

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS DE SÃO GABRIEL

MARIA CAROLINA PALEARI VARJÃO DE OLIVEIRA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA PROTEASE 3C DO VÍRUS DEFORMADOR
DA ASA (*DEFORMED WING VIRUS – DWV*)**

São Gabriel

2015

MARIA CAROLINA PALEARI VARJÃO DE OLIVEIRA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA PROTEASE 3C DO VÍRUS DEFORMADOR
DA ASA (*DEFORMED WING VIRUS – DWV*)**

Trabalho de conclusão de curso III,
Apresentado ao Curso de Bacharelado
em Biotecnologia da Universidade Federal
do Pampa, Campus São Gabriel, Como
requisito Parcial para obtenção do Título
de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Professor Dr. Andrés Delgado Cañedo

São Gabriel

2015

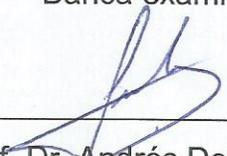
MARIA CAROLINA PALEARI VARJÃO DE OLIVEIRA

CLONAGEM E EXPRESSÃO DA PROTEASE 3C DO VÍRUS DEFORMADOR DA
ASA (DEFORMED WING VIRUS – DWV)

Trabalho de conclusão de curso III,
Apresentado ao Curso de Bacharelado em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Pampa, Campus São Gabriel, Como requisito
Parcial Para Obtenção do Título de Bacharel
em Biotecnologia.

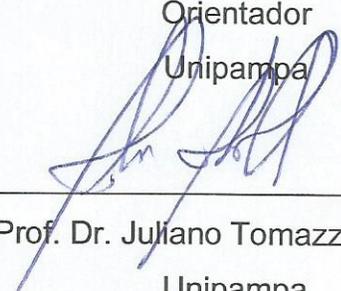
Trabalho de conclusão de curso III, defendido e aprovado em: 2 de dezembro de
2015.

Banca examinadora:



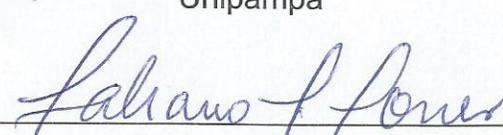
Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo

Orientador
Unipampa



Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

Unipampa



Prof. Dr. Fabiano Pimentel Torres

Unipampa

Dedico este trabalho aos melhores pais do mundo Givelder de Oliveira e Luzia Meire Paleari Varjão de Oliveira e aos meus queridos irmãos Maria Teresa Paleari Varjão de Oliveira e Pedro Henrique Paleari Varjão de Oliveira.

AGRADECIMENTOS

Por mais que muitas vezes pareça clichê e que para muitos, ciência e Deus não possam caminhar lado a lado, para mim isso não acontece de maneira nenhuma, por tanto minha maior gratidão é a Deus, qual me deu a oportunidade da vida e de ter todas as pessoas que citarei abaixo ao meu lado.

Agradeço aos mais maravilhosos pais que uma pessoa poderia ter a felicidade em ter, Meire e Gil, Mãe e Pai, obrigada pela vida, por todo o amor e carinho, por todos os ensinamentos, por todas as oportunidades que me proporcionaram amo vocês além dessa ou de qualquer outra vida.

Aos meus irmãos Maria Teresa e Pedro Henrique, obrigada seus pentelhos, sem vocês minha vida não teria sentido em nada, amo muito vocês.

As minhas tias queridas, Givania, Gisele, Geysa e Gleysi, que sempre vibraram com todas as minhas vitórias, me dando todo carinho, amizade e apoio quando precisei.

Ao meu orientador professor Andrés, não tenho palavras para expressar o quanto sou grata, por todas as lições, todas as palavras de incentivo, por acreditar e confiar em mim, mesmo quando sem querer acabo apagando mais de cinco mil arquivos de uma pasta do Dropbox, rs. Você será sempre um exemplo chefe, tenho muito carinho por você e orgulho de dizer que por cinco anos e meio fui a sua “Carminha” – de carma da sua vida. Obrigada por tudo!!!

A todos os professores que ao longo da minha graduação contribuíram para que eu me tornasse uma profissional de fundamento. Em especial ao professor Juliano Boldo, por sempre estar disposto a ajudar, seja com a explicação de uma técnica, empréstimo de material para realizar alguns experimentos ou apenas uma palavra amiga. E a outros três professores que dentre muitos lembrarei sempre com muito carinho, professora Analía Garnero com as palavras de carinho e apoio, professor Jeferson Franco com os reagentes sempre a mão, professor Luis Fabiano pelos conselhos e pelas

risadas nos momentos de descontração. Vocês sem dúvidas fizeram a diferença pra mim, obrigada meus queridos.

A todo grupo da apicultura da UNIPAMPA, em especial a Mariana Costa, co-orientadora e amiga, qual aprendi que dedicação e esforço são a chave de tudo, que me ensinou também que “saúde é pior que prego na bota” valeu Bozi.

Aos colegas que sempre estiveram disponíveis para auxiliar no laboratório, Darlene Rangel, Jéssica Tápia, Luiz Fernando Duarte, Aline Weyh, Érika Eisenhardt, Helber Barboza, Hudson Marques.

Aos técnicos dos laboratórios, em especial a Adriana Sassi, Michele Stach e Adriano de Paula, por toda ajuda e auxílio sempre.

Aos amigos que se tornaram a minha família gabrielense, que por muitas vezes foram irmãos, mãe, pai, psicólogos e que sempre estiveram ao meu lado, seja pessoalmente ou virtualmente devido a distancia, Isabella Picirillo, Ana Paula Perin, Marina Bolzan, Vanuza Braga, Lunardo Mattos, Gilson Santos, muito obrigada vocês são os melhores e os quero pra sempre em minha vida.

Ao meu bem, Amyr Krause, que chegou de mansinho, mas que em pouco tempo conquistou meu coração, que demonstra apoio incondicional, que sempre tem uma palavra de incentivo e carinho, que tem feito meus dias mais bonitos e colorido. Muito obrigada meu lindo.

E a todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram na realização deste trabalho, mas que não foram citados. Meu muito obrigada.

*"Que bom que nós nos encontramos com um paradoxo.
Agora, temos alguma esperança de progredir!"*

Niels Bohr

RESUMO

As abelhas são insetos da ordem *Hymenoptera*, e o representante mais conhecido é a abelha melífera (*Apis mellifera* L.), que é criada em grande escala para a produção de mel, cera, própolis, entre outros. Nos últimos anos a apicultura viu-se afetada por um aumento de eventos deletérios que culminam na perda das colméias, entre estes eventos encontram-se as infecções virais. O vírus com maior presença ao redor do mundo é o vírus deformador de asas (*Deformed Wing Virus – DWV*), um vírus pertencente à família *Picornaviridae* que infecta as abelhas tanto vertical quanto horizontalmente provocando morte nas fases iniciais de desenvolvimento ou deformação das asas e encurtamento abdominal, entre outras características físicas e comportamentais em indivíduos adultos. Os vírus da família *Picornaviridae* são pequenos vírus com genoma formado por RNA simples fita com sentido positivo e possuem uma única ORF no seu genoma que codifica uma poliproteína, a qual depois de traduzida é clivada pela protease 3C nela contida. Em outros vírus desta família, foi demonstrado que esta protease participa na regulação das funções das células hospedeiras através da degradação proteolítica de proteínas do hospedeiro, evitando e/ou bloqueando os mecanismos antivirais. Este trabalho teve por objetivo, realizar a clonagem molecular da sequência que codifica a protease 3C do vírus DWV. A partir de amostras de cDNA positivas para o vírus DWV, utilizando primers específicos juntamente com a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificou-se a região do genoma viral que codifica a protease 3C. A esta região foi adicionado um fragmento contendo 6 histidinas para posterior purificação proteica. O fragmento amplificado foi clonado no plasmídeo pGEX4T-1 pela técnica de PCR circular. A produção da protease 3C recombinante tem um peso molecular de aproximadamente 10 kDa e foi induzida em *Escherichia coli* da linhagem BL21(DE3)pLysS, por aproximadamente 6 horas realizando testes da indução a cada 2 horas de indução. Os resultados obtidos foram analisados por SDS-PAGE.

Palavras chaves: DWV; Protease 3C; *Apis mellifera*; pGEX4T-1; Clonagem.

ABSTRACT

Bees are insects of the *Hymenoptera* order, and the best known representative is the *Apis mellifera* L., reared on a large scale for the production of honey, bee wax and propolis. In the last years apiculture have been affected by an increase of deleterious events that culminate in loss of bee hives, among these events are the viral infections. The most abundant virus around the world the deformed wing virus (Deformed Wing Virus - DWV), a virus belonging to Picornaviridae family that infects the bees both vertically and horizontally causing death in the early stages of development or deformation of the wings and abdominal shortening among other behavioral and physical characteristics in adults. The Picornaviridae family of viruses are small viruses with genome constituted of simple strand RNA with positive sense and have a single ORF in its genome which encodes a polyprotein, which after translated, is cleaved by the 3C protease contained therein. In other viruses of this family, it was demonstrated that this protease participated in the regulation of functions of the host cells via proteolytic degradation of host proteins, preventing and / or antiviral blocking mechanisms. This study aims, perform the molecular cloning of the sequence were used as template for PCR encoding the 3C protease from DWV virus. Positive DNA samples of DWV virus using specific primers to amplify the region of the viral genome which encodes the 3C protease. It is was added in a fragment of 6 his-tag for subsequent protein purification. The amplified fragment was cloned into pGEX4T-1 plasmid by circular PCR. The production of recombinant 3C protease has a molecular weight of approximately 10 kDa was induced in *E. coli* strain BL21 (DE3) pLysS, for about 6 hours of induction conducting tests every 2 hours induction. The results were analyzed by SDS-PAGE.

Key words: DWV; 3C Protease; *Apis mellifera*; pGEX4T-1; Cloning.

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	
1.1 Abelhas e a Apicultura.....	11
1.2 Vírus que infectam abelhas.....	12
1.3 A Protease 3C.....	14
2 JUSTIFICATIVA.....	14
3 OBJETIVO.....	15
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos Específicos.....	15
4 MATERIAIS E METODOS.....	16
4.1 Amplificação e clonagem do fragmento viral que codifica a protease 3C.....	16
4.2 Eletroporação de <i>E. coli Dh5α</i> e <i>BL21(DE3)pLysS</i>	19
4.3 Purificação e análise de plasmídeos.....	20
4.4 Indução da Protease 3C com IPTG.....	21
4.5 Análise da expressão em SDS-PAGE.....	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
7 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

1.1 Abelhas e a Apicultura

As abelhas são insetos da ordem Hymenoptera, e o representante mais conhecido é a abelha melífera (*Apis mellifera* L.), que é criada em grande escala para a produção de mel, cera e própolis, entre outros [1]. As abelhas são de suma importância econômica e biológica por seu potencial polinizador, pois existem em grande número na natureza e pela facilidade de adaptação a várias estruturas florais, o que aumenta significativamente a produção de frutos e sementes, chegando em algumas regiões a serem responsáveis por até 90% da polinização local [2].

Atualmente se tem o conhecimento de aproximadamente vinte mil espécies de abelhas, onde quase três mil são encontradas no Brasil. Contudo, acredita-se que ainda existam milhares de espécies que não foram descobertas e caracterizadas. Dentre as espécies já caracterizadas, apenas uma pequena porcentagem das abelhas é produtora de mel, e essas produtoras são consideradas sociáveis por viverem em colônias, entre elas encontram-se as do gênero *Apis* [3].

No Brasil, as primeiras abelhas do gênero *Apis* a serem introduzidas foram as popularmente conhecidas como abelhas alemãs (*A. mellifera mellifera*), e as abelhas italianas (*A. mellifera ligustica*). Posteriormente as abelhas africanas (*A. mellifera scutellata*) foram introduzidas no país, ocasionando assim o cruzamento dela com as subespécies já existentes no Brasil. Desta forma originaram-se as abelhas africanizadas, que não são mansas como as abelhas européias originais; porém tem uma alta produção de mel e são de grande enxameação, o que possibilitou sua dispersão por quase todo o continente americano, com exceção de regiões muito frias [4].

O Brasil é conhecido mundialmente por ter boas técnicas de manejo da *A. mellifera* africanizada. Esse domínio das técnicas fez com que o país tivesse vantagens comerciais na sua produção, pois essa espécie é mais tolerante a doenças e mais adaptável ao clima tropical que as abelhas européias [5]. Com uma demanda agrícola cada vez maior, muitas técnicas interferem no

habitat natural das abelhas. Com isso já é possível a observação da grande diminuição na população das abelhas, em decorrência de doenças intrínsecas e ao uso de agrotóxicos que causam a morte dos insetos quando estes realizam suas visitas a flores e frutos contaminados [6].

Em muitos países, incluindo o Brasil, está sendo registrado um fenômeno chamado de "Colony Collapse Disorder" (CCD - Distúrbio do Colapso das Colônias), que se caracteriza pelo desaparecimento das colônias e junto com outros fatores causadores de perda de colônias, vem preocupando tanto apicultores quanto produtores agrícolas [7]. As colônias com CCD não precisam necessariamente apresentar sintomas característicos de doenças ou intoxicação antes de entrar em colapso. O fenômeno se caracteriza pelo desaparecimento repentino de abelhas adultas, deixando para trás crias, mel, e até a sua rainha. O que é mais intrigante é o fato de que nenhuma abelha morta é encontrada nem dentro nem nos arredores das caixas [7, 8].

Acredita-se que o CCD não tenha fatores específicos, e sim que é um conjunto de acontecimentos, como o uso de agrotóxicos e pesticidas em lavouras próximas aos apiários, condições climáticas e infecção por vírus e outros patógenos. Dentre estes, os vírus têm uma parcela considerável no acontecimento do CCD, pois são causadores de muitas doenças que assolam as abelhas. A combinação de condições climáticas desfavoráveis como o frio, a chuva, a seca ou qualquer outro fator ambiental que faça com que as abelhas não se encontrem em condições plenas causando estresse que por sua vez, favorecerá a queda do sistema imunológico, deixando-as mais susceptíveis às infecções virais [9].

1.2 Vírus que infectam abelhas

Os vírus que infectam abelhas podem atingir todas as castas (rainha, zangão e operárias), e em todas as fases da vida destas, (ovos, crias e adultos). A comunicação entre as abelhas se dá muitas vezes através do contato físico entre elas, tanto para se alimentarem quanto para produção de mel e própolis, para o acasalamento, ou mesmo transmitidos através dos cuidados com as larvas, agravando assim o contágio de toda a colônia por

uma possível doença. Este modo de contaminação é chamado de contaminação horizontal. Além da contaminação pelo contato físico, pode haver também uma contaminação por parasitas como o ácaro *Varroa destructor*, vetor de doenças que são transmitidas tanto para abelhas adultas como para as crias no momento em que o parasita se alimenta da hemolinfa das abelhas [10].

A maioria dos vírus que infectam abelhas possui RNA de fita simples em seus genomas, e pertencem às famílias Cripaviridae, Dicistroviridae e Iflaviridae, que estão dentro da superfamília de vírus *Picornavirus-like*. Os vírus de RNA possuem um capsídeo proteico que reveste a molécula da simples fita, que se liga covalentemente a proteína viral ligada ao genoma (*viral protein genome-linked*) na extremidade 5' e uma cauda poliA na extremidade 3' [11, 12]. Este RNA é traduzido em uma poliproteína que posteriormente é clivada por uma protease viral própria, denominada 3C, em proteínas funcionais e estruturais que serão responsáveis pela replicação do RNA e produção de novas partículas virais [10].

O vírus deformador das asas (deformed wing vírus – DWV) é um vírus de RNA que infecta abelhas verticalmente, através das rainhas contaminadas e pelo zangão durante o acasalamento, gerando uma prole contaminada, porém nem sempre causando sintomas da doença ou danos à colônia [10, 13]. Contudo quando o DWV é transmitido pelo ácaro *Varroa destructor*, normalmente causa infecções e o surgimento da doença [13,14]. O ácaro transmite o vírus na fase de pupa, quando estas ainda não têm total coloração dos olhos e as asas não estão completamente desenvolvidas. Neste momento muitas abelhas vão a óbito, porém se sobreviverem à infecção inicial, desenvolverão deformações nas asas, encurtamento do abdômen e terão uma vida média reduzida em comparação às não infectadas [13, 15].

1.3A Protease 3C

A protease 3C viral é uma enzima *cisteína-like* e é a responsável pela maior parte das clivagens na poliproteína viral [16]. Esta protease tem um papel de suma importância no processamento e maturação da poliproteína viral e participa diretamente das funções celulares do seu hospedeiro, através da degradação de proteínas do hospedeiro que pode evitar e/ou bloquear o sistema antiviral, possibilitando a instalação e replicação do vírus, por exemplo [17].

A protease 3C está presente em vírus que infectam os mais variados organismos, desde vírus que infectam humanos, bovinos e abelhas, alvo deste trabalho. O rhinovirus humano (HRVs) é o principal responsável por causar gripe em humanos e pertence à família Picorna-like. O HRVs traduz sua informação genética em uma poliproteína, que será precursora de proteases, esta poliproteína será processada e codificada pela protease 3C [13]. O vírus da febre aftosa é um vírus do gênero Aphthovirus da família Picornaviridae, este vírus contém um 8400 kb de cadeia positiva do RNA do genoma que é traduzido para um polipeptídeo de cadeia simples. Isso serve de suporte para uma série de proteases virais que processam precursores que geram o proteoma do vírus, têm protease 3C como a principal enzima envolvida neste passo, o que representa 10 das 13 enzimas envolvidas, o que a torna um alvo bastante atraente para a concepção de medicamentos antivirais para bovinos [18].

Apesar do conhecimento literário sobre a 3C em vírus que infectam os mais variados organismos, somente se tem conhecimento que ela está presente nos genomas dos vírus que infectam abelhas, mas ainda não há um conhecimento real sobre a sua funcionalidade específica quando infectam *A. mellifera*, o que ressalta a relevância deste trabalho para com a comunidade científica e apícola.

2. JUSTIFICATIVA

Uma das maiores produções de mel do Brasil acontece dentro da região do Pampa Gaúcho, pois possui uma grande variedade florística, que ao

mesmo tempo, permite a produção de um dos melhores méis do mundo quando analisadas suas características organolépticas. Contudo, a perda de abelhas, também está prejudicando a apicultura desta região e dentre os causadores deste fenômeno encontram-se os vírus.

O vírus DWV é o vírus mais relatado mundialmente no âmbito apícola e tem sido encontrado na maioria das colmeias que apresentavam sintomas de infecção viral, o que destaca a importância de serem realizadas pesquisas específicas com este vírus visando o entendimento dos mecanismos de infecção e assim escolher possíveis alvos para seu tratamento.

Sendo a protease 3C uma proteína chave na infecção viral que permite o combate do vírus aos mecanismos antivirais e, ao mesmo tempo, uma proteína com potencial biotecnológico, a sua clonagem e expressão ofereceria um modelo para estudar seu papel na infecção do vírus DWV e uma alternativa na busca de moléculas que inibam sua função catalítica.

3. OBJETIVO

Levando em consideração os pontos relatados acima o presente estudo tem por objetivo:

3.1 Objetivo geral

Contribuir de maneira significativa para estudos virais relacionados a protease 3C.

3.2 Objetivos específicos

Clonar a protease 3C de DWV no plasmídeo pGEX4T-1 adicionando uma cauda de histidina na extremidade carboxi terminal;

Transformar bactérias *E. coli* da linhagem BL21(DE3)pLysS com o plasmídeo recombinante;

Induzir a expressão da protease 3C em bactérias transformadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amplificação e clonagem do fragmento viral que codifica a protease 3C

Amostras de cDNA de abelhas que tiveram confirmada a infecção com DWV [19], foram usadas para amplificar por PCR a região que codifica a protease 3C. Foram desenhados primers específicos descritos na Tabela 1, contendo adicionalmente, uma região do plasmídeo pGEX4T-1 na região 5' dos mesmos para posterior clonagem pela técnica de PCR circular [20]. Além disso, uma sequência codificante da cauda de histidinas foi adicionada no primer reverso. Ao mesmo tempo, o plasmídeo pGEX4T-1 também foi submetido a PCR usando primers específicos (descritos na Tabela 1), desenhados para excluir a ORF que codifica a porção GST.

Tabela 1. Primers utilizados na clonagem.

Primer	Sequência
Primer reverso 3C pGEX: 5' -> 3'	<u>GCGAGGCAGATCGTCAGTCAATGATGATGATGATGATGC</u> GCACTAGCGTAACATCTAAC
Primer direto 3C pGEX: 5' -> 3'	<u>CACAGGAAACAGTATTCATGAGACCTGTGTTTCTAGCTAA</u> CC
Primer reverso pGEX4-T1: 5' -> 3'	<u>CATGAATACTGTTTCCTGTG</u>
Primer direto pGEX4-T1: 5' -> 3'	<u>TGACTGACGATCTGCCTCGC</u>

As regiões sublinhadas dos primers correspondem às sequências compartilhadas com o plasmídeo pGEX4-T1. As regiões ressaltadas em negrito correspondem às sequências específicas para amplificação da protease 3C. Em itálico é ressaltada a sequência que codifica a cauda de 6 histidinas. Fonte: o autor.

Todo o planejamento da clonagem, incluindo o desenho dos primers e posterior verificação do posicionamento *in frame* da sequência clonada, foram

realizados com auxílio do software pDRAW32 (<http://www.acaclone.com>). A Figura 1 mostra mapa final da clonagem, onde se tem o fragmento de interesse 3C inserido no vetor plasmidial pGEX4T-1 [21].

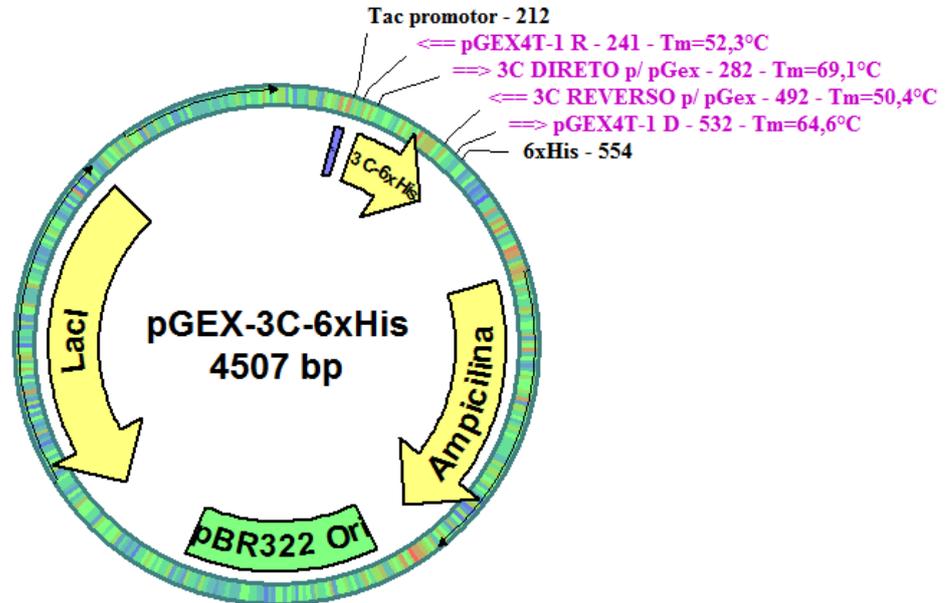
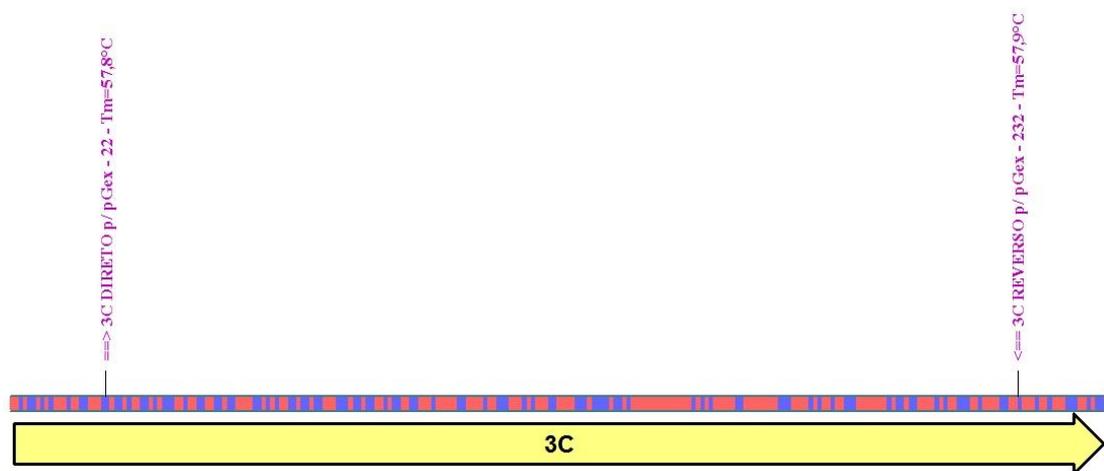


Figura 1. Representação do plasmídeo pGEX4T-1 clonando a sequência codificante para a protease 3C do vírus DWV, com cauda de 6 histidinas para posterior purificação. Dentro do DNA circular está descrito a quantidade de pares de bases, a descrição para a localização da cauda de histidina e onde se inicia o fragmento 3C. **Fonte: o autor.**

A clonagem da sequência codificante da protease 3C foi realizada pela técnica de PCR circular que consiste no uso de duas moléculas que possuem sobreposição de bases nas extremidades, Figura 2.



3C
252 bp

Figura 2. Sequência codificante da protease 3C, nas extremidades é possível observar onde os primers anelaram por sobreposição. **Fonte: o autor.**

Assim na região de PCR usada para clonagem as extremidades do plasmídeo servem como primers para amplificar o inserto e vice-versa, como observado na Figura 3.

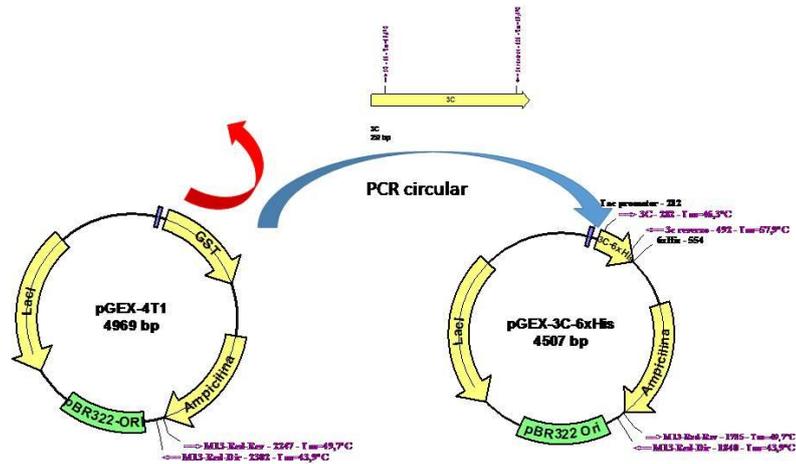


Figura 3. Esquema mostrando como se realizou a técnica PCR circular. É possível observar o plasmídeo pGEX4T-1 inicialmente com a porção GST e posteriormente o plasmídeo transformado pGEX-3C-6xHis. Fonte: o autor.

As condições da PCR usada na clonagem foram às mesmas utilizadas nas PCR que amplificam o plasmídeo pGEX4T-1, com a diferença de que não foram utilizados primers, somente os produtos das amplificações de 3C e pGEX4T1 utilizando 30 ciclos. As temperaturas, e tempos das PCR são descritos na Tabela 2 e as concentrações dos reagentes na Tabela 3.

Tabela 2. Condições utilizadas na termociclagem.

Programa	Temperatura	Tempo
Desnaturação Inicial	98°C	30 segundos
Desnaturação	94°C	15 segundos
Hibridização	58°C	20 segundos
Extensão	68°C	Tempo dependente do fragmento amplificado
Extensão Final	68°C	10 minutos

O número de ciclos para amplificar 3C e o plasmídeo foi 35 e para realizar a clonagem 30. O tempo de extensão foi de 30 segundos para amplificar o fragmento 3C e 5 minutos

para amplificar o plasmídeo e também no procedimento de clonagem por PCR circular.

Fonte: o autor.

Tabela 3. Reagentes utilizados em uma reação de PCR com volume final de 25 μ L

Reagente	Quantidade
Água ultra pura	16 μ L
dNTP (5mM)	1 μ L
Dimetilsulfoxido (DMSO)	1 μ L
DNA Polimerase de alta fidelidade (hi-FI)	0,2 μ L
Tampão da enzima (contendo magnésio)	2,5 μ L
Amostra	
cDNA	1 μ L
Plasmídeo (1ng/ μ L)	1 μ L
Produto de PCR pGEX4T-1	1 μ L(10ng)
Produto de PCR 3C	1 μ L (100ng)

O mix realizado com os reagentes citados tem um volume final de 25 μ L. Este mix então é levado ao termociclador onde será realizada a PCR.

4.2 Eletroporação de *Escherichia coli* Dh5 α e BL21(DE3)pLysS

Dois protocolos foram utilizados para produção de bactérias *E. coli* eletrocompetentes, devido ao fato que *BL21(DE3)pLysS*, ao contrário de *Dh5 α* , é sensível a baixas temperaturas e o protocolo padrão para produzir *E. coli* eletrocompetentes não pode ser usado nelas.

Para a *E. coli* da linhagem *Dh5 α* , foi realizado o crescimento de uma colônia por aproximadamente 12 horas em 5 mL de meio LB líquido estéril, transferiu-se essa cultura para um volume maior, 200 mL e o crescimento da mesma foi monitorado através de espectrofotometria usando uma absorbância a 600 nm, até que a cultura atingiu valores de absorbância (OD_{Abs}) entre 0,4 e 0,6. Ao atingir o crescimento desejado, a cultura foi mantida em gelo por 20 minutos, uma serie de lavagens com glicerol 10%

gelado e centrifugações a 4°C foram realizadas e as bactérias foram então aliqüotadas e conservadas a -80°C [23].

Para *E. coli* BL21(DE3)pLysS o protocolo é diferenciado, pois a falta de parede celular as deixa mais sensíveis aos agentes externos, e exige uma sequência diferenciada nos processos. Conforme o protocolo pré estabelecido para esta linhagem, as temperaturas devem variar apenas entre 20°C e 24°C, pois temperaturas mais frias ocasionariam lise da membrana celular bacteriana [24]. Por esse motivo, tanto a solução de glicerol quanto a temperatura de centrifugação foram mantidas dentro dos valores recomendados.

Para o procedimento de eletroporação 20µl de bactérias eletrocompetentes e aproximadamente 10 ng de plasmídeo recombinante foram misturados e colocados numa cubeta de 0,2 cm e imediatamente submetidos às seguintes condições: Capacitância 25µF e Cuvette (mm) 2 e 2.5 Kv. Após a eletroporação as bactérias foram acondicionadas em meio LB por 1 hora a 37°C e posteriormente plaqueadas em meio LB sólido contendo 100µg/ml de ampicilina para selecionar as bactérias transformadas.

4.3 Purificação e análise de plasmídeo

A colônia obtida da transformação, foi crescida em 2 ml de meio LB contendo ampicilina e testadas por PCR de colônia utilizando os mesmos primers e condições usadas para amplificação do fragmento 3C, para confirmação que esta sequência estava presente no plasmídeo. Como controle positivo utilizou-se cDNA de abelhas infectadas com o vírus DWV. O produto dessa PCR foi migrado em gel de agarose a 1%. Após confirmação procedeu-se à purificação do plasmídeo, a partir da mesma cultura bacteriana. A purificação foi realizada através de uma lise alcalina utilizando o kit específico para mini-prep de plasmídeo *Invisorb Spin Plasmid Mini Two* (250) da empresa *Invitex* [25].

4.4 Indução da protease 3C com IPTG

Com a confirmação da obtenção do produto recombinante procedeu-se a realização de uma nova eletroporação, desta vez o plasmídeo foi usado para transformar *E. coli* BL21(DE3)pLysS, as bactérias foram plaqueadas em meio LB Agar contendo dois tipos de antibióticos. Ampicilina a 100g/ml e cloranfenicol 34g/ml [24, 26].

Depois do crescimento, uma colônia foi colocada em LB líquido e posta a crescer *overnight* a 37° com agitação. Posteriormente esta cultura foi recolocada em 50 ml de meio LB líquido contendo os dois antibióticos e controlando seu crescimento até o mesmo atingir uma OD_{Abs} de 0,8. Atingindo o nível de crescimento desejado foi retirada uma alíquota sem induzir para o uso como controle e então adicionado 200µL de Isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside (IPTG) 1M. Alíquotas de 100µL foram tomadas a cada duas horas. Tanto a amostra não induzida quanto às alíquotas foram centrifugadas a 10.000 xG por um minuto e os pellets foram re-suspendidos em 100 µL em solução P300-EDTA (3.05 ml 0.5 M Na₂HPO₄, 1.95 ml 0.5 M NaH₂PO₄, 1ml 5M NaCl, 50µL 1M benzamidina, 17 µL 14.4 M 2-mercaptoethanol, 50 ml de água ultra pura), e congelado a -20°C até posterior análise. Ao total de 6 horas de indução as bactérias foram centrifugadas a 10.000g e o pellet re-suspendido em P300-EDTA, congeladas por 24horas em -80°C e posteriormente conservadas em -20°C até a análise [24].

4.5 Análise da expressão em SDS-PAGE

Levando em consideração o baixo peso molecular da proteína recombinante esperada, as amostras foram analisadas por SDS-PAGE em gel de 15%, sem gel de entrada, em tampão TRIS-Glicina. 15µL de cada amostra foram misturado com 7,5µL de tampão de corrida e aquecidas a 80°C por 5 minutos antes da aplicação. Amostras sem induzir e induzidas foram aplicadas e comparadas com o padrão de peso molecular de 100kDa *Broad Range Protein Molecular Weight Markers* da empresa *Promega* [27].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Duas amostras com confirmação prévia da presença do vírus DWV foram submetidas a PCR usando os primers específicos para amplificação e clonagem de 3C (desenhados para este trabalho). Ao mesmo tempo, o plasmídeo pGEX4T-1 foi submetido a PCR com primers desenhados para remoção da ORF que codifica a porção GST. Na Figura 4 pode ser observado que os primers desenhados para este trabalho possibilitaram a amplificação dos fragmentos de DNA desejados para realização da clonagem por PCR circular, apresentando os tamanhos esperados (314pb para 3C e 2.100 pb para pGEX4T-1 sem a ORF que codifica GST) [20].

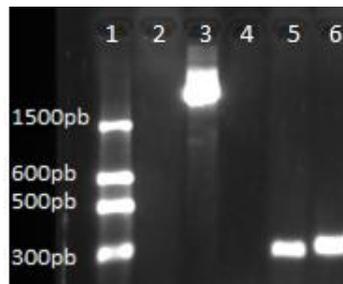


Figura 4. Fotografia de corrida eletroforética dos produtos de PCR necessários para posterior clonagem. 1) marcador molecular produzido no nosso laboratório por PCR 2) Controle negativo para amplificação de pGEX4T-1. 3) Produto de PCR com plasmídeo pGEX4T-1. 4) controle negativo para amplificação de 3C. 5/6) amostra de cDNA de abelhas com presença do vírus DWV. **Fonte: o autor.**

Após amplificação dos fragmentos de DNA desejados procedeu-se a ligação de ambos por PCR circular.

No presente trabalho nós desenhamos os experimentos para usar o plasmídeo pGEX4T-1 pela sua característica de possuir expressão induzível e por estar em disponibilidade em nosso campus. Contudo, este plasmídeo possui uma ORF que codifica um domínio GST para produção de proteína de fusão recombinante e na nossa estratégia pretendíamos realizar a purificação com o sistema conhecido como 6xHis-tag. Para tal, a região codificante GST (do segundo ao penúltimo códon) foi removida no procedimento de amplificação do plasmídeo, ao mesmo tempo no fragmento usado como inserto se procedeu à inserção de seis resíduos de histidina na porção

carboxi terminal da proteína. Esta inserção foi realizada pela adição da sequência codificante no primer reverso usado para amplificar 3C [22].

Para confirmação do sucesso da clonagem, o produto da PCR circular foi eletroporado em *E. coli coli Dh5 α* e das colônias resultantes realizou-se a purificação de plasmídeo e PCR utilizando o primer da 3C. Como pode ser observado na Figura 5 foi possível a obtenção de um plasmídeo recombinante.

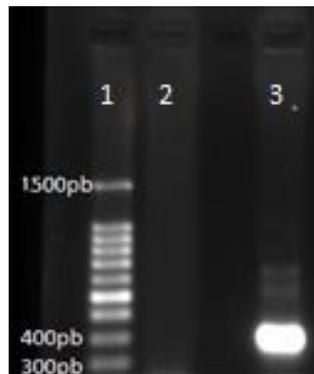


Figura 5. Gel de agarose a 1% em corrida eletroforética de PCR do produto da clonagem. 1) Marcador molecular de 1500pb. 2) Controle negativo. 3) Produto de PCR confirmando a obtenção do produto recombinante. **Fonte: o autor.**

Depois destas etapas, o produto recombinante (denominado pGEX-3C-6His) foi eletroporado em *E. coli BL21(DE3)pLysS*. Inicialmente foi usado o mesmo protocolo utilizado anteriormente em *Dh5 α* , mas não foi possível a obtenção do pellet após a centrifugação. A literatura não oferece referências claras sobre protocolos para produzir bactérias eletrocompetentes para esta linhagem. Entretanto, em um artigo metodológico de produção de proteínas recombinantes, Selleck & Tan 2008, ressaltam a necessidade de não centrifugar as bactérias da linhagem *BL21(DE3)pLysS* em baixas temperaturas e, por tal motivo, modificamos o protocolo de geração de bactérias eletrocompetentes trabalhando todos os procedimentos a temperatura ambiente. Embora com baixa eficiência, foi possível obter colônias positivas após seleção com dois antibióticos, ampicilina e clorofenicol [24].

Uma colônia foi retirada e colocada em meio LB líquido, onde permaneceu *overnight* para iniciar o processo de indução com IPTG.

Durante este experimento foram tomadas alíquotas não induzidas e induzidas por 2, 4, 6 horas. A expressão das alíquotas retiradas foi analisada por SDS-PAGE.

A banda de interesse possui um peso teórico de 10kDa. Para obtermos este valor a sequência codificante da nossa proteína recombinante, foi submetida a uma ferramenta do portal de bioinformática ExPaSy (<http://web.expasy.org/protparam/>). Na Figura 6 é demonstrado o perfil de proteína em eletroforese realizada em gel de poliacrilamida 15%.

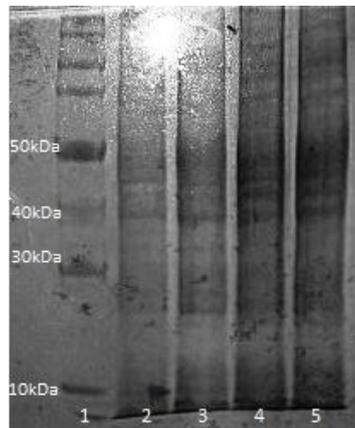


Figura 6. Produção de proteína recombinante, visualizada em SDS-PAGE a 15 %. No poço 1 está o marcador de peso molecular de 100kDa, *Broad Range Protein Molecular Weight Markers* da empresa *Promega*. Os poços 1, 2, 3, 4 são referentes às alíquotas de zero, 2, 4 e 6 horas de indução. **Fonte: o autor.**

Segundo Malcolm *et al.* após a indução com IPTG, os níveis intracelulares do inserto podem atingir aproximadamente 10% da proteína celular total [28]. Devemos levar em consideração que a protease recombinante pode ter efeito nas proteínas da linhagem bacteriana utilizada, quando analisamos a imagem do gel obtido com melhor resolução nenhuma banda aparece com a definição esperada entre induzidos e não induzidos. Logo acima do limite inferior da corrida destacam-se 3 bandas nos induzidos, mas com tamanho inferior aos 10 kDa. Ao mesmo tempo, o mais aproximado é uma banda fraca um pouco acima do marcador de 10kDa que parece evidente. Devido à necessidade de obtermos géis como melhor resolução todo o material usado como controle

(não induzido e induzido por 2 e 4 horas) foi utilizado e, por este motivo, um novo procedimento de indução deverá ser feito. Nos próximos ensaios uma quantidade maior de proteína deverá ser utilizada por corrida e alternativas de análise deverão ser utilizadas como eletroforese em tampão Tricina ao invés do tampão glicina ou, alternativamente, realizar análise por HPLC usando colunas C18.

6. Considerações finais

Com as análises realizadas até o momento, é possível confirmar a clonagem da protease 3C, entretanto, os experimentos iniciais de expressão não demonstram claramente uma banda com massa molecular esperada. Por este motivo novos experimentos de indução da expressão deverão ser feitos, pois esta é uma ferramenta inicial de grande importância para analisar os mecanismos de ação desta protease. Estudos posteriores utilizando esta ferramenta poderão gerar métodos eficazes de controle deste agente infeccioso reduzindo o prejuízo econômico dos apicultores e acrescentando novos conhecimentos à comunidade científica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- **Abelhas**. Disponível em < <http://pt.wikipedia.org/wiki/Abelha>> acessado em 18 de Mai 2015.
- 2- CARVALHO, R. G. **Apis mellifera: reprodução, polinização e produção de mel**. Defesa de trabalho de conclusão de curso. SP, 2010. Disponível em < <http://www.unifafibe.com.br/revistasonline/arquivos/revistabiologia/sumario/15/02032011082215.pdf16:24:15> > acessado em 18 de Mai 2015.
- 3- **AGÊNCIA DE APOIO AO EMPREENDEDOR E PEQUENO EMPRESÁRIO (SEBRAE)**. 2012. Disponível em < <http://www.apinews.com/pt/noticias-de-apicultura/item/18922-brasil-exportacoes-de-mel-maio-2012> > Acessado em: 30 de Abr de 2015.
- 4- ALLEN, M. & BALL, B. **The incidence and world distribution of the honey bee viruses**. Bee World 77, 141–162, 1996.
- 5- GONÇALVES, L. S. **MEIO SÉCULO DE APICULTURA COM ABELHAS AFRICANIZADAS NO BRASIL**. Disponível em < <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/87/artigo.htm> > Acessado em 18 de Mai 2015.
- 6- BOVI, T. S. **TOXICIDADE DE INSETICIDAS PARA ABELHAS *Apis mellifera***. Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Abr 2013.

- 7- GONÇALVES, L. S. *et al* **O desaparecimento das abelhas, suas causas, conseqüências e o risco dos neonicotinoides para o agronegócio apícola.** Mensagem Doce. n117. APACAME, p. 2-12. Jul. 2012.
- 8- OLDROYD, B. P. *et al* **What's killing American honey bees?** PLoS Biol. p. 168, 2007.
- 9- CHEN, Y.; EVANS, J.; FELDLAUFER, M. **Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*.** Journal of Invertebrate Pathology, v. 92, p. 152–159, 2006.
- 10-ONGUS, J. R. *et al*. **The 59 non-translated region of Varroa destructor virus 1 (genus Iflavirus): structure prediction and IRES activity in Lymantria dispar cells.** Journal of General Virology, v.87, p.3397–3407, 2006.
- 11-KOONIN, E. V. *et al*. **The Big Bang of Picorna-like virus evolution antedates the radiation of eucariotic supergroups.** Nature Reviews - Microbiology, vol. 6, p. 925-939, 2008.
- 12-ARNOLD, E. *et al*. **Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 21-25, 1987.
- 13- MIRANDA, J. R. *et al* **Deformed wing virus.** Journal of Invertebrate Pathology, San Diego, v. 103, p. 48-61, 2010.

- 14-YUE, C. & GENERSCH, E. *et al.* **RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*).** Journal of General Virology, Basingstoke, v. 86, p. 3419-3424, 2005.
- 15-KIM, J. H., *et al.* **High Cleavage Efficiency of a 2A Peptide Derived from Porcine Teschovirus-1 in Human Cell Lines, Zebrafish and Mice.** Plos ONE, v.6, Abr 2011.
- 16-WANG A, Q. M. & CHEN, S. **Human Rhinovirus 3C Protease as a Potential target for the development of antiviral agents.** Current Protein and Peptide Science, 8, 19-27, 2007.
- 17-OLIVEIRA, M. E. C., **Politeísmo e detecção de vírus deformador das asas em abelha *Apis mellifera scutellata* (Africanizada) e *Apis mellifera lingustica* (Européia).** Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” , Piracicaba, São Paulo, 2013.
- 18- JAULENT, A. M. *et al.* **A continuous assay for foot-and-mouth disease virus 3C protease activity.** Analytical Biochemistry 130-137. Jun 2007.
- 19-COSTA, M. F. *et al.* **Análise Filogenética de I flavivirus que Infectam *Apis mellifera*.** Dissertação de Mestrado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas- Universidade Federal do Pampa- UNIPAMPA. Nov. 2015.

- 20-QUAN J. & Tian J (2009) **Circular Polymerase Extension Cloning of Complex Gene Libraries and Pathways**. PLoS ONE 4(7): e6441. doi: 10.1371/journal.pone.0006441
- 21- NASR, S. L. **Can a sewing machine stitch together DNA?** Disponível em < <http://science.howstuffworks.com/life/genetic/dna-sewing-machine.htm> >
Acessado em 16 Nov de 2015.
- 22- Gene Pulse Xcell Instruction Manual. **Eletroporation System**. Catalog Numbers 165-2660, 165-2661, 165-2662, 165-2666, 165-2667 and 165-2668.
- 23-WILLIAM Selleck & Song Tan. **Recombinant protein complex expression in *E. coli***. *Curr Protoc Protein Sci*. 2008 May ; CHAPTER: Unit–5.21. doi:10.1002/0471140864.ps0521s52.
- 24-Agilent Technologies. **BL21(DE3) Competent Cells, BL21(DE3)pLysS Competent Cells, and BL21 Competent Cells**. Instruction Manual. Pág.3.
- 25- Invitex. **Invisorb Spin Plasmid Mini Two**. Instruction. Pág. 10.
- 26- CASAL, M. *et al*. Unidade I **Métodos convencionais em microbiologia**. Páginas 16 e 17. Disponível em < <http://www.asmtusa.org/edusrc/labcore.htm> >
Acessado em 30 Mar de 2015.

27- WILLIAMS, G. *et al.* **Deformed wing virus in western honey bees (*Apis mellifera*) from Atlantic Canada and the first description of an overtly-infected emerging Queen.** *Journal of Invertebrate Pathology* (2009).

28-BRUCE, A. M. *et al.* **Expression and characterization of Recombinant Hepatitis A Virus 3C Proteinase.** Dec. 1991.