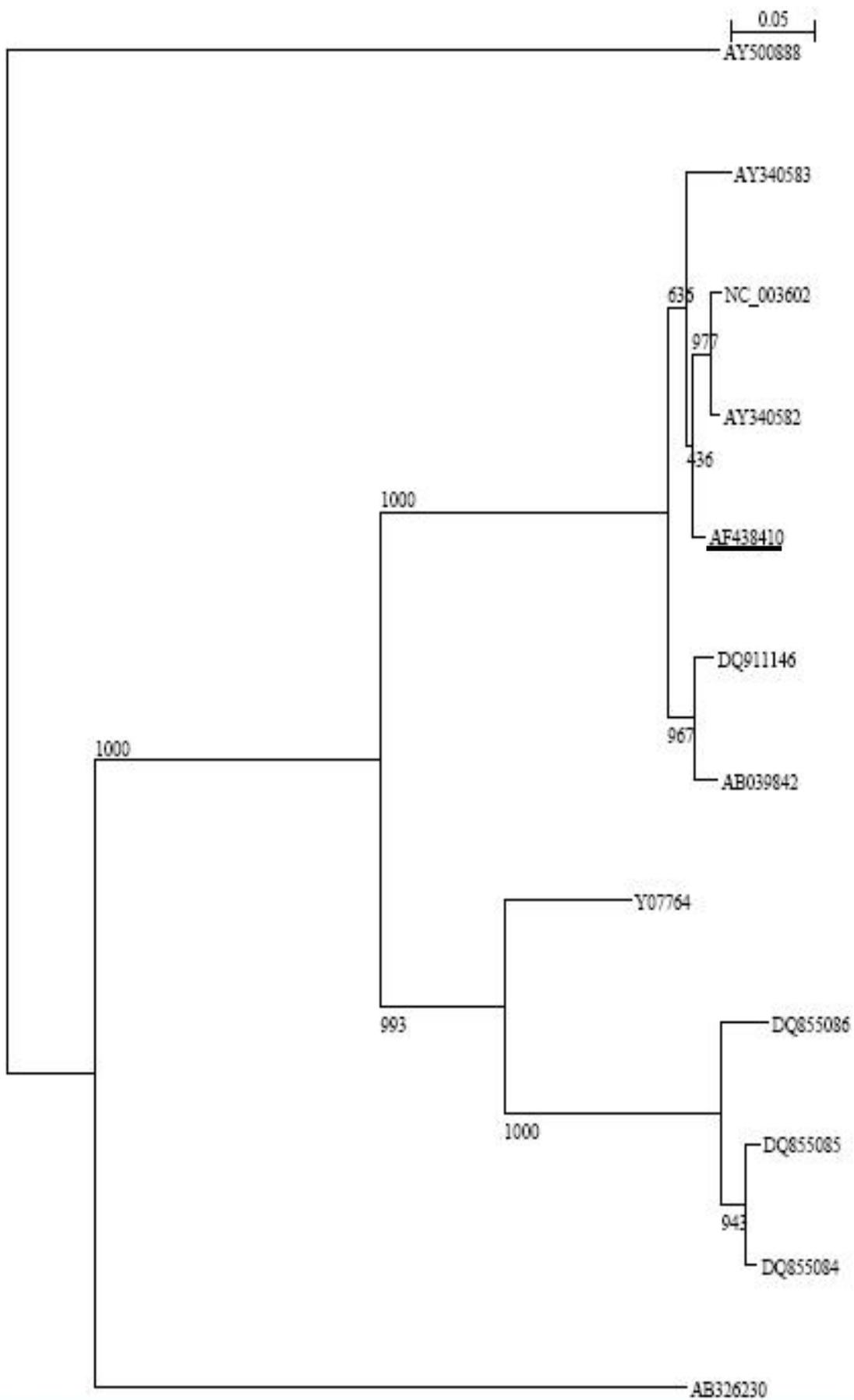


Figura 7 – Análise filogenética com a seqüência completa de nucleotídeos da região da ORF4 de rGVB1a e de isolados de vírus relacionados ao complexo rugoso. A seqüência do clone de rGVB1a (depositada por NICKEL *et al.*, (2002) no NCBI como Af438410) está sublinhada. A relação completa dos isolados está descrita na tabela 2.

Tabela 2 – Lista dos isolados referentes à Figura 7

nº de acesso	Vírus
AB039842	<i>Grapevine virus B</i>
AF438410	<i>Grapevine virus B</i> isolado BR1 (GVB1a)
AY340582	<i>Grapevine virus B</i> isolado comum
AY340583	<i>Grapevine virus B</i> isolado Itália
	<i>Grapevine Algerian latent virus</i> isolado
AY500888	Schunter River
DQ855084	<i>Grapevine virus A</i> isolado GTG11-1
DQ855085	<i>Grapevine virus A</i> isolado MSH18-1
DQ911146	<i>Grapevine virus B</i> isolado SL10
DQ855086	<i>Grapevine virus A</i> isolado GTR1-2
NC_003602	<i>Grapevine virus B</i>
Y07764	<i>Grapevine virus D</i> ORF1 e 2
AB326230	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> , isolado GC10j

4.3 Expressão

Das doze colônias transformadas duas foram isoladas e submetidas à indução por adição de IPTG 0,1 M (item 3.15). Amostras de culturas de células de *E.coli* BL21 (DE3) RP e AD494 (DE3) pLyS contendo o plasmídeo pET19b-GVB foram coletadas antes da indução e após 18 horas da indução.

A presença da rGVB1a no extrato de bactérias induzidas foi evidenciada, através de SDS-PAGE 13%, apenas em sedimento da linhagem de *E. coli* BL21

(DE3) RP induzida a 25°C na presença de ampicilina, apresentando massa molecular de 24 kDa (Figura 8).

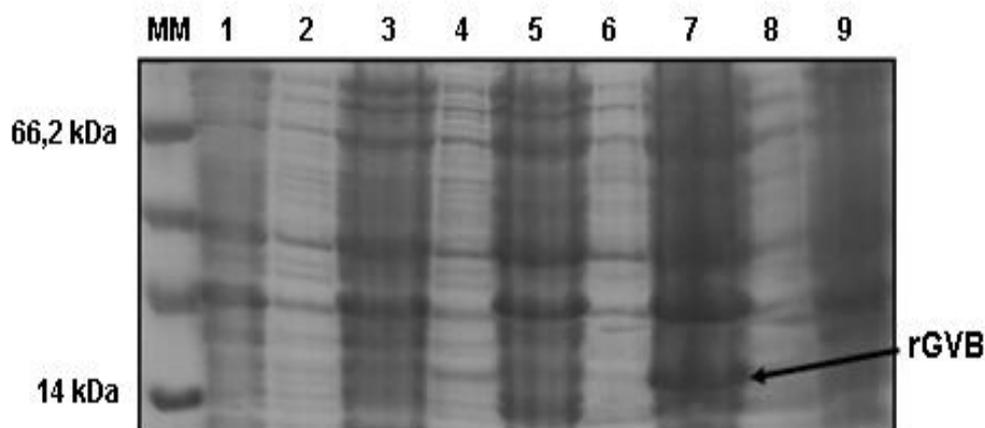


Figura 8 – SDS-PAGE 13% da expressão do clone pET19b-rGVB em *E. coli* AD494 e BL21 RP, corado com Coomassie G-250. MM, Marcador de Massa Molecular; AD494_1, sedimento sem indução (hora 0); 2, sobrenadante sem indução (hora 0); 3, sedimento induzido (18 horas); 4, sobrenadante induzido (18 horas); BL21 RP_5, sedimento sem indução (hora 0); 6, sobrenadante sem indução (hora 0); 7, sedimento induzido (18 horas); 8, sobrenadante induzido (18 horas); 9, sedimento de pET19b, sem inserto, induzido (18 horas).

4.4 Western blot

No ensaio de Western blot, foi confirmada a expressão em *E. coli* BL21 (DE3) RP, quando hibridizado com anticorpo anti-histidina (Figura 9). Este reconheceu a banda de 24 kDa correspondente à proteína capsial (rGVB1a),

demonstrando a presença da proteína (rGVB1a) em corpúsculos de inclusão (fração insolúvel). Observa-se também na figura o reconhecimento da proteína já purificada (GVB1a), após ser eluída com 50 mM de imidazol e dialisada em PBS.

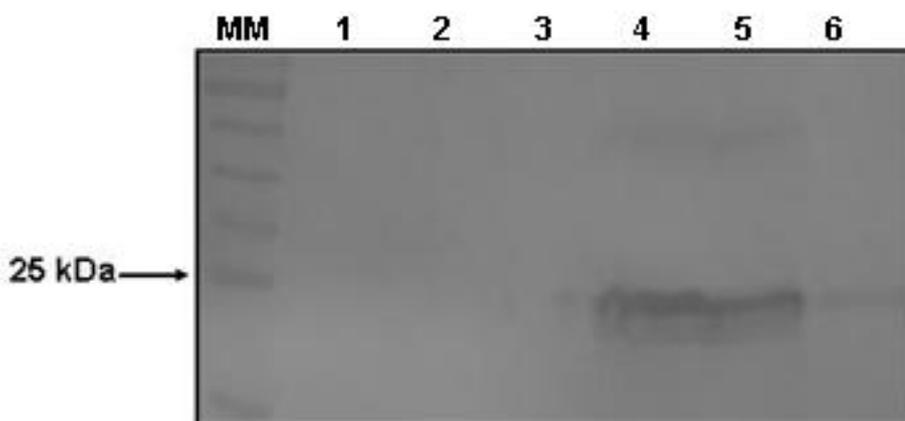


Figura 9 – Western blot hibridizado com anticorpo anti-histidina. MM, Marcador de massa molecular; 1, pET19b sem inserto induzido com 0,1 M IPTG por 18 horas; 2, pET19b-GVB não induzido; 3, pET19b-GVB induzido com 0,1 M IPTG por 18 horas, fração solúvel; 4 e 5, pET19b-GVB induzido com 0,1 M IPTG por 18 horas, fração insolúvel; 6, GVB1a purificado.

4.5 Solubilização dos corpúsculos de inclusão (CIs)

Para a solubilização da proteína recombinante presente em corpúsculos de inclusão, dois agentes desnaturantes foram testados: 8 M de uréia e 6 M de hidrocloreto de guanidina (GuHCl). Os CIs foram parcialmente solubilizados em 8 M de uréia. Já com 6 M de hidrocloreto de guanidina, a solubilização, como demonstrado na Figura 10, foi completa.

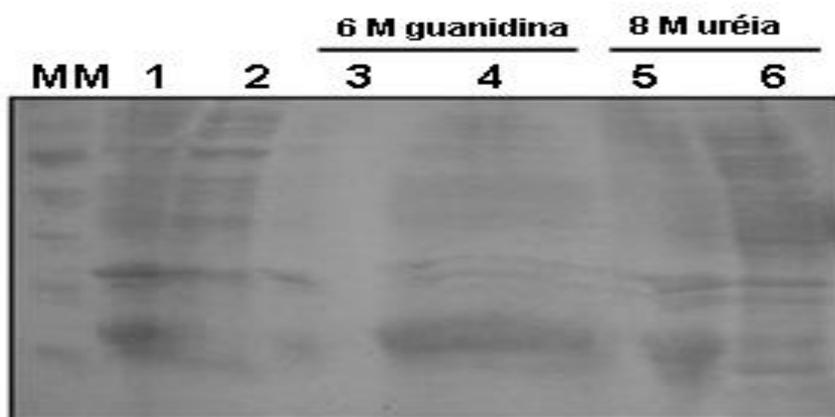


Figura 10 – Análise por SDS-PAGE 13% da solubilização da expressão do clone pET19b-GVB em *E. coli* BL21 RP, corado com Coomassie G-250. MM, Marcador de Massa Molecular; 1, sedimento (pET19b-GVB) expresso; 2, sobrenadante (pET19b-GVB) expresso; 3, sobrenadante (pET19b-GVB) solubilizado; 4, sedimento (pET19b-GVB) solubilizado; 5, sobrenadante (pET19b-GVB) solubilizado; 6, sedimento (pET19b-GVB) solubilizado.

4.6 Purificação

A solubilização obtida com 6 M de hidrocloreto de guanidina foi completa. Os corpúsculos lavados com PBS foram desnaturados e solubilizados utilizando o tampão de lise contendo: 20 mM fosfato de potássio, 500 mM NaCl, 6 M de hidrocloreto de guanidina e 1 mM β -mercaptoetanol, em pH 7,4 por 1 hora a 4°C e centrifugados a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. Essas preparações foram quantificadas em SDS-PAGE (13%), usando BSA como padrão de quantificação.

A proteína rGVB1a com seqüência codificadora da cauda de histidina, após solubilização foi purificada por cromatografia de afinidade por níquel em resina Sepharose-Ni²⁺ previamente equilibrada com tampão fosfato 20 mM, NaCl 500

mM, imidazol 60 mM, pH 7,4. Após o teste de solubilização realizado para verificar a que concentração de imidazol a proteína era solubilizada, concluiu-se que um único passo de purificação com 50 mM de imidazol foi suficiente para obtenção de uma GVB1a com adequado grau de pureza.

A proteína eluída foi então submetida à diálise em PBS, quando foi observada a agregação e precipitação desta. Por isso foi realizada nova eluição, utilizando o tampão de eluição (item 3.2.6) sem o β -mercaptoetanol, verificando-se que a proteína não precipitava mais após a diálise.

A fração contendo a GVB1a-NusTag foi identificada em SDS-PAGE 13 % corado com Coomassie G-250 e quantificada baseando-se em uma amostra de BSA (1,11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) utilizado como padrão de quantificação. A concentração calculada para a fração contendo GVB1a Nus tag foi de 0,11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

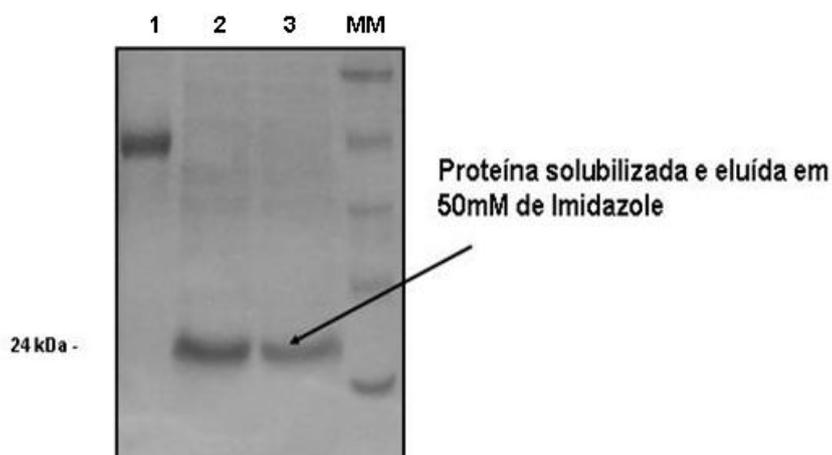


Figura 11 – SDS-PAGE 13% corado com coomassie G-250 para quantificação da proteína solubilizada e eluída. 1, BSA 1,11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 2 e 3, GVB1a purificado e eluído com 50 mM de imidazol; MM, marcador de massa molecular.

4.7 Produção de anticorpos policlonais

Os soros dos camundongos e do coelho inoculados com a GVB1a reconheceram a proteína recombinante de “Grapevine Corky Bark” em teste de Western blot (Figura 12) e ELISA. Após a segunda dose pôde-se observar uma pequena resposta imune nos camundongos inoculados com a GVB1a, mas somente após a quinta dose foi possível obter um resultado significativo de reconhecimento da proteína recombinante pelo soro, tanto dos camundongos como do coelho inoculado. Os soros pré-ímmunes de ambos os grupos não reconheceram a rGVB1a.

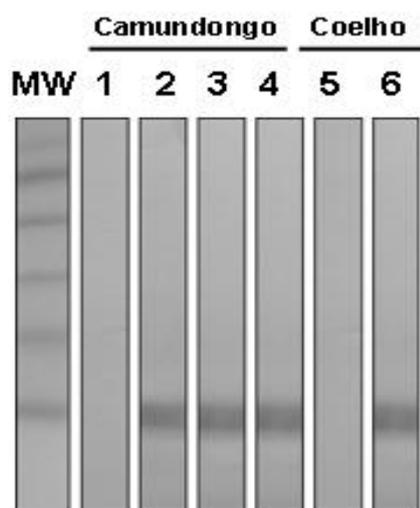


Figura 12 – Western blot hibridizado com soro dos animais inoculados. MW, marcador pré-corado; 1, soro pré-ímmune; 2 - 4, 5^a dose; 5, soro pré-ímmune; 6, 5^a dose.

4.8 Titulação do antisoro policlonal de coelho

A titulação do antisoro policlonal do coelho inoculado com a proteína recombinante foi realizada por ELISA após a oitava dose (Figura 13) para confirmar a imunogenicidade no coelho, que foi então submetido à sangria para obtenção do antisoro policlonal.

O controle positivo utilizado foi o soro obtido uma semana após a 8ª dose, o controle negativo utilizado foi o soro pré-imune do coelho e as diluições foram seriadas para verificar a resposta imune até a diluição de 1:6400.

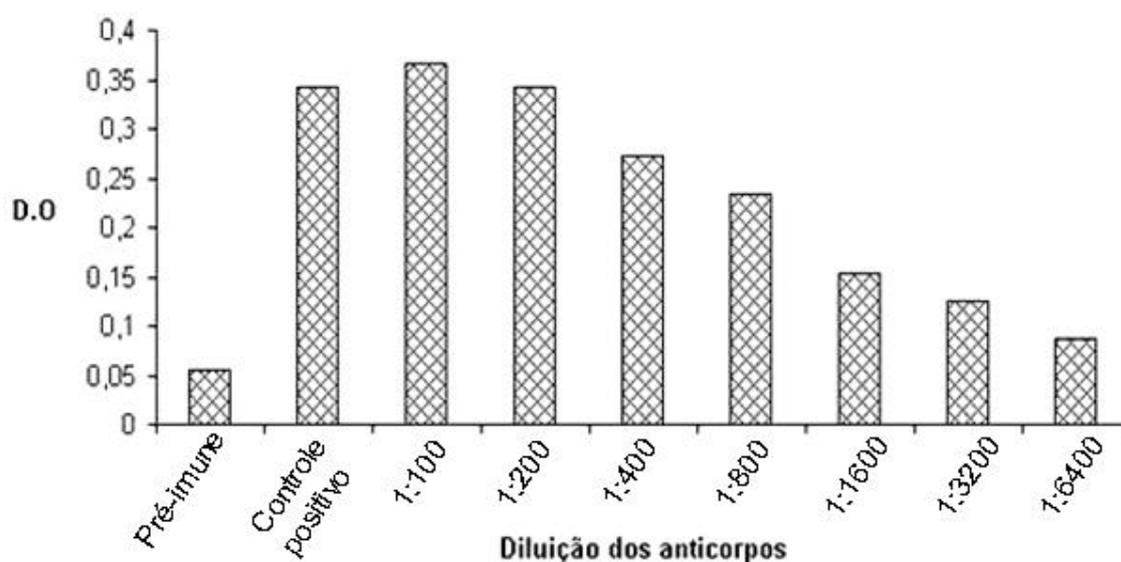


Figura 13 – Análise por ELISA do soro de coelho pré-imune e após imunização com GVB1a. Titulação do antisoro policlonal de coelho em diferentes diluições.

4.9 Produção de anticorpos monoclonais

Para produção de anticorpos monoclonais foram obtidos híbridos após a fusão celular realizada com esplenócito de camundongos inoculados com GVB1a. O sobrenadante dos híbridos foi testado por ELISA, com placa sensibilizada com 100 µg/poço de GVB1a e sendo o anticorpo primário o sobrenadante dos híbridos e o secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase. Foram realizadas sete fusões celulares, sendo que apenas uma não foi funcional, das seis resultantes foram obtidos 2154 híbridos dos quais apenas 1047 resultaram positivos no primeiro teste de ELISA, pois na absorvância óptica em comprimento de onda de 492 nm apresentaram leitura acima do controle negativo. Depois de repicados em meio HT-SFB 10% e mantidos em cultura por mais 4 dias em estufa a 37°C e 5% CO₂, os híbridos positivos foram submetidos ao ELISA nas mesmas condições acima citadas, comprovando-se que apenas um hibridoma era um positivo verdadeiro (2E9). Este foi clonado por diluição limitante em “feeder-layer” e utilizado para produção de ascite.

Testes de Western blot foram realizados para comprovar que o anticorpo monoclonal (2E11) reconhecia a proteína recombinante (Figura 14).



Figura 14 – Western blot hibridizado com 2E11 contra GVB1a. MM, marcador pré-corado; 1, anticorpo monoclonal 2E11.

4.10 Isotipagem do anticorpo monoclonal

Testes de ELISA permitiram determinar que o isotipo de mAb fosse IgG2a. O título foi determinado por Dot-Blot em 1:25 (dados não mostrados). A quantificação do anticorpo monoclonal 2E11 está representada na Figura 15, possuindo uma concentração de 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, obtida pela análise estimada baseada na concentração de BSA utilizada (1,11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

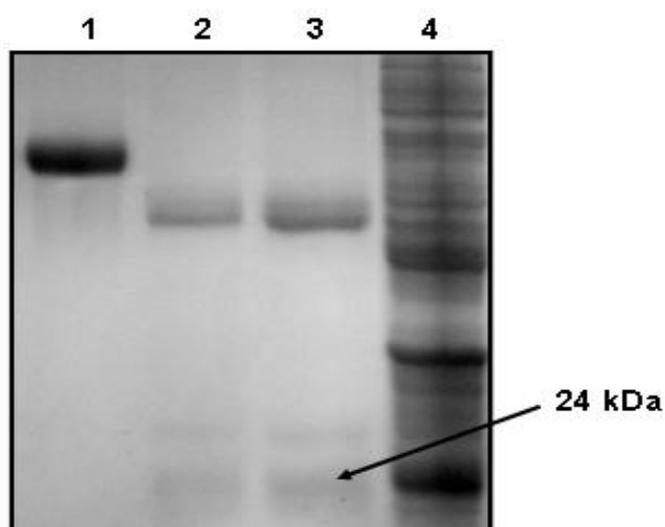


Figura 15 - SDS-PAGE 13% corado com coomassie G-250. 1, BSA 1,11 μ g/ μ L; 2 e 3, anticorpo monoclonal 2E11 anti GVB1a, 4, sedimento de pET19b-GVB após indução de 18 horas com 0,1 M de IPTG.

4.11 Reconhecimento da proteína nativa

Para testar se o anticorpo monoclonal 2E11, produzido durante o trabalho, reconhecia a proteína nativa, realizou-se um teste de Western blot onde foi aplicado na canaleta 1 extrato de videira assintomática, na canaleta 2 extrato de videira provavelmente infectada por GVB (sintomática) e na canaleta 3 a proteína recombinante (rGVB1a). Este Western blot (Figura 16) foi hibridizado com anticorpo monoclonal 2E11 produzido no laboratório de imunologia aplicada à sanidade animal. Este anticorpo não reconheceu o vírus na planta assintomática nem na sintomática, mas reconheceu a proteína recombinante rGVB1a.

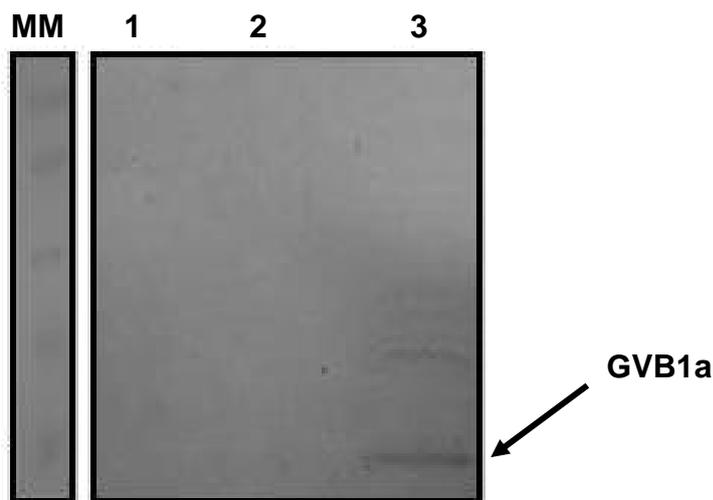


Figura 16 – Western blot. MM, marcador de massa molecular; 1, Extrato de videira sadia; 2, Extrato de videira provavelmente infectada; 3, rGVB1a. Todos hibridizados com anticorpo monoclonal 2E11.

Para confirmar a funcionabilidade do anticorpo monoclonal 2E11 foi realizado um novo Western blot, com a intenção de verificar se a planta sintomática apresentava mesmo a proteína nativa. Realizou-se um novo teste nas mesmas condições acima citadas, apenas substituindo o anticorpo monoclonal 2E11 pelo anticorpo comercial (Agritest). Neste caso o anticorpo monoclonal comercial não reconheceu a proteína na planta assintomática nem na sintomática, reconhecendo apenas a rGVB1a (Figura 17), indicando o baixo título viral ou a ausência dos vírus nas amostras testadas.

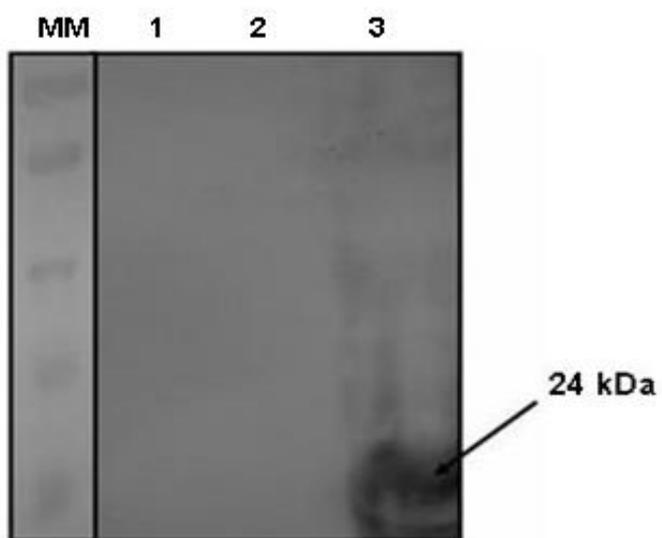


Figura 17 – Western blot. MM, marcador de massa molecular; 1, Extrato de videira sadia; 2, Extrato de videira provavelmente infectada; 3, rGVB1a. Todos hibridizados com anticorpo monoclonal comercial (Agritest).

5 DISCUSSÃO

O RNA fita simples de senso positivo do GVB codifica cinco ORFs (fases de leitura abertas). Segundo Shi *et al.* (2004) a análise comparativa de diversos isolados de GVB demonstrou ser a ORF4, que codifica para capa protéica, a menos variável tanto na seqüência de nucleotídeos, como na de aminoácidos. Esse foi um dos principais motivos pelos qual o nosso trabalho teve como foco a produção de anticorpos policlonais e monoclonais contra a proteína do capsídio viral codificada pela ORF4.

Para a obtenção da proteína recombinante foi utilizado o plasmídeo baseado no vetor de expressão pET19b contendo o inserto GVBcp (Figura 5), que expressa a proteína recombinante fusionada com uma cauda de histidina. A cauda de histidina facilita a purificação da proteína através da utilização de colunas de Niquel-Sepharose. (Hwang e Chung, 2002)

O seqüenciamento da região com o inserto GVBcp do plasmídeo pET19b-GVB (Figura 6) mostrou alta similaridade com seqüências de nucleotídeos de outros organismos da mesma família ou correlacionados (Figura 7). A análise da seqüência de aminoácidos (Figura 7) referente à capa protéica dos diferentes vírus comprova que o isolado GVB BR1 (**AF438410**) está intimamente relacionado ao isolado Itália (**AY340583**), conforme descrito anteriormente por Nickel *et al.* (2002). Nossos dados também comprovaram que isolados do mesmo gênero estão intimamente relacionados, como pode ser comprovado na análise filogenética representada na Figura 7.

Na análise filogenética com as seqüências de nucleotídeos (Figura 7) da capa protéica do GVB de diferentes linhagens, observou-se que o nosso isolado GVB1a possui alta similaridade com o isolado Itália, como já havia sido anteriormente descrito (NICKEL *et al.*, 2002; SHI *et al.*, 2004), separando os isolados de GVB dos demais isolados do mesmo gênero. Existe uma grande diversidade entre as diferentes linhagens do mesmo vírus. Uma explicação para essa diversidade genética entre os isolados pode ser devido ao fato deste possuir como única hospedeira natural a videira, a qual foi e ainda hoje é propagada vegetativamente. Isto, juntamente com a prática do enxerto, ocasionou uma mistura dos isolados de GVB de várias fontes (SHI *et al.*, 2004).

Neste estudo foi possível produzir com sucesso a proteína de fusão rGVB1a. A bactéria *E. coli* BL21 (DE3) RP foi transformada com a construção resultante (pET19b-GVB) pelo método de eletroporação de acordo com Sambrook *et al.* (1989) com modificações, sendo possível expressá-la em grande quantidade (Figura 8 - linha 7; Figura 9 - linhas 4 e 5). Após a transformação foi necessário explorar a influência das diferentes temperaturas na expressão da proteína de fusão. Segundo Schumann (2000) a temperatura é um importante fator ambiental, e quando alterada, requer resposta adaptativa das células bacterianas.

Embora a temperatura normal para o crescimento da bactéria seja de 37°C, para obtenção da proteína de fusão na forma solúvel, ou parcialmente solúvel é, às vezes, necessária uma mudança na temperatura. Conforme Jana e Deb (2005) a taxa de transcrição e tradução será substancialmente diminuída com o decréscimo da temperatura para 15°C a 20°C, já a taxa de dobramento protéico será apenas levemente afetada. Isto pode explicar porque, no nosso estudo, a

redução da temperatura para 25°C foi necessária para se obter a expressão da proteína recombinante rGVB1a, mesmo que na forma de corpúsculos de inclusão (Figura 9). De acordo com Sorensen e Mortensen (2005), uma técnica conhecida para limitar a agregação *in vivo* das proteínas recombinantes consiste no cultivo em temperaturas reduzidas, sendo uma das principais conseqüências da redução da temperatura a redução parcial das proteases de choque térmico que são induzidas durante a superexpressão, aumentando assim a estabilidade para o correto dobramento protéico. Outro fator é que, sob baixas temperaturas, ocorre a diminuição da quantidade de biomassa, permitindo assim o correto dobramento da proteína. Desta forma, foi obtida a expressão apenas a 25°C, e nesta condição foi obtida uma satisfatória quantidade de biomassa.

Segundo Prouty *et al.* (1975), proteínas agregam quando são sintetizadas em altas taxas, tornando o sistema celular saturado. García-Fruitos *et al.* (2005) citam que por ser largamente difundida a crença de que proteínas em corpúsculos de inclusão são biologicamente inativas e, portanto imprestáveis para utilização em bioprocessos. Produtos que tendem a se agregar têm sido desagregados para serem utilizados. Por outro lado, Li *et al.* (2003) afirmam existirem vantagens para a expressão em corpúsculos de inclusão, entre elas: os níveis de expressão são frequentemente mais altos, as proteínas são protegidas da degradação proteolítica, os corpúsculos de inclusão são facilmente separados das proteínas solúveis, entre outras.

Diversos agentes solubilizantes e diferentes protocolos têm sido descritos para solubilização de corpúsculos de inclusão (CIs) (TSUMOTO *et al.*, 2003; SARDANA *et al.*, 2004). Uréia e hidrocloreto de guanidina (HClGu) são exemplos

de agentes solubilizantes mais comumente empregados para CIs (TSUMOTO *et al.*, 2003). Neste trabalho foram utilizados para solubilização da rGVB1a a uréia na concentração de 8 M e o hidrocloreto de guanidina na concentração de 6 M (LEAL *et al.*, 2006). A uréia apresentou um baixo rendimento de solubilização dos CIs, já o hidrocloreto de guanidina apresentou um rendimento muito maior, como demonstrado na Figura 10. A ligação destes agentes à proteína é dependente da concentração e geralmente exige altas concentrações (6-8 M uréia e 6-7 M HClGu) do desnaturante para solubilização dos CIs, o que em alguns casos não é suficiente para evitar as interações intra e inter-cadeia, responsáveis pela agregação das proteínas (TSUMOTO *et al.*, 2003). A remoção gradual do agente desnaturante tem sido descrita como medida essencial para evitar a reagregação de proteínas solubilizadas (HWANG e CHUNG, 2002; SARDANA *et al.*, 2004). No nosso caso, a reagregação das partículas somente foi revertida com a remoção do β -mercaptoetanol do tampão de solubilização.

A Figura 11 mostra um SDS-PAGE 13% corado com coomassie G-250 com material purificado em coluna de afinidade à cauda de histidina em resina sepharose-Ni²⁺ (GE Healthcare), onde foi comprovado, depois de realizado um gradiente de concentração, que a melhor concentração de eluição foi 50 mM de imidazol. Na mesma figura está mostrada a quantificação da rGVB1a baseado no padrão de BSA, que ficou em 0,11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Para obtenção de um título imunogênico duas vezes maior que o controle positivo (monoclonal comercial), foi necessário oito doses de 100 μg em camundongos e 40 μg em coelhos de rGVB1a. Foram realizadas sete fusões e apenas um anticorpo monoclonal foi obtido (Figura 12), o que juntamente com o

fato de terem sido necessárias oito doses, pode indicar que a proteína é pouco imunogênica. Segundo Rubinson *et al.* (1997), uma proteína não estrutural ou de movimento pode ser um marcador preferível para detecção sorológica do vírus da planta. Existem diversas razões para a detecção da proteína de movimento (MP) ser mais eficiente do que da proteína do capsídeo, pelo menos no GVA. Uma delas é que a MP pode ser mais estável quando acumulada em células infectadas, enquanto a concentração do CP diminui com a queda no título viral. O fato de a MP ser mais imunogênica resulta em melhores produções de anti-soros na vacinação animal.

Para certificar que o mAb 2E11 (Figura 14), produzido após imunização de camundongos BALB/c, estava reconhecendo a proteína nativa, realizou-se um Western blot com extrato de plantas assintomáticas e provavelmente infectadas com GVB (sintomáticas), bem como da rGVB1a (Figura 16). Como não foi verificado o reconhecimento do vírus na planta sintomática pelo mAb 2E11, realizou-se então um teste para verificar se esta planta sintomática estava realmente infectada por GVB. Para isso realizou-se um novo Western blot (Figura 17), utilizando desta vez um anticorpo monoclonal comercial o qual também não reconheceu a presença do vírus nesta planta. No entanto reconheceu a rGVB1a, assim como o nosso anticorpo monoclonal (2E11). Isto pode ser devido à baixa quantidade do vírus na planta ou a estes sintomas estarem associados a outro vírus do complexo rugoso (SALDARELLI *et al.*, 2005). Segundo Saldarelli *et al.* (1996), o fato de um polipeptídeo de aproximadamente 20 kDa não ser identificado em extrato de tecido de plantas infectadas por GVB, pode ser devido ao fato desta proteína ser expressada brevemente e se encontrar em quantidades

abaixo do nível detectável ou devido à técnica utilizada para extração. Ainda segundo Saldarelli *et al.* (2005), a identificação do GVB em extrato de tecido de videiras é dificultada pelo baixo título que este apresenta.

Segundo Moreira *et al.* (2004), problemas na confiabilidade de testes sorológicos, tais como ELISA, para a detecção do vírus do gênero *Vitivirus*, ocorrem principalmente devido à anti-soros com baixo título, resultantes da baixa antigenicidade viral, a distribuição irregular do vírus na planta hospedeira e a variação do título viral nas diferentes estações do ano. Segundo Santos *et al.* (2005), apesar do grande avanço em estudos de diagnose e caracterização de vírus, muito pouco é conhecido sobre o modo de ação desses patógenos em videiras (*Vitis* spp.). No nosso estudo, o fato de o anticorpo monoclonal 2E11, que é específico para GVB, não ter reconhecido o vírus, pode ser decorrente da época de coleta das folhas e da distribuição irregular do mesmo pela planta.

A seqüência completa do cDNA que codifica a proteína capsidial de 24 kDa da ORF4 do GVB foi caracterizada, através da clonagem e seqüenciamento da mesma. A proteína rGVB1a foi utilizada para obtenção de anticorpos monoclonais e policlonais que foram purificados, isotipados e utilizados no reconhecimento da proteína recombinante. Estes resultados poderão ser úteis para o desenvolvimento de um método de diagnóstico para infecção por GVB.

6 CONCLUSÕES

A rGVB1a mostrou-se imunogênica em coelho e camundongos;

O anticorpo monoclonal reconhece a proteína recombinante, que também é reconhecida por um anticorpo monoclonal comercial contra proteína nativa de capsídio viral de GVB;

Ambos não reconheceram a presença da proteína viral em plantas preditadamente sintomáticas.

7 PERSPECTIVAS

Realizar uma infecção viral em plantas LN33 indicadoras do vírus para se obter uma quantidade maior de plantas para novos testes.

Isolar o vírus para ser usado na comprovação do reconhecimento deste pelo anticorpo monoclonal 2E11.

Avaliar se existe reatividade cruzada com outros vírus presentes em plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BONAVIA, M. *et al.* Studies on "corky rugose wood" of grapevine and on the diagnosis of grapevine virus B. **Vitis** 35, 53-58, 1996.
- DE LIMA, M.F. *et al.* Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 32: 747-754, 2002.
- DUNM, S.D. Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of protein on Western-blot by monoclonal antibodies. **Analytical Biochemistry**. 157: 144-153, 1986.
- ELZEIN, E.M.E.A. & CROWTER, J.R. Enzyme-labelled immunosorbent assay techniques in foot-and-mouth disease vírus research. **The Journal of Hygiene**, v. 80, p. 391-399, 1978.
- FAJARDO, V.M.T. *et al.* Detecção de um isolado de *Grapevine vírus A* e caracterização do gene da proteína capsidial. **Fitopatologia Brasileira** 28:221-227. 2003.
- GARCÍA-FRUITÓS E. *et al.* Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. **Microbial Cell Factories**. 4:27, 2005.
- GOSZCZYNSKI, D.E.; KASDORF, G.G.F. & PIETERSEN, G. Production and use of an antiserum to grapevine virus B capsid protein purified from SDS-polyacrylamide gels. **Vitis** 36, 191-194, 1997.

- HWANG, H.S. & CHUNG, H.S. Preparation of active recombinant cathepsin K expressed in bacteria as inclusion body. **Protein Expression and Purification**; 25 (3):541-6, 2002.
- JANA, S. & DEB, J.K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**; 67:289-298, 2005.
- KOHLER, G. & MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature** 256: 495-497, 1975.
- KUNIYUKI, H. *et al.* Transmissão experimental do Grapevine virus B pela cochonilha *Pseudococcus longispinus* Targioni-Tozzetti (Hemiptera: Pseudococcidae). **Summa Phytopathology** 32, 151-15, 2006.
- KUHN, G.B. & FAJARDO, T.V.M. Viroses da videira no Brasil - Complexo rugoso da videira, Intumescimento dos ramos da videira. 2007. (<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/complrug.html>)
- LEAL, A.T. *et al.* Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin expressed in inclusion bodies. **Protein Expression and Purification**; 45(1):107-14, 2006.
- LI, M.; SU, Z-G. & JANSON, J-C. In vitro protein refolding by chromatographic procedures. **Protein Expression and Purification**; 33:1-10, 2004.
- MOREIRA, A.E. *et al.* Caracterização do gene da proteína capsial de dois isolados, patologicamete distintos e serologicamente semelhantes, do Grapevine virus B em videiras no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira** 29, 75-80, 2004.

- MOSKOVITZ, Y. *et al.* Sequencing and assembly of a full-length infectious clone of grapevine virus B and its infectivity on herbaceous plants. **Archives of virology**, 153: 323-328, 2007.
- NICKEL, O. *et al.* Detection and coat protein gene characterization of an isolate of *Grapevine virus B* from corky bark-affected grapevines in southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira** 27, 279-284, 2002.
- PROUTY, W. F., KARNOVSKY, M. J. & GOLDBERG, A. L. Degradation of abnormal proteins in *Escherichia coli*. Formation of protein inclusions in cells exposed to amino acid analogs. **Journal Biological Chemistry**. 250, 1112-1122, 1975.
- RUBINSON, E. *et al.* Serological detection of *Grapevine Virus A* using antiserum to a nonstructural protein, the putative movement protein. **Phytopatology**, 1997.
- SALDARELLI, P.; MINAFRA, A. & MARTELLI, G.P. The nucleotide sequence and genomic organization of grapevine virus B. **Journal of General Virology**; 77 (Pt 10):2645-52, 1996.
- SALDARELLI, P. *et al.* Isolation of recombinant antibodies (scFvs) to grapevine virus B. **Journal of Virological Methods** ; 124(1-2):191-5, 2005.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed., **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.
- SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S. & FAJARDO, T.V.M. Níveis de Carboidratos em Folhas de Videiras Infetadas por *Grapevine virus A*, *Grapevine virus B* e *Grapevine leafroll-associated virus 3*. **Fitopatologia Brasileira**. 30(1), 2005.

- SARDANA, V.; XU, B. & ZUGAY-MURPHY, J. A general procedure for the purification of human beta-secretase expressed in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**; 34(2):190-6, 2004.
- SCHUMANN, W. Function and regulation of temperature-inducible bacterial proteins on the cellular metabolism. **Advances in biochemical engineering**. Vol.67 (140 ref), pp. 1-33, 2000
- SHI, B.J. *et al.* Extensive variation of sequence within isolates of Grapevine virus B+. **Virus Genes**; 29(2):279-85, 2004.
- SHULMAN, M.; WILDE, C.D. & KÖHLER, G. A better cellline for making hybridomas secreting specific antibodies. **Nature**; 276: 269-270, 1978.
- SORENSEN, H.P. & MORTENSEN, K.K. soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, 4:1, 2005.
- TANNE, E.; DUBITSKY, E. & BAZAK, H. Preliminary data on the effect of corky bark disease on Thompson Seedless vines grafted on various roostocks. **10th Meeting of International Council for the Study of Viruses and Virus-like Disease of the Grapevine**. p. 386-389, 1990.
- TSUMOTO, K. *et al.* Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. **Protein Expression and Purification**; 28(1):1-8, 2003.