

Boletim de Pesquisa 62
e Desenvolvimento ISSN 1676 - 1340
Agosto, 2004

**Análise de proteínas estruturais e de DNA do
baculovirus *Condylorrhiza vestigialis*
*nucleopolyhedrovirus***

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

José Amauri Dimázio

Presidente

Clayton Campanhola

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Dietrich Gerhard Quast

Sérgio Fausto

Urbano Campos Ribeiral

Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola

Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca

Herbert Cavalcante de Lima

Mariza Marilena T. Luz Barbosa

Diretores-Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Souza Dias

Chefe -Geral

Maurício Antonio Lopes

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado

Chefe-adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes

Chefe-Adjunto de Administração

ISSN 1676 - 1340
Agosto, 2004

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 62

Análise de proteínas estruturais e de DNA do baculovirus Condylorrhiza vestigialis nucleopolyhedrovirus.

Maria Elita Batista de Castro
Ana Cláudia Batista dos Santos
Zilda Maria de Araújo Ribeiro
Marlinda Lobo de Souza
Nilton José Sousa

Brasília, DF
2004

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61)
340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Alice Bianchi e Maria Iara Pereira Machado*

Editores eletrônicos: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2004): 150 unidades

A 532 Análise de proteínas estruturais e de DNA do baculovirus *Condylorrhiza vestigialis nucleopolyhedrovirus* / Maria Elita Batista de Castro ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 17 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676-1340; 62)

1. Baculovirus. 2. Proteínas estruturais. 3. DNA genômico.
I. Castro, Maria Elita Batista de. II. Série.

579.2436 – CDD 21

Análise de proteínas estruturais e de DNA do baculovirus *Condylorrhiza vestigialis* nucleopolyhedrovirus

Maria Elita Batista de Castro¹
Ana Cláudia Batista dos Santos²
Zilda Maria de Araújo Ribeiro³
Marlinda Lobo de Souza¹
Nilton José Sousa⁴

¹Bióloga, PhD, Virologia Molecular, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

²Bióloga,

³Bióloga, MSc., Fitopatologia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

Resumo	7
Abstract	8
Introdução	9
Materiais e Métodos	10
Purificação de poliedros (PIBs) e vírions (ARVs) a partir de larvas infectadas	
Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)	
Extração de DNA a partir de poliedros	
Clivagem de DNA por endonucleases de restrição (REN)	
Eletroforese em gel de agarose	
Resultados e Discussão	12
Análise de proteínas estruturais de <i>Condylorrhiza vestigialis</i> NPV	
- Partículas virais purificadas em gradiente de sacarose	
- Análise de partículas virais (poliedros e vírions) em PAGE-SDS	
Análise de DNA de <i>Condylorrhiza vestigialis</i> NPV	
- Análise de DNA por enzimas de restrição	
Referências Bibliográficas	16

Análise de proteínas estruturais e de DNA do baculovirus *Condylorrhiza vestigialis nucleopolyhedrovirus*

Resumo

Estudos vêm sendo desenvolvidos em nosso laboratório sobre a identificação e caracterização de um baculovirus recentemente descoberto, *Condylorrhiza vestigialis nucleopolyhedrovirus*- CvMNPV (Família *Baculoviridae*, gênero *Nucleopolyhedrovirus*), originariamente isolado da lagarta-do-álamo, *Condylorrhiza vestigialis*. Esta lagarta é considerada como a principal praga da cultura do álamo (*Populus*), planta cultivada no Brasil principalmente para suprir a indústria de fósforo na fabricação de palitos e caixas.

Neste trabalho foi investigado o padrão eletroforético das proteínas estruturais e do DNA genômico desse baculovirus. A purificação de poliedros (PIBs) e vírions (ARVs) foi feita a partir de macerados de larvas infectadas submetidos à ultracentrifugação em gradientes de sacarose. Essas partículas foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante (PAGE-SDS) e, como esperado, a fração de poliedros mostrou uma banda intensa de aproximadamente 33kDa, indicando a presença da principal proteína dos corpos de oclusão dos NPVs (poliedrina). Na fração de ARVs, 13 peptídeos (9 com peso molecular entre 29 e 66kDa) foram visualizadas após coloração do gel com nitrato de prata. Para análise do perfil genômico, o DNA foi extraído de poliedros por ciclos de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), e então clivado com cinco enzimas de restrição. Os produtos de digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose após coloração com brometo de etídeo. Diferentes perfis de restrição foram observados nos quais 8, 7, 9, 20 e 17 fragmentos de DNA foram gerados por clivagem com as enzimas *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Hind*III e *Pst*I, respectivamente.

Analysis of the structural proteins and DNA of *Condylorrhiza vestigialis* nucleopolyhedrovirus

Abstract

Studies are been carried out in our laboratory for the identification and characterization of a recently described baculovirus, *Condylorrhiza vestigialis* nucleopolyhedrovirus- CvMNPV (family *Baculoviridae*, genera *Nucleopolyhedrovirus*), originally isolated from the lagarta-do-álamo, *Condylorrhiza vestigialis*. This larvae is considered the main pest of poplar (*Populus*), a plant cultivated in Brazil to supply the match industry and fabrication of tooth picks and boxes. In the present work the eletrophoretic profile of the structural proteins and the genomic DNA of this baculovirus was investigated. The isolation of the polyhedra (PIBs) and virions (ARVs) was done from the crude extract of infected larvae by ultracentrifugation through sucrose gradients. These viral particles were analyzed by electrophoresis in denaturing polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE-SDS) which, as expected, showed a strong band with approximately 33 kDa, suggesting the presence of the main protein of the occlusion bodies (polyhedrin). In the ARVs fraction, 13 peptides gel (9 with molecular weight from 29 to 66 kDa) were observed after silver staining. For the analysis of the genomic profile, the DNA was extracted from polyhedra by cycles of phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1), and then cleaved with five restriction enzymes. The products of digestion were analyzed by electrophoresis in agarose gel and ethidium bromide staining. Different DNA restriction profiles were observed in which 8, 7, 9, 20 and 17 fragments were generated by cleavage with the *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Hind*III and *Pst*I respectively.

Introdução

Baculovirus são vírus de DNA dupla fita que infectam invertebrados, sendo a maioria deles detectados na ordem Lepidoptera. O uso de baculovirus como alternativa aos inseticidas químicos tem se tornado bastante promissor devido às suas características que conferem total segurança à saúde humana e ao meio ambiente e também pela possibilidade de seu uso em programas de manejo integrado de pragas, uma vez que não afetam insetos benéficos e outros organismos não-alvo.

Diante disso, a identificação de novos vírus com potencial para controle biológico tem sido bastante atraente e tem reforçado o desenvolvimento de estudos de caracterização de vírus provenientes de diversas culturas agrícolas e florestais.

Atualmente, em nosso laboratório, um baculovirus recentemente descoberto, *Condylorrhiza vestigialis nucleopolyhedrovirus*- CvMNPV (Família *Baculoviridae*, gênero *Nucleopolyhedrovirus*) vem sendo estudado e caracterizado (Castro *et al.*, 2003). Esse baculovirus foi originariamente isolado da lagarta *Condylorrhiza vestigialis*, uma importante praga da cultura do álamo (*Populus*), uma planta cultivada no Brasil principalmente para suprir a indústria de fósforo na fabricação de palitos e caixas.

Uma peculiaridade dos baculovirus é a produção de dois tipos de fenótipos denominados “budded virus” (BVs) e “occluded virus” (OVs ou PIBs), que são partículas altamente infecciosas responsáveis pela disseminação e propagação da doença. Os poliedros (PIBs), responsáveis pela transmissão do vírus de inseto para inseto, se apresentam oclusos em uma matriz protéica constituída principalmente pela poliedrina (95% do conteúdo protéico), com cerca de 30kDa (Rhomann, 1986), que permite a preservação do vírus no meio ambiente por longos períodos de tempo.

Neste trabalho, os poliedros do baculovirus CvMNPV, extraídos de lagartas infectadas (*Condylorrhiza vestigialis*), foram purificados e utilizados nos estudos ora propostos.

Objetivos:

Realizar estudos de caracterização do baculovirus CvMNPV baseados na análise de proteínas estruturais e de DNA do vírus.

Materiais e Métodos

Purificação de poliedros (PIBs) e vírions (ARVs) a partir de larvas infectadas

– Lagartas infectadas e mortas foram trituradas em tampão de homogeneização (ácido ascórbico 1%; SDS 2%; Tris 0,01M pH 7,8; EDTA 0,001M pH 8,0) e em seguida filtrado em 3 camadas de gaze com lã de vidro e depois centrifugado a 10.000rpm /15min, a 4°C em rotor Sorvall SS 34. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 10ml de tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 1mM pH 8,0), sendo então centrifugado a 12.000rpm /12min. nas mesmas condições. Descartado o sobrenadante, o precipitado foi ressuspense em tampão TE e então estimada a concentração de poliedros baseada na leitura da suspensão viral feita pelo espectrofotômetro (OD_{550nm}). O cálculo da concentração de PIBs é dado por: $OD_{550nm} \times 0,28 \times \text{fator de diluição} = \text{mg/ml}$. Em seguida, 5ml do material (30mg de PIBs/ml) foram aplicados em um gradiente de sacarose de densidade 1,17 a 1,30g/ml e centrifugado a 24.000rpm /40min., a 4°C (rotor Sorvall AH 627). A banda de poliedros formada no terço inferior do tubo foi coletada com uma pipeta Pasteur e diluída 4 vezes em tampão TE. Após centrifugação de 12.000rpm/15min., a 4°C (rotor Sorvall rotor SS 34), os poliedros foram ressuspensos em água, contados com auxílio de um hemacitômetro e de um microscópio invertido, e então armazenados a -20°C.

Para purificação de vírions, poliedros foram solubilizados em solução alcalina, pH 10.9 por 30min e aplicados em gradientes de sacarose 1,17 a 1,26g/ml, seguidos de ultracentrifugação a 24.000rpm/1h a 4°C (rotor Sorvall AH 627). As bandas de vírions liberadas por álcali (ARVs) foram coletadas, diluídas em quatro volumes de tampão TE e sedimentadas 24.000rpm/30min., a 4°C.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) - Foi utilizado o método de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS descrito por Laemmli (1970). Para análise das proteínas das partículas virais o gel separador foi preparado numa concentração de 15% e o concentrador 5%. As amostras foram diluídas em tampão amostra 2X, fervidas a 100°C por 5 minutos, resfriadas no gelo por 15 minutos e então aplicadas no gel. A migração foi feita com uma voltagem de 30V overnight. O gel foi corado com Coomassie blue e, para melhor visualização das bandas, foi então corado com nitrato de prata (Blum et al., 1987).

Purificação de DNA a partir de poliedros – O DNA foi extraído a partir de poliedros purificados na concentração de 1×10^9 PIB/ml, que após solubilizados em solução alcalina de carbonato de sódio 0,1M, foram purificados por ciclos de extração inicialmente com fenol, seguido de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico - IAA (25:24:1) e clorofórmio: IAA (24:1). Esse procedimento foi baseado no protocolo descrito por O'Reilly *et al.*, 1992.

Clivagem de DNA por endonucleases de restrição (REN) – As reações de digestão foram feitas utilizando o DNA viral purificado. Os sistemas consistiram de 0,7 - 1µg de DNA, enzima de restrição e tampão apropriados, e água autoclavada para completar um volume final de 20 - 30µl. As enzimas de restrição utilizadas foram: *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Hind*III e *Pst*I. As condições quanto à temperatura e tempo de digestão foram estabelecidas conforme recomendações do fabricante.

Eletroforese em gel de agarose – Géis de agarose foram preparados numa concentração de 0,8 a 1,0%, diluídos em tampão de corrida TAE 1X (TAE 50X: Tris base - 242g; ácido acético glacial - 57,1mL; EDTA 0,5 M, pH 8,0 - 100mL). Após polimerização do gel, as amostras de DNA preparadas em tampão (*gel loading buffer* 5X: azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%; ficoll 15%) foram aplicadas e submetidas a uma fonte de corrente elétrica sob voltagem constante de 80V. Para visualização do DNA, o gel foi corado com brometo de etídio em uma concentração final de 0,5µg/ml e submetido à luz ultravioleta.

Hibridizações Southern blot - Amostras de DNA de CvMNPV, clivadas com enzimas de restrição, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% e então transferidas para uma membrana de nylon para utilização em hibridização Southern blot. Para isso, o gel foi tratado previamente com solução de depurinação (HCl 0,25N) durante 20 minutos, solução de desnaturação (NaCl 1,5M; NaOH 0,5N) por 45 minutos e solução de neutralização (Tris-Base 1M; NaCl 1,5M pH7,4) por 45 minutos, sendo o DNA então transferido para membrana de nylon. Após 16 horas de transferência, a fixação dos fragmentos de DNA na membrana foi feita por secagem a vácuo a 80°C, por 2 horas. A membrana foi pré-hibridizada (SSC 6X, Denhardt's 5X, SDS 0,5%) a 68°C por 4 horas, seguida de hibridização por 16 horas, a 68°C, com uma sonda específica (DNA de CvMNPV fragmentado), numa concentração de 25ng, e marcada radioativamente [α -³²P]dCTP, utilizando o kit rediprime™ II (Amersham-Pharmacia). Em seguida a membrana foi submetida a três lavagens, por 30 minutos, a 68°C em solução SSC 2X, SDS 0,1% e então exposta ao filme raio-X Kodak T-Mat™ G/RA, a -80°C por 72 horas.

Resultados e Discussão

Análise de proteínas estruturais de *Condylorrhiza vestigialis* NPV

Partículas virais purificadas em gradiente de sacarose - Corpos de oclusão, também denominados de poliedros (PIBs), foram purificados através de ultracentrifugação em gradiente de sacarose e uma banda localizada no terço inferior do tubo, que corresponde aos poliedros, foi obtida (Fig.1A). Amostra da banda coletada ao ser observada ao microscópio de luz exibiu a presença de um grande número de poliedros, apresentando uma concentração de 10⁸ PIBs/ml, conforme determinação de contagem de partículas em hemacitômetro.

Para obtenção de vírions (ARVs), poliedros purificados foram solubilizados e submetidos a ultracentrifugação em gradiente de sacarose. Três bandas foram

visualizadas (abaixo do topo que contém a proteína poliedrina) indicando a possibilidade dos vírions conter de 1 a 3 nucleocapsídeos por envelope (Fig. 1B). Esta indicação está de acordo com a análise ultraestrutural de corpos de oclusão do CvMNPV apresentada em trabalho anterior (Castro et al., 2003), que evidencia tratar-se de um baculovirus do gênero *Nucleopolyhedrovirus* múltiplo (MNPV). Porém vale ressaltar que as bandas observadas na figura 1B estão bastante fracas, indicando baixa concentração do material, tornando assim difícil de se afirmar o número correto de bandas. A literatura relata a ocorrência de números variados de nucleocapsídeos por envelope nos MNPVs.

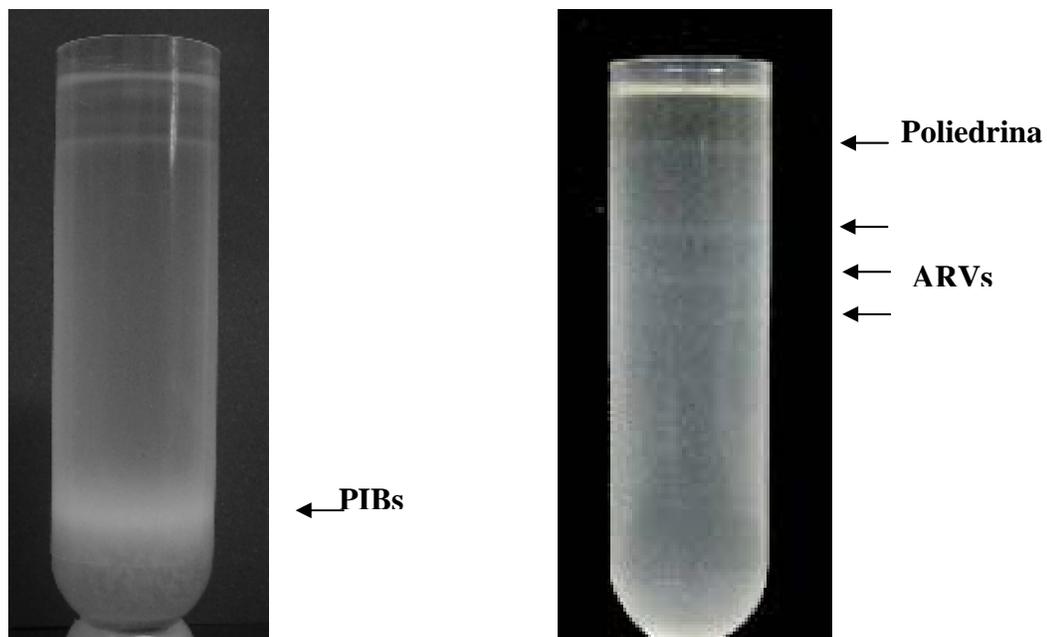


Fig. 1 - Purificação de partículas virais de *Condylorrhiza vestigialis* NPV. Ultracentrifugação em gradiente de sacarose. (A) PIBs, poliedros (corpos de oclusão); (B) ARVs, vírions liberados por solução alcalina.

Análise de partículas virais (poliedros e vírions) em PAGE-SDS - A análise dos poliedros em gel de poliacrilamida-SDS mostrou uma forte banda de

aproximadamente 33kDa, indicando a presença da poliedrina, a principal proteína dos NPVs (Fig.2, poço 2). Na fração dos ARVs (Fig.2, poço 1) foram identificadas bandas correspondentes a peptídeos de peso molecular variando entre 16,4 a 66kDa, sendo que a maioria corresponde a peptídeos de alto peso molecular, acima de 29kDa. A coloração do gel com nitrato de prata possibilitou a visualização de maior número de bandas, uma vez que este método possui maior sensibilidade (limite de detecção 2 a 5ng/banda de proteína) comparado ao Coomassie blue (limite de detecção 0.3 a 1µg/banda de proteína).

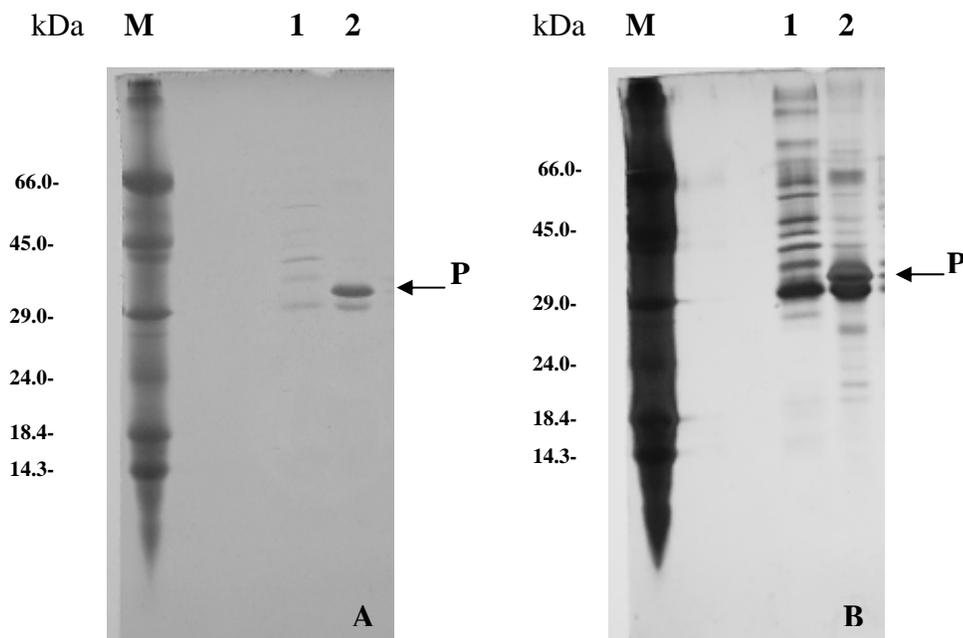


Fig. 2 - Análise de proteínas estruturais de *Condylorrhiza vestigialis* NPV. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 15%. A- coloração com Coomassie blue; B- coloração com nitrato de prata. M, marcador de peso molecular; (1) vírions (ARVs); (2) poliedros. A seta indica a principal proteína dos NPVs, a poliedrina.

Análise de DNA de *Condylorrhiza vestigialis* NPV

Análise de DNA por enzimas de restrição – Os diferentes perfis de DNA obtidos por clivagem com cinco enzimas de restrição estão apresentados na Figura 3. Como pode ser observado na análise por eletroforese em gel de agarose, amostras de DNA digeridas com as enzimas *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Hind*III e *Pst*I geraram, respectivamente, 8, 7, 9, 20 e 17 fragmentos de restrição. Os números de fragmentos aqui apresentados foram baseados também nos resultados obtidos pela hibridização da membrana contendo as amostras de DNA transferidas do gel, com a sonda de DNA de CvMNPV clivado e marcado com [α - 32 P]dCTP (Southern blot) (dados não mostrados).

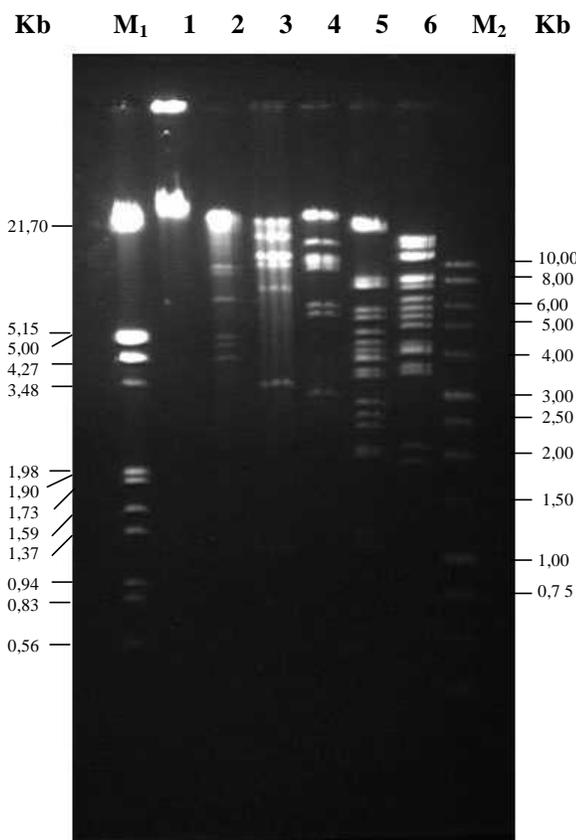


Fig. 3- Análise de restrição de DNA de *Condylorrhiza vestigialis* NPV. Eletroforese em gel de agarose 1%. (1) DNA viral intacto, DNA viral clivado com (2) -*Bam*HI, (3) -*Bgl*II, (4) -*Eco*RI, (5) -*Hind*III e (6) -*Pst*I; M₁: marcador DNA λ /*Eco*RI+*Hind*III, M₂: marcador 1kb.

Para caracterização de baculovirus várias técnicas podem ser utilizadas. A maioria delas requer inicialmente a purificação das partículas virais do corpo do inseto.

Neste trabalho, o processo de purificação de vírus utilizado foi baseado em centrifugação em gradiente de sacarose, pois oferece maior grau de pureza no isolamento das partículas virais (poliedros, ARVs e "budded virus").

Essas partículas purificadas podem então ser caracterizadas em diferentes níveis como morfológico - por análise em microscopia eletrônica; bioquímico - por análise dos peptídeos virais em eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS; e molecular - pela análise de DNA clivado por endonucleases de restrição (REN) em eletroforese em gel de agarose.

Portanto, as amostras virais analisadas neste trabalho mostram o padrão genômico de um baculovirus recentemente identificado, denominado ***Condylorrhiza vestigialis*** NPV e suas proteínas estruturais, dentre elas a poliedrina, a principal proteína dos *Nucleopolyhedrovirus*. Este trabalho é parte de estudos de caracterização do baculovirus CvMNPV ainda não descritos na literatura.

Agradecimentos

Este trabalho é parte de um projeto de pesquisa desenvolvido em parceria com a Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Parte desta pesquisa recebe apoio financeiro da "FUPEF do Paraná - Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná", "Indústrias Andrade Latorre S/A" e "Swedish Match do Brasil S/A".

Referências Bibliográficas

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

CASTRO, M. E. B.; RIBEIRO, Z. M. A.; SOUZA, M. L.; SOUSA, N. J.; MOSCARDI, F. **Identificação do baculovirus da lagarta-do-álamo *Condylorrhiza vestigialis***

(Guenée, 1854) (Lepidoptera: Pyralidae). Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 9p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 87).

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors**: a laboratory manual. 339p. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.

ROHRMANN, G. F. Evolution of occluded baculoviruses. In: GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. A. Eds. **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986. v.1, p. 203-215.