

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/9397
IB/80678

MESTRADO

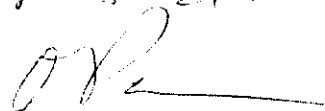
INSTITUTO DE BIOLOGIA

1988

ANGELA CRISTINA CAVALLARO

MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DO VÍRUS DE GRANULOSE DE *Diatraea*
saccharalis (Fabr., 1794) (VGDs) E CARACTERIZAÇÃO DE SEU
PRINCIPAL COMPONENTE PROTÉICO

*Este exemplar corresponde à redação final da
tese defendida pela candidata Sra. Angela Cristina
Cavallaro e é provida pela comissão julgadora
Campinas, 29 de abril de 1988*



Dissertação apresentada ao Insti-
tuto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para obten-
ção do título de Mestre em Biolo-
gia, Área Genética.

Orientador: Prof. Dr. OCTAVIO HENRIQUE DE OLIVEIRA PAVAN

CAMPINAS - SP

1988

U N I C A M P

Classif. 1

Autor C3/4 m

V. Ex.

Tombo BO/9397

IB / 789

1B/80678

BO/9397

Aos meus pais,

Alair e Eunice

ofereço

AGRADECIMENTOS

Na realização desse trabalho, contei com a espontânea e inestimável colaboração de várias pessoas, às quais deixo expresso os meus mais profundos agradecimentos, em especial:

- Ao Prof. Dr. Octavio Henrique O. Pavan, pela orientação oferecida durante a elaboração do trabalho

- Ao Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, pela leitura do manuscrito, pela amizade e confiança com que me recebeu em seu laboratório e também pela sábia orientação a nível profissional e pessoal

- Ao Prof. Dr. Willian José da Silva, pela utilização de equipamentos de seu laboratório

- Ao Prof. Dr. Crodowaldo Pavan e Profa. Dra. Ana Maria de Azeredo Espin, pela utilização de equipamentos de seu laboratório

- Aos pesquisadores e funcionários da Seção de Virologia do IAC, pela atenção com que me receberam quando da utilização do microscópio eletrônico, em especial ao: Dr. José Osmar Gaspar, Dr. Jorge Vega e Sandra

- A Anna Gagliardi, como bibliotecária-chefe do IB-UNICAMP, pela organização bibliográfica dessa tese

- A Teresa, funcionária do Centro de Microscopia Eletrônica, no auxílio das cópias dos negativos

- Aos funcionários da Seção de Entomologia do IAA/PLANALSUCAR, pelas facilidades concedidas

- Ao Carlos Corona, José e Dona Clair pelos valiosos serviços técnicos

- A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal a Nível Superior (CAPES) pelo suporte concedido para a realização desse trabalho

- A Helena, Ale, Jaque e Nancy pelo estímulo, apoio e sugestões (a ordem não altera o tamanho da gratidão)

- A Márcia, Dilaine, Regina, Ana, Juverlandi e Breno pelo estímulo e apoio

- A Laura Ottoboni, pelas sugestões, apoio, sobretudo pela disponibilidade para transmitir seu grande conhecimento e também seu auxílio prático

- A Bia, Cláudia, Ana, Guta, Rose, Suely, Guerreiro e Paulo, alguns pelos conselhos a outros por me escutarem

- Ao Prof. Dr. Darcy M. Silva e Prof. Dr. Renato Bonatelli Jr., pela leitura da tese e pelas sugestões

- Aos meus pais pelo esforço e trabalho que tiveram para que eu estudasse, a eles e a meus irmãos Cl e Ju pela compreensão e paciência.

INDICE

1.	INTRODUÇÃO	08
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	Lagartas de D. saccharalis	22
3.2	Vírus	23
3.3	Formas de inoculação	24
3.3.1	Inoculação individual	24
3.3.2	Inoculação massal	25
3.4	Purificação do cristal dos vírus	25
3.4.1	Purificação com deoxicolato de sódio	26
3.4.2	Purificação com Triton X-100	28
3.4.3	Purificação por centrifugação diferencial ..	30

3.5	Limpeza do cristal viral	33
3.6	Solubilização do cristal viral	35
3.6.1	Solubilização com solução alcalina e EDTA ..	35
3.6.2	Solubilização com ácido tricloroacético ...	37
3.6.3	Solubilização com solução alcalina de carbo- nato de sódio	39
3.7	Eletroforese em gel de poli(acrilamida e SDS)	41
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Inoculação Individual e massal	43
4.2	Purificação do cristal dos vírus	45
4.2.1	Purificação com deoxicolato de sódio	45
4.2.2	Purificação com Triton X-100	51
4.2.3	Purificação por centrifugação diferencial ..	54
4.3	Limpeza do cristal viral	60
4.4	Solubilização do cristal viral	61
4.4.1	Solubilização com solução alcalina	61
4.4.2	Solubilização com TCA	63
4.5	Eletroforese de proteínas virais de VPNAc, VPNAg VPNH ₂ , VPNTn e VGDs	64
5.	RESUMO E CONCLUSÕES	81
6.	SUMMARY AND CONCLUSIONS	84
7.	BIBLIOGRAFIA	87
8.	ANEXOS	103

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura economicamente importante para o Brasil, já que vem sendo utilizada como alternativa energética nas transformações pelas quais o país vem passando em relação aos combustíveis líquidos. Essa cultura tem também importância econômico-social, pois gera cerca de 1.700.000 empregos na produção de seus derivados e na indústria de manutenção e reposição (MACEDO & BOTELHO, 1988).

No Brasil, atualmente, existem 4 milhões de hectares dessa cultura, produzindo 277.000.000 de toneladas de matéria prima (safra 85/86) (MACEDO & BOTELHO, 1988).

Dentre as pragas mais importantes desta cultura encontra-se a *Diatraea saccharalis* (Fabricio, 1794), vulgarmente conhecida por broca da cana-de-açúcar. Dados recentes apontam que os prejuízos anuais causados pela broca são maiores que cem milhões de dólares (MACEDO & BOTELHO, 1988). Esse lepidóptero, na fase larval, cava galerias nos colmos causando problemas como falhas na germinação, tombamento da cana pelo vento, secamento dos ponteiros (MELO, 1985). Através dos orifícios, abertos pela broca, penetram os fungos *Colletotrichum falcatum* (Went) e *Fusarium moniliforme* (Sheldon) ocasionando a doença conhecida como podridão vermelha, que causa a inversão da sacarose, diminuindo a pureza do caldo e causando um menor rendimento (GALLO e cols, 1978).

O controle químico desses insetos torna-se bastante difícil pelo fato dos mesmos passarem a maior parte de seu desenvolvimento larval no interior da planta. Dessa forma, apresentou-se como alternativa a utilização dos inimigos naturais da broca, empregando-se assim o controle biológico. No Brasil, este tipo de controle é feito com a liberação do microhimenóptero *Apanteles flavipes* (Cam, 1891) e dos dípteros nativos *Metagonistilus minense* (Townsend, 1927) e *Paratheresia claripalpis* (Wulp, 1896) (IAA-PLANALSUCAR, 1982; MELO, 1986).

Entre os tipos de controle biológico da broca destaca-se o Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis* (VGDs) (STEINHAUS & MARSH, 1962; THOMAS & POINAR, 1973; PAVAN e cols, 1983b). O Vírus de Granulose pertence ao Gênero Baculovirus e a taxonomia empregada para designá-los descreve o tipo de baculovírus e a espécie em que foi pri-

meiramente isolado. Esses microorganismos, em geral, são específicos, mas podem infectar mais de um membro de uma mesma família. Assim temos a designação VGDs para o Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis*. Este patógeno através de estudos de laboratório e campo vem sendo viabilizado no controle biológico dessa praga (PAVAN e cols, 1983a, b, c; 1984; ALMEIDA e cols, 1984; RIBEIRO, 1985).

O Vírus de Granulose contém DNA circular de fita dupla dentro de um nucleocapsídeo, este é circundado por uma membrana ou envelope, toda esta estrutura está inserida dentro de uma matriz protéica, que no VG é denominada cápsula protéica (CONSIGLI e cols, 1983). O estudo da composição protéica de baculovírus tem sido usado para obter-se uma identificação mais precisa. Entretanto, outros testes são necessários na complementação desses estudos. Atualmente os métodos mais usualmente empregados são: eletroforese em gel de SDS e poliacrilamida, focalização isoelétrica, análise de DNA viral, sequenciamento de aminoácido e serologia.

O uso do VGDs como agente no controle da broca e sua consequente disseminação no meio ambiente necessita de técnicas detalhadas para reconhecimento e controle.

No estudo da composição protéica viral e nas técnicas usadas em laboratório para purificação do vírus, seguida da extração e obtenção de tais proteínas, é importante a padronização de metodologias que possam ser utilizadas para o reconhecimento, identificação e também na comparação com outros patógenos do mesmo grupo. O uso de

técnicas rotineiras num programa de produção massal desses vírus é indispensável para garantir a segurança e eficiência de um produto que possa ser utilizado no controle da broca da cana-de-açúcar, sem prejuízo para outros organismos que fazem parte do ecossistema. O Laboratório de Virologia de Insetos - I.B. - UNICAMP, encontra-se envolvido num projeto que desenvolve a produção massal do VGDs em escala semi-industrial. O estabelecimento destas técnicas são fundamentais para a implantação de um programa de diagnose do VGDs em larga escala.

Neste trabalho procuramos desenvolver metodologia para obter o Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis* livre de contaminantes; solubilizar a cápsula protéica (granulina) e caracterizá-la eletroforeticamente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os baculovírus são vírus pertencentes à família Baculoviridae e caracterizam-se por apresentarem o nucleocapsídeo em forma de bastão. Dentro desta família encontram-se três subgrupos, a saber: Vírus de Poliedrose Nuclear (VPN), Vírus de Granulose (VG) e Vírus de *Oryctes* (CONSIGLI e cols, 1983; VLAK & ROHRMANN, 1985)

O nucleocapsídeo é composto de várias proteínas dentro do qual está o material genético dos baculovírus. Tanto nos Vírus de Poliedrose Nuclear quanto nos Vírus de Granulose, o nucleocapsídeo é envolto por um envelope lipoprotéico, formando a unidade infecciosa, ou seja, o virion; que são incluídos numa matriz protéica.

Os Vírus de Poliedrose Nuclear podem apresentar de um a 39 nucleocapsídeos por envelope e assim são denominados, respectivamente, Vírus de Poliedrose Nuclear Simples (VPNS) e Múltiplos (VPNM). Os Vírus de Poliedrose Nuclear podem ainda ter cerca de 100 virions dentro de uma mesma matriz protéica e esta pode ter a forma de cubo ou poliedro e apresentar de 1-15 μm de diâmetro. A matriz protéica é chamada de poliedro e é composta de uma proteína denominada poliedrina (HARRAP & PAYNE, 1979 e CONSIGLI e cols, 1983).

Os Vírus de Granulose contem somente um nucleocapsídeo por envelope e apenas um virion por matriz protéica, sendo denominada grânulo, apresentando forma oval ou elipsóide com cerca de 0,5 μm de diâmetro. A proteína que compõe a matriz protéica é denominada granulina (HARRAP & PAYNE, 1979 e CONSIGLI e cols, 1983).

Os Vírus de *Oryctes* não são inclusos em matriz protéica e, embora esta seja uma das características dos baculovírus, o fato destes vírus apresentarem o nucleocapsídeo em forma de bastão e o mesmo ácido nucléico dos dois outros subgrupos permitem incluí-lo na mesma família podem também ser chamados de Vírus Não Incluso (VNI) (HARRAP & PAYNE, 1979; CONSIGLI e cols, 1983 e ROHRMANN, 1986).

Desde que PAILLOT (1926) e BERGOLD (1947) descreveram pela primeira vez um Vírus de Granulose e um Vírus de Poliedrose Nuclear respectivamente, muito vem sendo estudado a respeito de suas características e propriedades (SMITH, 1976; CONSIGLI e cols, 1983). A característica principal que fez dos baculovírus promissores agentes no

controle biológico de pragas, foi sua variação limitada de hospedeiro (CONSIGLI • cols, 1983). Os baculovírus têm um número limitado de hospedeiros e diferem de outros vírus que infectam insetos como o Vírus de Poliedrose Citoplasmática (VPC) da família Reoviridae, incluindo patógenos que atacam plantas e vertebrados, os Vírus Entomopox (VEP) da família Poxviridae possuem exemplares que também podem atacar vertebrados (VLAK & ROHRMANN, 1985). Os baculovírus restringem-se aparentemente a hospedeiros invertebrados e limitam-se a classe Insecta e duas espécies de Crustacea. Até 1980 existiam cerca de 300 baculovírus relatados, sendo que o VPN foi descrito em Lepidoptera, Hymenoptera, Trichoptera, Diptera, em contraste, porém, a infecção pelo VG parece limitar-se à Lepidoptera (GRANADOS, 1980; BILIMORIA, 1986 e Tweeten • cols, 1981). Numa revisão mais recente, ROHRMANN (1986) relata 537 baculovírus assim distribuídos: 2 VPN em Crustacea - Decapoda, na classe Insecta nas ordens: Trichoptera-1 VPN, Hymenoptera-26 VPN, Diptera-22 VPN, Lepidoptera-355 VPN, 113 VG e 2 VNI e em Coleoptera 16 VNI. Assim, 406 são VPN, 113 VG e 19 VNI.

O ácido nucléico dos baculovírus é um DNA circular de fita dupla, variando seu peso molecular de 60 a 110×10^6 d. Estes pesos moleculares foram determinados por uma grande variedade de técnicas biofísicas e bioquímicas como a microscopia eletrônica, a cinética de reassociação, a sedimentação em gradiente de sacarose e a digestão com enzima de restrição (HARRAP & PAYNE, 1979; TWEETEN • cols, 1981; VLAK & ROHRMANN, 1985 e KELLY, 1985).

A medida que os estudos sobre os baculovírus foram progredindo, o interesse nesse patógeno foi aumentando. Em alguns países os baculovírus estão sendo aplicados em testes de campo ou em aplicações em larga escala (TWEETEN e cols, 1981). Na URSS, em pragas de cultura de algodão, couve-flor e brócolis; no Japão, em pragas que atacam o arroz e árvores frutíferas e nos EUA, em soja, árvores frutíferas e florestas (TWEETEN e cols, 1981). Na Tailândia está sendo aplicado o VPN de *Spodoptera exigua*, na China o VPN de *Heliothis armigera* e o VG de *Pieris rapae*, na Colômbia o VPN de *Trichoplusia ni* (HUBER, 1986). No Brasil estão sendo realizados testes de campo e aplicações com o VGDs em cana-de-açúcar (PAVAN e cols, 1983b, c; ALMEIDA e cols, 1984) e com o VPNAg em soja (MOSCARDI, 1983).

O conhecimento da forma de replicação dos vírus, tipo de ácido nucléico, tecidos em que se replicam, formas de infecção e composição protéica são alguns aspectos do que já se abordou nos estudos sobre os baculovírus (BERGOLD, 1963; SMITH, 1976; CROIZER & CROIZER, 1977; SUMMERS & SMITH, 1978; TWEETEN e cols, 1981; KELLY, 1982; CONSIGLI e cols, 1983; PADHY, 1985; VLAK & ROHRMANN, 1985).

O procedimento de purificação é geralmente iniciado a partir da maceração das lagartas, seguida de vários ciclos de centrifugações diferenciais e/ou colchão e gradiente de sacarose (SUMMERS & EGAWA, 1972; MCCARTHY & LIU, 1976; SUMMERS & SMITH, 1975; 1978; TWEETEN e cols, 1977 e MASKOS & MILTENBURGER, 1981). No caso de alguns VPN é possível purificá-los a partir de cultura de células (MCCARTHY & DICAPUA, 1975; CARSTENS, 1979; WOOD, 1980).

TWEETEN • cols (1977) na purificação do Vírus de Granulose de *Plodia interpunctella* (VGPI) a partir de lagartas utilizaram a maceração, a centrifugação diferencial, o colchão e gradiente de sacarose empregando ainda o deoxicolato de sódio para isolar o vírus do tecido do hospedeiro. Estes pesquisadores encontraram no gradiente uma banda correspondente ao vírus e sua densidade foi de 1,271 g/cm: através deste protocolo de purificação foram recuperadas 37 % da atividade biológica original e a integridade física do vírus foi mantida.

MCCARTHY & LIU (1976) na purificação do Vírus de Poliedrose Nuclear de *Porthetria dispar* (VPNPd) empregaram centrifugação em baixa velocidade (2000 g), colchão de sacarose e ainda incubação das amostras de vírus em uréia, SDS e NaCl seguida de centrifugação em alta velocidade (10000 g) e gradiente de sacarose. Este procedimento com pequenas modificações nos passos iniciais da purificação foi empregado por MASKOS & MILTENBURGER (1981) na purificação do Vírus de Polidrose Nuclear de *Manestra brassicae* (VPNMb), *Autographa californica* (VPNAc) e *Lymantria dispar* (VPNLd).

LONGWORTH • cols (1972) empregaram centrifugação em alta velocidade (10000 g - 20 min) e vários ciclos de centrifugação em gradiente de glicerol e sacarose na purificação do Vírus de Granulose de *Pieris brassicae* (VG Pb). O mesmo procedimento foi utilizado na purificação do Vírus de Granulose de *Spodoptera littoralis* (VGSi), *Melanchra persicaria* (VGMp), *Pieris brassicae* (VG Pb) e Vírus de Poliedrose Nuclear de *Manestra brassicae* (VPNMb) e encontraram em gradiente de sa-

carose uma banda na qual se encontrava o vírus ao redor de uma concentração de 56 % no gradiente (HARRAP & LONGWORTH, 1974).

SUMMERS & SMITH (1975, 1976, 1978) na purificação do Vírus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatilis* (VPNAg), *Trichoplusia ni* (VPNTn), *Heliothis zea* (VPNH_z), *Autographa californica* (VPNAc) e Vírus de Granulose de *T. ni* (VG_{Tn}) homogeneizaram as lagartas em uréia, ácido ascórbico, e 1 % de SDS, seguido de centrifugação em gradiente de sacarose.

PAVAN *• cols* (1981) maceraram as lagartas infectadas de *A. gemmatilis* com SDS e feniltiouréia e utilizaram vários ciclos de centrifugação diferencial na purificação do VPNAg.

Após o isolamento do poliedro (VPN) e cápsula protéica (VG) visando ao fracionamento do vírus para o estudo de seus vários componentes protéicos. A proteína da cápsula ou do poliedro dos baculovírus é um dos componentes melhor estudado, sendo ela obtida, a partir da dissociação da matriz protéica, através do uso de soluções de carbonato de sódio (SUMMERS & PASCHKE, 1970; KHOSAKA *• cols*, 1971; EGAWA & SUMMERS, 1972; HARRAP, 1972; KOZLOV *• cols*, 1974; MCCARTHY & LIU, 1976; CROIZER & CROIZER, 1977; TWEETEN *• cols*, 1978; SUMMERS & SMITH, 1978; MASKOS & MILTENBURGER, 1981).

As condições ótimas para tais dissoluções dependem de vários fatores como tempo e temperatura de incubação na solução alcalina, molaridade dos reagentes e pH, sendo estas diferentes para cada

vírus (TWEETEN • cols, 1981; CONSIGLI • cols, 1983). Relata-se ainda a influência, nessa dissolução, de uma enzima denominada protease alcalina que degrada a proteína da matriz em pequenos peptídeos (EPPSTEIN • cols, 1975, EPPSTEIN & THOMA, 1975; KOZLOV • cols, 1975a, b; MCCARTHY & LIU, 1976; MCINTOSH & PADHY, 1976; EPPSTEIN & THOMA, 1977, SUMMERS & SMITH, 1978; PAYNE & KALMAKOFF, 1978 e TWEETEN • cols, 1978). Na replicação *in vitro* do baculovírus essa enzima não é relatada (ZUMMER, 1979). Foram descritas várias formas de inativação dessa enzima com o uso de inibidores de protease, tais como: HgCl₂, diisopropil fosfofluoreto e tratamento de calor (EPPSTEIN • cols, 1975; SUMMERS & SMITH, 1975; TWEETEN • cols, 1978; LANGRIDGE & BALTER, 1981; CONSIGLI • cols, 1983).

Foram relatadas formas alternativas de solubilização para a matriz protéica de vários baculovírus para evitar a degradação da proteína da cápsula, ou poliedro, pela protease alcalina. Algumas das substâncias usadas foram: guanidina, uréia e n-propanol, entretanto os tratamentos podem produzir danos nos vírus (EGAWA & SUMMERS, 1972; KAWANISHI • cols, 1972).

YAMAMOTO & TANADA (1978 a, b) empregaram na solubilização do Vírus de Granulose de *Pseudaletia unipuncta* (VGPI) 0,02 N de NaOH, pH 12, sem que houvesse dano ao envelope viral.

KOZLOV • cols (1974, 1975a, b) empregaram a solubilização alcalina da proteína do Vírus de Poliedrose Nuclear de *Galleria mellonella* (VPNGm) e *Bombyx mori* (VPNBm) com carbonato de sódio (PP-1)

e ácido acético (PP-2) e encontraram diferenças nas duas preparações quanto ao número de bandas encontradas, quando corridas em eletroforese de poliacrilamida e SDS, na preparação 1 (PP-1). Nesta encontraram 3 bandas com 26600, 22600 e 11600 d e na preparação 2 (PP-2), uma banda de 30200 d. O resultado obtido na preparação 1 é devido á degradação da proteína da matriz em peptídeos menores pela protease alcalina.

SUMMERS & SMITH (1975), na dissolução da cápsula protéica de Vírus de Granulose de *T. ni* (VGTn), utilizaram três tipos de solubilização: 1) em pH ácido, empregando ácido fórmico e ácido acético, 2) em pH neutro utilizando uréia e 3) em pH alcalino com diferentes molaridades de carbonato de sódio. Quando empregaram o tratamento 1 e 2 encontraram uma única banda com peso molecular de 28000 d; usando solução alcalina encontraram uma banda entre 7000 e 12000 d; somente quando estas amostras foram previamente tratadas a 70°C por 20 min é que foi possível observar apenas uma banda de 28000 d.

O Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis* (VGDs) foi primeiramente relatado nos EUA por STEINHHAUS & MARSH (1962) e na América do Sul em lagartas coletadas no Uruguai por THOMAS & POINAR (1973).

PAVAN & cols (1983b, c) descreveram o VGDs e sua etiologia, relacionando também a dose inoculada com o estágio de desenvolvimento das lagartas. Foi calculada, além disso, DL-50 e TL-50 para as diferentes doses e os 2º, 3º, 4º e 5º estágios de desenvolvimento larval. Estes pesquisadores observaram que quanto mais avançado o estágio

de desenvolvimento do hospedeiro, a dose e o tempo letal são maiores para uma mesma dose aplicada. A DL-50 para lagartas de 3º estágio foi de 42,36 cápsulas/lagarta, e o TL-50 para lagartas do mesmo estágio foi de 47,56 dias.

RIBEIRO (1985), testou em lagartas de *D. saccharalis* a inoculação do VGDs, VPNTn, VPNAg e a inoculação mista do VGDs + VPNTn e do VGDs + VPNAg. Observou, a partir daí, que o inóculo simples de cada vírus foi mais efetivo que os inóculos mistos, quanto ao tempo letal. O TL-50 destes, quando comparado ao de cada vírus separadamente, foi maior. Ainda foi realizada nesse trabalho a passagem seriada do VPNTn e do VPNAg em lagartas de *D. saccharalis*. Foi observado que houve uma adaptação do vírus ao hospedeiro alternativo, sendo que a DL-50 foi diminuindo com o decorrer das passagens. O VPNAg tornou-se cerca de 100 vezes mais virulento, enquanto que o VPNTn aumentou sua virulência em 800 vezes.

Ainda em relação ao emprego do VGDs em testes de laboratório, foram realizados trabalhos sobre inativação com ultra-violeta (CAVALLARO, A.C., dados não publicados), inativação térmica (RIBEIRO & PAVAN, 1985), aspectos estruturais (ZANOTTO e cols, 1986) e análise comparativa de dois isolados geográficos (CAVALLARO e cols, 1984).

Em relação aos testes de campo, têm sido realizados trabalhos para o conhecimento da mortalidade em campo. ALMEIDA e cols (1984) em testes de campo com aplicação terrestre do VGDs inocularam as seguintes doses: 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 cápsulas de vírus (c)/2,7

μl , sendo que foram aplicados 50 l de solução de vírus por hectare. No caso de 10^4 c/2,7 μl a mortalidade encontrada foi de 6,9 % e 10^5 c/2,7 μl foi de 15,1 %. Na aplicação aérea a concentração de vírus aplicado foi de 10^5 c/2,7 μl , tendo sido coletadas lagartas em campo 30, 60, 90, 120 e 150 dias após cada aplicação. Após 30 dias da aplicação encontrou-se cerca de 26,7 % das lagartas coletadas contaminadas pelo vírus. Esse trabalho mostra que mesmo nas coletas mais tardias, ou seja, 150 dias após a aplicação, encontrou-se 15,45 % de lagartas contaminadas pelo vírus, mostrando a sua grande persistência, mesmo em condições que poderiam ser consideradas desfavoráveis.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Lagartas de *D. saccharalis*

Lagartas de *D. saccharalis* (3º e 4º estágios) utilizadas para inoculação individual e massal foram gentilmente cedidas pela Seção de Entomologia do IAA/PLANALSUCAR, Araras-SP.

3.2 Vírus

Os vírus utilizados nos experimentos foram obtidos da coleção do Laboratório de Virologia de Insetos do Departamento de Genética e Evolução - IB - UNICAMP.

Os Vírus de Poliedrose Nuclear de **Anticarsia gemmatilis** (VPNAg), Vírus de Poliedrose Nuclear de **Trichoplusia ni** (VPNTn) e Vírus de Poliedrose Nuclear de **Heliothis zea** (VPNH_z) foram primeiramente obtidos dos hospedeiros originais e posteriormente inoculados em **D. saccharalis**.

O Vírus de Poliedrose Nuclear de **Autographa californica** (VPNAc) foi obtido de cultura de tecido de inseto, gentilmente cedido por M.D. Summers, e posteriormente inoculado em **D. saccharalis** e purificado.

O Vírus de Granulose de **D. saccharalis**, empregado nas inoculações realizadas, foi obtido de experimentos anteriores do laboratório. Todos os vírus acima relacionados foram utilizados em eletroforeses em gel de poli-acrilamida e SDS.

3.3 Formas de inoculação do vírus

3.3.1 Inoculação individual

Com auxílio de um furador de rolha foram cortados pequenos discos (3,0 mm de diâmetro) de dieta artificial de HENSLEY & HAMMOND (1968), posteriormente modificada por DEGASPARI e cols (1981), que estavam contidas em tubos de vidro. Os discos foram distribuídos numa placa de acrílico com 24 cavidades (1 disco/cavidade). Em seguida, inoculou-se, com auxílio de um microaplicador, uma gota (2,7 μ l) de VGDs por disco, nas concentrações de 10^6 , 10^5 e 10^4 c/2,7 μ l e em cada cavidade da placa colocou-se uma lagarta. As placas foram fechadas e colocadas em câmara úmida por 24 h com fotoperíodo de 16 h e temperatura de $26 \pm 1^\circ$ C. Após esse período as lagartas que se alimentaram de toda dieta contaminada foram transferidas em câmara asséptica para tubos, contendo dieta isenta de vírus, colocando-se uma lagarta por tubo. Esses tubos foram então, colocados em suportes e novamente transferidos para câmara a $26 \pm 1^\circ$ C.

Em dias alternados foi feita a observação dos tubos para a verificação da mortalidade. As lagartas mortas por vírus foram guardadas em congelador (-20° C) para posterior purificação.

3.3.2 Inoculação massal

Para a multiplicação do VGDs foi utilizada a inoculação em massa das lagartas. Uma dieta com composição igual aquela utilizada para inoculação individual e nos tubos foi cortada em cubos e colocadas em caixas plásticas (12x23x7 cm), sendo, em seguida inoculada com vírus na concentração de 10^5 c/2,7 μ l, com um pulverizador manual de plantas. Em cada caixa foram colocadas cerca de 100 lagartas no 4º estágio de desenvolvimento. As caixas foram então lacradas com fita crepe e dispostas em câmara com temperatura de $26 \pm 1^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de 16 h. Após doze dias as lagartas que apresentavam sinais de infecção foram retiradas e guardadas em copos plásticos; cada copo foi preenchido em média com 500 lagartas e com cerca de 50 g de peso; nesses copos foram anotados data da inoculação, data da retirada das lagartas, concentração do vírus inoculado e peso. Estes copos foram guardados em congelador (-20°C) para posterior purificação do vírus.

3.4 Purificação do cristal dos vírus

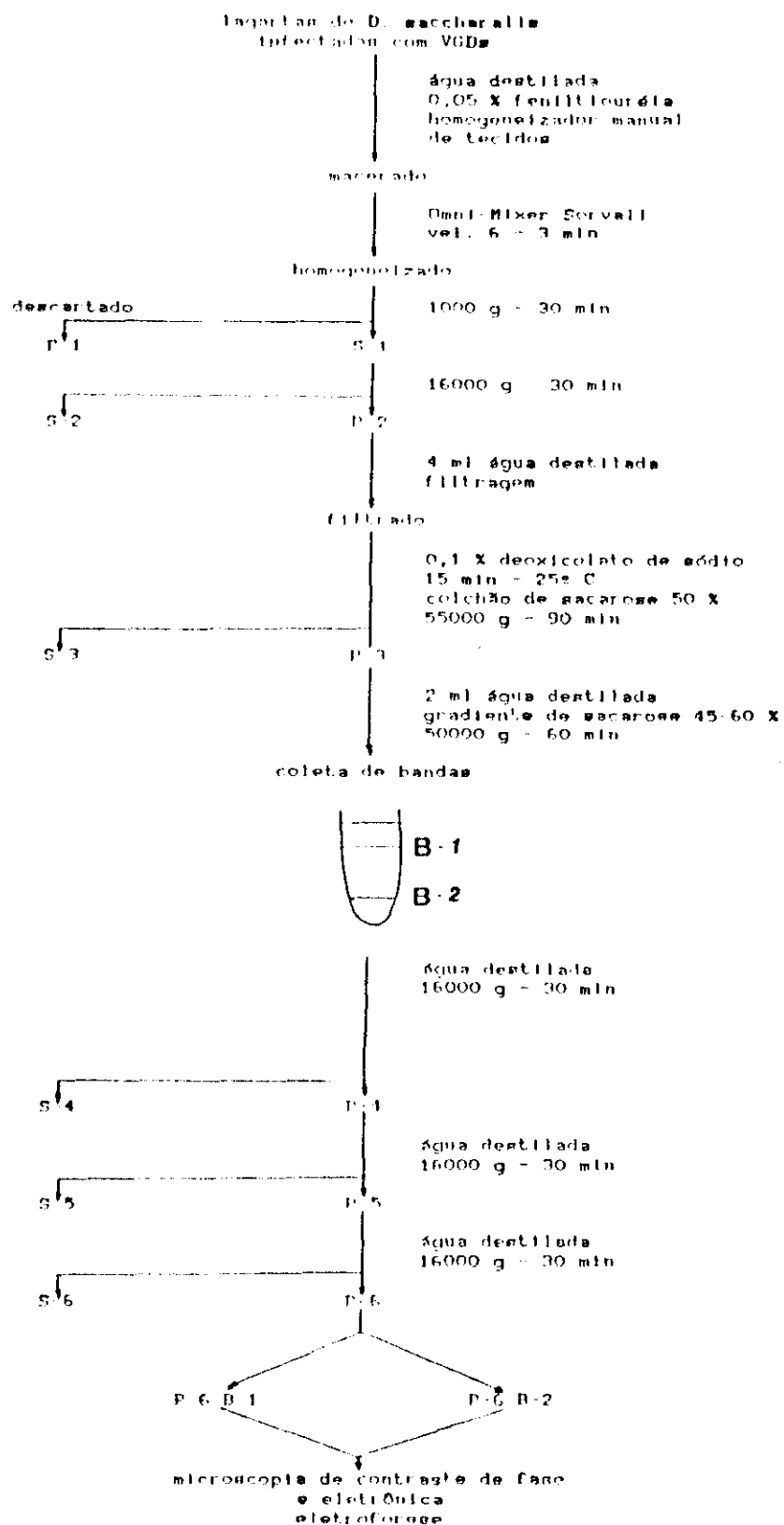
Foram testadas algumas metodologias para purificação do VGDs, desde a centrifugação diferencial até a purificação através de colchão e gradiente de sacarose. Nessas purificações também foram empregados dois tipos de detergentes: deoxicolato de sódio e triton X-100.

Para a purificação do VPNAg foram utilizadas apenas centrifugações diferenciais.

3.4.1 Purificação com Deoxicolato de Sódio (Esquema 1)

As 20 lagartas de *D. saccharalis* infectadas, adicionou-se água destilada (1 ml/lagarta) e 0,05 % de feniltiouréia; seguiu-se a maceração das mesmas em homogeneizador manual de tecidos. Esse macerado foi homogeneizado em Omni-Mixer Sorvall por um período de 3 min, sendo então submetido à centrifugação a 1000 g por 30 min. O precipitado (P-1) foi descartado e o sobrenadante (S-1) coletado e centrifugado a 16000 g por 30 min. O sobrenadante (S-2) foi descartado e o precipitado (P-2) ressuscitado em água destilada e filtrado em duas camadas de papel de filtro. Adicionou-se ao filtrado, 0,1 % de deoxicolato de sódio e deixou-se incubar à temperatura ambiente (25° C) por 15 min. A seguir, as amostras foram centrifugadas em colchão de sacarose 50 % (p/p) a 55000 g por 90 min. Descartou-se o sobrenadante (S-3) e ressuscitou-se o precipitado (P-3) em 2 ml de água destilada, centrifugou-se, em seguida, o precipitado (P-3) em gradiente de sacarose 45-60 % (p/p) a 50000 g por 60 min. Procedeu-se a coleta das bandas obtidas, e estas foram diluídas em água destilada, seguindo-se o procedimento de retirada de sacarose, centrifugando-se a 16000 g por 30 min. O sobrenadante (S-4) foi descartado e o precipitado (P-4) ressuscitado em água destilada e centrifugado a 16000 g por 30 min. O sobrenadante (S-5) foi descartado e o precipitado (P-5) foi ressuspen-

ESQUEMA 1. Processo de purificação do VGDs a partir de lagartas infectadas utilizando-se deoxicolato de sódio.

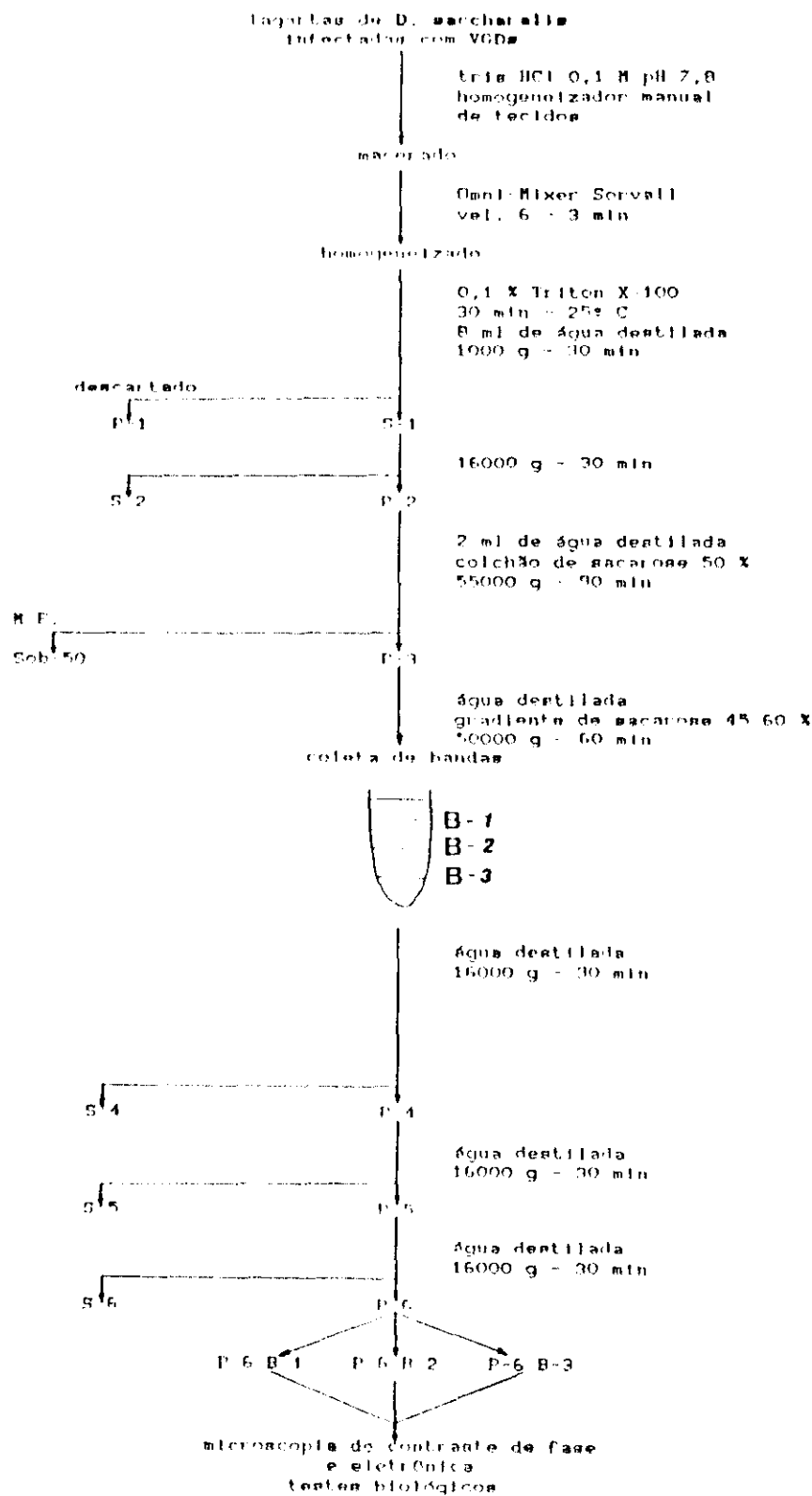


dido em água destilada e centrifugado a 16000 g por 30 min. O sobrenadante (S-6) foi descartado e o precipitado (P-6) de cada amostra foi utilizado para análise em microscopia de contraste de fase, microscopia eletrônica e eletroforese.

3.4.2 Purificação com Triton X-100 (Esquema 2)

Cinquenta gramas (aproximadamente 500 lagartas) de lagartas de *D. saccharalis* infectadas com VGDs foram macerados em homogeneizador manual de tecidos, adicionando-se 1 ml de 0,1 M Tris-HCl pH 7,8 por lagarta. Esse macerado foi homogeneizado em Omni-Mixer Sorvall por 3 min e adicionou-se a este, triton X-100, numa concentração final de 0,1 % deixando-se incubar durante 30 min à temperatura ambiente. A seguir, adicionou-se 8 ml de água destilada e centrifugou-se a 1000 g por 30 min. O precipitado (P-1) foi descartado e o sobrenadante (S-1) centrifugado a 16000 g durante 30 min. Descartou-se o sobrenadante (S-2) e ressuspendeu-se o precipitado (P-2) em água destilada, seguindo centrifugação em colchão de sacarose 50 % a 55000 g por 90 min. Amostras desse sobrenadante (S-3) foram coletadas para observação em microscópio eletrônico. O precipitado (P-3) foi ressuspendido em água destilada e centrifugado em gradiente de sacarose 45-60 % a 50000 g por 60 min. A seguir, foram coletadas as bandas que foram, então, diluídas em água destilada seguindo-se vários ciclos de centrifugação em alta velocidade (16000 g - 30 min) para retirada de sacarose. O sobrenadante (S-4) foi descartado e o precipitado (P-4) ressuspendido em água destilada e novamente centrifugado. O precipitado (P-5) foi res-

ESQUEMA 2. Processo de purificação do VGDs a partir de lagartas infectadas utilizando-se Triton X-100.



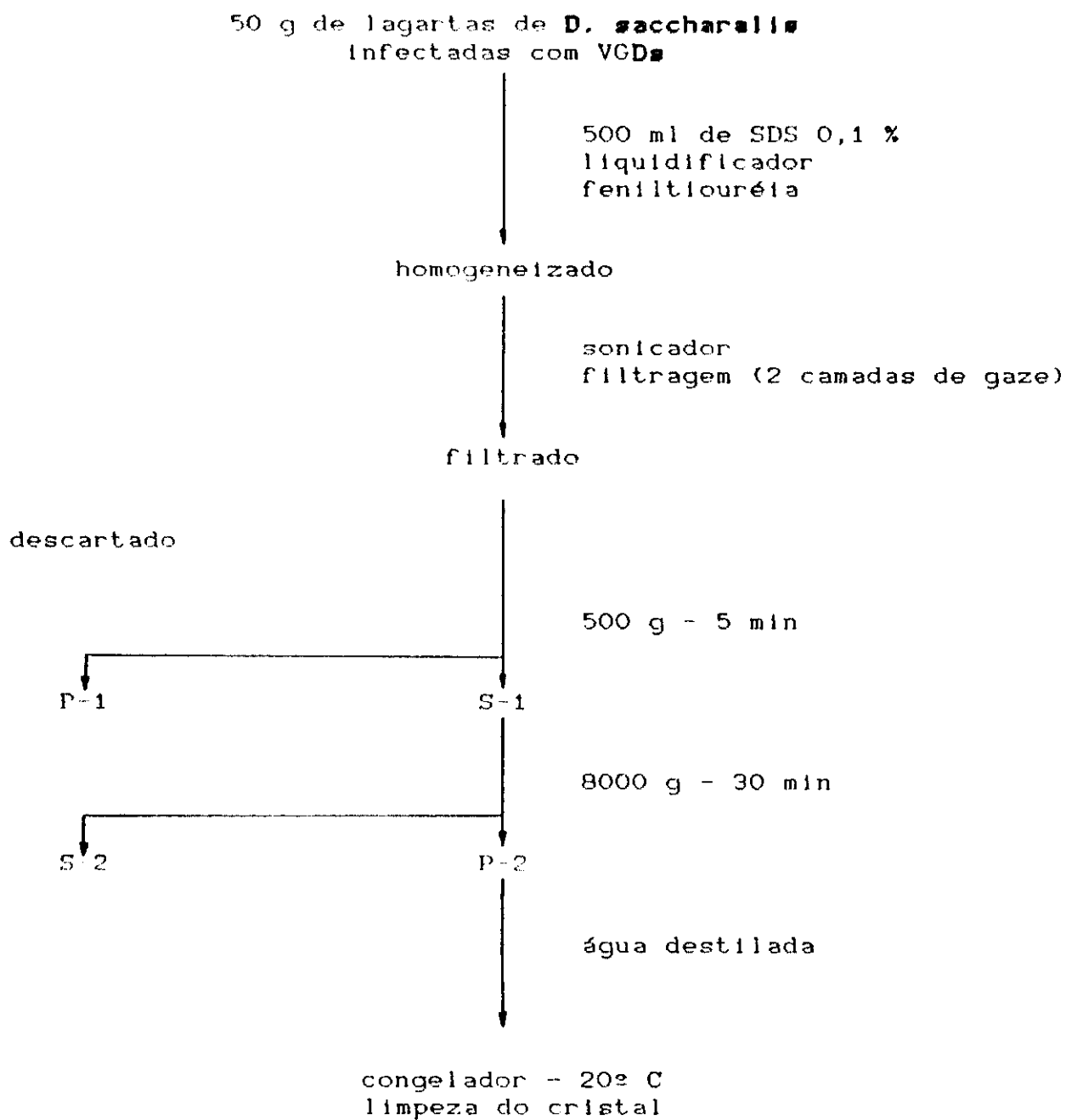
suspenso em água destilada e centrifugado a 16000 g - 30 min e o sobrenadante (S-5) descartado. O precipitado (P-6) de cada uma das amostras foi analisado em microscópio eletrônico e usado para testes biológicos, enquanto que os sobrenadantes (S-6) foram descartados.

3.4.3 Purificação por centrifugação diferencial

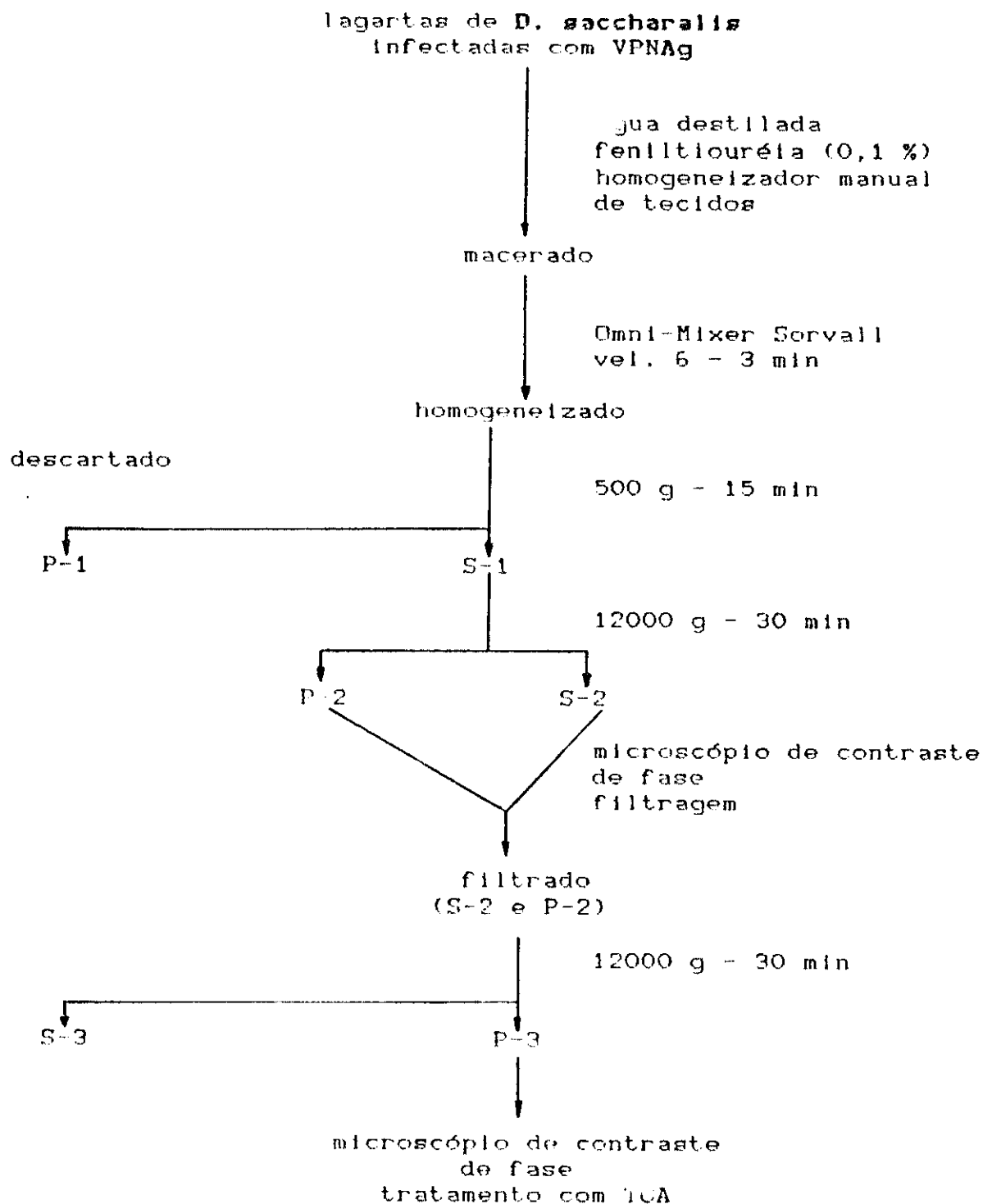
A cada 50 g de lagartas de *Diatraea saccharalis* infectadas com VGDs adicionou-se 500 ml de solução de SDS 0,1 % , feniltiouréia e homogeneizou-se em liquidificador (Esquema 3). A seguir, esse homogeneizado foi sonificado e filtrado em duas camadas de gaze. Esse filtrado foi então submetido à centrifugação diferencial, em centrifuga refrigerada (Beckman J2-21), sendo o primeiro ciclo de 500 g por 5 min. O precipitado (P-1) foi descartado e o sobrenadante (S-1) centrifugado a 8000 g por 30 min. Ressuspendeu-se o precipitado (P-2) em água destilada e estocou-se em congelador a - 20° C para posterior utilização.

Um procedimento semelhante (Esquema 4) foi empregado para purificação de VPNAg; vinte lagartas de *D. saccharalis*, mortas pelos vírus (VPNAg), foram maceradas em homogeneizador manual de tecidos com adição de água destilada (1 ml/lagarta) e 0,05 % de feniltiouréia. Esse macerado foi posteriormente tratado em Omni-Mixer Sorvall na velocidade 6 durante 3 min. A seguir, esse homogeneizado foi centrifugado a 500 g por 15 min. O precipitado (P-1) foi descartado e o sobrenadante (S-1) centrifugado a 12000 g por 30 min. O precipitado (P-2) foi

ESQUEMA 3. Processo de purificação do VGDs a partir de lagartas infectadas através de produção massal. A purificação do vírus nesse caso foi feita utilizando-se apenas centrifugação diferencial.



ESQUEMA 4. Processo de purificação do Vírus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatilis* a partir de lagartas de *D. saccharalis* infectadas.



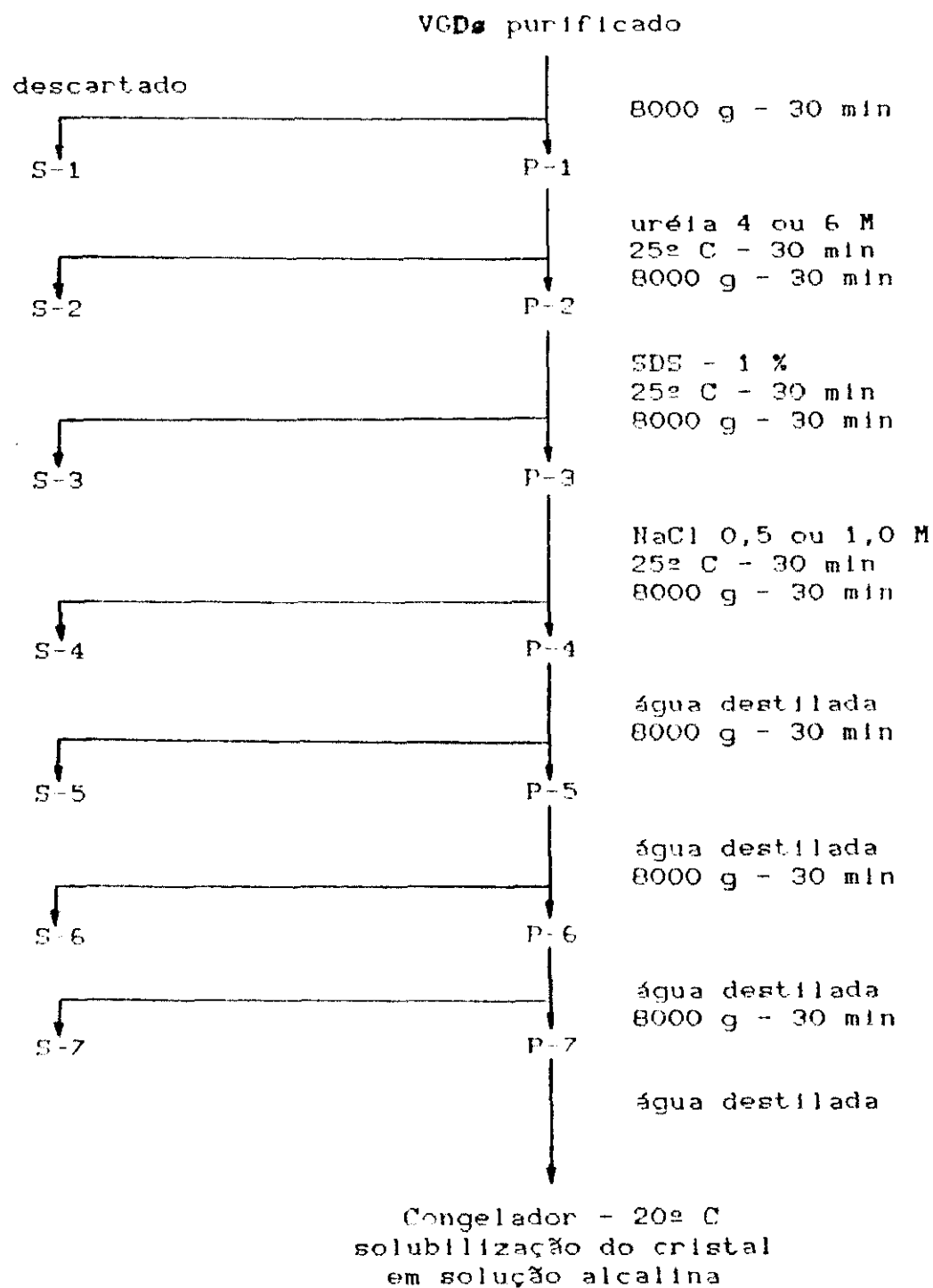
ressuspendido e assim como o sobrenadante (S-2) filtrado em filtro de papel. Os dois filtrados foram observados em microscópio de contraste de fase e quantificados em hemocitômetro. Devido a alta quantidade de vírus observada no sobrenadante (S-2) uniu-se este ao precipitado (P-2) e centrifugou-se a 12000 g por 30 min. O sobrenadante (S-3) e o precipitado (P-3) obtidos foram observados novamente em microscópio de contraste de fase para confirmação da presença do vírus. Após a observação seguiu-se o tratamento do precipitado (P-3) com ácido Tricloroacético.

3.5 Limpeza do cristal viral (Esquema 5)

Esse procedimento tem por finalidade retirar pequenos contaminantes que possam estar aderidos à matriz protéica dos vírus.

O VGDs obtido através da inoculação em massa das lagartas e purificado através da centrifugação diferencial foi centrifugado a 8000 g durante 30 min e o precipitado (P-1) foi ressuspendido em uréia 4 ou 6 M e deixado incubar à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) por 30 min, sendo então centrifugado a 8000 g por 30 min. O precipitado (P-2) foi ressuspendido em SDS 1 % e incubado à temperatura ambiente por 30 min, seguido de centrifugação a 8000 g por 30 min. O sobrenadante (S-2) foi descartado. O precipitado (P-3) foi ressuspendido em NaCl 0,5 ou 1,0 M e incubado à temperatura ambiente por 30 min e então, centrifugado a 8000 g por 30 min. O sobrenadante (S-3) foi descartado.

ESQUEMA 5. Limpeza do cristal viral empregando-se uréia, SDS, NaCl e água destilada antes da utilização dessas amostras de vírus para solubilização da cápsula protéica em solução alcalina.



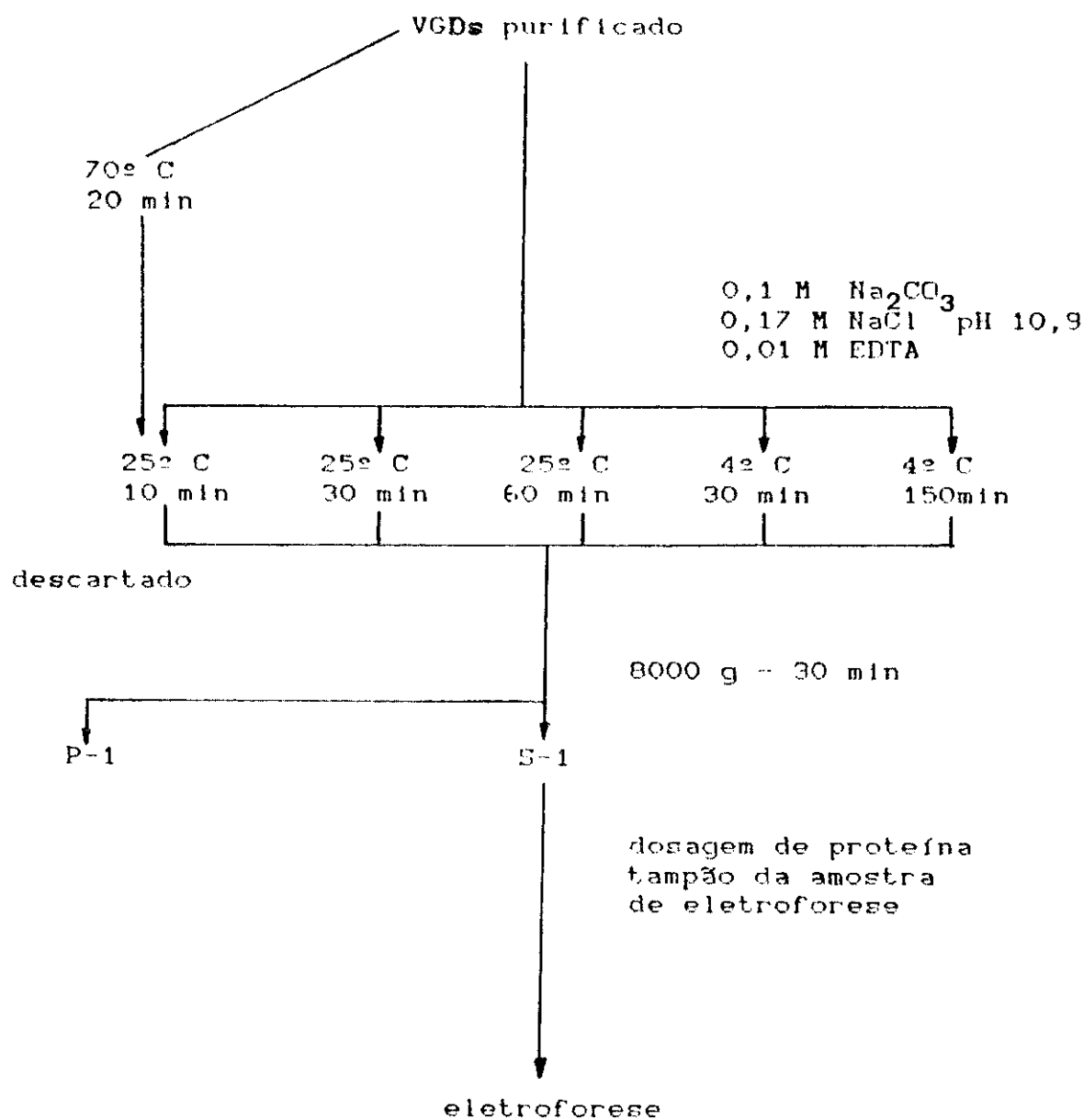
Após esse tratamento as amostras foram ressuspendidas em água destilada e precipitadas por 3 ciclos de centrifugação a 8000 g por 30 min. Foram, então, ressuspendidas em água destilada até a obtenção do precipitado (P-7). Estes foram ressuspendidos num volume mínimo de água destilada e foram estocados em congelador (-20°C) para uso posterior ou imediatamente submetido ao tratamento de solubilização alcalina com carbonato de sódio (McCARTHY & LIU, 1976).

3.6 Solubilização do cristal viral

3.6.1 Solubilização com solução alcalina e EDTA (Esquema 6)

Amostras de VGDs com concentração por volta de 10^5 c/2,7 μl e obtidas através da inoculação em massa das lagartas, purificadas por centrifugação diferencial e passadas pelo tratamento de limpeza do cristal foram tratadas de duas maneiras: a) tratamento térmico a 70°C por 20 min; b) sem tratamento térmico. A seguir, adicionou-se a estas amostras o mesmo volume de solução alcalina de Na_2CO_3 0,1 M; NaCl 0,17 M e EDTA 0,01 M, pH 10,9 e foram testadas nas seguintes temperaturas e tempos de incubação: 25°C por 10, 30 e 60 min e 4°C durante 30 e 150 min. Procedeu-se então, a centrifugação de cada uma das amostras a 8000 g durante 30 min. Os precipitados (P-1) foram descartados e dos sobrenadantes (S-1) foram coletadas amostras para dosagem de

ESQUEMA 6. Processo de dissolução da cápsula protéica de VGDs utilizando-se solução alcalina e EDTA, pH 10,9.



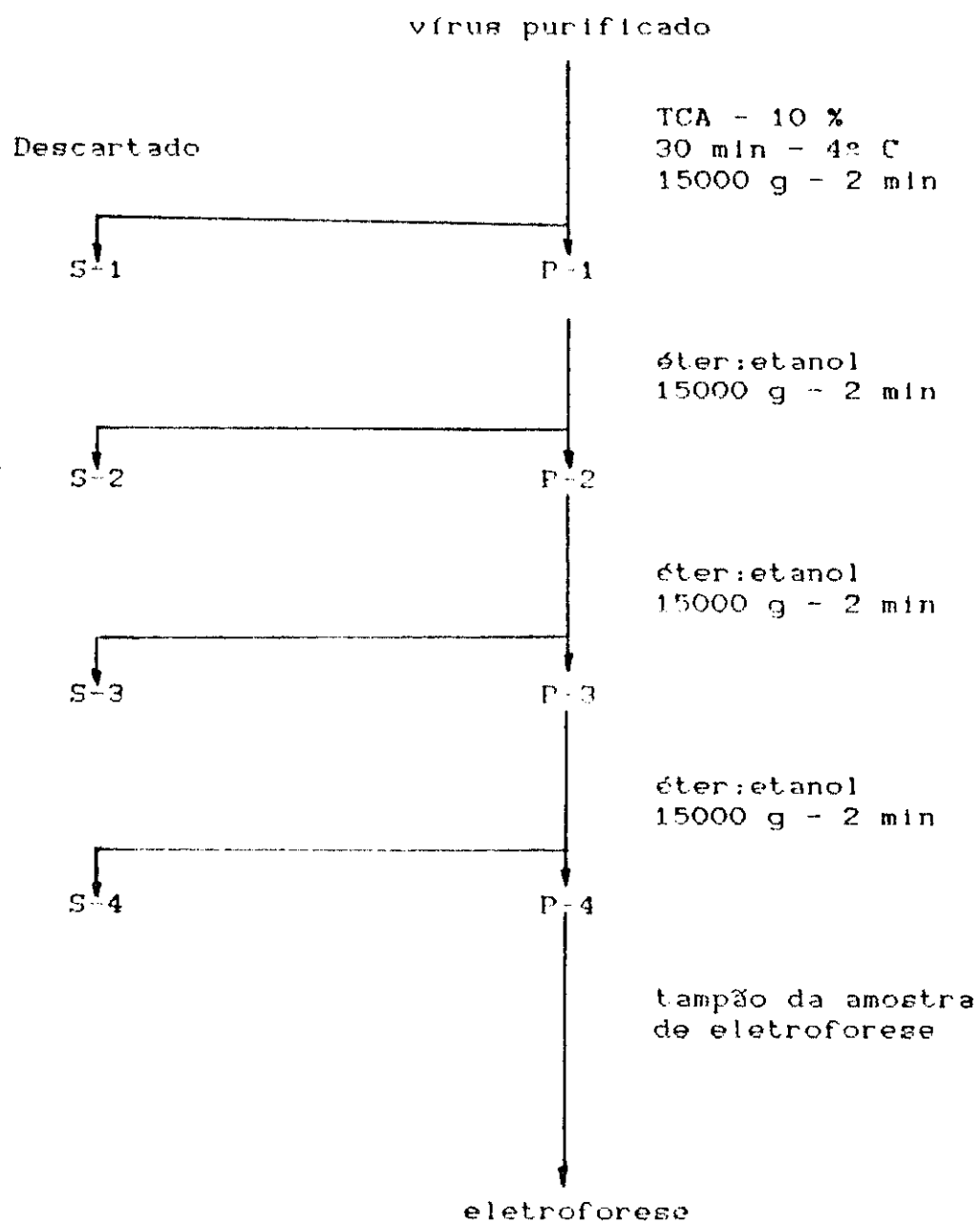
proteína (LOWRY, 1951). A seguir, adicionou-se a 100 μ l do sobrenadante (S-1) o mesmo volume do tampão da amostra de eletroforese.

3.6.2 Solubilização com Ácido Tricloroacético (TCA) (Esquema 7)

Adicionou-se a 300 μ l de VGDs purificado com o uso de deoxicolato de sódio o mesmo volume de TCA 20 %, numa concentração final de 10 %. Deixou-se incubar a 4° C por 30 min, centrifugando-se, a seguir, a 15000 g por 2 min, em microcentrifuga Micronal SPIN 1. O sobrenadante (S-1) foi descartado e o precipitado (P-1) foi ressuspensionado em 100 μ l de éter:etanol (1:1) e centrifugou-se a 15000 g por 2 min. O sobrenadante (S-2) foi descartado e o precipitado (P-2) ressuspensionado em 100 μ l de éter:etanol e centrifugado 15000 g por 2 min, o sobrenadante (S-3) foi descartado. O precipitado (P-3) foi ressuspensionado em éter:etanol e novamente centrifugado a 15000 g por 2 min. O sobrenadante (S-4) foi descartado e o precipitado (P-4) ressuspensionado no tampão da amostra de eletroforese.

A solubilização da matriz protéica em ácido foi muito pouco empregada, e como o TCA estava sendo utilizado pela primeira vez com essa finalidade, necessitou-se da confirmação da viabilidade da mesma, sendo então utilizados, nesse tratamento, vírus cujos PMs da proteína de suas respectivas matrizes eram conhecidos e encontravam-se dentro da coleção de vírus do Laboratório de Virologia. São eles: Vírus de Poliedrose Nuclear de *A. gemmatilis* (VPNAg), Vírus de Poliedrose Nuclear de *T. ni* (VPNTn), Vírus de Poliedrose Nuclear de *H. zea* (VPNH_z) e Vírus de Poliedrose Nuclear de *A. californica* (VPNAc).

ESQUEMA 7. Processo de dissolução da matriz protéica utilizando-se ácido tricloroacético (TCA). Nesse tipo de dissolução empregou-se o VPNAc, VPNAg, VPNH₂, VPNTn e VGDs.



Os estoques de vírus utilizados apresentavam as seguintes concentrações: 10^5 c/2,7 μ l para VPNAg e VPNTn, $1,62 \times 10^6$ c/2,7 μ l para VPNH₂ e $2,2 \times 10^7$ c/2,7 μ l para VPNAc, sendo que a quantidade total de vírus nos 300 μ l de cada amostra tratada com TCA foi: $1,2 \times 10^7$ cristais para VPNAg e VPNTn, $1,8 \times 10^8$ cristais para VPNH₂ e $2,5 \times 10^9$ cristais para VPNAc.

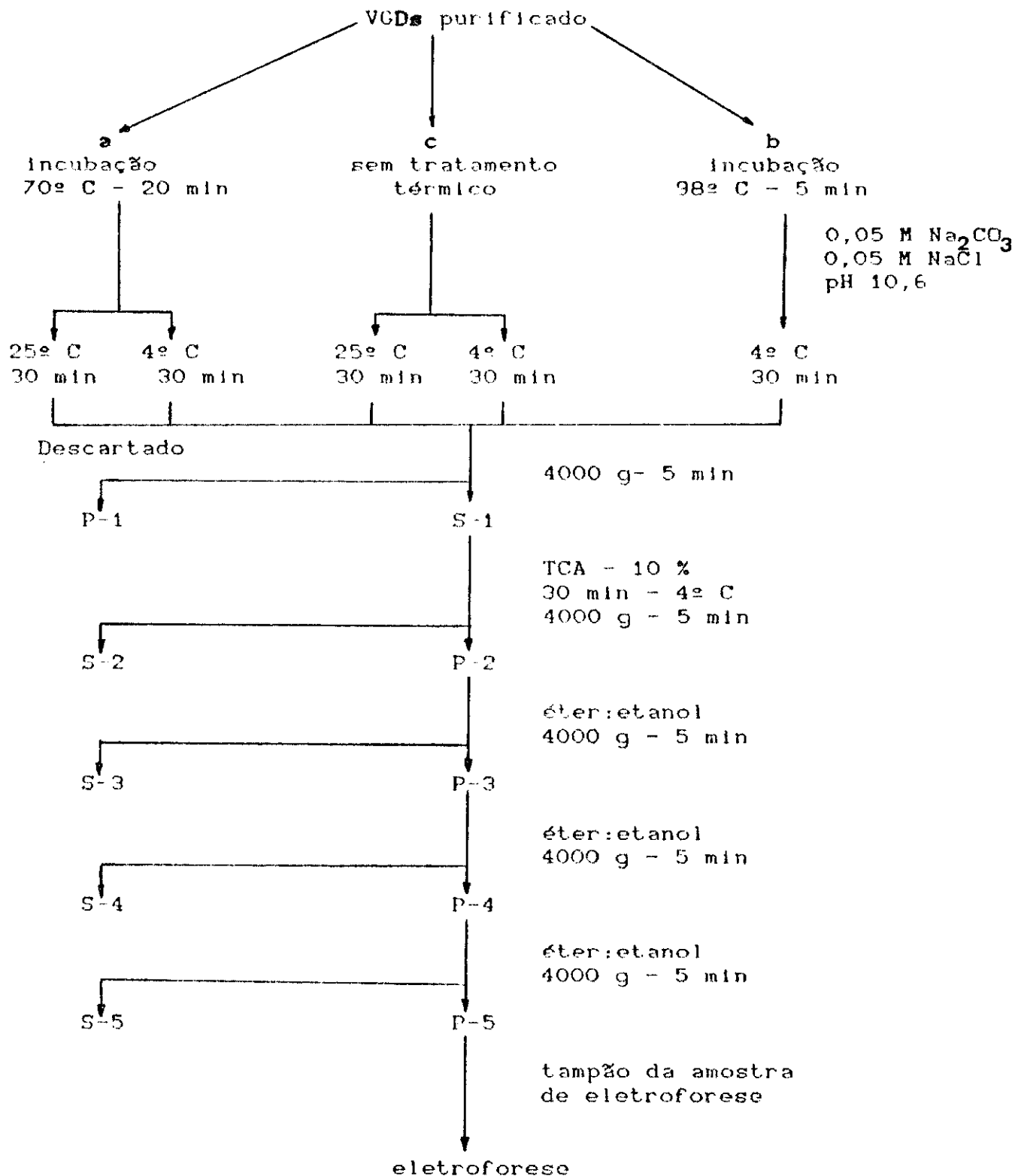
3.6.3 Solubilização com solução alcalina de carbonato de sódio

(Esquema 8)

As amostras de VGDs usadas nesse tipo de solubilização foram obtidas através da inoculação em massa das lagartas e purificadas por centrifugação diferencial. Essas amostras foram tratadas da seguinte maneira: a) 70° C por 20 min; b) 98° C por 5 min; c) sem tratamento térmico. A seguir, adicionou-se a estas amostras o mesmo volume de solução alcalina de 0,05 Na₂CO₃, 0,05 M NaCl pH 10,6. Nos tratamentos a e c variou-se a temperatura de incubação com a solução mencionada acima.

Após os diferentes tratamentos as amostras foram centrifugadas a 4000 g por 5 min. O precipitado (P-1) foi descartado e ao sobrenadante (S-1) foi adicionado o mesmo volume de TCA 20 % numa concentração final de 10 %, e foi incubado a 4° C por 30 min. O sobrenadante (S-2) foi descartado e o precipitado (P-2) foi ressuspendido em éter:etanol e centrifugado a 4000 g por 5 min. O sobrenadante (S-3)

ESQUEMA 8. Processo de dissolução da cápsula protéica de VGDs utilizando-se solução alcalina pH 10,6 com diferentes temperaturas.



foi descartado e o precipitado (P-3) ressuspensionado em éter:etanol e centrifugado a 4000 g por 5 min. Repetiu-se esse procedimento até a obtenção do precipitado (P-5) que foi ressuspensionado no tampão da amostra de eletroforese (Esquema 8).

3.7 Eletroforese de proteína viral em gel de poliácrlamida e SDS

As eletroforeses foram realizadas em aparato vertical, com a placa de gel medindo 16,5 x 14,0 x 0,15 cm.

A metodologia empregada no preparo dos géis, tampões e amostras foi descrita por LAEMMLI (1970); neste trabalho utilizou-se também uma modificação na qual adicionou-se uréia ao gel.

Nos anexos de 1 a 8 encontram-se respectivamente composição das soluções estoques, composição dos tampões, composição das soluções corante e descorante e composição dos géis.

O tempo de duração das corridas eletroforéticas foi ao redor de 4 h, utilizando-se corrente elétrica de 15 mA e 90 V até o limite do gel de empacotamento e 30 mA e 120 V até o final do gel de resolução. A concentração de acrilamida no gel de empacotamento variou de 3 a 5 %. O gel de resolução é muito mais concentrado (6,5 a 12 % de acrilamida) que o primeiro e é nele que a amostra vai se separar, mos-

trando as bandas protéicas que a compõem, segundo seus pesos moleculares.

Após a corrida o gel é retirado da placa e corado por no mínimo 4 h na solução corante. Em seguida, é colocado na solução descorante, sendo que esta solução é trocada várias vezes; depois de descorado mede-se a distância das bandas dos padrões e calcula-se o R_f , para em seguida, medir-se as bandas das amostras. A partir dos padrões é possível concluir o PM das proteínas das amostras testadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Inoculação individual e massal

As lagartas inoculadas através da inoculação massal apresentaram poucos sintomas de infecção e muitas destas, retiradas das caixas, mostraram-se escuras e desfazendo-se, provavelmente contaminadas por bactérias.

A contaminação pode ocorrer na abertura das caixas para o exame, pois a dieta é um meio rico para o desenvolvimento de microorganismos como fungos e bactérias, contaminando assim as lagartas que dela se alimentarem.

Na inoculação individual as lagartas apresentaram os sintomas anteriormente descritos para outras espécies como: mudança de coloração, letargia, parada de alimentação, estando muito infectadas pelo VGDs.

Comparando-se os dois processos nota-se que a infecção é mais facilmente observável na inoculação individual. Neste tipo de inoculação pode-se, conhecer, além do mais, o quanto de vírus a lagarta comeu, já que são transferidas para os tubos apenas as lagartas que se alimentaram de toda dieta, e o volume e a concentração do vírus aplicado é conhecida. Diferentemente, na inoculação massal, onde a aplicação é feita com um pulverizador de plantas, é difícil precisar o quanto a lagarta comeu de dieta contaminada.

A inoculação massal é vantajosa pois trabalha-se com grande número de lagartas de uma só vez, tornando o trabalho de inoculação mais fácil. Assim, na obtenção de vírus para esse trabalho deu-se preferência para inoculação individual, já que se torna possível observar os sintomas de infecção e também a quantidade de vírus com que a lagarta foi contaminada.

4.2 Purificação do cristal do vírus

4.2.1 Purificação com deoxicolato de sódio

Nas purificações do VGDs (Esquema 1) com deoxicolato de sódio e centrifugação em gradiente de sacarose foram encontradas duas bandas localizadas a 1 e 4 cm do menisco, sendo assim denominadas bandas B-1 e B-2 respectivamente (Figura 1, A).

Essas bandas foram observadas em microscópio de contraste de fase e eletrônico, utilizando-se coloração negativa com acetato de uranila, para confirmação da presença do VGDs.

A observação em microscopia eletrônica confirmou o anteriormente observado em microscópio de contraste de fase. A banda B-1 apresentou algumas partículas virais (VG), células de lagartas e, em algumas purificações, notou-se a presença de bactérias. A banda B-2, localizada próxima ao fundo do tubo, ao redor da concentração de sacarose de 56 a 59 %, mostrou grande quantidade de vírus e a ausência de contaminantes de quaisquer espécie (Figura 2).

As purificações posteriores do VGDs foram realizadas segundo o esquema 1, visto que essa sequência apresentou como resultado o VGDs sem qualquer contaminante, evidenciando, portanto, ser um bom método para a obtenção do vírus puro para ser utilizado em testes biológicos e eletroforeses.

FIGURA 1. Purificação empregando-se deoxicolato de sódio (A) e triton X-100 (B). A figura mostra as diferentes bandas encontradas quando as amostras foram centrifugadas em gradiente de sacarose.

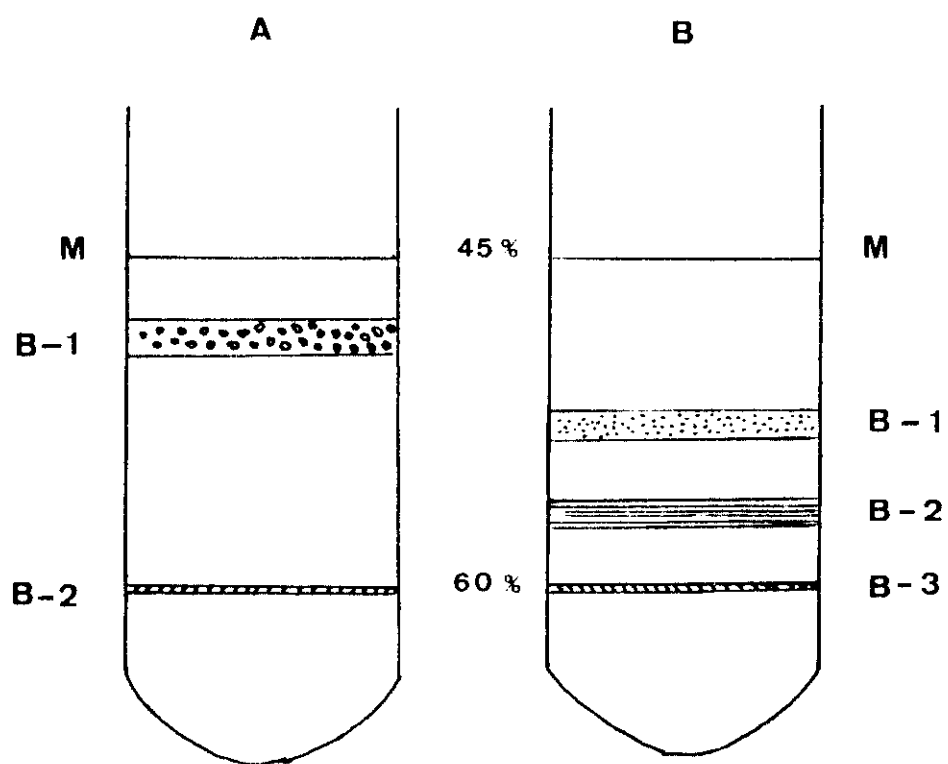
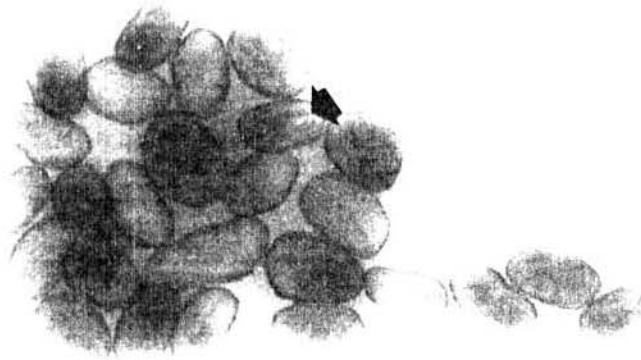


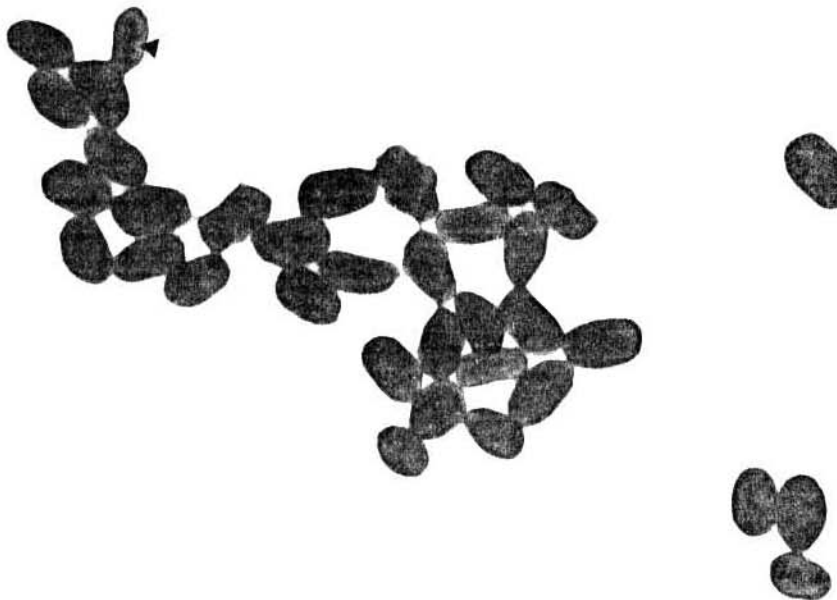
FIGURA 2. Micrografia da banda B-2 do tubo A, mostrando o VGDs purificado sem a presença de contaminantes, **A** (35200 x), **B** (29040 x). A seta mostra o nucleocapsídeo do VGDs, este apresenta forma de bastão. (As amostras observadas no microscópio eletrônico foram coradas com acetato de uranila).

A

49



B



A obtenção do VGDs próximo à região de maior concentração de sacarose (ao redor de 58 %) é semelhante ao resultado obtido por TWEETEN e cols (1977) na purificação de Vírus de Granulose de *Plodia interpunctella* (VGPI), em que este apresentou densidade de 1,271 g/cm³ que corresponde à concentração de sacarose de 57 %.

A purificação do VGDs foi realizada empregando-se modificações da metodologia descrita pelos pesquisadores acima citados, já que estes utilizaram 0,1 M de Tris-HCl pH 7,8 para ressuspender as amostras de VGPI. Quando utilizamos este procedimento para ressuspender o precipitado (P-6) das duas bandas (Esquema 1), seguindo-se a observação destes em microscópio eletrônico, notamos a presença das partículas de VGDs muito agregadas, dificultando a visualização (banda B-2). A agregação de partículas virais, com o uso de tampão Tris-HCl é descrita para alguns vírus de plantas (GASPAR, J.O.; comunicação pessoal).

As amostras do precipitado (P-6) da banda B-2, que se apresentaram agregadas, foram diluídas em água destilada e centrifugadas (16000 g - 30 min). O precipitado obtido foi ressuspendido em água destilada e novamente observado em microscopia eletrônica, sendo que as partículas virais apresentaram-se desagregadas. Nas purificações posteriores todos os precipitados (P-6) (Esquema 1) foram ressuspendidos em água destilada.

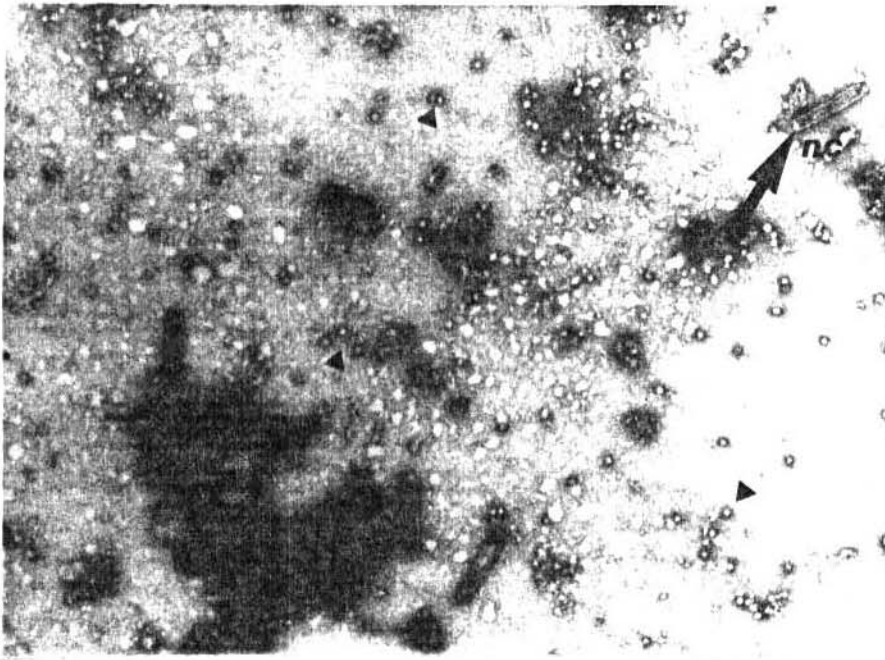
A presença de aglomerados de VGDs provavelmente não influencia a virulência destes, mas as partículas agregadas tornam difícil a quantificação dos mesmos, dificultando também o uso de concentrações determinadas para a inoculação individual ou mesmo para massal.

4.2.2 Purificação com Triton X-100

Na purificação do VGDs com Triton X-100 (Esquema 2) e centrifugação em gradiente de sacarose, foram encontradas 3 bandas localizadas à 1,8, 3,1 e 4,3 cm do menisco, estas foram denominadas bandas B-1, B-2 e B-3 respectivamente (Figura 1, B).

As três bandas foram observadas em microscópio de contraste de fase e microscópio eletrônico. Observou-se que a amostra da banda B-1 não apresentava partículas virais, apenas contaminantes. Na banda B-2 (Figura 3) notou-se a presença de nucleocapsídeos de VGDs, sem sua cápsula protéica. Nessa banda foram encontradas partículas que se assemelham em forma e tamanho a um vírus de inseto denominado Densovírus. Esses densovírus já foram descritos anteriormente em lagartas de *D. saccharalis* (MEYNADIER e cols, 1977), podendo, porém ser macromoléculas ou artefatos da microscopia eletrônica. Amostras da banda B-2 foram inoculadas em lagartas de *D. saccharalis* ocasionando sua morte, embora o experimento tenha sido realizado com pequeno número de lagartas (50) (CAVALLARO, 1988). É necessário, além de um ensaio com um maior número de indivíduos, uma análise dos tecidos das lagartas

FIGURA 3. Micrografia da banda B-2 do tubo B, mostrando nucleocapsídeos do VGD₈, sem a cápsula protéica (nc). Pode-se observar também partículas que assemelham-se a densovírus (DNV) (35200 x).



infectadas para confirmar se o suposto DNV se multiplica nestes tecidos ou se o responsável pela infecção e mortalidade destas foram os nucleocapsídeos do VGDs.

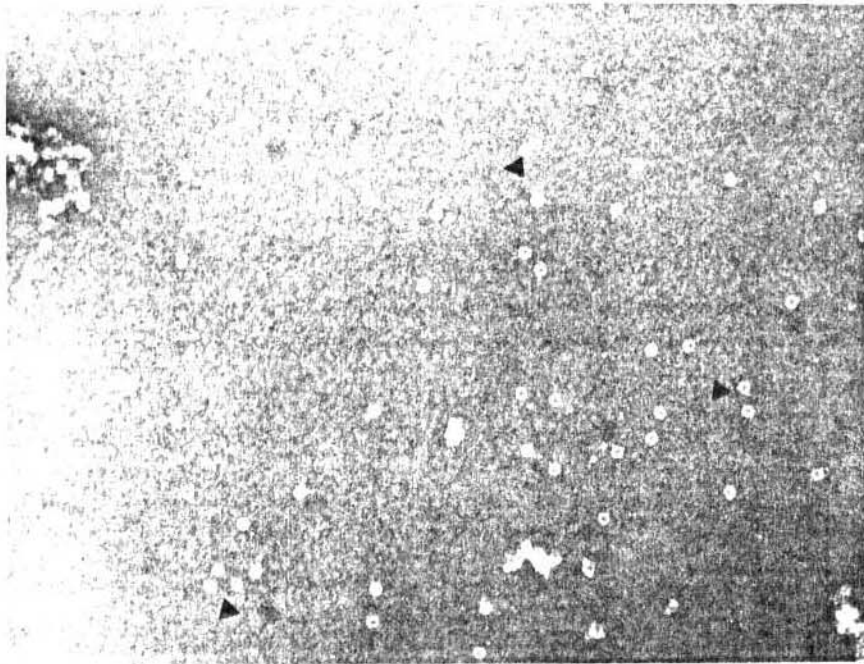
A banda B-3 não apresentou o VGDs completo, nem seu nucleocapsídeo, nem as estruturas semelhantes aos densovirus. As estruturas aqui observadas, e também em amostras do sobrenadante do colchão de sacarose 50 % (Sob-50), foram diferentes da anteriormente notadas na banda B-2. As partículas eram muito menores, podendo ser capsídeos de densovirus, ou até macromoléculas que fazem parte da cápsula ou mesmo dos nucleocapsídeos de VGDs.

Diferentemente da purificação com deoxicolato de sódio, na purificação com triton X-100 não foi observado o VGDs completo, em qualquer uma das bandas. A ausência da cápsula protéica nos nucleocapsídeos observados na banda B-2, faz supor que o triton X-100, ou mesmo sua concentração possa ter ocasionado a solubilização da cápsula protéica.

4.2.3 Purificação por centrifugação diferencial

Os VGDs purificados dessa forma nunca se apresentaram completamente puros no último precipitado das centrifugações, sempre foram observados contaminantes, como pequenas partículas, células de la-

FIGURA 4. Micrografia da amostra Sob-50 do tubo de colchão de sacarose, partículas encontradas que assemelham-se a capsídeos de densovírus (118.125 x) (seta).



gatas e algumas vezes bactérias. Uma nova centrifugação desses precipitados (P-2) (Esquema 3) à uma velocidade baixa, seguida de alta, não conseguiu retirar os contaminantes.

Aumentou-se a velocidade na segunda centrifugação (de 8000 para 16000 g) e também aumentou-se o tempo da baixa, sem que fossem obtidos resultados satisfatórios.

A centrifugação diferencial foi utilizada depois da maceração das lagartas inoculadas massalmente, sendo que sempre se trabalhou com um grande volume de amostra a ser purificada.

Os contaminantes não podem ser admitidos quando trata-se do emprego de técnicas bioquímicas para estudo de proteínas, uma vez que estes influiriam nos resultados a serem obtidos. Dessa forma, apesar da maior dificuldade de trabalhar-se com pequeno número de lagartas inoculadas individualmente e, por via de consequência com menor quantidade de vírus, optou-se pela purificação do VGDs através da centrifugação diferencial, seguida de colchão e gradiente de sacarose.

Quando se emprega o processo de purificação seguindo-se o esquema 1, trabalha-se, ao contrário da inoculação massal, com pequeno volume de amostras de vírus. Sendo o volume da amostra muito grande é praticamente impossível que toda solução seja submetida à centrifugação em colchão e gradiente de sacarose, já que no colchão utiliza-se 4 ml de solução de vírus em cada três tubos centrifugados (Rotor SW 25).

A produção em massa não inviabiliza o uso de amostras de vírus obtidos pela centrifugação diferencial na sua utilização em técnicas bioquímicas. Entretanto, é necessário trabalhar apenas com uma pequena parte do volume total de amostra obtido e a passagem deste pelo colchão e gradiente de sacarose.

Os VPNAg inoculados em lagartas de *D. saccharalis*, individualmente, também foram purificados por centrifugação diferencial e os sobrenadante (S-2) e o precipitado (P-2) foram quantificados apresentando pela ordem: $1,83 \times 10^9$ c/ml num volume total de 25 ml (quantidade total de vírus: $4,58 \times 10^{10}$ cristais) e $3,04 \times 10^9$ c/ml, sendo o volume total de 4 ml (quantidade total de vírus: $1,22 \times 10^{10}$ cristais).

Além de encontrar-se uma grande quantidade de vírus no sobrenadante (S-2), que seria descartado, também notou-se a presença de contaminantes tanto neste sobrenadante quanto no precipitado (P-2); essas duas amostras foram unidas para serem filtradas e, em seguida, foram submetidas novamente à centrifugação (12000 g - 30 min).

A observação do sobrenadante (S-3) e do precipitado (P-3) em microscópio de contraste de fase revelou a presença de algumas células de lagartas e também de poucas partículas virais do VPNAg no sobrenadante (S-3) e grande quantidade destes no precipitado (P-3).

A purificação do VPNAg inoculado em *D. saccharalis* foi realizada baseando-se na metodologia descrita por PAVAN e cols (1981), que empregaram 500 g - 2 min, seguido de 8000 g - 20 min.

Na purificação do VPNAg, realizada neste trabalho, utilizando-se o procedimento mostrado no esquema 4, o tempo de centrifugação na menor velocidade foi aumentado de 2 para 15 min para permitir maior adesão dos restos de tecidos das lagartas à parede do tubo, sendo que o g utilizado permaneceu o mesmo. O tempo e a velocidade de centrifugação no segundo ciclo foram aumentados em relação à metodologia descrita pelos pesquisadores acima, permitindo uma perda menor no sobrenadante.

O VPNAg isolado através da centrifugação diferencial, diferentemente do VCDs purificado dessa mesma forma, apresentou-se muito mais limpo e puro neste último. Esse resultado pode ser justificado pelo fato de na purificação do VPNAg ter sido utilizado 8000 g para precipitá-los, enquanto que para o VCDs, 16000 g, fazendo assim, com que precipitasse uma maior quantidade de contaminantes.

Ainda, em relação ao procedimento empregado na purificação do VPNAg (Esquema 4) não se utilizou qualquer detergente durante a maceração, por esta ter sido realizada com um pequeno número de lagartas. Dessa forma, a ausência do detergente pode ter prejudicado a quantidade de vírus obtido já que os detergentes auxiliam no desprendimento dos vírus dos tecidos (NEWTON, 1969). No entanto, não foi possível a verificação e quantificação dessa perda. Seria útil que em purificações posteriores de quaisquer vírus, mesmo trabalhando-se com poucas lagartas, fossem usados detergentes, quer o utilizado nesse trabalho para o VCDs (Esquema 1) e VCPi (TWEETEN e cols, 1977), quer o SDS usado por PAVAN e cols (1981) para o próprio VPNAg.

4.3 Limpeza do cristal viral

As lagartas infectadas massalmente tiveram seus vírus purificados por centrifugação diferencial e estes foram submetidos à limpeza do cristal.

A observação do último precipitado (P-7) em microscópio de contraste de fase mostrou contaminantes de lagartas e algumas vezes de pequenos aglomerados de cristais, provavelmente de uréia. Esses cristais persistiram nas amostras, mesmo quando a concentração de uréia foi diminuída. A quantidade de vírus observada nesses precipitados (P-7) sempre foi muito pequena.

A perda de vírus pode ter ocorrido parcialmente durante os passos da limpeza, devido a manipulação das amostras, e também pela velocidade utilizada para precipitação (8000 g) ser ineficiente.

A presença de contaminantes e a baixa concentração de vírus resultantes desse processo, fez com que este não fosse empregado rotineiramente como um passo para a obtenção do vírus "limpo" a ser empregado para as solubilizações.

O emprego de uréia, SDS e NaCl foi utilizado na purificação de VPN de *Porthetria dispar* (VPNPd) (McCARTHY & LIU, 1976). Esses purificados foram empregados na solubilização alcalina.

A utilização desses reagentes mostrou não ter grande importância, uma vez que relatos posteriores de purificação, suprimiram esse passo, mesmo os pesquisadores que se basearam na metodologia descrita por McCARTHY & LIU (1976) (MASKOS & MILTENBURGER, 1981). SUMMERS & SMITH (1978) e TWEETEN *e cols* (1977) também não utilizaram esse procedimento para purificação e limpeza dos vírus.

4.4 Solubilização do cristal viral

4.4.1 Solubilização com solução alcalina (solução de carbonato e solução de carbonato e EDTA)

A dosagem de proteínas do VCDs solubilizado em solução alcalina nunca chegou a 1mg/ml. Dessa forma, o gel eletroforético dessas amostras sempre mostrou pouca ou nenhuma resolução.

Pode-se associar a baixa concentração de proteínas à protease alcalina que degrada a proteína da matriz em pequenos peptídeos (EPPSTEIN & THOMA, 1975; EPPSTEIN *e cols*, 1975; EPPSTEIN & THOMA, 1977; KOZLOV *e cols*, 1975a, b; McINTOSH & PADHY, 1976; McCARTHY & LIU, 1976; PAYNE & KALMAKOFF, 1978; TWEETEN *e cols*, 1978; SUMMERS & SMITH, 1978).

Amostras de VGDs foram pré-aquecidas como forma de inativação dessas enzimas; esse procedimento, porém, não alterou os resultados obtidos anteriormente, ou seja a concentração de proteína continuou sendo pequena.

Supondo-se a existência de uma protease associada ao VGDs, as diferentes temperaturas e tempos de aquecimento das amostras podem não ter sido suficientes para inativá-la.

O pré-aquecimento foi utilizado para solubilização alcalina do VPN de *Trichoplusia ni* (SUMMERS & SMITH, 1975) com resultados positivos.

Sabe-se também que existe uma grande variação em relação ao tempo e temperatura de incubação e também no pH empregado para a solubilização alcalina da matriz protéica de diferentes vírus (CONSIGLI e cols, 1983).

A baixa concentração de proteínas nas amostras de VGDs solubilizadas em soluções alcalinas de carbonato podem ter ocorrido por vários fatores como a presença da protease alcalina, e a ineficiência do pré-aquecimento como método de inativação desta, a perda parcial de vírus em alguns passos da limpeza do cristal - visto que as amostras solubilizadas alcalinamente passaram por esse procedimento - e também pelas amostras apresentarem desde os passos iniciais dos procedimentos uma baixa quantidade de vírus.

A ausência de uma resposta concreta para essas questões e a ineficiência das variações nos procedimentos, fizeram com que fosse empregada uma solução alternativa, a solubilização em ácido.

4.4.2 Solubilização com TCA

A observação visual do precipitado (P-1) (Esquema 7) mostrou a atuação do TCA sobre a amostra de VGDs, pela grande quantidade de precipitado. Sabendo-se que o TCA precipita proteínas a efetividade do método foi observada quando as amostras de VGDs foram submetidas à eletroforese, mostrando grande quantidade de proteína no gel.

Dessa forma, o mesmo procedimento foi utilizado em VPNAc, VPNAg, VPNH₂ e VPNTn observando-se também grande quantidade de precipitado (P-1), sendo este dependente das concentrações iniciais das amostras. O VPNH₂ cuja quantidade inicial de vírus foi de $1,8 \times 10^8$ cristais; de VPNAc, $2,5 \times 10^9$ cristais apresentaram maior quantidade de precipitado que as amostras de VPNTn e VPNAg, cujas quantidades iniciais foram menores.

A lavagem dos precipitados com éter:etanol mostrou melhores resultados que a ressuspensão desses com esta solução, pois provocava a formação de grumos e aderência de material na pipeta Pasteur. Quando da adição do tampão da amostra de eletroforese, houve amostras

que modificaram a coloração desse tampão indicando a presença do ácido. As amostras foram, então, lavadas com tampão Tris HCl 0,1 M pH 7,8 e após foi novamente adicionado o tampão da amostra.

4.5 Eletroforese de proteínas virais de VPNAc, VPNAg, VPNH₂, VPNTn e VGDs

Como resultado de uma corrida eletroforética podemos observar a figura 5 que mostra, esquematicamente, as bandas dos padrões de PM e também as bandas protéicas da amostra de VGDs solubilizada em ácido. Nessa corrida eletroforética foram obtidas sete bandas com os seguintes PM: 69000, 63000, 53500, 31500, 26000, 21000 e 15000 d. A figura 6 mostra o gráfico de determinação de PM, apontando o principal componente do VGDs.

Nas eletroforeses iniciais não se utilizaram os padrões de PM para a determinação dos pesos moleculares das proteínas do VGDs, pois foram necessárias muitas adaptações antes de encontrarmos as condições ideais para a realização das eletroforeses. Mesmo assim, as bandas do VGDs sempre resolveram de forma semelhante e a banda maior e mais densa foi encontrada na mesma posição em todos os géis.

A concentração de acrilamida no gel de resolução foi variada entre 6,5 e 10 %, sendo que nas diferentes concentrações o núme-

FIGURA 5. Esquema de corrida eletroforética mostrando as bandas do VGDs com seus respectivos PMs (2) e dos padrões (1), (o) origem.

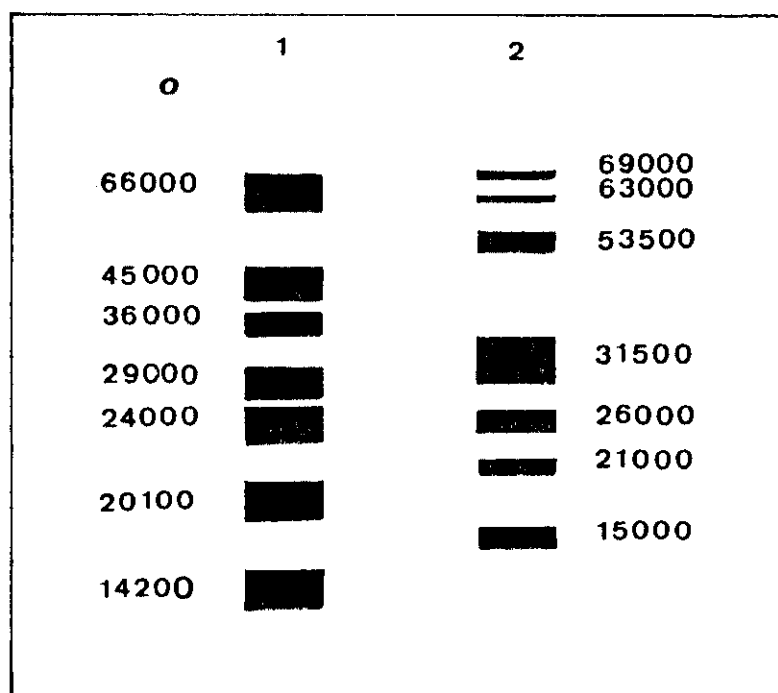
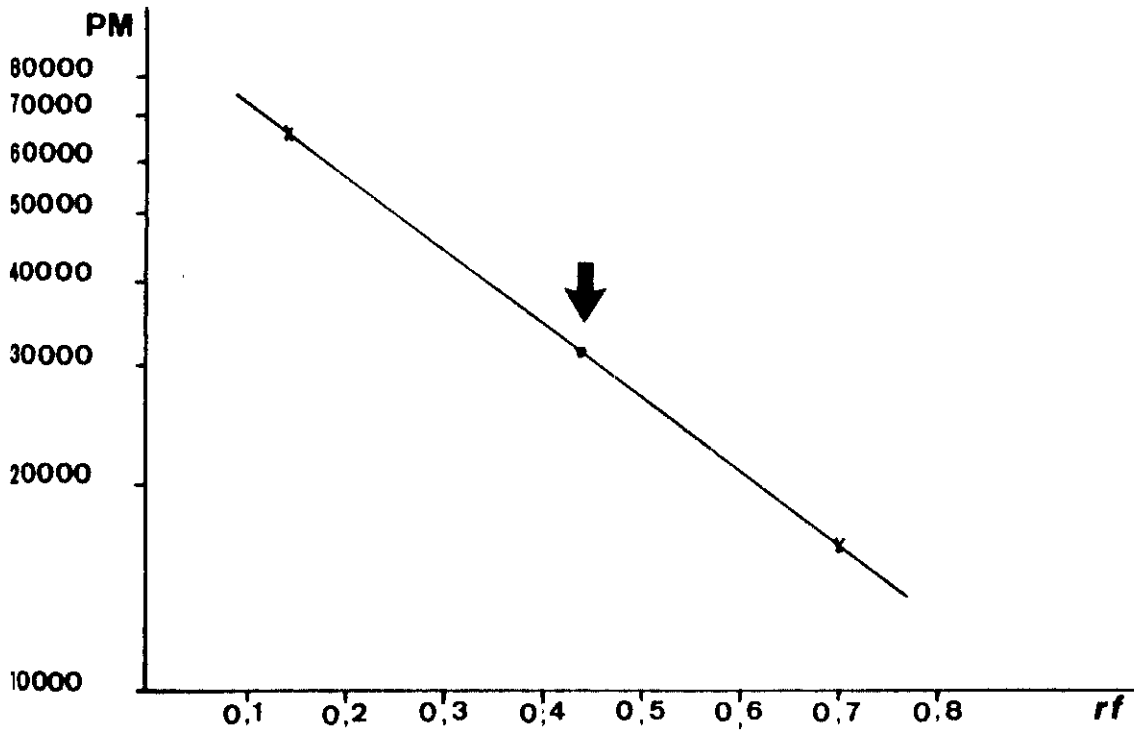


FIGURA 6. Gráfico de determinação de PM mostrando, a banda mais densa do VCDs, granulina.



ro de bandas encontradas foi igual, mesmo quando se variou o volume das amostras de VGDs aplicadas.

Nos dois tipos de géis empregados, o que apresentou melhor resolução foi gel de poli(acrilamida e SDS). A adição de uréia foi empregada na tentativa de melhorar a resolução e as condições ideais para a realização das eletroforeses. Embora tenha apresentado uma boa resolução, leva desvantagem em relação ao gel em que se utiliza poli(acrilamida e SDS).

Em relação ao tipo de tratamento dado às amostras de VGDs antes destas serem submetidas à eletroforese, as amostras que apresentaram melhor resolução foram aquelas tratadas com TCA.

Quando seguiu-se o procedimento de solubilização do VGDs com solução alcalina de carbonato de sódio e NaCl e também quando nesta solução foi adicionado EDTA, as amostras testadas não resolveram nos dois tipos de géis utilizados.

As amostras de VPNAc e VPNH₂, quando solubilizadas com TCA, não mostraram boa resolução nas primeiras eletroforeses corridas por apresentarem-se muito concentradas. Embora, a concentração de proteínas nessas amostras não fosse conhecida, foi acrescentado às amostras um volume cinco e dez vezes maior de tampão da amostra de eletroforese. As amostras que apresentaram melhor resolução, quando submetidas novamente à eletroforese, foram as mais diluídas (1:10) tanto para VPNAc quanto para VPNH₂.

As amostras de VPNAc em qualquer volume aplicado revelaram sempre quatro bandas com os seguintes PM: 65000, 32000, 27000 e 10500 d, sendo que a banda maior foi a de 32000 d. A amostra de VPNH₂ mostrou 5 bandas com: 60000, 33000, 24500, 20500 e 10500 d, sendo que a banda maior e mais densa foi a de 33000 d. A representação esquemática dessa corrida eletroforética pode ser observada na figura 7.

As amostras de VPNAg e VPNTn que foram também tratadas com TCA continham menor quantidade de vírus. Devido a esse fato o precipitado (P-1), logo após a exposição ao TCA, sempre foi muito menor que das amostras de VPNAc, VPNH₂ e também de VGDs. Sendo assim, as amostras de VPNAg e VPNTn sempre foram ressuspensas (P-6) num volume menor de tampão da amostra de eletroforese. Independente do volume de amostra aplicado no gel e também no qual foi ressuspensa, nos géis corridos sempre foi resolvida uma única banda de 32000 d, tanto para VPNAg, quanto para VPNTn (Figura 8). Como é sabido a proteína da cápsula é quantitativamente maior que as outras proteínas que compõe um baculovírus. Dessa forma, mesmo trabalhando-se com pequenas concentrações de vírus para tratamento de dissolução seguido de eletroforese, essas proteínas foram as que se mostraram mais nítidas no gel.

Juntamente com esses dois foi tratada novamente uma amostra de VGDs que apresentou as mesmas bandas mostradas na figura 5.

Em relação às primeiras corridas eletroforéticas, observou-se que a maior fração protéica do VGDs - que foi resolvida nos

FIGURA 7. Esquema eletroforético onde foram corridas as amostras de:
1) Padrão de PM, 2) VPNH~~z~~ e 3) VPNA~~c~~, tendo sido os dois ví-
rus solubilizados em TCA, (o) origem.

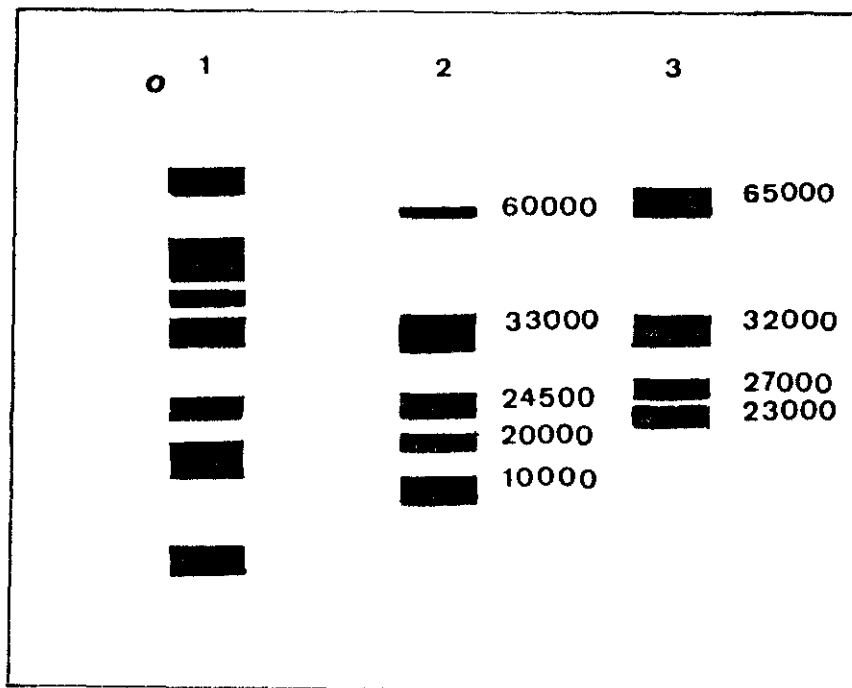
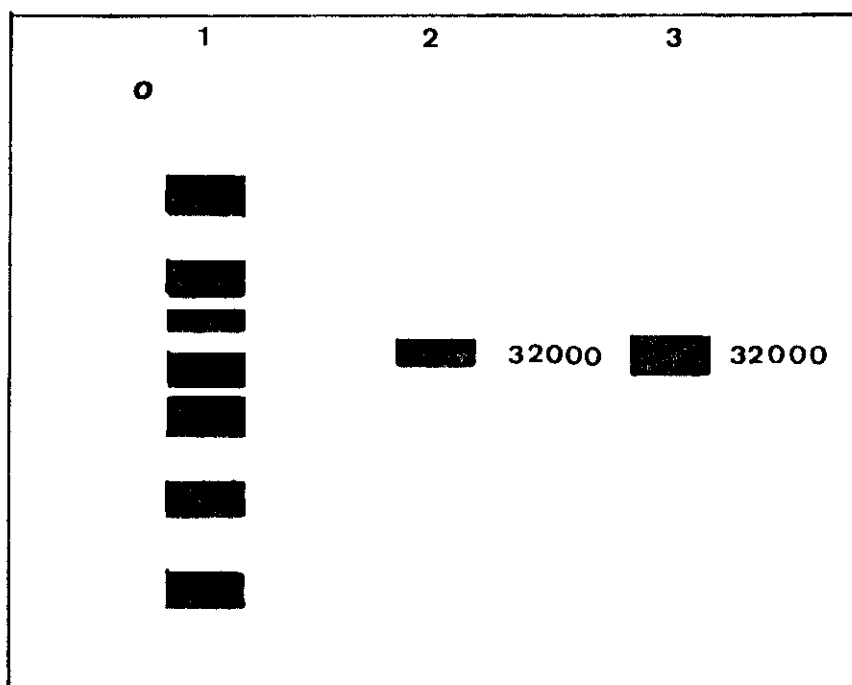


FIGURA 8. Esquema eletroforético onde foram corridas as amostras de:
1) Padrão de PM, 2) VPNT_n e 3) VPNA_g, todas as amostras de
vírus foram tratadas com TCA, (o) origem.



géis e que apresentou 31500 d - encontrava-se dentro da faixa de variação de PM descrita para proteínas da matriz de vários baculovírus testados por CROIZER & CROIZER (1977) e revisados por HARRAP & PAYNE (1979) e TWEETEN *e cols* (1981). Sendo assim, supomos ser essa fração de 31500 d a banda correspondente à proteína da cápsula do VGDs (figura 6).

Esse dado foi questionado, uma vez que, como se afirmou anteriormente, a grande maioria dos pesquisadores empregaram solução alcalina para obtenção da proteína da matriz. A partir desse resultado foram então testados outros vírus que se encontravam na coleção do laboratório (VPNAc, VPNAg, VPNH₂ e VPNTn), para confrontação dos resultados obtidos através do tratamento com TCA e os empregados por outros autores.

O VPNTn revelou uma única banda de 32000 d; comparando-se aos dados encontrados na literatura, pode se observar que existe uma grande variação de autor para autor. EPPSTEIN & THOMA (1975), EPPSTEIN *e cols* (1975) e EPPSTEIN & THOMA (1977) encontraram a proteína da matriz de VPNTn de 28000 a 28300 d; SUMMERS & SMITH (1976), 28000 d; CIBULSKY *e cols* (1975 a, b), 26700 d; CROIZER & CROIZER (1977), 31400 d; SUMMERS & SMITH (1978), 31000 d.

Quanto ao VPNAc, tratado com TCA apresentou uma de suas bandas maior e mais densa com 32000 d; comparado-se tal resultado com a literatura, esta proteína apresenta uma variação de 28000 a 33000 d, sendo que SUMMERS & SMITH (1978) encontraram 28000 d, CROIZER & CROIZER (1977), 30000 d e SMITH *e cols* (1983), 33000 d.

Em relação ao VPNH₂, tratado com TCA, a maior fração proteica apresentou 33000; a literatura descreve uma proteína com 31300 d (CROIZER & CROIZER, 1977) e 27000 d (SUMMERS & SMITH, 1978).

CROIZER & CROIZER (1977) quando estudaram 23 baculovírus com diferentes proteínas da matriz, utilizaram várias técnicas para a solubilização destas, dentre as quais a descrita por KOZLOV e cols (1974, 1975a, b) que utilizaram ácido acético 67 % e solução alcalina de carbonato de sódio e cloreto de sódio para VPN de *Bombyx mori* (VPNB_m) e *Galleria mellonella* (VPNG_m). Tanto as amostras de VPNB_m quanto as de VPNG_m, quando solubilizadas em ácido, apresentaram um único componente de 28000 d e quando tratadas em solução alcalina apresentaram essa banda como componente principal e bandas com maior e menor PM. A diferença do número de bandas encontradas nos diferentes tratamentos, sugerem os autores, é devida à clivagem ou agregação dessas proteínas face ao tempo de incubação, temperatura e pH da solução alcalina que ativariam a enzima protease alcalina, também descrita para outros vírus. Através desses experimentos pode-se observar que tanto o tratamento ácido quanto o alcalino sempre originaram a banda principal de 28000 d.

No caso dos tratamentos feitos com TCA 10 %, o fato de no gel aparecerem mais bandas que o componente principal tanto de VPNAc, VPNH₂ e VGDa, pode ter sido devido à concentração destes, diferentemente do VPNAg e VPNTn que apresentavam-se em uma concentração menor.

A presença de outras bandas não prejudica a identificação da proteína da matriz, uma vez que sendo esta o maior componente protéico do vírus, a banda maior e mais densa está diretamente relacionada à granulina ou poliedrina dos vírus estudados.

Em relação às comparações dos resultados obtidos para poliedrina de VPNAc, VPNAg, VPNH₂ e VPNTn obtidas em nosso laboratório e de outros pesquisadores, se consideradas discrepâncias, podem ser explicadas de algumas formas.

Na eletroforese de poli(acrilamida), obtém-se o PM relativo das proteínas, já que o PM real é conseguido através do tamanho do gene (WILSON, 1986); sendo assim, esse peso molecular relativo está sujeito a alterações devido às técnicas empregadas para sua obtenção. Dessa forma, alteração nas concentrações de acrilamida, diferenças no tampão da cuba e da amostra, emprego ou não de uréia, tipo de aparato utilizado (placa ou tubo), tempo de corrida, corrente elétrica, tipo de corante e reagentes alteram o PM de uma mesma proteína. Devem ser levados em consideração, ademais, os dados obtidos para a construção da reta para a determinação dos PMs (MARUNIAK, 1986).

Uma proteína pode, então, encontrar-se dentro de uma faixa de variação dependendo do método empregado. A variação no PM de proteínas devido ao emprego de metodologias diferentes não foi descrita em relação à vírus de insetos. Relata-se essa variação em zeínas, que foram classificadas numa classe de proteínas com PM de 22000 a 24000 d. A classe mostrou ser uma única proteína com variação devido às técnicas empregadas (WILSON, 1986).

São vários os autores citados em relação a técnicas eletroforéticas nos diferentes trabalhos relacionados por HARRAP & PAYNE (1979), entre estes estão: DAVIS (1964), MAIZELL (1969), LAEMMLI (1970).

Na determinação do PM de proteínas do VPNTn, inclusive a proteína da matriz, SUMMERS & SMITH (1978) empregaram a metodologia descrita por LAEMMLI (1970) enquanto que EPPSTEIN & THOMA (1975), EPPSTEIN e cols (1975) e EPPSTEIN & THOMA (1977) basearam-se em DAVIS (1964).

CROIZER & CROIZER (1977) estudaram os mesmos vírus relacionados nesse trabalho empregando a técnica descrita por MAIZELL (1969). Os dados obtidos em nosso laboratório seguiram o sistema descrito por LAEMMLI (1970) e também uma modificação desse sistema adicionando-se uréia ao gel.

A pequena discrepância existente em relação aos nossos dados quanto às poliedrinas de VPNAc, VPNAg, VPNH₂ e VPNTn e a literatura conhecida, não impedem a possibilidade de reconhecê-las através de eletroforese em gel de poli(acrilamida e SDS. Isto, significa que a utilização de soluções alcalinas para a obtenção da proteína da matriz pode ser substituída, quando na impossibilidade de utilizá-la, pelo emprego de TCA, uma vez que como relatado por KOZLOV e cols (1974, 1975a, b), tanto a solubilização alcalina, quanto ácida resultam num componente principal correspondente à proteína da matriz.

Pode-se considerar também que os vírus empregados nesses experimentos, com exceção do VPNAc, foram obtidos através da passagem seriada destes através do hospedeiro alternativo *Diatraea saccharalis*. Não é relatado que ocorram modificações ao nível de proteína da matriz quando se altera a especificidade do vírus ao inseto (VLAK & ROHRMANN, 1985). Estudos recentes mostram que ocorrem alterações ao nível da molécula de DNA (VLAK & ROHRMANN, 1985). Se alterações aos níveis protéicos existem, quando um vírus isolado de um determinado inseto "adapta-se" a outro, é provável que estas alterações ocorram em proteínas que compõem o envelope viral, já que é este que une-se à membrana celular das células do intestino do inseto para ser iniciado o processo de infecção (MAZZONE, 1985).

O emprego de TCA para obtenção e reconhecimento da proteína da cápsula do VGDs mostrou-se eficiente. Entretanto, é preciso considerar que proteínas com diferentes composições de aminoácidos podem ter o mesmo PM. Dessa forma, a afirmação de que duas proteínas com os mesmos PMs são proteínas idênticas não pode ser efetuada. Sendo assim, é possível empregar a eletroforese como uma técnica para identificação de proteínas de baculovírus, levando-se em consideração a necessidade do emprego de outras técnicas para a diferenciação entre dois vírus ou mesmo para a afirmação de que duas amostras coletadas em locais diferentes contenham o mesmo vírus.

A interação da eletroforese com outras técnicas, como a serologia, o sequenciamento de aminoácidos, eletroforese de DNA seria

ideal para a comparação e diferenciação de isolados e também de vírus que tenham-se adaptado a um determinado hospedeiro sem contudo, ser original da determinada espécie. É importante também essa interação no caso do uso desses vírus como inseticida biológico. A obtenção de um patógeno eficiente e a certeza da disseminação no meio ambiente de apenas o patógeno em questão, seria favorecido pelas técnicas de reconhecimento acima descritos.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho objetivou a padronização de técnicas visando a caracterização de proteínas do Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis* (VGDs).

Várias metodologias de purificação foram testadas para o VGDs, até a definição do padrão ideal a ser seguido, para se obter o vírus livre de contaminantes. Algumas variações experimentadas mostraram-se ineficientes, pois não foi obtido o vírus puro. A purificação do VGDs através de centrifugação diferencial apresentou, como contaminantes, restos de tecidos e células de lagartas e, algumas vezes, bactérias.

O emprego de triton X-100, como detergente, fez com que a cápsula protéica do VCD_s se solubilizasse durante os passos de sua purificação.

O esquema de purificação que se mostrou mais eficiente foi aquele em que o macerado de lagartas passou por um ciclo de centrifugação diferencial, seguida de centrifugação em colchão e gradiente de sacarose e, neste último, coletando-se a banda mais próxima à concentração de 58 %.

A observação das amostras de VCD_s em microscópio eletrônico mostrou que estas, quando ressuspensas em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,8, apresentavam as partículas virais agregadas, e separadas e nítidas quando ressuspensas em água destilada.

O emprego de soluções alcalinas na solubilização da cápsula protéica do VCD_s não apresentou o resultado esperado, ou seja, a obtenção da granulina. Mesmo variando-se o tempo e a temperatura de incubação das amostras, a concentração de proteínas apresentou-se sempre muito baixa.

A solubilização do VCD_s com TCA apresentou uma concentração de proteínas maior, possibilitando o reconhecimento da granulina, quando as amostras foram corridas em eletroforese.

Foi testada a solubilização com TCA em vírus que já tinham o peso molecular de suas respectivas proteínas da matriz conhecido através de solubilização alcalina (VPNAc, VPNAg, VPNH₂ e VPNTn). Houve uma pequena variação que não pode ser atribuída ao método de obtenção destas, e sim à variabilidade de metodologias empregadas em eletroforese.

Dessa forma, pode-se concluir que com o emprego de TCA é possível obter-se as proteínas do vírus e também determinar o seus pesos moleculares.

Em relação à metodologia de eletroforese, a que mostrou melhor resolução foi a de poliacrilamida e SDS sem o emprego de uréia. Através da análise de padrões eletroforéticos pode-se obter um padrão das proteínas do VGDs apresentando a granulina como principal componente com um peso molecular de 31500 d.

6. SUMMARY AND CONCLUSIONS

This study aimed a padronization of methodology envisaging the characterization of the proteins of the *Diatraea saccharalis* Granulosis Virus (DsGV).

Several methodologies for the purification of DsGV were tested, to obtain virus free of contaminants. Some variations in the protocol experimented were not efficient resulting in contaminated preparations. The purification of DsGV through differential centrifugation showed tissue and cells debris and bacteria as contaminants. The

use of triton X-100 as detergent solubilized the proteic capsule of DsGV during the purification steps.

The most effective methodology for purification was the homogenization of larvae followed by a cycle of differential centrifugation and by centrifugation in a sucrose cushion and gradient. The virus band is found at the sucrose concentration of 58 %.

The observation of the DsGV samples in electron microscope showed that the samples in Tris-HCl buffers formed bundles which were not formed when the samples were maintained in water.

The use of alkaline solutions to dissolve the proteic capsule of DsGV did not present the expected results in different incubation times and temperatures resulting in all cases in low concentration of the proteins. Better results were obtained with TCA which results in much higher yields of total protein.

To evaluate the method, a series of other baculoviruses were treated with TCA and the resulting protein profiles compared to those obtained by other authors using the alkaline treatment. The results were very similar showing that the method is a viable alternative procedure.

The electrophoresis methodology showing the best resolution of the proteins was that with polyacrilamide and SDS without urea.

The eletrophoretic profile of D₈GV proteins has been obtained and the main component can be identified as granulin having a molecular weight of 31500 d.

7. BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, L.C.; DEGASPARI, N.; PAVAN, O.H.O.; BOTELHO, P.S.M. & COLETI, J.T. Vírus de granulose da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabr.): avaliação de um bioinseticida em potencial. In: Congresso Nacional da Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil (Stab), 3, São Paulo. 1984. *Anais*. p. 289-92.
- BERGOLD, G.H. Die Isolierung des Polyeder Virus und die Natur der Polyeder. *Z. Naturf.*, 26: 122-47. 1947.
- BERGOLD, G.H. The molecular structure of some insect virus inclusion bodies. *J. Ultrastruct. Res.*, 8: 360-78. 1963

BILIMORIA, S.L. Taxonomy and Identification of baculoviruses. In: Granados, R.R. & Frederici, B.A., ed. **The biology of baculoviruses**, v. 1. Flórida, CRC Press, Inc. p. 37-59. 1986.

CARSTENS, E.B.; TJIA, S.T. & DOEFLER, W. Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with AcNPV. **Virology**, 99: 386-98. 1979.

CAVALLARO, A.C.; PAVAN, O.H.; PALOMARI, D.M. & ALMEIDA, L.C. Uma análise comparativa de dois isolados geográficos do Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis*. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso de Ciência**, 36, São Paulo. p. 36. 1984.

CAVALLARO, A.C.; PAVAN, O.H.; OLIVEIRA, A.R. & ALMEIDA, L.C. Métodos de purificação do Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis*. In: **Reunião Anual de Genética de Microorganismos**, 13, Ribeirão Preto. p. 78. 1986.

CAVALLARO, A.C.; PAVAN, O.H. & OLIVEIRA, A.R. Isolamento de um vírus de denso nucleose (DNV) em lagartas de *Diatraea saccharalis*. In: **Reunião Anual de Genética de Microorganismos**, 15, Piracicaba. p. 101. 1988.

CIBULSKY, R.J.; HARPER, D.J. & GUDAUSKAS, R.T. Biochemical comparison of polyhedral viruses infecting pestline larvae (Lepidoptera:Noctuidae). **J. Inverth. Pathol.** 29: 182-91. 1977.

CIBULSKY, R.J.; HARPER, D.J. & GUDAUSKAS, R.T. Biochemical comparison of virion proteins from five nuclear polyhedrosis viruses infecting pestline larvae (Lepidoptera:Noctuidae). **J. Inverth. Pathol.** 30: 303-13. 1977.

CONSIGLI, R.A.; TWEETEN, K.A.; ANDERSON, D.K. & BULLA Jr., L.A. Granulosis viruses, with emphasis on the GV of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. **Adv. Virus Res.**, 28: 141-73. 1983.

CROIZER, G. & CROIZER, L. Evaluation du poids moléculaire de la protéine des corps d'inclusion de divers baculovirus d'insectes. **Arch. Virol.**, 55: 247-50. 1977.

DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II Methods and application to human serum proteins. **Ann. N.Y. Acad. Sci. USA**, 121: 404-27. 1964.

- DEGASPARI, N.; BOTELHO, P.S.M. & MACEDO, N. Controle químico da *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar na região Centro Sul do Brasil. **Boletim Técnico IAA/PLANALSUCAR**, 3: 1-16. 1981.
- EGAWA, K. & SUMMERS, M.D. Solubilization of *Trichoplusia ni* granulosis virus proteinic crystal. I. Kinetics. **J. Invertebr. Pathol.**, 19: 395-404. 1972.
- EPPSTEIN, D.A. & THOMA, J.A. Alkaline protease associated with the matrix protein of a virus infecting the cabbage looper. **Biochem. biophys. Res. Commun.**, 62(2): 478-84. 1975.
- EPPSTEIN, D.A.; THOMA, J.A.; SCOTT, H.A.; YOUNG III, S.Y. Degradation of matrix protein from a nuclear polyhedrosis virus of *Trichoplusia ni* by endogenous protease. **Virology**, 67: 591-94. 1975.
- EPPSTEIN, D.A. & THOMA, J.A. Characterization and serology of the matrix protein from nuclear polyhedrosis virus of *Trichoplusia ni* before and after degradation by an endogenous proteinase. **Biochem. J.**, 167: 321-32. 1977.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.
In: Ceres, ed. **Manual de Entomologia Agrícola**. 531 p. 1978.

GRANADOS, R.R. Infecting and mode of action of baculovirus. **Biotechnol. Bioeng.** 22: 1377-405. 1980.

HARRAP, K.A. The structure of nuclear polyhedrosis viruses. II The virus particle. **Virology**, 50: 124-32. 1972.

HARRAP, K.A. & LONGWORTH, J.F. An evaluation of purification methods for baculoviruses. **J. Inverth. Pathol.**, 24: 55-62. 1974.

HARRAP, K.A. & PAYNE, C.C. The structural properties and identification of insect virus. **Adv. Virus Res.**, 25: 273-355. 1979.

HENSLEY, S.D. & HAMMOND, J.R.A.M. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on artificial diet. **J. econ. Entomol.**, 61: 1742-4. 1968.

- HUBER, J. Use of baculoviruses in pest management programs. In: Granados, R.R. & Frederici, B.A., ed. **The biology of baculoviruses**, v. 2. Flórida, CRC Press, Inc. p. 181-202. 1986.
- IAA-PLANALSUCAR. Relatório anual. Coordenadoria Regional Sul, Araras, SP. 1: 125-43 p. 1982.
- KAWANISHI, C.Y.; EGAWA, K. & SUMMERS, M.D. Solubilization of **Trichoplusia ni** GV proteinic crystal. II Ultrastructure. **J. Inverth. Pathol.**, 20: 95-100. 1972.
- KELLY, D.C. Baculovirus replication. **J. gen. Virol.**, 63: 1-13. 1982.
- KELLY, D.C. The structure and physical characteristics of Baculovirus. In: Maramosch, K. & Sherman, K.E., ed. **Viral insecticides for biological control**. New York, Academic Press. 1985. p. 469-88.
- KHOSAKA, T.; HIMENO, M. & ONODERA, K. Separation and structure of components of nuclear polyhedrosis virus of the silk worm. **J. Virol.**, 7: 267-73. 1971.

KOZLOV, E.A.; SIDOROVA, N.M. & SEREBRYANI, S.D. The isolation and physicochemical properties of polyhedral protein of nuclear polyhedrosis virus of large wax moth (*Galleria mellonella*). *Biochemistry*, Moscow, **39**: 130-4. 1974.

KOZLOV, E.A.; SIDOROVA, N.M.; SEREBRYANI, S.B. Proteolytic cleavage of polyhedral protein during dissolution of inclusion bodies of the nuclear polyhedrosis viruses of *Bombix mori* and *Galleria mellonella* under alkaline conditions. *J. Inverth. Pathol.*, **25**: 97-101. 1975 (a).

KOZLOV, E.A.; LEVITINA, T.L.; SIDOROVA, N.M.; RADAUSKI, Y.L. & SEREBRYANI, S.B. Comparative chemical studies of the polyhedral proteins of the nuclear polyhedrosis viruses of *Bombix mori* and *Galleria mellonella*. *J. Inverth. Pathol.*, **25**: 103-7. 1975 (b).

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-5. 1970.

LANGRIDGE, W.H.R. & BALTER, K. Protease activity associated with the capsule protein of *Estigmene acrea* granulosis virus. *Virology*, **114**: 595-600. 1981.

LONGWORTH, J.F.; ROBERTSON, J.S. & PAYNE, C.C. The purification and properties of inclusion body protein of the granulosis virus of *Pieris brassicae*. *J. Inverth. Pathol.*, 19: 42-50. 1972.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275. 1951.

MACEDO, M. & BOTELHO, P.S.M. Controle Integrado da broca de cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera, Pyralidae). IAA-PLANALSUCAR (no prelo).

MAIZELL, J. V. Acrylamide gel electrophoresis of protein and nucleic acids. In: Habel, K. & Salzman, N. P., eds. **Fundamental techniques in virology**. New York, Academic Press, 1969. p. 334-62.

MASKOS, C.B. & MILTENBURGER, H.G. SDS-PAGE comparative studies on the polyhedral and viral polypeptides of the nuclear polyhedrosis viruses of *Manestra brassicae*, *Autographa californica* and *Lymantria dispar*. *J. Inverth. Pathol.*, 37: 174-80. 1981.

- MARUNIAK, J.E. Baculoviruses structural proteins and protein synthesis. In: Granados, R.R. & Fredericki, B.A., ed. **The biology of baculoviruses**, v. 1. Florida. CRC Press, Inc. p. 129- 46. 1986.
- MAZZONE, H.M. Receptors in the infection process. In: Maramorosh, K. & Sherman, K.E., ed. **Viral insecticides for biological control**. New York, Academic Press. 1985. p. 695-734.
- McCARTHY, W.J. & DICAPUA, R.P. In: International Congress of Virology 3., Madrid, 1975. p. 5. **Apud**: HARRAP, K.A. & PAYNE, C.C. The structural properties and identification of insect viruses. **Adv. virus Res.**, **25**: 273-355. 1979.
- McCARTHY, W.J. & LIU, S.Y. Electrophoretic and serological characterization of **Porthetria dispar** polyhedron protein. **J. Inverth. Pathol.**, **28**: 57-65. 1976.
- McINTOSH, A.H. & PADHI, S.B. In vitro and in vivo comparative studies of several nuclear polyhedrosis viruses (NPVs) by neutralization, immunofluorescence and polyacrylamide gel electrophoresis. In: **Invertebrate tissue culture: applications in medicine, biology and agriculture**. **Apud**: PADHI, S.B. Viral protein for identification of insect viruses.

MEYNADIER, G.E.; FRASER, M.J. & SUMMERS, M.D. Mise en évidence d'un denonucleose chez *Diatraea saccharalis* (Lep.: Pyralidae). *Entomophaga*, 22: 115- 120. 1977.

MELO, Q.M.S. Aspectos biológicos de *Metagonistylum minense* (Towns, 1927) e *Paratheresia claripalpis* (Wulp, 1896) (Diptera: Tachnidae) em diferentes temperaturas. Piracicaba, 1985. 107 p. Universidade de São Paulo, ESALQ. Dissertação de Mestrado.

MOSCARDI, F. Utilização de *Baculovirus Anticarsia* para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis*. Comunicado Técnico. EMBRAPA. nº 23, 21 p. 1983.

NEWTON, B.E. Surface active compounds. In: Dawson, R.M.C., et al., ed. *Data for biochemical research*. 2. ed. Oxford, Oxford Univ. Pr., 1969. p.374-7.

PADHY, S.B. Viral protein for the identification of insect virus. In: Maramorosch, K. & Sherman, K.E., ed. *Viral insecticides for biological control*. New York, Academic Press, 1985. p. 55-77.

PAILLOT, A. Sur une nouvelle maladie du noyau au grasserie des chenilles de **Pieris brassicae** et un nouveau groupe de microorganismes parasites. **C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci.**, 198: 204-205. 1926.

PAVAN, O.H.O.; BOUCIAS, D.G. & PENDLAND, J.C. The effects of serial passage of a nucleopolyhedrosis virus through an alternate host system. **Entomophaga**, 26: 99-108. 1981.

PAVAN, O.H.O. O vírus de granulose de **Diatraea saccharalis** Fabricius (broca da cana-de-açúcar). **Saccharum**, 25: 27-29. 1983 (a).

PAVAN, O.H.O.; RODRIGUES, E.P. & VERONS, S.K. Vírus de Granulose de **Diatraea saccharalis**: efeito da dose e idade do hospedeiro na mortalidade de lagartas de broca de cana-de-açúcar., **D. saccharalis**. In: **Congresso Brasileiro de Entomologia**, 8. Brasília. p.260. 1983 (b).

PAVAN, O.H.O.; BOUCIAS, D.G.; ALMEIDA, L.C.; GASPAR, J.O.; BOTELHO, P. S.M. & DEGASPARI, N. A granulosis virus of **Diatraea saccharalis** Fabr. I. Pathogenicity, replication and ultrastructure. In: **Congress of International Society of Sugar Cane Technologists**. 18., Cuba, 1983 (c). v. 2. p.644-59.

PAVAN, O.H.O. & ALMEIDA, L.C. Produção industrial do vírus de granulose de *Diatraea saccharalis*: seleção genética e controle de qualidade . In: **Reunião Anual de Genética de Microorganismos**, 11., Londrina. 1984. Anais.

PAYNE, C.C. & KALMAKOFF, J. Alkaline protease associated with virus particles of a nuclear polyhedrosis virus: assay, purification and properties. **J. Virol.**, 26(1): 84-92. 1978.

RIBEIRO, H.C.T. Seleção Genética e interação de baculovírus em *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). Campinas, 1985. Tese de Mestrado. 96 p. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

RIBEIRO, H.C.T. & PAVAN, O.H. Inativação térmica de baculovírus. In: **Encontro de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**, 2. Campinas, UNICAMP. p. 44. 1985.

RODRIGUES, E.P.; GANDINI, M.S.M. & PAVAN, O.H.O. Vírus de granulose de *Diatraea saccharalis*: suscetibilidade de lagartas de primeiro estágio larval. In: **Congresso Brasileiro de Entomologia**, 8. Brasília, 1983. p. 261. Anais.

ROHRMANN, G.F. Evolution of occluded baculoviruses. In: Granados, R.R. & Frederick, B.A., ed. **The biology of baculoviruses**, v. 1. Florida. CRC Press, Inc. p. 203-16. 1986.

SMITH, K.M. **Virus-Insect Relationships**. New York, Longman. 670 p. 1976

SMITH, G.E.; FRASER, M.J. & SUMMERS, M.D. Molecular engineering of **Autographa californica** nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutation within the polyhedrin gene. **J. Virol.**, **46**(2): 584-93. 1983.

STEINHAUS, A.E. & MARSH, G. Reports of diagnose of diseased insects, 1951-1961. **Hilgardia**, **33**(9): 349- 427. 1962.

SUMMERS, M.D. & EGAWA, K. Physical and chemical properties of **Trichoplusia ni** granulosis virus granulin. **J. Virol.**, **12**: 1092-103. 1972.

- SUMMERS, M.D. & SMITH, G.E. *Trichoplusia ni* granulosis virus granulins: a phenol-soluble phosphorylated protein. *J. Virol.*, **16**(5): 1108-1116. 1975.
- SUMMERS, M.D. & SMITH, G.E. Comparative studies of baculovirus granulins and polyhedrins. *Intervirology*, **6**: 168-80. 1976.
- SUMMERS, M.D. & SMITH, G.E. Baculovirus structural polypeptides. *Virology*, **84**: 390-402. 1978.
- SUMMERS, M.D. & PASCHKE, J.D. Alkali-liberated granulosis virus of *Trichoplusia ni*. I Density gradient purification of virus components and some of their in vitro chemical and physical properties. *J. Invertebr. Pathol.*, **16**: 227-240. 1970.
- THOMAS, G.M. & POINAR Jr, G.O. Report of diagnosis of disease in silkworms, 1962-1972. *Hilgardia*, **42**: 261-360. 1973.
- TWEETEN, K.A.; BULLA Jr., L.A. & CONSIGLI, R. Isolation and purification of a granulosis virus from infected larvae of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *App. Environ. Microbiol.*, **34**(3): 320-7. 1977.

TWEETEN, K.A.; BULLA Jr., L.A. & CONSIGLI, R. Characterization of an alkaline protease associated with a granulosis virus of *Plodia interpunctella*. *J. Virol.*, **26**(3): 702-11. 1978.

TWEETEN, K.A.; BULLA Jr., L.A. & CONSIGLI, R. Applied and molecular aspects of insect granulosis viruses. *Microbiol. Rev.*, **45**(3): 379-408. 1981.

VLAK, J.M. & ROHRMANN, G.F. The nature of polyhedrin. In: Maramorosch, K. & Sherman, K.E., ed. *Viral insecticides for biological control*. New York, Academic Press. 1985. p. 489-542.

WILSON, C.M. Serial analysis of zein by isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Plant Physiol.*, **82**: 196-202. 1986.

WOOD, H.A. Protease degradation of *AcNPV* proteins. *Virology*, **103**: 392-9. 1980.

- YAMAMOTO, T. & TANADA, Y. Protein component of two strains of granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Inverth. Pathol.*, 32: 158-70. 1978 (a).
- YAMAMOTO, T. & TANADA, Y. Biochemical properties of viral envelopes of insect baculovirus and their role in infectivity. *J. Inverth. Pathol.*, 32: 202-11. 1978 (b).
- ZANOTTO, P.M.A.; PONCEN, B. & PAVAN, O.H. Aspectos estruturais do Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis* utilizados em controle biológico. In: *Reunião Anual de Genética de Microorganismos*, 13. Ribeirão Preto. p. 83. 1986.
- ZUMMER, M. & FAULKNER, P. Absence of protease in baculovirus polyhedral bodies propagated in vitro. *J. Inverth. Pathol.*, 33: 383-4. 1979.

8. ANEXOS

ANEXO 1. Composição das soluções estoque para preparo dos géis de empacotamento e resolução (poli-acrilamida + SDS)

SOLUÇÃO A

Tris	36,3 g	pH 8,9
HCl 1 M	48,0 ml	
H ₂ O q.s.p.	100,0 ml	

SOLUÇÃO B

Tris	0,6 g	pH 6,8
HCl 1 M	48,0 ml	
H ₂ O q.s.p.	100,0 ml	

SOLUÇÃO C

Acrilamida	15,0 g
Bis-Acrilamida	0,4 g
H ₂ O q.s.p.	50,0 ml

SOLUÇÃO D

Acrilamida	7,2 g
Bis-Acrilamida	0,4 g
H ₂ O q.s.p.	50,0 ml

SOLUÇÃO E

Persulfato de amônio	0,10 g
H ₂ O q.s.p.	25,0 ml

SOLUÇÃO F

SDS	10,0 g
H ₂ O q.s.p.	100,0 ml

ANEXO 2. Composição das soluções estoques para preparo dos géis de empacotamento e resolução (poli-acrilamida + SDS + uréia)

SOLUÇÃO 1

Tris	36,6 g	
HCl 1 N	48,0 ml	
Temed	0,23 ml	pH 8,9
H ₂ O q.s.p.	100,0 ml	

SOLUÇÃO 2

Tris	5,93 g	
HCl 1 N	48,0 ml	
Temed	0,46 ml	pH 6,9
H ₂ O q.s.p.	100,0 ml	

SOLUÇÃO 3

Acrilamida	27,0 g
Bis-Acrilamida	0,6 g
H ₂ O q.s.p.	100,0 ml

SOLUÇÃO 4

Acrilamida	10,0 g
Bis-Acrilamida	2,5 g
H ₂ O q.s.p.	100,0 ml

SOLUÇÃO 5

Riboflavina	4,0 mg
H ₂ O q.s.p.	100,0 ml

SOLUÇÃO 6

SDS	0,2 %
Uréia	8,0 M

ANEXO 3. Tampões - composição do tampão da cuba e da amostra (poliacrilamida + SDS)

O tampão da cuba do gel sem uréia consiste no uso de 0,0125 M de Tris-Glicina (pH 8,5) dissolvidos em água destilada. Esse tampão deve ser diluído 7 vezes e quando utilizado no reservatório superior da cuba deve-se adicionar SDS numa concentração final de 1 %.

Tampão da amostra:

mercaptoetanol	14,8 μ l
SDS	0,74 g
bromofenol azul a 1 %	0,2 ml
tampão da cuba	1,0 ml
sacarose	2,96 g
H ₂ O	6,2 ml

Preparo do padrão de peso molecular do gel sem uréia

Padrões para peso molecular - SDS 70 L/Sigma

albumina bovina	66000 d
albumina de ovo	45000 d
gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase	36000 d
anidrase carbonica	29000 d
tripsinogênio	24000 d
inibidor de tripsina	20100 d
alfa lactoalbumina	14200 d

O padrão de peso molecular foi preparado utilizando-se 10 μ l de solução contendo essas proteínas (1 mg/1ml) e adicionando-se o mesmo volume de tampão da amostra.

ANEXO 4. Tampões - composição do tampão da cuba e da amostra
(poliacrilamida + SDS + uréia)

Tampão da cuba:

SDS	2,0 g
Tris	6,0 g
Glicina	28,0 g
H ₂ O q.s.p.	1000 ml

Essa solução estoque de tampão deve ser diluída 1:1 para ser utilizada.

Tampão da amostra:

Tris-Fosfato	0,01 M
Uréia	4 M
SDS	1 %
Mercaptoetanol	0,1 %

Adiciona-se à 25 μ l de tampão da amostra, 2 μ l de bromo-fenol azul a 0,05 % e 2 μ l de mercaptoetenol.

ANEXO 5. Composição das Soluções Corante e Descorante
(poliacrilamida + SDS)**Corante:**

Comassie Blue	0,5 g
Ácido Acético	83,4 ml
Metanol	208,4 ml
H ₂ O	208,4 ml

Descorante:

Ácido Acético	70 ml
Metanol	300 ml
H ₂ O	630 ml

ANEXO 6. Composição das Soluções Corante e Descorante
(poliacrilamida + SDS + uréia)

Corante:

Comassie Blue	5,0 g
Acido Acético	70,0 ml
H ₂ O	1000,0 ml

Descorante:

Acido Acético	750	ml
Metanol	175	ml
H ₂ O	650	ml

ANEXO 7. Composição do Gel para placa medindo (16,5 x 14,0 x 0,15 cm)
 (poliacrilamida SDS)

Gel de resolução

Solução	Volume
A	3,75 ml
B	11,70 ml
E	3,75 ml
F	0,3 ml
H ₂ O	10,50 ml

Gel de empacotamento

Solução	Volume
B	1,0 ml
D	1,0 ml
E	1,0 ml
F	0,08 ml
H ₂ O	4,95 ml

ANEXO 8. Composição do Gel para placa medindo (16,5 x 14,0 x 0,15 cm)
 (poliacrilamida + SDS + uréia)

Gel de resolução

Solução	Volume
1	3,75 ml
2	11,25 ml
6	10,00 ml
	+ 14,00 mg de persulfato de amônio

Gel de empacotamento

Solução	Volume
1	1,5 ml
4	3,0 ml
5	2,5 ml
6	6,0 ml