



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

PATRÍCIA BRÄUNIG

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UM FRAGMENTO RECOMBINANTE DA
PROTEÍNA DE 28 KDa DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA
(WSSV) DE CAMARÕES**

Florianópolis

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PATRÍCIA BRÄUNIG

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UM FRAGMENTO RECOMBINANTE DA
PROTEÍNA DE 28 KDa DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV)
DE CAMARÕES

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Biotecnologia.
Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto

Florianópolis

2009

Bräunig, Patrícia

Clonagem e expressão de um fragmento recombinante da proteína de 28 KDa do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) de camarões/ Patrícia Bräunig. Florianópolis, 2009, 51 p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2009.

1. WSSV; 2. VP28; 3. proteínas recombinantes.

Este trabalho foi realizado no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina, com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), International Foundation for Science (IFS) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

***Aos meus pais,
sem o amor, apoio e incentivo
deles nada disso seria possível.***

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador por ter aceitado me orientar, pelos ensinamentos, orientação, conselhos, paciência e pela confiança em mim depositada que no princípio era uma desconhecida. Muito obrigada Aguinaldo!

Ao prof. Edmundo por disponibilizar seu laboratório bem como pelos inúmeros esclarecimentos e orientações fornecidos.

Aos parceiros de bancada Renata Gatti e Rafael Rosa por toda ajuda prestada e conhecimento compartilhado.

Aos colegas do LIA (UFSC) que tornaram-se amigos, espero levar essa amizade por toda vida independente de onde ela nos leve. Em especial a Sílvia, pela companhia nessa jornada do mestrado.

Aos colegas do LVA e da Proto (UFSC) por toda ajuda bem como pelas as alegrias e decepções compartilhadas. Em especial a Patrícia Stocco por toda informação, esclarecimento e orientação prestados.

A minha “chefa” Fernanda Vogel pela compreensão, conselhos, ajuda e pela amizade que surgiu entre nós.

Aos colegas do Ladopar (UFSC) pela recepção amigável da nova funcionária, compreensão nos momentos de ausência no lab e por toda ajuda nos experimentos.

Aos colegas da Viro (UFSC) por aceitarem e acolherem tão carinhosamente mais uma farmacêutica intrusa. Em especial ao prof. Eduardo e ao Fernandinho pelos esclarecimentos e ajuda.

Aos meus amigos de Florianópolis, Santa Maria e Agudo pela compreensão da minha ausência e por me “arrancarem” do lab ou da frente da dissertação dizendo que eu precisava relaxar.

A minha família (mãe, pai, mano e vó) pelo amor, apoio, incentivo e compreensão durante os dias difíceis dessa jornada.

À Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC pela oportunidade;
Ao CNPq pelo apoio financeiro;

Meus agradecimentos a todos que, diretamente ou não, contribuíram para a elaboração desse trabalho.

“No meio de qualquer dificuldade
encontra-se a oportunidade.”

Albert Einstein

“Somos quem podemos ser,
sonhos que podemos ter”

Humberto Gessinger

RESUMO

O vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) é o agente infeccioso que trouxe maiores prejuízos à carcinicultura brasileira e mundial. Métodos de detecção do vírus são importantes na medida em que possibilitam a identificação da infecção dos camarões, permitindo que os criadores tomem medidas de contenção da disseminação viral, amenizando assim as perdas econômicas. As proteínas estruturais do WSSV, principalmente a VP28, são amplamente empregadas na obtenção de anticorpos poli e monoclonais, que por sua vez são utilizados no desenvolvimento de testes de detecção do WSSV. A síntese protéica em sistemas recombinantes é amplamente empregada para obtenção de proteínas recombinantes. Neste estudo, a região gênica mais hidrofílica da proteína do envelope viral VP28 foi amplificada, clonada, seqüenciada e expressa. A expressão por meio da cepa de *E. coli* BL21(DE3) *plysS* resultou em uma proteína recombinante de aproximadamente 21 KDa, denominada VP28r. A proteína recombinante possui uma cauda de histidinas na região N-terminal e permaneceu no interior da bactéria na forma de agregados insolúveis conhecidos como corpos de inclusão. Os corpos de inclusão foram solubilizados com uréia 8M e a proteína foi purificada através de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados em condições desnaturantes. A metodologia para expressão e purificação da VP28r desenvolvida no presente estudo demonstrou um bom rendimento protéico final possibilitando o futuro emprego desta proteína na produção de anticorpos que potencialmente podem ser empregados no desenvolvimento de testes de detecção do WSSV.

Palavras-chave: WSSV, VP28, proteínas recombinantes, métodos de diagnóstico

ABSTRACT

White spot syndrome virus (WSSV) is the infectious agent responsible by great losses in the shrimp production in Brazil and around the world. The developing of reliable methods for virus detection is important in order to allow the identification of infected shrimps, providing the creators the ability to adopt measures to contain viral spreading, thereby alleviating economic losses. The structural proteins of WSSV, mainly VP28, are widely employed in order to obtain poly and monoclonal antibodies, which in turn may be used in the development of tests for WSSV detection. Protein synthesis in recombinant systems is widely employed to obtain recombinant proteins. In this study, the most hydrophilic genomic region of the viral envelope protein VP28 was amplified, cloned, sequenced and expressed. The expression by *E. coli* BL21 (DE3) *plysS* resulted in a recombinant protein of approximately 21 KDa, named VP28r, which is connected to a tail of histidine in the N – terminal. This protein remained as insoluble aggregates in inclusion bodies. These inclusion bodies were solubilized with 8M urea and the protein was purified by affinity chromatography of metallic ions under denaturing conditions. The methodology for expression and purification of VP28r developed in this study showed a good protein yield, allowing the possible employment of this protein in the production of antibodies that can be potentially employed in the development of WSSV detection tests.

Key-words: WSSV, VP28, recombinant proteins, diagnostic methods.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Manchas brancas característica da infecção causada pelo WSSV.....	03
Figura 2: Micrografia eletrônica do WSSV.....	04
Figura 3: Representação esquemática do WSSV.....	06
Figura 4: Representação da região N-terminal transmembrânica da proteína VP28	07
Figura 5: Diagrama do teste imunocromatográfico para detecção do WSSV.....	11
Figura 6: Representação esquemática do vetor pET-14b.....	20
Figura 7: Representação esquemática do processo de purificação da VP28r	25
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídeo, demonstrando a amplificação do fragmento de interesse (558 pb) pela PCR, a partir do DNA total extraído de camarões infectados com WSSV.....	28
Figura 9: Seqüência de nucleotídeos codificante para a região hidrofílica da proteína VP28 presente no plasmídeo pET-14b-VP28r, determinada através do seqüenciamento de DNA.....	30
Figura 10: Seqüência de aminoácidos deduzida da proteína recombinante VP28r comparada com a seqüência da VP28 disponível no GenBank.....	31
Figura 11: Análise da indução de expressão da VP28r em SDS-PAGE 15%, mostrando o tamanho de aproximadamente 20 KDa bem como sua maior concentração na fração insolúvel.....	32

Figura 12: Western blotting demonstrando a presença da VP28r no extrato protéico da *E. coli* BL21(DE3) *plysS* abrigando pET-14b-VP28r após indução da expressão.....**33**

Figura 13: Perfil eletroforético do lisado bacteriano e fases da segunda purificação protéica da VP28r.....**34**

Figura 14: Representação esquemática da regulação da expressão protéica em um sistema recombinante contendo pET.....**38**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados na amplificação da seqüência codificadora da região hidrofílica da VP28.....	15
Tabela 2: Condições de indução de expressão da VP28r.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Da: dalton

DEPC: dietilpirocarbonato

dNTP: deoxinucleotídeos trifosfatados

ELISA: ensaio imunoenzimático (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*)

Hz: hertz

IPTG: isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

kb: quilo pares base de DNA

KDa: quilo Daltons

LB: meio Luria-Bertani

mA: miliAmper

nm: nanômetro

ORF: fase aberta de leitura (do inglês *open reading frame*)

pb: pares de base de DNA

PBS: tampão salina fosfato (do inglês *phosphate-buffered saline*)

PCR: reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase chain reaction*)

pmol: picomoles

q.s.p: quantidade suficiente para

Taq: *Thermus aquaticus*

U: unidade de atividade enzimática

WSSV: vírus da síndrome da mancha branca (do inglês *white spot syndrome virus*)

X-GAL: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactosídeo

Aminoácidos

A – Alanina	C – Cisteína	D – Ácido aspártico
E – Ácido glutâmico	F – Fenilalanina	G – Glicina
H – Histidina	I – Isoleucina	K – Lisina
L – Leucina	M – Metionina	N – Asparagina
P – Prolina	Q – Glutamina	R – Arginina
S – Serina	T – Treonina	V – Valina
W – Triptofano	Y – Tirosina	

SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
1.1 Aspectos gerais.....	01
1.2 Vírus da síndrome da mancha branca.....	02
1.3 Métodos de diagnóstico da síndrome da mancha branca.....	07
2. Justificativa.....	12
3. Objetivos.....	13
3.1 Objetivo Geral.....	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
4. Materiais e Métodos.....	14
4.1 Extração do material genético de tecidos de camarões da espécie <i>Litopenaeus vannamei</i> infectados naturalmente com WSSV.....	14
4.2 Desenho dos iniciadores.....	15
4.3 Amplificação da região que codifica a sequência da região hidrofílica da VP28.....	16
4.4 Clonagem do produto de PCR da região hidrofílica da VP28 no vetor pGEM-Teasy.....	16
4.5 Isolamento de DNA plasmidial das bactérias contendo o plasmídeo pGEM-Teasy-VP28r.....	17
4.6 Subclonagem do fragmento codificante da região hidrofílica da VP28 em vetor de expressão pET-14b.....	18
4.7 Seqüenciamento do fragmento VP28r inserido no vetor de expressão pET-14b.....	20

4.8 Expressão da proteína VP28r em <i>E. coli</i> BL21(DE3) <i>plysS</i>	21
4.9 Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida e <i>Western blotting</i> do perfil protéico das bactérias contendo plasmídeo recombinante pET-14b-VP28r.....	23
4.10 Purificação da VP28r.....	24
5. Resultados.....	28
5.1 Amplificação da sequência codificadora da proteína VP28r.....	28
5.2 Clonagem, expressão e purificação da VP28r.....	29
5.2.1 Clonagem da região codificadora da porção hidrofílica da proteína VP28r.....	29
5.2.2 Sequenciamento da região codificadora da porção hidrofílica da proteína VP28r.....	29
5.2.3 Expressão da VP28r.....	32
5.2.4 Purificação da VP28r.....	33
6. Discussão.....	35
7. Conclusões.....	42
8. Perspectivas.....	43
9. Referências Bibliográficas.....	44

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

A carcinicultura, técnica de criação de camarões em cativeiro, contribui significativamente na produção aquícola mundial. Segundo dados da *Food and Agriculture Organization* (2009), a produção mundial de camarões no ano de 2008 foi de 6 milhões de toneladas. No Brasil, em 2006, a carcinicultura produziu aproximadamente 76.000 toneladas de camarões (FAO, 2006). Os principais produtores mundiais de camarão são os países asiáticos, dentre os quais, destacam-se: China, Tailândia e Vietnã. Na América destacam-se México, Equador e Brasil sobressaem-se na produtividade desse crustáceo (FAO, 2006).

No Brasil a carcinicultura começou a ser praticada na década de 70. Nessa época cultivaram-se principalmente a espécie de camarão nativo *Farfantepenaeus brasilienses*, bem como a espécie de camarão exótico *Marsupeneaus japonicus* (NUNES; SURESH, 2001). Essas espécies, porém, renderam resultados pouco satisfatórios devido à falta de conhecimento e tecnologia na área de criação de camarões em cativeiro nesta época. Visando reverter essa situação, na década de 90, *Litopenaeus vannamei*, espécie de camarão exótica proveniente do Pacífico Ocidental, foi introduzida nos cultivos do país devido as suas características de alta produtividade, rápido crescimento, sobrevivência e adaptação a variadas condições de cultivo (NUNES; SURESH, 2001). Atualmente essa é a principal espécie de camarão empregada na carcinicultura brasileira e mundial (FAO, 2005; LIGHTNER, 2003).

Apesar de toda renda e empregos gerados pela carcinicultura, esta atividade encontra problemas que ameaçam sua viabilidade. Um dos principais problemas que provoca efeitos devastadores sobre o cultivo, levando à queda na produção, são as enfermidades que podem acometer camarões. Tais enfermidades são causadas principalmente por microrganismos patogênicos transmissíveis como vírus, bactérias, protozoários e fungos (LIGHTNER; REDMAN, 1998).

Os vírus são considerados os patógenos de maior importância na carcinicultura porque provocam altos níveis de mortalidade no cultivo (LIGHTNER, 2003). Dentre os inúmeros vírus que infectam camarões destacam-se, devido aos

efeitos nocivos sobre o cultivo de peneídeos, o vírus da infecção na hipoderme e necrose do tecido hematopoiético (IHHNV), vírus da síndrome de taura (TSV), vírus da cabeça amarela (YHV), vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) e o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) (ANDRADE et al., 2007; LIGHTNER, 2003).

O WSSV foi o patógeno que trouxe maiores prejuízos a carcinicultura mundial (WANG et al. 1999), uma vez que os peneídeos são altamente suscetíveis a esse vírus (LIGHTNER, 2003). O primeiro aparecimento do WSSV ocorreu em Taiwan, no início dos anos 90 (CHOU et al., 1995). Após contaminar os cultivos de camarões presentes no continente Asiático, o vírus disseminou-se para outras regiões do mundo, atingindo fazendas produtoras de camarões nos Estados Unidos, América Central, América do Sul, Europa e Austrália (SOTO; LOTZ, 2001; VAN HULTEN et al., 2001).

Entre dezembro de 2004 e janeiro de 2005, o WSSV foi detectado pela primeira vez no Brasil, em cultivos no estado de Santa Catarina (APHIS-USDA, 2005). A infecção dos cultivos catarinenses pelo WSSV inutilizou 20% da produção catarinense de camarões, aproximadamente 200 toneladas de camarões, causando prejuízo de 3 milhões de reais aos produtores (SEIFFERT et al., 2006). Desde então, devido à disseminação do WSSV nos cultivos do estado, a carcinicultura em Santa Catarina vive momentos de decadência refletindo na diminuição da área produtiva, redução da produção e do lucro, bem como do número de postos de trabalho. Esta situação somente foi amenizada recentemente no ano de 2008 quando a disseminação do WSSV foi parcialmente controlada.

1.2 Vírus da síndrome da mancha branca

O WSSV é capaz de infectar uma ampla gama de crustáceos. Caranguejos, lagostas e siris são portadores assintomáticos, enquanto os camarões peneídeos são altamente suscetíveis à infecção e apresentam a enfermidade da síndrome da mancha branca (FLEGEL, 1997; LO et al., 1996a). Pelo menos 18 espécies de camarões peneídeos desenvolvem a síndrome da mancha branca, tanto camarões cultivados em fazendas quanto os de vida selvagem (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008). O vírus infecta o epitélio cuticular, tecidos conectivos e hematopoiéticos, os

órgãos linfóides e o sistema nervoso (SHI et al., 2005). Na espécie *L. vannamei* a mortalidade pode alcançar níveis de 90 a 100% dentro de 3 a 7 dias após a infecção (CHOU et al., 1995; ZHAN et al., 1998).

Os sinais clínicos da enfermidade causada pelo WSSV são camarões letárgicos, exibindo nado lento na superfície, baixo consumo alimentar, corpo com uma coloração rosada a pardo-avermelhado e cauda vermelha (NUNES; MARTINS, 2002). Porém o principal sinal que indica infecção pelo WSSV são as manchas brancas no exoesqueleto e na epiderme do camarão, na parte dorsal do rostrum (Figura 1). Estas manchas são depósitos de sais de cálcio na epiderme cuticular e podem ser facilmente observadas a olho nu, sendo que o mecanismo exato da formação destas manchas ainda não é bem conhecido, mas é possível que a infecção pelo WSSV induza a disfunção do tegumento proporcionando a deposição dos sais (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008; NUNES; MARTINS, 2002; WANG et al., 1999). Entretanto, as manchas brancas que originaram a denominação da enfermidade não constituem um sinal clínico exclusivo dessa síndrome, podendo ser causada por outra enfermidade de origem bacteriana ou até mesmo por condições ambientais (WANG et al., 2002).

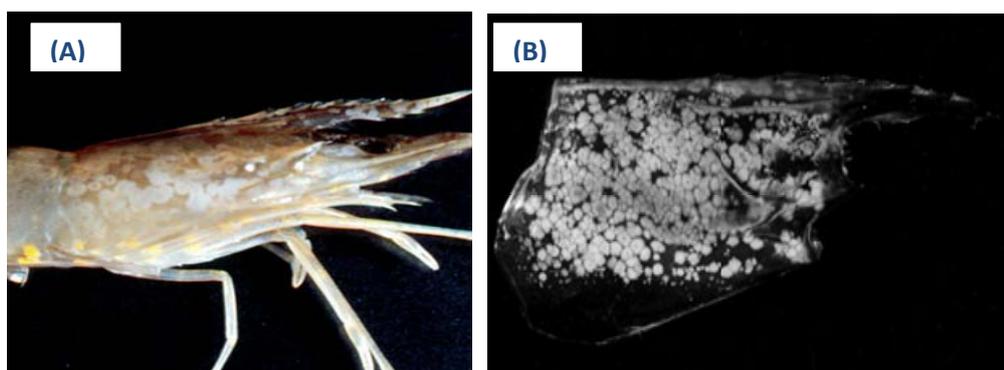


Figura 1: Manchas brancas característica da infecção causada pelo WSSV. (A) Camarão infectado com WSSV apresentando manchas brancas (Fonte: pacrc.uhh.hawaii.edu/mexico/en/docs/graphics.htm). (B) Mancha branca na carapaça do camarão da espécie *Penaeus monodon* (Fonte: ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008).

A transmissão do WSSV ocorre tanto pela via horizontal quanto pela vertical. Na transmissão vertical o agente viral é transmitido dos camarões progenitores aos camarões na fase pós-larval e na transmissão horizontal, que é a principal forma de disseminação do WSSV, a transmissão do vírus ocorre através da água contaminada com partículas virais ou dos animais infectados principalmente por meio do canibalismo de camarões infectados (LIU et al., 2007; QUANG et al., 2008).

O WSSV é um vírus envelopado com morfologia oliveo-baciliforme e dimensões de aproximadamente 275 nm de comprimento por 120 nm de largura (WONGTEERASUPAYA et al., 1995). A característica morfológica mais interessante deste vírus é a presença de uma extensão em forma de filamento na extremidade da partícula viral (Figura 2) (DURAND et al., 1997). Devido às características peculiares do WSSV, sua classificação taxonômica era incerta, tendo sido inicialmente classificado como um baculovirus. Recentemente, porém, o Comitê Internacional em Taxonomia de Vírus classificou o WSSV em uma nova família e gênero: família Nimaviridae e gênero *Whispovirus* (ICTVdB, 2006).



Figura 2: Micrografia eletrônica do WSSV. As setas apontam para o filamento na extremidade do vírus (bar = 250 nm) (Fonte: DURAND et al., 1997).

O genoma do WSSV consiste em uma molécula de DNA dupla fita com aproximadamente 300 kb (YANG et al., 2001). Neste genoma foram identificadas 531 possíveis fases de leitura de transcrição gênica (*open reading frames-ORFs*), das quais 181 ORFs provavelmente codificam proteínas funcionais. Até o momento

mais de 40 proteínas do WSSV foram caracterizadas, sendo no mínimo 38 proteínas estruturais, destas 21 estão localizadas no envelope e 10 presentes no capsídeo (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008).

São cinco os principais polipeptídeos presentes na partícula viral com massas moleculares de 28 kDa, 26 kDa, 24 kDa, 19 kDa e 15 kDa, sendo essas proteínas denominadas respectivamente de VP28, VP26, VP24, VP19 e VP15 (VAN HULTEN; GOLDBACH; VALK, 2000; VAN HULTEN et al., 2002). Atualmente, é conhecida a seqüência de nucleotídeos bem como a localização no genoma dos genes codificadores das proteínas estruturais acima citadas, sendo estes genes designados como vp28, vp26, vp24, vp19 e vp15 (VAN HULTEN; GOLDBACH; VALK, 2000; VAN HULTEN et al., 2000, 2002). A proteína VP15 possui 61 aminoácidos enquanto que a proteína VP19 é constituída por 121 aminoácidos (VAN HULTEN et al., 2002). As proteínas VP28, VP26 e VP24 possuem quantidade de aminoácidos muito semelhantes, 204, 204 e 208 aminoácidos respectivamente. Porém, apesar de apresentarem número de aminoácidos praticamente iguais, possuem mobilidades eletroforéticas ligeiramente distintas devido à diferença nos pontos isoelétricos, bem como a diferenças conformacionais e modificações pós-traducionais das proteínas, principalmente fosforilações, uma vez que não há proteínas glicosiladas no WSSV (VAN HULTEN; GOLDBACH; VALK, 2000; XIE; XU; YANG, 2006). Estas modificações pós-traducionais, além da modificação pós-transcricional do *splicing*, justificam o fato de a proteína VP28 possuir peso molecular de 28 KDa quando seu peso teórico estimado é de 22 KDa (VAN HULTEN et al., 2000). Inúmeras pesquisas demonstraram que as proteínas VP26, VP24 e VP15 localizam-se no nucleocapsídeo enquanto que VP28 e VP19 estão localizadas no envelope da partícula viral do WSSV (Figura 3) (VAN HULTEN; GOLDBACH; VALK, 2000; VAN HULTEN et al., 2000, 2002). Quando os perfis protéicos de vírus isolados de diferentes regiões geográficas são comparados percebe-se que não há variabilidade estrutural entre as 4 proteínas principais (VP28, VP24, VP19 e VP15) bem como há baixa variabilidade antigênica entre os isolados (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008).

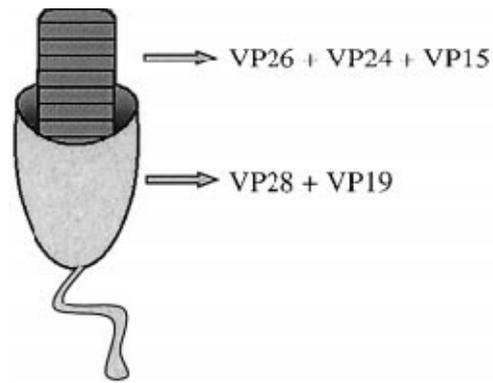


Figura 3: Representação esquemática do WSSV (Adaptado de VAN HULTEN, GOLDBACH, VLAK; 2000).

As proteínas estruturais do WSSV são as primeiras moléculas a interagir com as células do hospedeiro (TSAI et al., 2006). Portanto, acredita-se que as proteínas do envelope viral exerçam papel importante no processo de infecção, desempenhando as funções de reconhecimento e ligação aos receptores da superfície celular do hospedeiro (WU; WANG; ZHANG, 2005). No modelo proposto para a replicação viral, o WSSV infecta uma célula suscetível por meio das proteínas do envelope viral, principalmente a VP28, que interagem com receptores de membrana e desta forma o WSSV entra na célula. O envelope funde com o endossomo e o nucleocapsídeo é transportado até o núcleo, sendo o genoma do WSSV liberado dentro do núcleo e então o processo de replicação viral pode ter início. Novas partículas virais são formadas no núcleo, resultando na lise da membrana nuclear. O vírus é então totalmente formado no citoplasma e liberado, por meio da célula que se rompe, para começar o ciclo novamente em outra célula suscetível (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008; GUOHUA et al., 2004). Além das funções acima citadas, as proteínas estruturais do WSSV também são importantes para a determinação da posição taxonômica do vírus e para o desenvolvimento de testes diagnósticos (VAN HULTEN; GOLDBACH; VALK, 2000). A VP28 é muito importante no processo de infecção da célula alvo e juntamente com a VP24, participa na infecção viral (ROBALINO et al., 2006; XIE; XU; YANG, 2006). A proteína de 28 KDa, umas das proteínas mais abundantes no envelope viral (XIE; XU; YANG, 2006), possui uma região transmembrana de aproximadamente 30 aa na

região N- terminal (Figura 4) responsável pela hidrofobicidade, sendo que a remoção desta região aumenta a solubilidade da proteína (TANG et al., 2007).

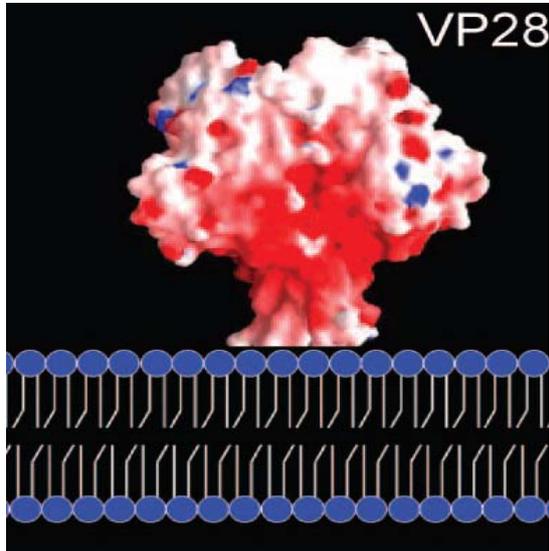


Figura 4: Representação da região N-terminal transmembrânica da proteína VP28 (Adaptado de TANG et al., 2007).

1.3 Métodos de diagnóstico da síndrome da mancha branca

É essencial diagnosticar precocemente os camarões doentes para que possam ser tomadas providências a fim minimizar os danos causados pela infecção pelo WSSV (OKUMURA et al., 2004). Segundo Lightner e Redman (1998) existem vários métodos para diagnosticar doenças e identificar patógenos que acometem camarões em cultivo. No diagnóstico da síndrome da mancha branca as técnicas laboratoriais mais utilizadas são: análise histopatológica, técnicas de biologia molecular e técnicas que utilizam princípios imunológicos (POULOS et al., 2001; YOGANANDHAN et al., 2004).

No exame histológico, cortes de tecido do camarão são corados com hematoxilina e eosina e observados ao microscópio óptico comum (BELL; LIGHTNER, 1988) sendo que as principais manifestações histológicas visualizadas no tecido infectado pelo WSSV são hipertrofia celular e nuclear, além de inclusões intracelulares eosinofílicas e necrose tecidual (PANTOJA; LIGHTNER, 2003;

RAJENDRAN et al., 2005). Entretanto, estas manifestações não são específicas da infecção pelo WSSV, uma vez que podem ocorrer em tecidos infectados por outros patógenos como o YHV, devendo o diagnóstico histopatológico ser confirmado com outra metodologia (PANTOJA; LIGHTNER, 2003).

As principais técnicas de biologia molecular realizadas para detectar WSSV em amostras de camarão são as reações de PCR e hibridização *in situ*. A reação de PCR, por ser altamente específica e sensível, é considerada padrão ouro na detecção do WSSV (POULOS et al., 2001). Tapay, Nadala e Loh (1999) desenvolveram uma das inúmeras metodologias de PCR disponíveis para detectar WSSV, na qual utilizaram iniciadores desenhados a partir de um fragmento do genoma viral. Esta técnica de PCR foi capaz de detectar WSSV em camarões infectados provenientes de diferentes regiões geográficas. Durand e Lightner (2002) padronizaram uma metodologia de PCR em tempo real, técnica muito sensível e específica, que quantifica a carga viral presente em diferentes tecidos do camarão. Apesar de serem técnicas muito específicas e sensíveis existem fatores que limitam a difusão da PCR como método de detecção, tais como necessidade de enviar as amostras para laboratórios devidamente equipados, necessidade de pessoal treinado e principalmente devido à demora na obtenção do resultado, sendo que muitas vezes quando o carnicicultor recebe o resultado da reação de PCR grande parte dos camarões já estão mortos pela infecção por WSSV (ANIL; SHANKAR; MOHAN, 2002).

Na técnica de hibridização *in situ*, sondas específicas para WSSV geradas a partir de reação de PCR e marcadas com composto fluorescente não radioativo hibridizam com o vírus presente no tecido e quando observado ao microscópio o corte histológico positivo para WSSV apresenta-se fluorescente (NUNAN; LIGHTNER, 1997). Assim como a PCR, a hibridização *in situ* é bastante sensível e específica, porém este método é pouco viável como técnica de rotina para detecção do WSSV devido à necessidade de ser realizado por profissional treinado em laboratório devidamente equipado e também devido ao tempo que leva para que o resultado seja enviado ao carnicicultor (DURAND et al., 1996).

As técnicas laboratoriais que utilizam princípios imunológicos fundamentam-se na interação antígeno-anticorpo. Baseados nesse princípio básico da imunologia,

os testes para detecção do WSSV utilizam anticorpos poli e ou monoclonais produzidos contra WSSV ou contra suas proteínas estruturais (POULOS et al., 2001; YOGANANDHA et al., 2004). Os principais testes desenvolvidos até o momento que utilizam princípios imunológicos para detectar WSSV são teste de aglutinação em látex, ELISA e teste imunocromatográfico.

Zhan et al. (1999, 2004) utilizaram anticorpos monoclonais direcionados contra WSSV no desenvolvimento de um teste de ELISA que emprega, além destes anticorpos monoclonais responsáveis pelo reconhecimento do vírus, um outro anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com fosfatase alcalina. Esta técnica apresentou-se específica para WSSV, uma vez que não houve reatividade com as amostras que continham outros agentes infecciosos de camarão. Entretanto, a ocorrência de resultados falso positivo devido à fosfatase alcalina endógena do camarão impossibilita o uso deste teste como método de detecção para WSSV. Dentre as várias reações imunoenzimáticas desenvolvidas para detecção do WSSV encontra-se a metodologia elaborada por Chen, Wang e Shih (2002) que emprega três anticorpos diferentes. Este ensaio utiliza um anticorpo monoclonal direcionado contra um epítipo da proteína VP28, bem como um anticorpo policlonal anti-WSSV e um terceiro anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase. A característica diferencial deste teste é a capacidade de quantificar as partículas virais presentes na amostra através da comparação da leitura da densidade óptica com uma curva padrão.

Liu et al. (2002) padronizaram uma reação de ELISA para detecção do WSSV diferente das citadas anteriormente, pois utiliza anticorpos monoclonais direcionados contra diferentes epítopos da proteína VP28. Dois anticorpos monoclonais foram usados no revestimento dos poços da placa e um terceiro anticorpo monoclonal foi conjugado com peroxidase. Estes anticorpos reconhecem a proteína VP28 constituinte do envelope do WSSV e como resultado dessa interação antígeno-anticorpo ocorre uma reação colorimétrica nos poços. Este teste é capaz de detectar pequenas quantidades de vírus presentes na hemolinfa e possui sensibilidade e especificidade comparável com a PCR. A realização do teste de ELISA é simples, entretanto necessita ser realizado em laboratório devidamente equipado. Assim sendo, o teste de ELISA surge como mais uma técnica para detecção do WSSV,

porém, o fato de ser um método enzimático colorimétrico que necessita ser realizado em laboratório impede sua aplicação nas fazendas de cultivo.

Visando um teste de detecção para WSSV que pudesse ser realizado nos cultivos de camarão, Okumura et al. (2004) produziram um ensaio de aglutinação utilizando partículas de látex. As partículas de látex contêm anticorpos policlonais direcionados contra WSSV aderidos à sua superfície e que interagem com a partícula viral presente na amostra promovendo aglutinação visível a olho nu. O ensaio de aglutinação em látex mostrou boa sensibilidade, porém, houve aglutinação não específica entre o látex e componentes da hemolinfa, gerando resultados falsamente positivos o que limita enormemente a utilização desta técnica como método de diagnóstico (OKUMURA et al., 2004, 2005).

Por fim, métodos imunocromatográficos para detecção do WSSV foram desenvolvidos por diferentes grupos de pesquisadores com o objetivo de desenvolver um teste de diagnóstico rápido, barato e simples que possa ser realizado nos cultivos de camarões (POWELL et al., 2006; SITHIGORNGUL et al., 2006; WANG; ZHAN, 2006). De um modo geral, os testes imunocromatográficos para detecção do WSSV utilizam anticorpos de captura e anticorpos conjugados com ouro coloidal, ambos direcionados contra o WSSV ou contra suas proteínas estruturais (SITHIGORNGUL et al., 2006; WANG; ZHAN, 2006). Nas amostras infectadas com WSSV submetidas ao teste imunocromatográfico, ocorre ligação entre o antígeno viral e os anticorpos presentes na tira de papel, resultando em uma banda colorida visível a olho nu (Figura 5). Quando realizado com amostras infectadas com YHV ou TSV, bem como com amostra livre de patógenos, o teste não gerou resultado positivo (POWELL et al., 2006; SITHIGORNGUL et al., 2006; WANG; ZHAN, 2006). Os testes imunocromatográficos para detecção do WSSV apresentam sensibilidade inferior quando comparados com a sensibilidade apresentada pelas técnicas de PCR e ELISA. Estes testes imunocromatográficos são também pouco sensíveis na detecção das fases iniciais da infecção por WSSV, que corresponde a poucas horas após a contaminação. Entretanto, apresentam boa sensibilidade quando decorrido aproximadamente 24 horas após a infecção, ou seja, antes dos sinais clínicos como o aparecimento da mancha branca tornarem-se evidentes. Portanto, o teste imunocromatográfico é uma ferramenta útil que pode ser

utilizada no processo de identificação de camarões infectados pelo WSSV (POWELL et al., 2006).

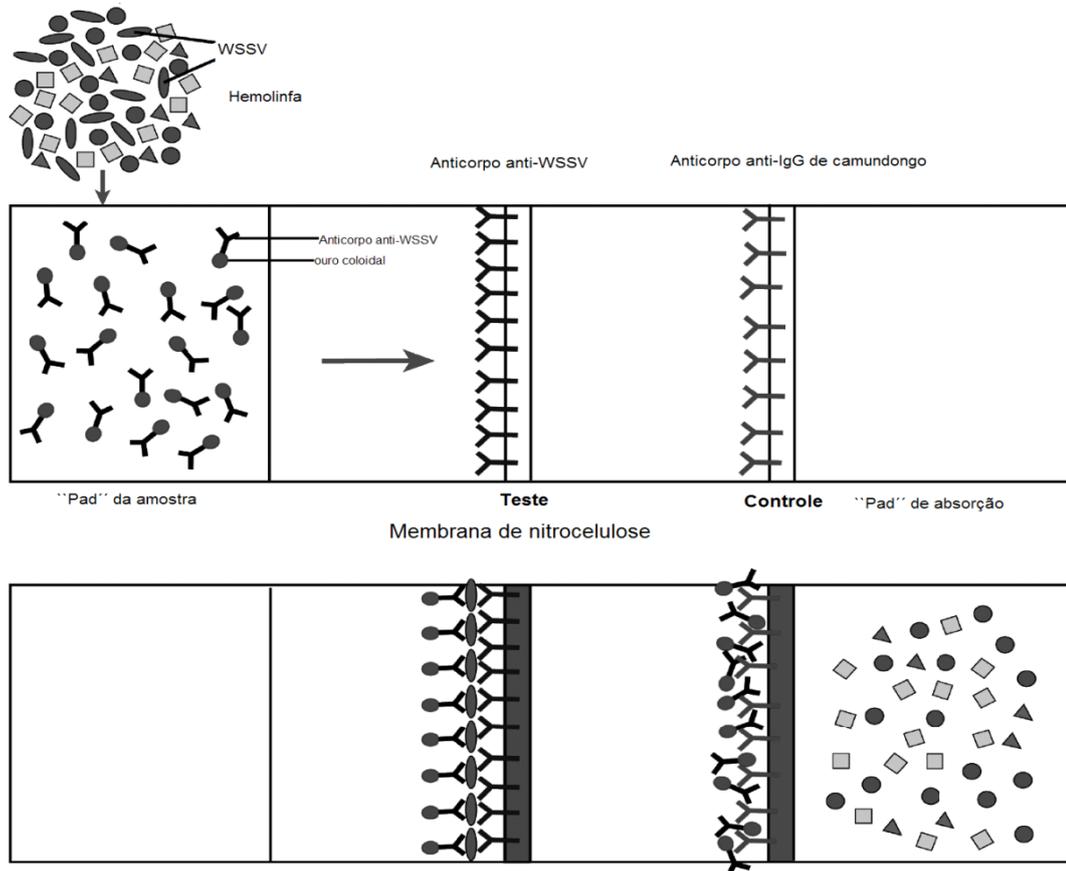


Figura 5: Diagrama do teste imunocromatográfico para detecção do WSSV (adaptado de SITHIGORNGUL et al., 2006).

2. JUSTIFICATIVA

A principal técnica utilizada atualmente para detecção do WSSV é a PCR. Embora se trate de uma técnica bastante específica e sensível, possui o inconveniente da demora na liberação do resultado. O teste imunocromatográfico é uma ótima alternativa de técnica para detecção do WSSV, pois é bastante rápido, fornecendo o resultado em poucos minutos, de baixo custo, fácil de ser manuseado e interpretado, não havendo necessidade de pessoal capacitado para sua execução, podendo ser realizado nas fazendas de cultivo de camarões sem a necessidade de enviar amostras para serem analisadas em laboratórios. O diagnóstico precoce que pode ser obtido pelo teste imunocromatográfico apresenta ainda a possibilidade de controle da enfermidade através de observações simples, possibilitando a correção de problemas ainda em sua fase inicial. Ao ser incluído na rotina da fazenda, torna-se ferramenta importante no combate às perdas de produção e conseqüentemente perda financeira na região sul do país.

No desenvolvimento do teste imunocromatográfico, bem como de outros métodos de diagnóstico baseados no princípio imunológico como teste de ELISA e aglutinação em látex, são utilizados anticorpos poli ou monoclonais anti-VP28, que geralmente são obtidos empregando-se a proteína recombinante VP28 sintetizada em sistema heterólogo. Portanto, a proteína recombinante VP28 é uma importante ferramenta biotecnológica que poderá ter inúmeras aplicações, dentre elas a utilização na produção de anticorpos monoclonais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Clonar, expressar e purificar um fragmento recombinante e hidrofílico da proteína de 28 KDa do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) de camarões.

3.2 Objetivos específicos

- Amplificar o fragmento de DNA codificante para a região da VP28 compreendida entre o nucleotídeo 87 até o final da sequência nucleotídica à partir do DNA total extraído de camarões naturalmente infectados com WSSV;
- Realizar a clonagem do fragmento acima descrito no vetor pGEM-Teasy e posteriormente no vetor de expressão pET-14b;
- Confirmar a natureza do fragmento de interesse por meio de seqüenciamento de DNA;
- Padronizar as condições de expressão da proteína VP28r;
- Expressar a proteína VP28r em sistema procariótico;
- Purificar a proteína VP28 recombinante;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Extração do material genético de tecidos de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* naturalmente infectados com WSSV

Material genético total proveniente de tecidos infectados com WSSV foi purificado pelo método de extração do fenol-clorofórmio (LO et al., 1996b; SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Inicialmente o cefalotórax contendo manchas brancas foi picotado com auxílio de uma lâmina de bisturi e em seguida macerado em presença de tampão de extração (10 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1% SDS, 10mM Tris-HCl, pH 7,4). Ao tecido macerado foi adicionado cerca de 4 volumes do tampão de extração contendo 200 µg de proteinase K/ml de tampão e incubado a 42°C até a completa digestão do tecido. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume de uma mistura fenol-clorofórmio, misturado por inversão e centrifugado por 10 min a 14.000 xg, sendo este processo repetido até obtenção de uma fase aquosa límpida. A fase aquosa foi então transferida para novo tubo e adicionado um volume igual de clorofórmio, misturado por inversão e centrifugado nas mesmas condições acima descritas. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para outro tubo e a ela foi adicionado solução de acetato de sódio 0,3 M pH 5,2. Sobre essa solução foi acrescentado 2,5 X volumes de etanol 100% gelado e em seguida a solução foi incubada a -80°C por 1h. Após esse período, o tubo foi centrifugado durante 30 min a 14.000 xg, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado suspenso com 500 µl de etanol 70% gelado e centrifugado novamente por 10 min a 14.000 xg. Mais uma vez o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o precipitado mantido em uma estufa a 37°C até a completa volatilização do etanol. Em seguida o precipitado foi suspenso em 50 µl de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) e permaneceu durante aproximadamente 16 h à temperatura ambiente, sendo então incubado com 20 mg/ml de RNase por 1h a 37°C. Foram, então, adicionados 50 µl de isopropanol e o material foi centrifugado por 10 min a 14.000 xg. Ao término da centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em 500 µl de etanol 70% gelado e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriormente descritas. O sobrenadante foi descartado e o tubo mantido na estufa 37°C para eliminar o

restante do etanol. Adicionou-se então 50 µl de TE, sendo o tubo mantido por 6 h à temperatura ambiente. A qualidade do DNA extraído foi analisada em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo (0,5 mg/ml), sendo o resultado visualizado sob luz ultravioleta. A concentração de DNA foi estimada em espectrofotômetro (Biophotometer, Eppendorf) na absorvância de 260 nm.

4.2 Desenho dos iniciadores

Foram desenhados iniciadores específicos para clonar o fragmento hidrofílico da proteína VP28 a partir do nucleotídeo 87 até o nucleotídeo 615 da seqüência codificante. O par de iniciadores VP28 senso e anti-senso foi projetado com base na seqüência codificante da molécula disponível no GenBank (acesso DQ681069; NCBI- National Center for Biotechnology Information, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e com auxílio do programa de bioinformática DNASTAR. Nos iniciadores senso e anti-senso foram inseridos, respectivamente, sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *BamHI* (BioLabs). As seqüências dos iniciadores estão listadas na tabela 1. Os iniciadores sintetizados liofilizados foram suspensos em água ultra purificada.

Tabela 1: Iniciadores utilizados na amplificação da seqüência codificadora da região hidrofílica da VP28.

Nome do iniciador	Seqüência 5' – 3'	Sítio de restrição	Temperatura de anelamento (°C)
VP28 senso	<u>CATATGAATCACA</u> ACTGTGACCAAGACCA	<i>NdeI</i>	70
VP28 anti-senso	ATAG <u>GATCC</u> AGCACGATTTATTTACTC	<i>BamHI</i>	60

Região sublinhada corresponde ao sítio de ação da enzima de restrição

4.3 Amplificação da região que codifica a seqüência da região hidrofílica da VP28

A amplificação da região que codifica a seqüência codificadora da região hidrofílica da VP28 foi realizada por PCR na presença de 20 ng de DNA, 10 pmol de cada iniciador, 1U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, na presença do tampão da enzima e em um volume final de 10µl de reação. A reação de PCR foi feita no termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 seg, etapa de ligação dos iniciadores a 60°C por 45 seg e etapa de extensão a 72°C por 1 min. Ao término dos ciclos, as amostras foram submetidas a uma extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos de PCR foram examinados em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo (0,5 mg/ml), visualizados sob luz ultravioleta em transluminador e o resultado fotodocumentado através de câmera fotográfica digital (KODAK) utilizando o programa UVP *Life Science Software* versão 4.0.

4.4 Clonagem do produto de PCR da região hidrofílica da VP28 no vetor pGEM-Teasy

O produto de PCR de 558 pb foi ligado no vetor plasmidial pGEM-Teasy (Promega). A reação de ligação foi feita na presença de 3U da enzima T4 DNA Ligase (Promega), 50 ng do pGEM-Teasy, 5 µl do tampão da enzima, 2 µl do produto de PCR e 1 µl da água DEPC, durante 14h a 16°C. O plasmídeo resultante desta ligação foi denominado pGEM-Teasy-VP28r.

As bactérias *Escherichia coli* DH5α competentes, previamente preparadas (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), foram transformadas com o plasmídeo pGEM-Teasy-VP28r por eletroporação. Inicialmente as células eletrocompetentes foram retiradas do freezer -80°C e mantidas no gelo para descongelar lentamente. Em seguida, sob condições estéreis, foi pipetado na cubeta de eletroporação 2 µl da reação de ligação e aproximadamente 100µl das células descongeladas. A cubeta mantida em gelo foi então levada ao eletroporador (*MicroPulser Electroporator*, Bio-Rad) e submetida ao pulso de aproximadamente 5000 V por 4,8 miliseg. Após o

choque, com a cubeta ainda no gelo, foi adicionado 1 ml de meio SOC. As bactérias suspensas em meio SOC foram transferidas para tubo tipo *ependorf* e mantidas durante 1h a 37 °C sob agitação. Decorrido esse tempo, 300 µl das bactérias transformadas foram plaqueados em placas de Petri contendo meio ágar LB na presença de X-GAL (20 µg/ml), IPTG (0,5 mM), ampicilina (100µg/ml) e incubadas por 16 h a 37°C.

Após o crescimento bacteriano foi possível visualizar colônias de coloração brancas e azuis. Para comprovar a presença do inserto no plasmídeo pGEM-Teasy-VP28r foi realizada reação de PCR diretamente das colônias bacterianas de coloração branca, que são as colônias que supostamente contêm pGEM-Teasy-VP28r. Na reação de PCR utilizou-se os iniciadores pGEM-F (5'-ACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATA-3') e Excel-R (5'-GTTGTAAAACGACGGCCAGTGAAT-3'), os quais são direcionados para regiões do vetor próximas ao sítio de clonagem. A PCR foi feita utilizando-se uma alíquota da colônia bacteriana branca e demais reagentes e condições de reação foram idênticas à anteriormente descrita. Os produtos de PCR foram examinados em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo, visualizado sob luz ultravioleta em transluminador para verificação de presença de um fragmento de tamanho esperado de 720 pb correspondente aos pares de bases do inserto mais os do vetor.

4.5 Isolamento de DNA plasmidial das bactérias contendo o plasmídeo pGEM-Teasy-VP28r

Após a comprovação da presença do inserto, procedeu-se o isolamento do DNA plasmidial das colônias bacterianas contendo plasmídeo recombinante. Portanto, as colônias positivas na reação de PCR foram cultivadas em placa de 96 cavidades profundas (*deep well*) contendo 1 ml de meio LB acrescido de ampicilina (100 µg/ml) por cavidade, sendo mantida sob agitação (120 rpm) a 37°C por um período de 20-24h. Após o crescimento bacteriano, a placa foi centrifugada por 7 min a 4.000 xg, o sobrenadante foi descartado e em cada cavidade foi adicionado 240 µl de GET (glicose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8,0). A placa foi então selada com adesivo e agitada em vórtex por 2 min, sendo em seguida centrifugada por 6 min a 4.000 xg, o adesivo então removido e o sobrenadante

descartado. Adicionou-se em cada cavidade 80 µl de GET contendo 10mg de RNase/ml de solução e a placa foi agitada no vórtex por mais 2 min.

Toda a suspensão de bactérias foi transferida para placa de 96 cavidades com fundo redondo e adicionado 80 µl de uma solução contendo NaOH 0,2M e SDS 1% em cada cavidade. A placa foi selada com outro adesivo e por inversão o conteúdo foi misturado. Este processo foi seguido de um período de incubação por 10 min em temperatura ambiente e em seguida a placa foi centrifugada por alguns segundos a 4.000 xg. Após esta centrifugação foi adicionado 80 µl de uma solução contendo acetato de potássio 5M e ácido acético glacial P.A em cada cavidade. A placa foi novamente selada e submetida à inversão para misturar as soluções. Incubou-se novamente por 10 min a temperatura ambiente e submeteu-se à centrifugação por alguns segundos a 4.000 xg. Após esta breve centrifugação o adesivo foi removido e placa foi incubada por 30 min a 90°C, sendo novamente selada e incubada no gelo por 15 min. A placa foi então centrifugada durante 4 min a 4.000 xg a 4°C.

Cerca de 120 µl de cada cavidade foram transferidos para uma placa filtro (Millipore MAGV N22) fixada sobre uma microplaca com fundo em V, sendo este conjunto de placas centrifugado por 5 min a 4.000 xg a 20°C e após a centrifugação a placa filtro foi removida. Na placa de fundo em V foi adicionado 100 µl de isopropanol em cada cavidade e esta foi centrifugada por 45 min a 4.000 xg a 20°C. Após o sobrenadante ser descartado foi adicionado 150 µl de etanol 70% gelado/cavidade e em seguida procedeu-se nova centrifugação de 5 min a 4.000 xg a 20°C. O sobrenadante foi descartado, a placa levada para a estufa a 37°C até a completa eliminação do etanol e então foi adicionado 30 µl de água DEPC para suspender o precipitado e mantido às 16h à temperatura ambiente. A placa foi guardada a 4°C até o momento do uso do DNA plasmidial (pGEM-Teasy-VP28r).

4.6 Subclonagem do fragmento codificante da região hidrofílica da VP28 em vetor de expressão pET-14b

Para a etapa de expressão protéica, o fragmento codificante da porção hidrofílica da VP28 foi extraído do vetor pGEM-Teasy-VP28r e clonado no vetor de

expressão pET-14b (Novagen) (Figura 6). Inicialmente foi feita, separadamente, a restrição de aproximadamente 50 ng/μl de pET-14b e de pGEM-Teasy-VP28r com 40U de *BamHI* (BioLabs), em condições salinas adequadas, num volume final de 40μl durante 16h a 37°C. Após a reação de digestão enzimática, foi efetuada separadamente a precipitação de cada uma das reações. Adicionou-se inicialmente 80 μl de isopropanol 100% sobre o produto da restrição, que foi então centrifugado por 30min a 14.000 xg. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se ao precipitado 100 μl de etanol 70% gelado. Os tubos foram novamente centrifugados a 14.000 xg por 5min, o etanol descartado, os tubos levados a estufa 37°C para eliminação total do etanol e após a secagem na estufa o precipitado foi suspenso em água DEPC. Procedeu-se então à reação em presença de 40U da enzima *NdeI* (BioLabs), 15 μl da primeira reação, em condições salina adequada, durante 3h a 37°C.

Para comprovar a digestão completa dos plasmídeos, após a segunda reação de digestão enzimática, as amostras foram analisadas em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo (0,5 mg/ml) e visualizadas sob luz ultravioleta em transluminador. Os fragmentos esperados correspondiam a uma banda de aproximadamente 4671 pb correspondente ao pET-14b linearizado, uma outra banda em torno de 558 pb que corresponde ao fragmento VP28 e também a banda de 3015 pb referente ao pGEM-Teasy linearizado. Comprovada a digestão enzimática por meio da visualização no gel dos produtos das restrições, pET-14b linearizado e o fragmento VP28 que foi liberado do pGEM-Teasy estes foram submetidos à purificação, utilizando-se o *kit GFXTM PCR DNA and gel band purification* (Amersham) conforme recomendações do fabricante. Após a purificação, o fragmento que codifica a porção hidrofílica de VP28 e a forma linearizada do plasmídeo pET-14b, foram então submetidos à reação de ligação contendo 1 μl de tampão da enzima 10X, 3U de T4DNA ligase (Promega), aproximadamente 50ng de pET-14b (Novagen) e a mesma quantidade do fragmento que codifica a porção hidrofílica de VP28 durante 16h a 16°C, gerando o plasmídeo denominado pET-14b-VP28r.

pET-14b sequence landmarks

T7 promoter	646-662
T7 transcription start	645
His* Tag coding sequence	554-571
Multiple cloning sites	
(<i>Nde</i> I - <i>Bam</i> HI I)	510-526
T7 terminator	404-450
pBR322 origin	2845
<i>bla</i> coding sequence	3606-4463

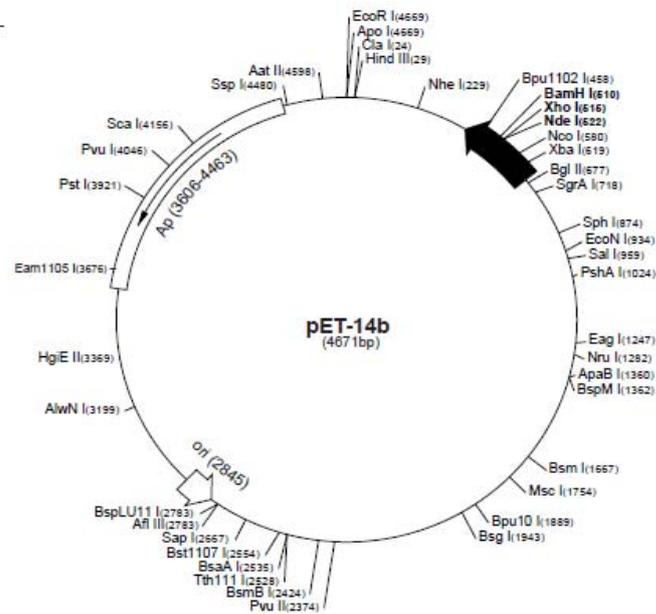


Figura 6: Representação esquemática do vetor pET-14b (Adaptado de Novagen, 2006).

4.7 Seqüenciamento do fragmento VP28r inserido no vetor de expressão pET-14b

O pET-14b-VP28r foi utilizado no processo de transformação por eletroporação de bactérias *E. coli DH5α*. As bactérias transformadas por eletroporação foram cultivadas e após o crescimento bacteriano, o pET-14b-VP28r foi extraído pelo método de extração de DNA plasmidial em placa anteriormente descrito. O seqüenciamento do plasmídeo contendo o inserto de interesse foi realizado utilizando-se o *kit DYEnamic ET Dye Terminator* (GE Healthcare). Na reação de seqüenciamento foram utilizados os iniciadores T7 Promoter (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') (Novagen) e T7 Terminator (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3') (Novagen), específicos para o vetor pET-14b. A PCR foi feita com 5 pmol de cada um dos iniciadores, 3,2 µl do *Mix dyenamic et terminator* (GE Healthcare) e aproximadamente 1.200 ng de pET-14b-VP28r, sendo as condições utilizadas as seguintes: 95°C por 1 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 seg, temperatura de ligação dos iniciadores a 55°C por 15 seg e extensão a 60°C por 90 seg. Os produtos foram precipitados com

isopropanol 70% e a leitura das bases foi realizada no seqüenciador *MegaBace 1000 DNA Analysis System* (GE Healthcare).

As seqüências gênicas obtidas foram submetidas a uma avaliação de qualidade pelo programa *Phred* (índice de confiabilidade >20) (EWING et al., 1998) e agrupadas em consenso (*clusters*) através do programa CAP3 (*Sequence Assembly Program*) (HUANG; MADAN, 1999). Após essa análise, as seqüências nucleotídicas e aminoacídicas deduzidas foram confrontadas e analisadas utilizando-se o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), a fim de se encontrar similaridades com seqüências nucleotídicas (BLASTN) e protéicas (BLASTX) de peptídeos da proteína VP28. A tradução e análise das seqüências aminoacídicas deduzidas foram estimadas utilizando-se o programa virtual ExPASy Proteomics (Expert Protein Analysis System: <http://us.expasy.org/tools>).

4.8 Expressão da proteína VP28r em *E. coli BL21(DE3) plysS*

Com a finalidade de expressar a proteína VP28r, bactérias *E. coli BL21(DE3) plysS* eletrocompetentes foram transformadas com o pET-14b-VP28r. Esta cepa bacteriana é a indicada pelo fabricante do pET-14b (Novagen) para ser utilizada na expressão de proteínas cuja seqüência codificante está inserida neste plasmídeo.

Para isso, o plasmídeo pET-14b-VP28r e as células bacterianas foram submetidos ao processo de eletroporação realizado como descrito anteriormente, porém após o choque as bactérias foram plaqueadas em meio ágar LB contendo ampicilina (100 µg/ml). Após a transformação, foi realizado um pré-cultivo de 10 ml de meio LB contendo 100µg/ml de ampicilina e 34 µg/ml de cloranfenicol a partir de uma colônia isolada da placa de LB ágar contendo as colônias bacterianas transformadas. O pré-cultivo foi realizado a 37°C por 15h, em uma incubadora com plataforma de agitação a 140 rpm. Deste pré-cultivo foi transferido 1 ml para tubo de 50 ml contendo 24 ml do mesmo meio. O crescimento bacteriano a 37°C foi verificado por espectrofotometria (*Biophotometer*, Eppendorf) até atingir a fase logarítmica de crescimento correspondente à densidade óptica de aproximadamente 0,5-0,7 no comprimento de onda a 600 nm. Neste momento, foi retirada uma alíquota de aproximadamente 2 ml para verificação da expressão protéica basal.

A indução da expressão foi testada empregando diferentes concentrações de IPTG combinadas com diversas temperaturas e tempos de indução (Tabela 2). Após os testes, o cultivo teve a expressão induzida com a melhor condição que compreende na adição de IPTG em uma concentração final de 1mM sob agitação (120 rpm). Após 4h, duas alíquotas de 2 ml foram retiradas do cultivo, centrifugadas por 10 min a 10.000 xg, a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados bacterianos suspensos em 200 µl de tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 (Tris-HCl) contendo inibidores de proteases (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma). Uma das amostras, mantida no gelo, foi submetida a 5 ciclos de sonicação a 12 Hz por 40 s no sonicador *60 sonic Dismembrator* (Fisher Scientific). Após a sonicação a amostra foi centrifugada a 10.000 xg por 10 min a 4°C, o sobrenadante e o precipitado foram separados em diferentes tubos, sendo o precipitado suspenso em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0.

Tabela 2: Condições de indução de expressão da VP28r

Concentração de IPTG (mM)	Temperatura de indução (°C)	Tempo de indução (horas)
1	37	1, 3, 4 e 5
1	17	1, 3 e 5
1	27	5
0,5	27	5
1	17	16
0,5	17	16

4.9 Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western blotting* do extrato protéico das bactérias contendo plasmídeo recombinante pET-14b-VP28r

O perfil de expressão protéica a partir das alíquotas recolhidas foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida (*Ready Gel System*, Bio-Rad) sob condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE). As amostras analisadas foram misturadas ao tampão de amostra (SDS 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02%, beta-mercaptoetanol 200mM, Tris-HCl 240mM, pH 7) e submetidas a aquecimento a 100°C por 5 min, sendo posteriormente aplicadas no gel. O gel onde as amostras foram aplicadas compreende em um gel de empacotamento na concentração de 5% de poliacrilamida e um gel de separação de 15% de poliacrilamida, sendo a eletroforese feita em presença de tampão de corrida (SDS 0,1%, glicina 190mM, Tris 25mM) numa corrente elétrica de 20 mA por aproximadamente 3h.

As bandas protéicas foram reveladas incubando-se os géis em solução corante contendo *Coomassie Brilliant Blue* R-250 a 0,25% dissolvido em isopropanol 50% e ácido acético 10% v/v em água DEPC. Uma solução contendo ácido acético glacial a 10% e metanol a 45% v/v em água ultrapura foi utilizada para descorar o gel e assim possibilitar a visualização das bandas protéicas.

A outra alíquota colhida do cultivo, que não foi submetida à sonicação, foi utilizada para avaliar a expressão da proteína VP28r através da imunodeteção da cauda de polihistidina presente na proteína recombinante por meio do *Western blotting*. Inicialmente esta amostra foi submetida à eletroforese em SDS-PAGE em condições desnaturantes, nas mesmas condições acima descritas. Após a separação das bandas protéicas no gel foi realizada a transferência para uma membrana de nitrocelulose. A transferência se deu através do sistema *mini trans-blot cell* (Bio-Rad) utilizando tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, água ultrapura q.s.p 2l) durante 15 h a 25 v em banho de gelo dentro da geladeira. Para verificação da transferência a membrana foi corada com vermelho de *Ponceau* 0,5%. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de bloqueio (leite em pó desnatado 5%, PBS-Tween 0,1%) por 1h a temperatura ambiente (TA), em constante agitação. Após 1h, lavou-se a membrana

4x por 5 min com tampão de lavagem (Tris 25 mM, NaCl 0,15M, Tween 0,1%). Em seguida a membrana foi incubada por 90 min à TA com anticorpo anti-polihistidina de camundongo (Sigma) diluído em tampão de lavagem (1:5000). Lavou-se novamente a membrana 4x por 5 min e foi então incubada com anticorpo secundário anti-imunoglobulina de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma), também diluído em tampão de lavagem (1:10000), por 1h e após a incubação a membrana foi lavada 5 x de 5 min com tampão de lavagem.

Para revelação, 500 µl de uma mistura dos reagentes do *kit* ECL (*ECL western blotting*, GE healthcare) foi colocada sobre a membrana, cobrindo toda a superfície da membrana. Após 1min, escoou-se o excesso da mistura e a membrana foi depositada sobre uma placa de vidro dentro do cassete e sobre a membrana foi colocada uma transparência. Neste momento apagou-se a luz, o filme foi cortado na dimensão correspondente a membrana, colocado sobre a transparência, o cassete foi fechado em seguida e aguardou-se 5 min. Decorrido os 5min, o cassete foi aberto, o filme foi retirado com auxílio de uma pinça e mergulhado durante 2min em solução reveladora (KODAK). Em seguida, o filme foi mergulhado no ácido acético por 30s, seguiu para a solução fixadora (KODAK) onde ficou imerso durante 30s e finalmente lavado com água.

4.10 Purificação da VP28r

A proteína VP28r foi purificada da fração insolúvel do precipitado bacteriano, a partir de corpos de inclusão, por metodologia baseada na afinidade por íons metálicos imobilizados. A purificação foi realizada sob condições desnaturantes, empregando tampões com alta concentração de uréia (8M) e pH decrescente (8,0 6,3 e 4,5) (Figura 7).

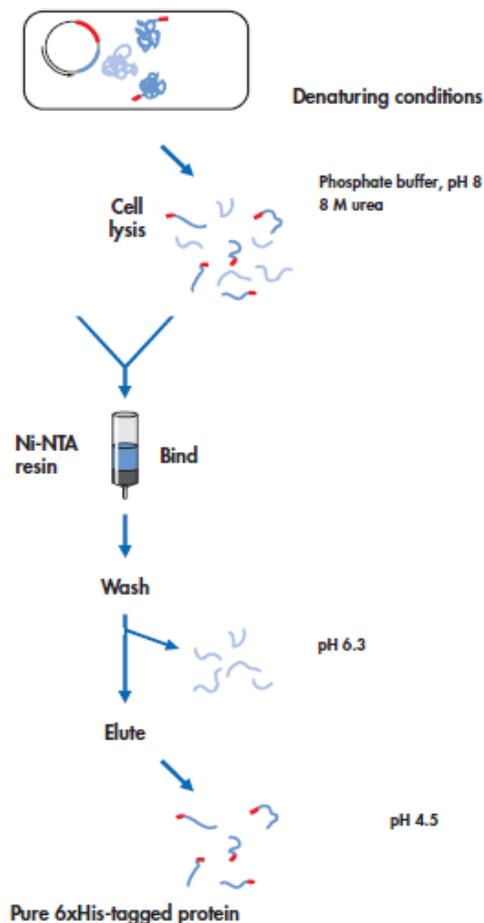


Figura 7: Representação esquemática do processo de purificação da VP28r (Adaptado de QIAGEN, 2003).

Para purificação protéica foi necessário aumentar o volume do cultivo bacteriano. Portanto, 5 ml do pré-cultivo das colônias bacterianas transformadas com o pET-14b-VP28r foram transferidos para um *erlenmeyer* de 500ml contendo 150 ml do meio LB com 100µg/ml de ampicilina e 34 µg/ml de cloranfenicol. O cultivo teve a expressão induzida pela adição de IPTG (concentração final de 1mM), sendo as condições de expressão 37°C por 4h, sob agitação (120 rpm). Ao término das 4h, uma alíquota de 2 ml foi retirada do cultivo, centrifugada por 10 min a 10.000 xg a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano suspenso em 200 µl de tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0. O restante do cultivo foi centrifugado a 6.000 xg por 20 min a 4°C sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado celular suspenso em Tris-HCl 20mM pH 7,4 e novamente centrifugado nas condições

descritas acima. Após esta segunda centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano submetido à purificação descrita a seguir.

Para a purificação da VP28r utilizou-se primeiramente a resina Ni-NTA agarose (QIAGEN). Cerca de 200µl de resina foram equilibrados com 400µl de tampão contendo uréia 8M, NaH₂PO₄ 100mM, Tris-HCl 100mM pH 8,0. As células bacterianas foram ressuspensas neste tampão na proporção de 5ml de tampão/g de precipitado, mantidas sob leve agitação por 1h a 60°C. Decorrido esse tempo, procedeu-se uma centrifugação a 10000 xg por 30 min a 4°C, sendo que o sobrenadante retirado e misturado à resina. A resina em contato com o sobrenadante foi então mantida a 4°C por 1h sob agitação, centrifugada por 3min a 100xg, o sobrenadante passado para novo tubo e a resina submetida a 3 etapas de lavagem por 3 min a 1000xg com 1ml de tampão de lavagem (uréia 8M, NaH₂PO₄ 100mM, Tris-HCl 100mM pH 6,3). Procedeu-se então à etapa de eluição da proteína, na qual a resina foi misturada com 200µl de tampão de eluição (uréia 8M, NaH₂PO₄ 100mM, Tris-HCl 100mM pH 4,5), mantida no gelo por 3 min e em seguida centrifugada por 3min a 1000xg a 4°C, sendo este processo repetido por 3x.

Após esta etapa de purificação, as alíquotas provenientes desta primeira purificação foram submetidas a um segundo protocolo de purificação, utilizando a coluna de purificação NTA *colum* (QIAGEN). Inicialmente a coluna foi equilibrada com 600µl de tampão contendo uréia 8M, NaH₂PO₄ 100mM, Tris-HCl 100mM pH 8,0, sendo centrifugada por 2min a 700xg. Em seguida foi adicionado 600µl das frações eluídas na primeira etapa de purificação na coluna e esta foi centrifugada durante 4min a 700xg. A coluna foi então lavada 3x com 600µl de tampão de lavagem sendo centrifugada por 2min a 700xg. Para finalizar, adicionou-se 200µl de tampão de eluição na coluna e esta foi centrifugada por 2min a 700xg sendo este procedimento efetuado 3x. Em ambos os protocolos de purificação seguiu-se as orientações do fabricante. Durante as etapas do segundo processo de purificação, foram separados pequenos volumes das lavagens e eluições que foram submetidas a análises por SDS-PAGE.

As eluições provenientes da última purificação foram submetidas à diálise para eliminação da uréia presente nas amostras purificadas, utilizando uma membrana de celulose (MW 5.3 kDa, SIGMA) colocada entre as eluições e o tampão

de diálise contendo NaCl 500 mM, EDTA 0,5 mM, glicerol 20-40% , DTT 5 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,5. As amostras foram dialisadas por 48h sob agitação a 4°C, sendo o tampão de diálise trocado a cada 16h. Após a diálise, a determinação da concentração protéica foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (1976).

5. RESULTADOS

5.1 Amplificação da seqüência codificadora da proteína VP28r

A porção do gene que codifica a região hidrofílica da proteína foi amplificada por PCR a partir de DNA total extraído do tecido de camarões infectados naturalmente com WSSV. A temperatura ideal de anelamento dos iniciadores foi de 60°C e a amplificação da região de interesse produziu um fragmento de aproximadamente 558 pb, condizente com o tamanho esperado (Figura 8).

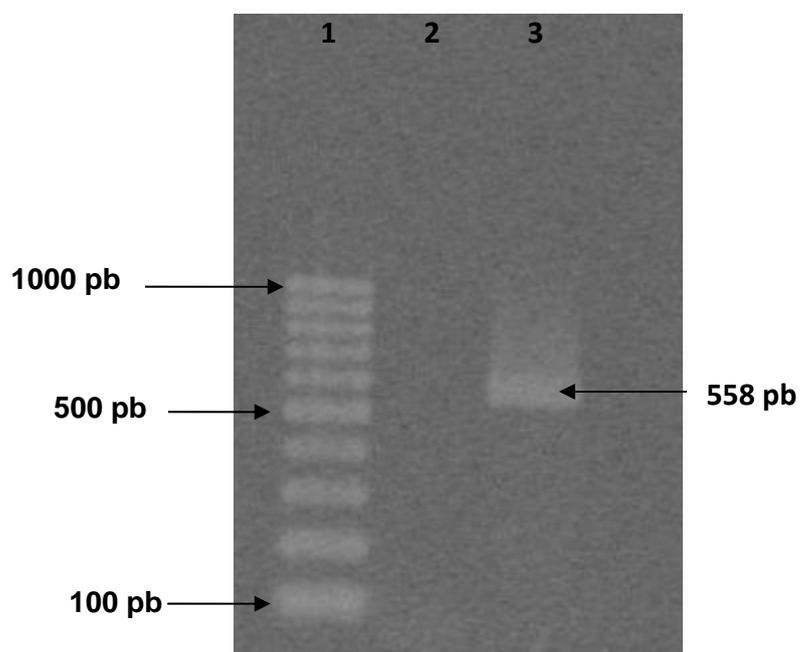


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídeo, demonstrando a amplificação do fragmento de interesse (558 pb) pela PCR, a partir do DNA total extraído de camarões infectados com WSSV. 1: padrão de peso molecular (Genruler 100 pb DNA ladder) 2: controle negativo (reação de PCR realizada na ausência de DNA); 3: amplificação da porção do gene de VP28.

5.2 Clonagem, expressão e purificação da VP28r

5.2.1 Clonagem da região codificadora da porção hidrofílica da proteína

VP28r

O produto de PCR obtido (558 pb) foi clonado primeiramente no vetor pGEM-Teasy (Promega). O produto da ligação, denominado pGEM-Teasy-VP28r, foi utilizado na transformação de bactérias *E. coli DH5 α* , resultando em diversas colônias bacterianas contendo o plasmídeo. O plasmídeo pGEM-Teasy-VP28r foi extraído das bactérias transformadas e submetido as reações enzimáticas de clivagem, resultando na liberação do fragmento correspondente a sequência codificadora da VP28r. A sequência codificadora da porção hidrofílica da VP28 liberada do pGEM-Teasy foi purificada e então submetida à reação de ligação com o vetor de expressão pET-14b (Novagen). A reação de ligação resultou no plasmídeo pET-14b-VP28r que foi empregado tanto nas etapas de seqüenciamento quanto na de expressão da proteína recombinante.

5.2.2 Seqüenciamento da região codificadora da porção hidrofílica da proteína

VP28r

Para a reação de seqüenciamento, primeiramente procedeu-se a transformação de bactérias *E. coli DH5 α* com o pET-14b-VP28r. Das colônias bacterianas resultantes do processo de transformação foi extraído DNA plasmidial e este DNA foi empregado na reação de seqüenciamento. O seqüenciamento do pET-14b-VP28r foi realizado utilizando-se o *kit DYEnamic ET Dye Terminator* (GE Healthcare) no seqüenciador *MegaBace 1000 DNA Analysis System* (GE Healthcare).

A seqüência nucleotídica gerada na reação de seqüenciamento do fragmento de DNA codificante para a porção hidrofílica da proteína (VP28r) inserido no plasmídeo pET14-b foi confrontada com a seqüência correspondente à proteína VP28 disponível no GenBank (acesso n°. DQ681069) e observou-se a totalidade de similaridade entre as bases (Figura 9).

```

VP28-GB ATGGATCTTTCTTTCACTCTTTTCGGTCGTGTCGGCCATCCTCGCCATCACTGCTGTGATT 60

VP28-GB GCTGTATTTATTGTGATTTTTAGGTATCACAACTGTGACCAAGACCATCGAAACCCAC 120
VP28-seq TCACAAACTGTGACCAAGACCATCGAAACCCAC
*****

VP28-GB ACAGACAATATCGAGACAAACATGGATGAAAACCTCCGCATTCTGTGACTGCTGAGGTT 180
VP-28seq ACAGACAATATCGAGACAAACATGGATGAAAACCTCCGCATTCTGTGACTGCTGAGGTT
*****

VP28-GB GGATCAGGCTACTTCAAGATGACTGATGTGTCCTTTGACAGCGACACCTTGGGCAAATC 240
VP28-seq GGATCAGGCTACTTCAAGATGACTGATGTGTCCTTTGACAGCGACACCTTGGGCAAATC
*****

VP28-GB AAGATCCGCAATGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAGGAAGAAGATGCGGATCTTGCATC 300
VP28-seq AAGATCCGCAATGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAGGAAGAAGATGCGGATCTTGCATC
*****

VP28-GB ACTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAGTGACTGTGGGGCAGAATCTCACCTTTGAGGGA 360
VP28-seq ACTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAGTGACTGTGGGGCAGAATCTCACCTTTGAGGGA
*****

VP28-GB ACATTCAAGGTGTGGAACAACACATCAAGAAAGATCAACATCACTGGTATGCAGATGGTG 420
VP28-seq ACATTCAAGGTGTGGAACAACACATCAAGAAAGATCAACATCACTGGTATGCAGATGGTG
*****

VP28-GB CCAAAGATTAACCCATCAAAGGCCTTTGTCGGTAGCTCCAACACCTCCTCCTCACCCCC 480
VP28-seq CCAAAGATTAACCCATCAAAGGCCTTTGTCGGTAGCTCCAACACCTCCTCCTCACCCCC
*****

VP28-GB GTCTCTATTGATGAGGATGAAGTTGGCACCTTTGTGTGTGGTACCACCTTTGGCGCACCA 540
VP28-seq GTCTCTATTGATGAGGATGAAGTTGGCACCTTTGTGTGTGGTACCACCTTTGGCGCACCA
*****

VP28-GB ATTGCAGCTACCGCCGGTGAAATCTTTTCGACATGTACGTGCACGTCACCTACTCTGGC 600
VP28-seq ATTGCAGCTACCGCCGGTGAAATCTTTTCGACATGTACGTGCACGTCACCTACTCTGGC
*****

VP28-GB ACTGAGACCGAGTAA 615
VP28-seq ACTGAGACCGAGTAA
*****

```

Figura 9: Seqüência de nucleotídeos codificante para a região hidrofílica da proteína VP28 presente no plasmídeo pET-14b-VP28r, determinada através do seqüenciamento de DNA. VP28-seq: seqüência gerada pela reação de seqüenciamento das bases codificantes da VP28r; VP28-GB: seqüência de nucleotídeos disponível no GenBank. O asterisco (*) indica regiões de similaridade de bases nucleotídicas. A região da VP28-GB sem comparação indica a porção codificante da região hidrofóbica transmembrana N-terminal.

As seqüências aminoacídicas também foram comparadas. A seqüência aminoacídica da VP28r foi deduzida através do programa ExPASy Proteomics à partir da seqüência de nucleotídeos geradas no seqüenciamento e esta foi confrontada com a seqüência aminoacídica da VP28 disponível no GenBank (acesso n°. DQ681069) (Figura 10). A comparação destas seqüências aminoacídicas demonstrou 100% de similaridade entre elas.



Figura 10: Seqüência de aminoácidos deduzida da proteína recombinante VP28r comparada com a seqüência da VP28 disponível no GenBank. VP28-Seq: seqüência aminoacídica deduzida a partir do resultado do seqüenciamento; VP28-GB: seqüência aminoacídica disponível no GenBank (acesso n°. DQ681069). O asterisco (*) indica os locais de similaridade entre as seqüências, a região destacada em cinza indica os aminoácidos presentes na proteína recombinante excluindo-se a porção do pET-14b e as letras em vermelho correspondem à cauda de histidinas na região N-terminal.

5.2.3 Expressão da VP28r

Para expressão da proteína VP28r, bactérias *E. coli* BL21(DE3) *plysS* foram transformadas, inserindo-se o pET-14b-VP28r. A indução da expressão da VP28r foi testada em diferentes condições com a finalidade de encontrar a condição de expressão em que grande quantidade de proteína fosse expressa e de preferência na fração solúvel, sem formar corpos de inclusão encontrados na fração insolúvel, uma vez que é mais recomendado purificar a proteína quando esta se encontra na fração solúvel pelo fato de não requerer condições desnaturantes. Apesar das diferentes condições testadas não foi possível expressar a proteína em quantidade abundante na fração solúvel, sendo que a melhor condição de indução de expressão obtida foi quando se utilizou 1mM de IPTG, a 37°C, durante 4 h sob agitação. Nestas condições foi possível visualizar, no gel de poliacrilamida a 15%, uma banda mais intensa na altura de aproximadamente 20 KDa correspondendo ao tamanho esperado da VP28r. Com a sonicação obteve-se duas frações: uma solúvel e outra insolúvel. A análise destas frações revelou que a totalidade da proteína encontrava-se na fração insolúvel (Figura 11).

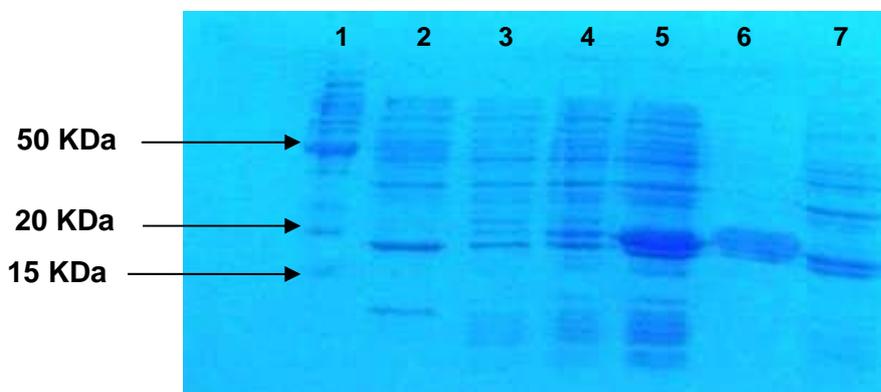


Figura 11: Análise da indução de expressão da VP28r em SDS-PAGE 15%, mostrando o tamanho de aproximadamente 20 KDa bem como sua maior concentração na fração insolúvel. 1: padrão de peso molecular; 2: extrato de *E. coli* BL21(DE3) *plysS*; 3: extrato de *E. coli* BL21(DE3) *plysS* contendo o pET-14b; 4: extrato de *E. coli* BL21(DE3) *plysS* contendo o pET-14b-VP28r sem indução; 5: extrato de *E. coli* BL21(DE3) *plysS* contendo o pET-14b-VP28r após a indução da expressão; 6: Fração insolúvel; 7: Fração solúvel .

Antes de iniciar a etapa de purificação, foi necessário confirmar se a proteína presente em maior quantidade no perfil de expressão das bactérias após a indução com IPTG era realmente a VP28r. Para isso, uma alíquota do precipitado bacteriano obtido após indução da expressão foi submetido à análise por *Western blotting* e como resultado deste teste observou-se uma banda na altura de aproximadamente 20 KDa (Figura 12). Esta banda corresponde a uma proteína que possui na sua composição várias histidinas consecutivas, característica condizente com VP28r que possui uma cauda contendo 6 histidinas na sua composição aminoacídica.

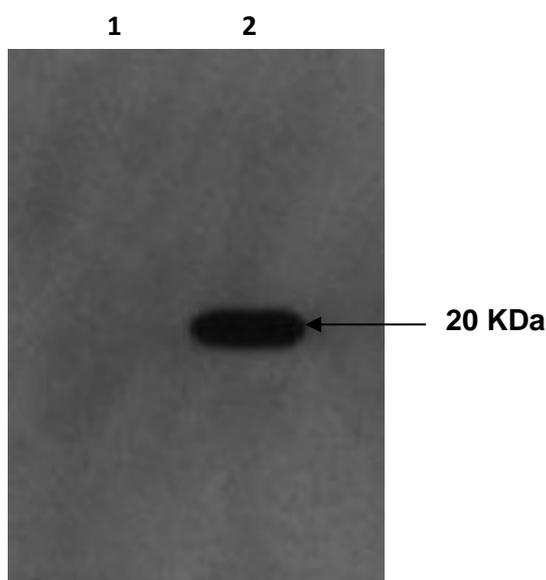


Figura 12: Western blotting demonstrando a presença da VP28r no extrato protéico da *E. coli BL21(DE3) plysS* abrigando pET-14b-VP28r após indução da expressão. 1: precipitado bacteriano não induzido; 2: precipitado bacteriano após indução da expressão.

5.2.4 Purificação da VP28r

A purificação da VP28r foi realizada a partir dos precipitados bacterianos, uma vez que esta se encontra na fração insolúvel. O precipitado bacteriano foi primeiramente submetido a condições desnaturantes para solubilização da proteína encontrada sob a forma de corpos de inclusão. Após a solubilização procedeu-se à purificação, sendo que para obter melhor rendimento do processo realizaram-se duas etapas de purificação. Primeiramente foi utilizada a resina Ni-NTA agarose (QIAGEN) e as eluições provenientes desta primeira purificação foram submetidas a um segundo protocolo utilizando a coluna de purificação NTA (QIAGEN). Isto

permitiu que grande parte da proteína estivesse presente nas eluições, restando pouca quantidade nas lavagens, garantindo que nas eluições fosse encontrada maior quantidade de proteína recombinante sem a presença das demais proteínas bacterianas (Figura 13).

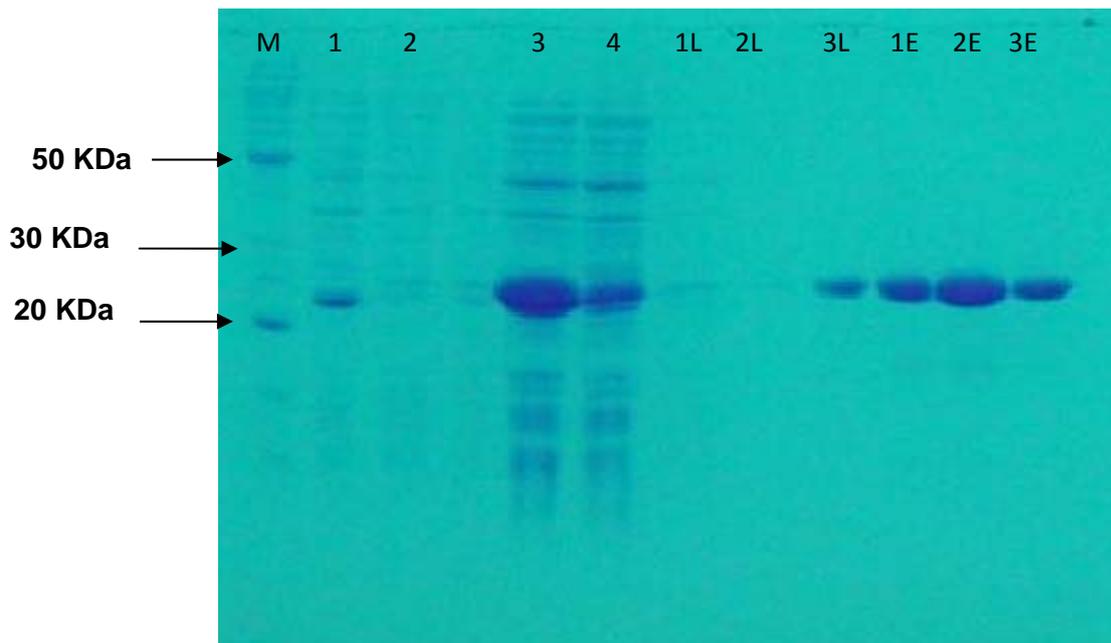


Figura 13: Perfil eletroforético do lisado bacteriano e fases da segunda purificação protéica da VP28r. M: marcador de peso molecular; 1: extrato de *E. coli* BL21(DE3) *plysS* contendo pET-14b; 2: extrato de *E. coli* BL21(DE3) *plysS* contendo pET-14b-VP28r sem indução; 3: extrato de *E. coli* BL21(DE3) *plysS* contendo pET-14b-VP28r após a indução da expressão; 4: lisado celular; 1L: primeira lavagem; 2L: segunda lavagem; 3L: terceira lavagem; 1E: primeira eluição; 2E: segunda eluição; 3E: terceira eluição.

A concentração protéica das eluições provenientes das purificações após a diálise foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976). Obteve-se concentrações finais de VP28r variando de 128 a 241 $\mu\text{g/ml}$.

6. DISCUSSÃO

O WSSV é um vírus que infecta inúmeros crustáceos, mas os camarões peneídeos são altamente suscetíveis a este vírus, sendo que os níveis de mortalidade chegam a 100% dentre 3 a 10 dias após a infecção (LIU et al., 2002). A infecção severa pelo WSSV tem como principal sinal clínico o aparecimento de manchas brancas visíveis a olho nu na parte dorsal do rostrum dos camarões (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008). Este vírus dissemina-se rapidamente causando prejuízos aos criadores. O primeiro aparecimento do WSSV foi em Taiwan, no início dos anos 90 (CHOU et al., 1995) e a partir deste local o vírus propagou-se pelo mundo chegando no Brasil no final de 2004, quando o WSSV foi detectado nas fazendas de cultivo de camarões do estado de Santa Catarina (APHIS-USDA, 2005). A enfermidade da síndrome da mancha branca que acomete os camarões cultivados e também selvagens possui grande importância econômica, pois quando um cultivo é acometido pelo WSSV a mortalidade é muito grande, gerando enormes perdas financeiras aos criadores.

Métodos de detecção do WSSV são importantes, pois possibilitam aos criadores detectar a presença do vírus no cultivo e assim tomar as providências de contenção da disseminação viral para impedir as perdas econômicas. As proteínas estruturais do WSSV, principalmente as proteínas presentes no envelope, como a VP28, são utilizadas como imunógenos na obtenção de anticorpos poli e monoclonais, que podem então ser empregados na confecção de vários testes de detecção deste vírus. Muitas vezes estas proteínas são obtidas empregando-se a tecnologia de síntese protéica em sistemas recombinantes, uma vez que esta técnica permite que somente a parte desejável da proteína seja sintetizada, além de fornecer grande quantidade de proteína funcional. A expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* é o método mais utilizado para obtenção de grandes quantidades de proteínas com baixo custo, sendo que as proteínas obtidas com esta tecnologia são amplamente utilizadas em pesquisas na área de biotecnologia e na indústria farmacêutica (SCHMIDT, 2004).

Através do uso desta ferramenta biotecnológica, produção de proteínas recombinantes em *E. coli*, Liu et al. (2002) e Sithigorngul et al. (2006) desenvolveram trabalhos nos quais a proteína VP28 é expressa por cepas de *E. coli* e a proteína recombinante resultante é aplicada em testes de detecção do WSSV.

No trabalho de Liu et al. (2002), a VP28 recombinante é utilizada na produção de anticorpos monoclonais que são posteriormente empregados no desenvolvimento de um teste de ELISA do tipo captura, que se mostrou bastante sensível na detecção do WSSV presente tanto em tecidos quanto na hemolinfa de camarões. Já Sithigorngul et al. (2006) empregaram a proteína recombinante na obtenção de anticorpos policlonais que foram utilizados no desenvolvimento de um teste imunocromatográfico bastante prático que pode ser facilmente utilizado nas fazendas de cultivo.

Uma vez que a VP28 destaca-se como a proteína de escolha para a produção de anticorpos empregados nos testes de detecção do WSSV, pois é a proteína mais abundante no envelope viral, o presente estudo visou à expressão e purificação de um fragmento hidrofílico da VP28 para que no futuro este fragmento recombinante possa ser utilizado na produção de anticorpos monoclonais que potencialmente serão empregados na confecção de um teste imunocromatográfico. Este teste imunocromatográfico é um teste de baixo custo, rápido e poderá ser aplicado pelos próprios carcinicultores nos cultivos de camarões para detecção do WSSV.

No presente estudo, para se obter a proteína recombinante, VP28r, inicialmente foi feito um estudo da seqüência gênica codificante para a VP28 e desta análise decidiu-se amplificar somente uma parte da proteína, excluindo-se a região responsável pela porção transmembrana. A região transmembrânica é hidrofóbica, influenciando na solubilidade protéica e dificultando sua expressão em sistemas recombinantes (TANG et al., 2007; XIE; XU; YANG, 2006). A exclusão da região N-terminal hidrofóbica da VP28 também foi realizada por Witteveldt *et al.* (2004) quando produziu uma proteína recombinante com intuito de utilizar a VP28 no desenvolvimento de uma vacina oral administrada aos camarões.

Porém, mesmo com a exclusão desta porção transmembrana, a proteína mantém algumas de suas características como a antigenicidade. Almejando amplificar a região hidrofílica da seqüência codificadora da VP28, iniciadores foram desenhados com auxílio de um programa de bioinformática e sintetizados. A reação de PCR foi feita utilizando-se DNA extraído de camarões naturalmente infectados pelo WSSV e foi possível amplificar um fragmento de aproximadamente 558 pb, condizente com o tamanho esperado para a porção da seqüência nucleotídica codificadora da porção hidrofílica da VP28. A amplificação de um fragmento codificante da VP28 também foi realizada no estudo feito por Chaivisuthangkura *et*

al. (2004). Porém, tais autores optaram por amplificar a região codificadora da VP28 a partir de 118 nucleotídeos após o códon de iniciação (ATG), gerando um fragmento de 516 pb que foi utilizado na construção de um vetor de expressão visando a indução da expressão protéica.

Neste estudo, o fragmento codificante para a VP28r, obtido através da reação de PCR, foi clonado no vetor pGEM-Teasy e posteriormente subclonado no vetor de expressão pET-14b. O plasmídeo recombinante pET-14b-VP28r foi seqüenciado e confirmou-se a inserção correta da sequência codificante para a parte hidrofílica da proteína VP28. Além desta informação, com o resultado do seqüenciamento foi possível constatar a identidade entre a sequência nucleotídica disponível no GenBank (acesso DQ681069) e a sequência de nucleotídeos obtida na reação de seqüenciamento. Quando analisado somente os nucleotídeos codificadores da VP28r, excluindo-se as bases responsáveis pela região transmembrana hidrofóbica, observou-se a similaridade total entre as bases. Esta observação foi importante, uma vez que cepas virais de diferentes origens podem apresentar diferenças na sua composição genética (MARKS *et al.*, 2004). No presente trabalho não foi constatada diferenças de bases nucleotídicas entre a sequência de nucleotídeos disponível no GenBank, que é proveniente de vírus isolado na Índia, e a sequência de nucleotídeos geradas no seqüenciamento que é proveniente do material genético de WSSV extraído de camarão naturalmente infectado e coletado em cultivos no sul do Brasil. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos por Garza *et al.* (2008) e Seok *et al.* (2004), onde o seqüenciamento da região codificante para a VP28 de vírus isolados no México e na Coréia, respectivamente, não demonstrou diferença com as seqüências nucleotídicas disponíveis no GenBank para a VP28 de vírus isolados de diversos países. Devido à homologia total entre as bases nucleotídicas, as composições aminoacídicas também revelaram 100% de identidade como pode ser visto no alinhamento das seqüências de aminoácidos.

A expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* pode freqüentemente promover a formação de agregados insolúveis da proteína, denominados corpos de inclusão (VALLEJO; RINAS, 2004). A formação dos corpos de inclusão depende de uma série de fatores como a natureza da proteína, a taxa de expressão protéica, a composição e o pH do meio de cultivo e a localização celular da proteína expressa (HOCKNEY, 1994; MARCO *et al.*, 2005). Bactérias da cepa *E. coli* BL21(DE3)*plysS* possuem no seu genoma um sistema sujeito a regulação denominado *operon lac*.

Quando uma substância indutora análoga da lactose, como o IPTG, é adicionado ao meio de cultivo, este composto liga-se ao repressor que então não pode mais se ligar ao DNA no sítio operador, resultando na expressão gênica constitutiva da T7 RNA polimerase. O pET-14b por sua vez, também possui o sistema *operon lac* e na presença do IPTG o repressor não consegue ligar-se ao operador, permitindo assim a ação da enzima T7 RNA polimerase na região promotora do *operon*, resultando na expressão do gene exógeno inserido no vetor (Figura 14). Pelo fato de o IPTG agir em 2 *operons* distintos espera-se que a expressão de proteínas heterólogas neste sistema seja altamente regulada (NOVAGEN, 2006; ZAHA et al., 2003). Esta cepa bacteriana também possui na sua constituição genômica o plasmídeo pLysS que proporciona baixos níveis intracelulares de T7 lisozima, um inibidor da T7 RNA polimerase (NOVAGEN, 2006).

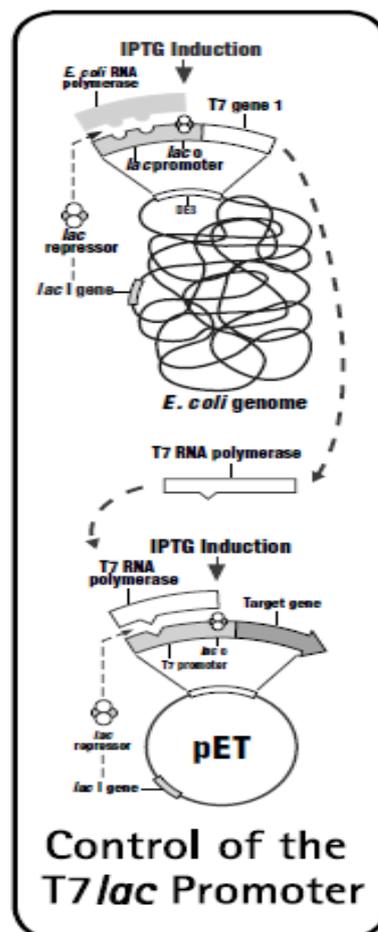


Figura 14: Representação esquemática da regulação da expressão proteica em um sistema recombinante contendo pET (Fonte: Novagen, 2006).

No presente estudo a indução da expressão da VP28r com IPTG em bactérias *E. coli BL21(DE3)plysS* gerou uma quantidade significativa de proteína recombinante. Quando ocorre alto nível de expressão protéica, a proteína tende a formar corpos de inclusão que ficam depositados na fração insolúvel, podendo haver também proteína na fração solúvel. A análise por SDS-PAGE das frações provenientes da sonicação do precipitado bacteriano revelou que a totalidade da VP28r estava na fração insolúvel. Mesmo quando foram testadas diferentes temperaturas e concentrações de IPTG na indução da expressão, com intuito de obter proteína na fase solúvel, não se obteve quantidades significativas de VP28r solúvel.

A análise por SDS-PAGE do perfil protéico do lisado da bactéria *E. coli BL21(DE3)plysS* após a indução da expressão demonstrou a presença de uma banda bem evidente na altura de aproximadamente 20 kDa. Este resultado difere da maioria dos resultados obtidos por outros autores que obtiveram a VP28 recombinante de aproximadamente 28 KDa, uma vez que nesses estudos utilizaram todo o gene da proteína no desenvolvimento do sistema de expressão (LIU et al., 2002; YOGANANDHAN et al., 2004; ZHANG et al., 2002).

Enquanto que no presente estudo, para confirmar que a banda proeminente na altura de 20 KDa após a indução da expressão correspondia a VP28r foi realizado um ensaio de *Western blotting* no qual foi utilizado um anticorpo anti-histidina. O resultado deste procedimento assegurou que a banda mais intensa na altura de 20 KDa, visualizada após a indução da expressão, corresponde a uma proteína que contém polihistidina na sua composição, característica condizente com a VP28r que apresenta cauda de histidinas conferida pelo vetor pET-14b. Este tipo de análise por *Western blotting* utilizando anticorpo anti-histidina também foi empregado por Yoganandhan e colaboradores (2004) para confirmar a expressão de VP28 recombinante fusionada à cauda de histidinas no trabalho que utiliza a VP28 recombinante na obtenção de antisoro policlonal.

A histidina possui afinidade por íons metálicos e a presença de seis histidinas na região N-terminal da proteína recombinante possibilitou sua purificação baseada na afinidade por íons metálicos imobilizados na resina ou na coluna. Este método, em que íons metálicos como Zn^{+2} , Cu^{+2} ou Ni^{+2} são imobilizados a uma matriz, é utilizado para purificação de uma imensa variedade de proteínas e peptídeos

contendo cauda de histidinas e também simplifica o processo de purificação (SULKOWSKI, 1985). No presente estudo a purificação foi realizada sob condições desnaturantes, ou seja, utilizando tampão com alta concentração de uréia para solubilizar a proteína que estava seqüestrada em corpos de inclusão e assim permitir sua purificação. A solubilização da proteína expõe totalmente a cauda de histidina, favorecendo sua ligação com o íon metálico e conseqüentemente aumentando a eficiência da purificação (NOVAGEN, 2006; QIAGEN, 2003). Para eluir a proteína, liberando-a da matriz, foi empregado um gradiente de pH sob condições desnaturantes uma vez que a histidina possui pKa de aproximadamente 6,0 e torna-se protonada quando o pH é reduzido, com isso ocorre sua liberação do íon metálico (QIAGEN, 2003).

Visando otimizar a purificação da VP28r, os precipitados bacterianos após a indução da expressão foram submetidos a 2 protocolos consecutivos de purificação. A utilização de 2 processos subsequentes de purificação reduziu a quantidade de proteína que fica retida nas lavagens, bem como garantiu preparações mais puras de VP28r. Na maioria dos trabalhos publicados que descrevem a expressão de VP28 em *E. coli*, a proteína recombinante foi purificada sob condições desnaturantes utilizando-se soluções contendo uréia, o que indica a presença desta proteína na fração insolúvel. Em alguns trabalhos a purificação da proteína ocorreu a partir do gel de poliacrilamida (CHAVISUTHANGKURA et al., 2004; ZHANG et al., 2002) e em outros por meio da afinidade entre o metal e a histidina presente na proteína recombinante sintetizada (LIU et al., 2002; ROBALINO et al., 2006; YOGANANDHAN et al., 2004).

As proteínas purificadas em condições desnaturantes podem ser utilizadas diretamente ou, para fins específicos, serem renaturadas e sofrerem o enovelamento para assumirem suas estruturas conformacionais nativas. A renaturação da proteína purificada pode ser realizada na própria coluna antes da eluição com a proteína ainda imobilizada ou em solução de diálise. A cauda de histidina não necessita ser removida da proteína para que esta seja utilizada na imunização, uma vez que a histidina é pouco imunogênica (QIAGEN, 2003). As alíquotas contendo VP28r provenientes das eluições, após sofrerem o processo de diálise que garante a eliminação da uréia, além de proporcionar certo enovelamento e renaturação da proteína, tiveram suas concentrações protéicas determinadas pelo método de Bradford (1976). Foi obtido um rendimento protéico final variando de 128 a 241

$\mu\text{g/ml}$ após todo processo de purificação e diálise. O rendimento obtido na purificação de proteínas ligadas a cauda de histidinas a partir de corpos de inclusão, geralmente é maior quando comparado à purificação em condições nativas, pois durante o processo de desnaturação as histidinas são completamente expostas facilitando a ligação aos íons metálicos possibilitando assim uma maior recuperação da proteína de interesse.

O rendimento protéico de VP28r obtido empregando-se as técnicas de expressão e purificação desenvolvidas no presente estudo justifica a aplicação destas técnicas na obtenção de VP28r para posterior utilização na imunização de camundongos com a finalidade de produzir anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais anti-VP28 poderão ser utilizados então no desenvolvimento futuro de um teste imunocromatográfico. Este teste desenvolvido no Brasil possuirá baixo custo e poderá ser utilizados pelos próprios carcinicultores na fazenda de criação de camarões, permitindo um diagnóstico simples, rápido, barato e acurado.

7. CONCLUSÕES

O fragmento hidrofílico da proteína VP28, a partir do nucleotídeo 87 até o final da seqüência codificante, foi amplificado à partir de DNA total extraído do tecido de camarões infectados naturalmente com WSSV.

O fragmento amplificado por PCR foi clonado nos vetores pGEM-Teasy e posteriormente no pET-14b.

O seqüenciamento demonstrou a identidade total das bases nucleotídicas entre o fragmento hidrofílico da VP28 inserido no pET-14b e a seqüência disponível no GenBank (acesso DQ681069).

O seqüenciamento também confirmou a inserção correta da seqüência codificadora no vetor de expressão pET-14b.

A proteína recombinante, denominada VP28r, foi expressa em *E. coli* BL21(DE3) *plysS*, sendo visualizada uma banda de forte intensidade na região de 21 KDa na fração insolúvel na análise por SDS-PAGE.

A proteína recombinante foi solubilizada a partir dos corpos de inclusão e purificada através de cromatografia por afinidade com íons metálicos.

Análise por *Western blotting* do extrato bacteriano após indução da expressão confirmou a expressão da VP28r fusionada à cauda de histidinas.

A concentração final de VP28r foi determinada pelo método de Bradford (1976) e obteve-se rendimento protéico variando de 128 a 241 µg/ml.

8. PERSPECTIVAS

- ✓ Utilizar a proteína VP28r na obtenção de anticorpos monoclonais.
- ✓ Empregar os anticorpos monoclonais anti-VP28r no desenvolvimento e padronização de um teste imunológico como o teste imunocromatográfico que detecte a presença do WSSV em amostras de camarões.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, T. P. D.; SRISUVAN, T.; TANG, K. F.J.; LIGHTNER, D.V. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using Taq Man probe for detection and quantification of Infectious myonecrosis virus (IMNV). **Aquaculture**, v.264, p.9-15, 2007.

ANIL, T. M.; SHANKAR, K. M.; MOHAN, C.V. Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.51, p.67-75, 2002.

APHIS-USDA. Impact worksheet white spot disease in Brazil. **Aphis-Udda**, Natural Resources Research, 2005. Disponível em:<
http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cei/taf/iw_2005_files/foreign/whitespot_brazil_012705_files/WhitespotdiseaseBrazil012105.htm>. Acesso em: abril de 2009.

BELL, T. A.; LIGHTNER, D.V. A handbook of normal penaeid shrimp histology. **World Aquaculture Society**, special publication, n.1, 1988.

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

CHAVISUTHANGKURA, P.; TANGKHABUANBUTRA, J.; LONGYANT, S.; SITHIGORNGUL, W.; RUKPRATANPORN, S.; MENASVETA, P.; SITHIGORNGUL, P. Monoclonal antibodies against a truncated viral envelope protein (VP28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infections in shrimp. **Science Asia**, v. 30, p. 359-363, 2004.

CHEN, Z. J.; WANG, C. S.; SHIH, H.H. An assay for quantification of white spot syndrome virus using a capture ELISA. **Journal of Fish Diseases**, v.25, p.249-251, 2002.

CHOU, H. Y.; HUANG, C. Y.; WANG, C. H.; CHLANG, H. C.; LO, C. F. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.23, p.165-173, 1995.

DURAND, S.; LIGHTNER, D. V.; NUNAN, L. M.; REDMAN, R. M.; MARI, J.; BONAMI, J.R. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.27, p.59-66, 1996.

DURAND, S.; LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M.; BONAMI, J. R. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v.29, p.205-211, 1997.

DURAND, S.; LIGHTNER, D. V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. **Journal of Fish Diseases**, v.25, n.7, p.381-389, 2002.

ESCOBEDO-BONILLA, E. C. M.; SANZ, A. V.; WILLE, M.; SORGELOOS, P.; PENSAERT, M. B.; NAUWYNCK, H.J. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v.31, p.1-18, 2008.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture. **FAO**, pp.176, 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/011/i0250e/i0250e00.HTM>>. Acesso em: abril de 2009.

FAO. Introductions and movement of two penaeid shrimp species in Asia and the Pacific. **FAO Fisheries Technical Paper**, n.476, pp.99, 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/009/a0086e/A0086E07.htm>>. Acesso em: junho de 2007.

FAO. State of world aquaculture. **FAO Fisheries Technical Paper**, N.500, pp.147, 2006. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/009/a0874e/a0874e00.htm>>. Acesso em: junho de 2007.

FLEGEL, T. W. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.13, p.433-442, 1997.

GARZA, M. Z. J.; SILVA, G. L.; ENCINAS, R. J. L.; GONZÁLEZ, A. J. M. Nucleotide sequence variations of the major structural proteins (VP15, VP19, VP26 and VP28) of White spot syndrome virus (WSSV), a pathogen of cultured *Litopenaeus vannamei* in Mexico. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, p. 197-203, 2008.

GUOHUA, Y.; WANG, Z.; QI, Y.; YAO, L.; QIAN, J.; HU, L. Vp28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.37, n.6, p.726-734, 2004.

HOCKNEY, R. C. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. **Trends Biotechnology**, v.12, p. 456-463, 1994.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research.**, 9(9):868-77. 1999.

ICTVdB. The Universal virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTVdB Management, 2006. 00.103.0.01.001. White spot syndrome virus 1. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm>>. Acesso em: julho de 2007.

LIGHTNER, D. V. The penaeid shrimp viral pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV and YHV. History in the Americas and current status. **Aquaculture Panel Meeting**, p.6-24, 2003.

LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, v.164, p.201–220, 1998.

LIU, W.; WANG, Y. T.; TIAN, D. S.; YIN, Z. C.; KWANG, J. Detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp by means of monoclonal antibodies (MAbs) specific to an envelope protein (28 kDa). **Diseases of Aquatic Organisms**, v.49, p.11-18, 2002.

LIU, B.; YU, Z.; SONG, X.; GUAN, Y. Studies on the transmission of WSSV (white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.95, p.87-92, 2007.

LO, C. F.; HO, C. H.; PENG, S. E.; CHEN, C. H.; HSU, H. C.; CHIU, Y. L.; CHANG, C. F.; LIU, K. F.; SU, M. S.; WANG C.H.; KOU, G. H. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.27, p. 215-225, 1996a.

LO, C. F., LEU, J. H.; HO, C. H.; CHEN, C. H.; PENG, S. E.; CHEN, Y. T.; YEH, P. Y.; HUANG, C. J.; WANG, C. H.; KOU, G. H. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSSV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.25, p. 133-141, 1996b.

MARCO, A.; VIGH, L.; DIAMANT, S.; GOLOUBINOFF, P. Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in *Escherichia coli* by osmolytes, plasmid or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones. **Cell Stress & Chaperones**, v.10, p.329, 2005.

MARKS, H.; GOLDBACH, R. W.; VLAK, J. M.; VAN HULTEN, M. C. W. Genetic variation among isolates of white spot syndrome virus. **Archives of Virology**, v.149, p.673-697, 2004.

NOVAGEN. **pET system manual**. v.11. ed. 2006.

NUNAN, L. M.; LIGHTNER, D. V. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). **Journal of Virological Methods**, v.63, p.193-201, 1997.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda parte I e II. Panorama da aquicultura, 2002. **Instituto de Ciências do Mar/Universidade Federal do Ceará**. Disponível em: <<http://www.aqualider.com.br/article.php?recid=91&hl=wssv>>. Acesso em: junho de 2007.

NUNES, A. J. P.; SURESH, A. V. Marine shrimp farming in northeastern Brazil. **World Aquaculture**, p.32-66, 2001.

OKUMURA, T.; FUMIKO, N.; YAMAMOTO, S.; YAMANO, K.; OSEKO, N.; INOUE, K.; OOMURA, H.; SAWADA, H. Detection of white spot syndrome virus from stomach tissue homogenate of the Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*) by reverse passive latex agglutination. **Journal of Virological Methods**, v.119, p.11-16, 2004.

OKUMURA, T.; NAGAI, F.; YAMAMOTO, S.; OOMURA, H.; INOUE, K.; ITO, M.; SAWADA, H. Detection of white spot syndrome virus (WSSV) from hemolymph of penaeid shrimps *Penaeus japonicus* by reverse passive latex agglutination assay using high-density latex particles. **Journal of Virological Methods**, v.124, p. 143-148, 2005.

PANTOJA, C. R.; LIGHTNER, D. V. Similarity between the histopathology of white spot syndrome virus and yellow head syndrome virus and its relevance to diagnosis of YHV disease in the Americas. **Aquaculture**, v.218, p.47-54, 2003.

POULOS, B. T.; PANTOJA, C. R.; BRADLEY-DUNLOP, D.; AGUILAR, J.; LIGHTNER, D.V. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.47, p.13-23, 2001.

POWELL, J. W. B.; BURGE, E. J.; BROWDY, C. L.; SHEPARD, E. F. Efficiency and sensitivity determination of Shrimple®, an immunochromatographic assay for white spot syndrome virus (WSSV), using quantitative real-time PCR. **Aquaculture**, v.257, p.167-172, 2006.

QUANG, D. N.; HOA, P. T. P.; DA, T. T.; ANH, P.H. Persistence of White spot syndrome virus in shrimp ponds and surrounding areas after an outbreak. **Environ Monit Assess**, v.10.1007, p.1-4, 2008.

QIAGEN. The QIAexpressionist. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged protein. 5. ed. 2003.

RAJENDRAN, K. V.; VIJAYAN, K. K.; SANTIAGO, T.C.; RAJAN, J. J. S. White spot syndrome virus (WSSV) infection in tiger shrimp *Penaeus monodon*: A non-lethal histopathological rapid diagnostic method using paraffin and frozen sections. **Aquaculture International**, v.13, n.4, p.341-349, 2005.

ROBALINO, J.; PAYNE, C.; PARNELL, P.; SHEPARD, E.; GRIMES, A. C.; METZ, A.; PRIOR, S.; WITTEVELDT, J.; VLAK, J. M.; GROSS, P. S.; WARR, G.; BROWDY, C. L. Inactivation of white spot syndrome virus (WSSV) by normal rabbit serum: implications for the role of the envelope protein VP28 in WSSV infection of shrimp. **Virus research**, v. 118, p. 55-61, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. (Eds) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 1-3.

SCHMIDT, F.R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 363-372, 2004.

SEIFFERT, W. Q; BELTRAME, E.; ANDREATTA, E. R.; MAGGIONI, D. S. Enfermidades uma oportunidade para repensar o cultivo de camarões marinhos. **Panorama da Aquicultura**, v. 97, p. 32-38, 2006.

SEOK, S. H.; PARK, J. H.; CHO, S. A.; BAEK, M. W.; LEE, H.Y.; KIM, D. J.; PARK, J.H. Cloning and sequencing of envelope proteins (VP19, VP28) and nucleocapsid (VP15, VP35) of a white spot syndrome virus isolate from Korean shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 60, p. 85-88, 2004.

SHI, Z.; WANG, H.; ZHANG, J.; XIE, Y.; LI, L.; CHEN, X.; EDGERTON, B. F.; BONAMI, J. R. Response of crayfish, *Procambarus clarkii*, haemocytes infected by white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v.28, p.151-156, 2005.

SITHIGORNGUL, W.; RUKPRATANPORN, S.; PECHARABURANIN, N.; LONGYANT, S.; CHAVISUTHANGKURA, P.; SITHIGORNGUL, P. A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.72, p.101-106, 2006.

SOTO, M. A.; LOTZ, J. M. Epidemiological parameters of white spot syndrome virus infections in *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.78, p.9-15, 2001.

SULKOWSKI, E. Purification of proteins by IMAC. **Trends Biotechnology**, v.3, p.1-7, 1985.

TANG, X.; WU, J.; SIVARAMAN, J.; HEW, C. L. Crystal structures of major envelope proteins VP26 and VP28 from white spot syndrome virus shed light on their evolutionary relationship. **Journal of Virology**, v.81, n. 12, p. 6709-6717, 2007.

TAPAY, L. M.; NADALA Jr., E. C. B.; LOH, P. C. A polymerase chain reaction protocol for the detection of various geographical isolates of white spot virus. **Journal of Virological Methods**, v.82, p.39-43, 1999.

THE UNIVERSITY OF HAWAII. Apresenta diversas imagens de camarões. Disponível em:< pacrc.uhh.hawaii.edu/mexico/en/docs/graphics.htm>. Acesso em: junho de 2007.

TSAI, J. M.; WANG, H. C.; LEU, J. H.; WANG, A. H. J.; ZHUANG, Y.; WALKER, P. J.; KOU, G. H.; LO, C. F. Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. **Journal of Virology**, v.80, n.6, p.3021-3029, 2006.

VALLEJO, L. F.; RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. **Microbial Cell Factories**, v.3, p.1-12, 2004.

VAN HULTEN, M. C. W.; GOLDBACH, R. W.; VLAK, J. M. Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. **Journal of General Virology**, v.81, p.2525-2529, 2000.

VAN HULTEN, M. C. W.; REIJNS, M.; VERMEESCH, A. M. G.; ZANDBERGEN, F.; VLAK, J. M. Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. **Journal of General Virology**, v.83, p.257-265, 2002.

VAN HULTEN, M. C. W.; WESTENBERG, M.; GOODALL, S. D.; VLAK, J. M. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. **Virology**, v.266, p.227-236, 2000.

VAN HULTEN, M. C. W.; WITTEVELDT, J.; PETERS, S.; KLOOSTERBOER, N.; TARCHINI, R.; FIERS, M.; SANDBRINK, H.; LANKHORST, R. K.; VLAK, J. M. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. **Virology**, v.286, p.7-22, 2001.

WANG, Q.; WHITE, B.; REDMAN, R.; LIGHTNER, D.V. Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duodorum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. **Aquaculture**, v.170, p.179-194, 1999.

WANG, Y.T.; LIU, W.; SEAH, J. N.; LAM, C. S.; XIANG, J. H.; KORZH, V.; KWANG, J. White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the *Peneaus merguensis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.52, p.249-259, 2002.

WANG, X.; ZHAN, W. Development of an immunochromatographic test to detect white spot syndrome virus of shrimp. **Aquaculture**, v.255, p.196–200, 2006.

WITTEVELDT, J.; CIFUENTES, C. C.; VLAK, J. M.; VAN HULTEN, M. C. W. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. **Journal of Virology**, v. 78, n. 4, p. 2057-2061, 2004.

WONGTEERASUPAYA, C.; VICKERS, J. E.; SRIURAIRATANA, S.; NASH, G. L.; AKARAJAMORN, A.; BOONSAENG, V.; PANYIM, S.; TASSANAKAJON, A.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; FLEGEL, T. W. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.21, p. 69-77, 1995.

WU, W.; WANG, L.; ZHANG, X. Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. **Virology**, v.332, p.578-583, 2005.

XIE, X.; XU, L.; YANG, F. Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of White spot syndrome virus. **Journal of Virology**, v.80, p.10615-10623, 2006.

YANG, F.; HE, J.; LIN, X.; PAN, Q. L. D.; ZHANG, X.; XU, X. Complete genome sequence of the shrimp white spot baciliform virus. **Journal of Virology**, v.75, n.23, p.11811-11820, 2001.

YOGANANDHAN, K.; MUSTHAQ, S. S.; NARAYANAN, R. B.; HAMEED, A. S. S. Production of polyclonal antiserum against recombinant VP28 protein and its application for the detection of white spot syndrome virus in crustaceans. **Journal of Fish Diseases**, v.27, p. 517-522, 2004.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. *Biologia Molecular Básica*. 3. ed. Porto Alegre: Mercado aberto, 2003.

ZHAN, W. B.; WANG, Y. H.; FRYER, J. L.; YU, K. K.; FUKUDA, H.; MENG, Q. X. White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.10, p. 405-410, 1998.

ZHAN, W. B.; WANG, Y. H.; FRYER, J. L.; OKUBO, K.; FUKUDA, H.; YU, K.K.; MENG, Q.X. Production of monoclonal antibodies (MAbs) against white spot syndrome virus (WSSV). **Journal of Aquatic Animal Health**, v.11, p.17-22, 1999

ZHAN, W. B.; WANG, Y. H.; CHEN, J.; XING, J.; FUKUDA, H. Elimination of shrimp endogenous alkaline phosphatase background and development of enzyme immunoassays for the detection of white spot syndrome virus (WSSV). **Aquaculture**, v.239, p.15-21, 2004.

ZHANG, X.; HUANG, C.; XU, X.; HEW, C.L. Identification and localization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes as envelope protein. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 1069-1074, 2002.