

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/12155
IB/80642

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1990

70642

CLONAGEM MOLECULAR E EXPRESSÃO DOS GENES DO CRISTAL PROTÉICO
DE *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *ISRAELENسيس* EM *ESCHERICHIA*
COLI.



REJANE MARIA CÁSSIA DE CASTRO

ORIENTADORA: PROF. DRA. YOKO BOMURA ROSATO

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida
pela candidata Rejane M.C. Castro e aprovada pela
comissão julgadora.

Y. Bomura
8/3/90

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do título
de mestre em Ciências Biológicas,
área de concentração de Genética.

CAMPINAS - SÃO PAULO

1990

CLASSF.	T
AUTOR	C279e
V.	EX
TOMBO BC	12155
	FR 9402

À Therezinha Alves Cássia,

minha mãe,

todo o meu carinho, respeito e homenagem.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato pela orientação, apoio, incentivo e amizade durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu marido, Antônio Hélio, pelo amor e companheirismo que nos une e pela sua imensa colaboração com a datilografia do manuscrito.

Ao pequeno Dante, meu filho, pela sua vida que tanta alegria e beleza trouxe à minha.

Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho pela valiosa orientação durante a realização de parte deste trabalho no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília e pela inestimável colaboração com a síntese do oligonucleotídeo utilizado neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Arruda pelo acesso ao seu laboratório.

À Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin pelo empréstimo do microscópio e das gaiolas utilizadas na criação dos mosquitos.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano pelo material cedido para os testes de hemólise.

Ao Dr. Adilson Leite pela inestimável colaboração prestada durante as diversas etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio Luiz Messias, ao Prof. Dr. Otávio Henrique Pavan e ao Prof. Dr. Tomomasa Yano pelo exame prévio do manuscrito e pelas críticas e sugestões.

Ao Gérson A.R. da Silveira e Newton Goulart Madeira pelas

sugestões dadas para a criação dos mosquitos em laboratório.

Ao Wilson pela manutenção da criação dos mosquitos.

À Sandra pela assistência técnica prestada durante todo trabalho.

Ao Sr. Manuel pela colaboração na coleta de sangue dos coelhos.

Ao Sr. Francisco por ter ajudado na criação dos coelhos.

À Sonja pela amizade e hospitalidade oferecida em Brasília.

À Suzi pela suas críticas e opiniões e sobretudo pelo companheirismo tão valioso durante todo o mestrado.

As amigas do Laboratório de Genética Molecular de Bactérias: Valéria Maia, Valéria Batista, Andréa e Renata pela convivência e colaboração.

Aos alunos e técnicos do Laboratório de Biologia Molecular pelo apoio e colaboração durante o desenvolvimento do trabalho na UnB.

À Laura e Isa pela auxílio prestado em todas as etapas deste trabalho.

À Helena Camarão pela sua atenção e colaboração prestadas.

À Rosana, Rosângela, Nair e Sílvia pela ajuda solícita em tantas horas.

À Sílvia, da Secretaria de Pós-graduação do Depto. de Genética, pela atenção, auxílio e eficiência demonstrada.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Abreviaturas

Ap - Ampicilina

ATP - Adenosina trifosfato

DNA - Ácido desoxiribonucleico

DO - Densidade ótica

DTT - Dithiothreitol

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

η - Índice de refração

IPTG - Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

Kb - 10^3 pares de bases

kD - 10^3 Dalton

Lac - Lactose

mA - 10^{-3} Ampere

MD - 10^6 Daltons

nm - 10^{-9} metros

pb - pares de base

p/v - peso/volume

RNase - ribonuclease

SDS - dodecil sulfato de sódio

Tris - Tris (hidroximetil) aminoetano

U - Unidade de atividade enzimática

UV - Ultra-violeta

X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

INDICE

1 - Introdução	1
2 - Revisão bibliográfica.....	3
2.1 - Características gerais de <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
2.1.1 - Classificação e estrutura morfológica.....	3
2.1.2 - Características do cristal protéico.....	7
2.1.3 - Clonagem molecular do gene do cristal.....	8
2.2 - Características gerais de <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	11
2.2.1 - Caracterização do cristal protéico.....	11
2.2.1.1 - Composição e estrutura.....	11
2.2.1.2 - Modo de ação da toxina.....	15
2.2.2 - Clonagem molecular do gene do cristal.....	19
3 - Materiais e Métodos.....	26
3.1 - Linhagens de bactérias e plasmídios.....	26
3.2 - Insetos.....	28

3.3 - Meios de cultura.....	29
3.4 - Bioensaios.....	30
3.5 - Extração de DNA plasmidial.....	31
3.5.1 - Extração de DNA plasmidial de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	31
3.5.2 - Preparo do plasmídio vetor por ultracentrifugação em gradiente de densidade de cloreto de céσιο-brometo de etideo (Maxipreparação).....	34
3.5.3 - Extração de DNA plasmidial de <i>E.coli</i> (minipreparação).....	35
3.5.4 - Soluções e tampões utilizados na extração de DNA plasmidial.....	36
3.6 - Digestão com enzimas de restrição e extração da enzima.....	39
3.7 - Ligação de fragmentos de DNA.....	40
3.8 - Transformação de células de <i>E.coli</i>	41

3.9 - Seleção e análise de recombinantes.....	42
3.9.1 - Clones portadores do plasmídio híbrido contendo DNA de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	42
3.9.2 - Detecção de atividade hemolítica.....	43
3.9.3 - Detecção de atividade larvicida.....	44
3.9.4 - Hibridização com sonda do gene da proteína de 28 kD.....	44
3.9.4.1 - Transferência do DNA plasmidial para a membrana de nitrocelulose.....	44
3.9.4.2 - Marcação da sonda.....	46
3.9.4.3 - Hibridização da membrana.....	46
3.9.4.4 - Soluções e tampões utilizados na hibridização com sonda radioativa....	47
3.9.5 - Análise imunológica das proteínas produzidas pelos clones recombinantes de <i>E.coli</i>	49
3.9.5.1 - Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).....	49
3.9.5.2 - Preparo das amostras para eletroforese em gel de	

SDS-PAGE.....	52
3.9.5.3 - Purificação das proteínas de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	53
3.9.5.4 - Preparo dos antisoros contra proteínas de <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	54
3.9.5.5 - Análise imunológica das proteínas produzidas pelos clones recombinantes de <i>E.coli</i>	55
3.9.5.6 - Soluções e tampões utilizados na transferência de proteínas do gel.....	57
4 - Resultados.....	59
4.1 - Avaliação da atividade larvicida de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> e caracterização de proteínas.....	59
4.2 - Construção do banco plasmidial de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	60
4.3 - Caracterização dos clones recombinantes.....	65
4.3.1 - Caracterização da atividade hemolítica.....	65

4.3.2 - Caracterização da atividade larvicida.....	67
4.3.3 - Análise dos fragmentos de DNA clonados de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	67
4.3.4 - Hibridização com o gene da proteína de 28 kD.....	68
4.3.5 - Análise imunológica das proteínas produzidas pelos clones recombinantes de <i>E. coli</i>	71
5 - Discussão.....	75
6 - Resumo.....	84
7 - Summary.....	85
8 - Referências bibliográficas.....	86

1 - Introdução

Bacillus thuringiensis é uma bactéria gram-positiva que produz inclusões cristalinas protéicas durante o processo de esporulação (Somerville, 1978).

As propriedades inseticidas desse cristal protéico tem estimulado o seu estudo, objetivando a produção comercial do cristal para o seu uso como agente de controle biológico.

Com um espectro de ação relativamente amplo, *Bacillus thuringiensis* é tóxico à larvas de Lepidoptera, em particular contra insetos pragas desta ordem, Coleoptera e Diptera. Outros animais e plantas não são afetados pelo cristal tóxico (Whiteley e Schnepf, 1986).

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* é de especial importância desde que é altamente tóxica à várias espécies de Diptera entre as quais se incluem larvas de mosquitos e simuliídeos, vetores de doenças humanas como malária e febre amarela (De Barjac, 1978).

A perspectiva de uso do *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* como agente de controle biológico desses insetos que representam um grande problema de saúde pública para o terceiro mundo, tem estimulado um considerável interesse na caracterização do seu cristal protéico.

O cristal da subespécie *israelensis* é constituído de três polipeptídeos principais (Klier e Rapoport, 1987) e a

determinação das atividades biológicas de cada polipeptídeo tem sido foco de controvérsia atual.

O sucesso da construção de bancos plasmidiais e da clonagem do gene do cristal têm aberto a possibilidade de se determinar a localização do gene do cristal e de se obter evidências diretas dos papéis biológicos de cada peptídeo. Atualmente a maioria dos genes responsáveis pelos diferentes polipeptídeos já foram clonados principalmente por grupos da França (Instituto Pasteur), Inglaterra (Universidade de Cambridge) e dos Estados Unidos. Diferentes tentativas foram efetuadas para se receber tais clones para posterior estudo e devido ao insucesso nessa tarefa propusemo-nos a isolar os genes responsáveis pela produção dos diferentes polipeptídeos de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.

As seguintes etapas foram efetuadas:

1 - Estabelecimento de um sistema de bioensaio. Padronização na criação e manutenção de mosquitos (*Aedes fluviatilis*) e na formulação do *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.

2 - Construção de um banco plasmidial.

3 - Seleção de clones através das atividades hemolítica e larvicida, hibridização com sonda de oligonucleotídeo e análise imunológica dos peptídeos produzidos pelos genes clonados.

2 - Revisão Bibliográfica

As espécies de bactérias entomopatogênicas de maior importância pertencem às famílias Enterobacteriaceae e Bacillaceae. A família Bacillaceae, que concentra as bactérias esporulantes, envolve dois gêneros da maior importância, *Clostridium* e *Bacillus*.

Conforme descrito no Bergey's Manual (1974), o gênero *Bacillus* compreende 49 espécies. Segundo Habib e Andrade (1986) 7 dessas espécies são representados por patógenos: *B. cereus*, *B. larvae*, *B. alvei*, *B. popilliae*, *B. lentimorbus*, *B. sphaericus* e *B. thuringiensis*.

2.1 - Características gerais de *Bacillus thuringiensis*

2.1.1 - Classificação e estrutura morfológica

De acordo com Whiteley e Schnepf (1986), *B. thuringiensis* foi primeiramente isolada em 1901 por Ishiwata que identificou um bacilo patogênico de *Bombyx mori*, dando-lhe o nome de *B. sotto*, atualmente classificado como *B. thuringiensis* subsp. *sotto*. O nome *Bacillus thuringiensis* foi dado por Berliner em 1915 quando isolou um bacilo causador de doenças em larvas de Lepidoptera.

Vários métodos tem sido usados para classificar as centenas de isolados de *B. thuringiensis* em subespécies. Além dos critérios

bioquímicos usuais, a taxonomia desse grupo tem-se baseado nas análises sorológicas dos antígenos flagelares, proposta por Bonnefoi e de Barjac (1963). Até 1986 já eram conhecidos 22 sorotipos (Whitheley et al, 1986). Norris e Burges (1963) e Norris (1964) através de análise eletroforética de esterases de células vegetativas estabeleceram padrões que correspondiam aos grupos sorológicos obtidos por Bonnefoi e de Barjac (1963), com exceção das subspécies *sotto* e *dendrolimus*. Estas subspécies são sorologicamente idênticas porém pela análise de esterases mostraram ser diferentes. Tal fato reforçou a proposta de Norris e Burges (1963) para o uso desse critério na taxonomia de isolados de *Bacillus thuringiensis*.

As subspécies de *B. thuringiensis* são representadas por células em forma de bastonete medindo de 1.0 a 1.2 por 3.0 a 5.0 μm . Às vezes, as células ocorrem em cadeias e movem-se, geralmente, por flagelos. *B. thuringiensis* é aeróbica ou facultativamente anaeróbica dentro da faixa de 10 a 45 °C. É gram-positiva e forma esporos elípticos e cilíndricos. Uma das características bacteriológicas mais típicas de *B. thuringiensis* é o desenvolvimento de um cristal protéico intracelular durante o processo de esporulação. Também denominado de δ -endotoxina, por ser produzido dentro da célula bacteriana, o cristal protéico detém propriedades inseticidas e seu espectro de ação varia entre as espécies de insetos de acordo com a subspécie e variedade a qual pertence.

Além da δ -endotoxina, algumas linhagens de *B. thuringiensis* produzem outras toxinas de ação tóxica pouco definidas. Entre as toxinas mais importantes estão a δ -endotoxina, β -exotoxina, endósporo e α -exotoxina (Habib e Andrade, 1986). A β -exotoxina é tóxica para espécies de Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Isoptera e Orthoptera. Entretanto, o efeito teratogênico e a possível mutagenicidade levaram à proibição do uso de produtos comerciais à base de linhagens produtoras desta substância (Burges, 1975). Burges et al (1976) revelaram o efeito tóxico de uma proteína do endósporo para lagartas de algumas espécies de lepidópteros, nestes insetos a mistura de cristais e esporos é muito mais patogênica que os cristais purificados. A α -exotoxina exige um pH em torno de 6.6 a 7.4 para melhor atuação, sendo tóxica para várias espécies de insetos (Toumanoff, 1953).

Conforme mencionado, Bonnefoi e de Barjac (1963) estabeleceram a classificação dos isolados de *B. thuringiensis* baseada na análise do sorotipo flagelar. Krywienczyk et al (1978,1980,1981) incrementaram a classificação das centenas de isolados de *B. thuringiensis* através da análise sorológica dos antígenos do cristal protéico. De um modo geral, foi encontrada uma correlação entre o sorotipo flagelar e o sorotipo do cristal.

A exceção a esta predominância de um tipo de cristal em cada grupo sorológico foi encontrada entre isolados de *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* que apresentaram cristais do tipo K-1 e K-73 (Krywienczyk et al, 1978).

Cristais sorologicamente idênticos podem ocorrer em diferentes subspécies, como o cristal K-1 que ocorre tanto na subspécie *kurstaki* como em alguns isolados da subspécie *thuringiensis*. O cristal do tipo K-1 é particularmente interessante por conter duas toxinas distintas com ação tóxica para lepidópteros e dípteros. Entretanto, a atividade larvicida para dípteros não é restrita a este tipo de cristal pois há pelo menos três subspécies (*israelensis*, *kyushuensis* e 73-G-10-2) tóxicas somente para mosquitos e cujos cristais são sorologicamente distintos do tipo K-1 (Aronson et al, 1986).

Dulmage (1981) verificou a ocorrência de subgrupos quanto à toxicidade a várias espécies de insetos dentro de um mesmo sorotipo de cristal. Este resultado indicou que as diferenças na toxicidade das subspécies de *B. thuringiensis* estão relacionadas tanto com o sorotipo flagelar como com o sorotipo do cristal. Esses subgrupos exemplificam também a complexidade e a variabilidade dos cristais de *B. thuringiensis* possivelmente resultante da evolução e adaptação dos isolados desta bactéria dentro de uma gama de hospedeiros naturais.

A capacidade de troca de marcadores genéticos plasmidiais e cromossomais entre subspécies de *B. thuringiensis* e *B. cereus* foi demonstrada em alguns trabalhos e poderia estar relacionada com a variabilidade de antígenos de cristais dentro dos sorotipos flagelares (Gonzales e Carlton, 1982; Minnich e Aronson, 1984).

A troca de genes poderia ocorrer naturalmente entre os

isolados de *B. thuringiensis* conduzindo à criação de um novo tipo de toxina pela presença de dois ou mais genes diferentes da protoxina, ou mesmo a recombinação entre tais genes criando uma nova espécie de protoxina (Aronson et al, 1986).

2.1.2 - Características do cristal protéico

O cristal é formado durante o estágio II da esporulação e na maioria das subespécies de *B. thuringiensis* é encontrado externamente à membrana do esporo denominada de exospório. Nas subespécies tóxicas a lepidópteros o peso molecular do cristal intacto é de 230 kD e foi calculado por Holmes e Monro (1965) através de difração de raio-X. Os pesos moleculares obtidos por Huber et al (1981) revelaram a natureza dimérica do cristal.

O cristal protéico varia quanto ao número, forma e composição nas diferentes subespécies. Geralmente há um cristal por célula mas podem ser encontrados dois ou mais (Bechtel e Bulla, 1976) e a forma do cristal é caracteristicamente bipiramidal.

O cristal intacto não tem efeito tóxico e é considerado uma protoxina. O cristal é dissolvido sob as condições alcalinas do intestino médio dos insetos após a ingestão pelas larvas. As proteínas dissolvidas são processadas por ação das proteases do intestino resultando em polipeptídeos menores (Lecadet e Dedonder, 1967).

Condições alcalinas (pH acima de 8) e tampões alcalinos

redutores podem provocar *in vitro* a dissolução da protoxina em moléculas de tamanhos variáveis (Calabrese et al, 1980). O número e tamanho das proteínas do cristal dependem da linhagem de *B. thuringiensis* e das condições usadas para dissolver o cristal (Whiteley e Schnepf, 1986).

Nas linhagens de *B. thuringiensis* tóxicas para lepidópteros, o cristal é composto de um ou vários polipeptídeos cujos tamanhos variam de 120 a 160 kD (Klier e Rapoport, 1987).

Uma estimativa média do tamanho da toxina ativa de espécies tóxicas a lepidópteros está em torno de 55 a 70 kD e seu domínio ativo está localizado na porção amino-terminal do peptídeo (Aronson et al, 1986).

2.1.3 - Clonagem molecular do gene do cristal

Os genes do cristal protéico de *B. thuringiensis* estão localizados em plasmídios e no DNA cromossomal.

Os primeiros resultados que relacionaram a presença de plasmídios com a produção da protoxina foram obtidos por Debabov et al (1977) e Stahly et al (1978). Segundo esses autores, a perda da capacidade de sintetizar a protoxina em mutantes coincidia com a perda total dos plasmídios.

Gonzalez et al (1981) estudando mutantes acristalíferos espontâneos e mutantes obtidos por cura plasmidial evidenciaram a relação entre a síntese da protoxina e a presença de plasmídios de

alto peso molecular.

Experimentos de clonagem molecular forneceram evidências diretas da localização dos genes da protoxina em plasmídios de vários tamanhos. O primeiro gene da protoxina clonado foi da subespécie *kurstaki*, já comercializado como o bioinseticida, HD-1-Dipel (Schenepf et al, 1981).

Klier et al (1982) clonaram dois genes da protoxina da subespécie *thuringiensis berliner 1715* sendo um deles localizado no cromossomo.

A partir desses trabalhos pioneiros com o HD-1 (Dipel) e a subespécie *berliner*, diferentes grupos de pesquisa têm trabalhado na localização dos genes da protoxina das várias subespécies de *B. thuringiensis*. Recentemente, foi clonado um gene da protoxina de *B. thuringiensis* subespécie *tenebrionis* com ação tóxica para coleópteros (McPherson et al, 1988). Os cristais desta subespécie são constituídos de cinco proteínas distintas. Análise da sequência de aminoácidos revelou a presença de dois códons de iniciação indicando que as diferentes proteínas podem ser codificadas por diferentes sequências do gene clonado ou podem ser resultantes da ação proteolítica de um único produto gênico primário.

Kronstad e Whiteley (1986) definiram três classes de genes do cristal presentes na linhagem HD-1 da subespécie *kurstaki*. Höfte et al (1986) comparando as sequências de DNA dos genes de cada uma dessas classes concluíram que as regiões da extremidade 5 até o

códon 282 e do códon 724 até o codón de finalização são homólogas entre as três classes de genes, porém na região central há diferenças consideráveis. Entretanto, contrariando estes resultados, Geiser et al (1986) detectaram, através de experimentos de hibridização, uma homologia considerável na região central das três classes de genes propostas por Kronstad e Whiteley (1986).

Mais recentemente, Visser et al (1988) isolaram cinco genes diferentes do cristal da subespécie *entomocidus* pertencendo a quatro famílias gênicas com espectro de ação distinto entre os lepidópteros. Este resultado sugere que a multiplicidade de genes do cristal pode determinar a especificidade da ação tóxica a lepidópteros dentro das linhagens de *B. thuringiensis*.

Posteriormente, Visser (1989) analisou 25 linhagens diferentes através de experimentos de hibridização com sequências nucleotídicas dos quatro tipos de genes clonados da espécie *entomocidus* (Visser et al, 1988). Nem todas as linhagens mostraram a presença de sequências relacionadas com os quatro tipos de genes usados como sonda indicando que outros genes podem ainda ser encontrados.

Lereclus et al (1983) encontraram uma sequência de DNA comum a vários genes do cristal do cristal protéico. O mapeamento e microscopia eletrônica detalhados revelaram que esta sequência denominada Th, estava organizada estruturalmente de forma semelhante a um elemento de inserção (IS). A sequência Th foi

designada e caracterizada por Lereclus et al (1986) como o transposon Tn 4430.

O arranjo das sequências repetidas e invertidas (IR) e a evidência da transposição da sequência Th em vários plasmídios sugere que o gene do cristal pode sofrer transposição. Tal mecanismo poderia explicar a dispersão dos genes do cristal encontrada em diferentes plasmídios das subspécies de *B. thuringiensis* e no próprio DNA cromossomal. A ocorrência desse mecanismo explicaria também a diversidade dos produtos gênicos do gene do cristal encontrada nesta espécie através de eventos de recombinação possivelmente envolvendo grandes segmentos de DNA (Whiteley e Schnepf, 1986).

2.2 - Características Gerais de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

2.2.1 - Caracterização do cristal protéico

2.2.1.1 - Composição e estrutura

B. thuringiensis subsp. *israelensis* foi isolada por Goldberg e Margalit (1977) e descrita como sendo do sorotipo H-14. O seu cristal protéico é tóxico a muitas espécies de mosquitos e simuliídeos, sendo inócua para larvas de lepidoptera (Tyrell et al, 1979).

Este patógeno produz geralmente de duas a quatro inclusões cristalinas por célula podendo ser ovais ou de forma indefinida (Mikkola et al, 1982). Os cristais de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* são compostos de três polipeptídeos principais de 28, 68 e 130 kD (Klier e Rapoport, 1987).

Lee et al (1985) mostraram que os cristais de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* variam de acordo com o tamanho, morfologia e composição protéica durante o processo de esporulação. Inicialmente aparecem cristais menores e através de experimentos de incorporação de aminoácidos marcados com C^{14} , os autores demonstraram que as diferentes proteínas vão sendo sintetizadas e incorporadas aos distintos cristais protéicos por etapas durante todo o processo de esporulação.

Os cristais solubilizados do *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* são citolíticos à células em culturas de dípteros, lepidópteros e mamíferos e possuem ainda atividade hemolítica (Thomas e Ellar, 1983 b). Entretanto, a identificação dos peptídeos tóxicos responsáveis por esses vários efeitos tem sido foco de trabalhos conflitantes (Whiteley e Schnepf, 1986).

Os primeiros trabalhos que visavam a elucidação dos papéis biológicos de cada peptídeo foram feitos através da purificação dos cristais, isolamento dos principais polipeptídeos através de métodos bioquímicos e o teste das distintas atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*.

Yamamoto et al (1983) analisaram a composição protéica dos

cristais de vários mutantes da subespécie *israelensis* e encontraram a perda da atividade larvicida associada com a perda da proteína de 28 kD. Bioensaios com a fração purificada de 28 kD e seu derivado de 25 kD confirmaram a correlação acima.

Davidson e Yamamoto (1984) demonstraram que o polipeptídeo de 25 kD resultante da digestão por proteases do peptídeo de 28 kD apresenta as atividades larvicida, citolítica e hemolítica.

Armstrong et al (1985) encontraram todos os efeitos tóxicos do cristal da subespécie *israelensis* reunidos em dois peptídeos de tamanho aproximado de 25 kD. Esses polipeptídeos diferem na presença de dois aminoácidos na extremidade amino-terminal e são resultantes da quebra proteolítica da proteína de 28 kD.

Contrariamente a estes resultados acima, Hurley et al (1985) demonstraram que as atividades larvicida e citolítica *in vitro* da subespécie *israelensis* podem ser desempenhadas por duas proteínas distintas de 65 e 28 kD, respectivamente.

Lee et al (1985) demonstraram que a toxicidade à larvas de mosquitos está relacionada à presença do peptídeo de 65 kD.

Um efeito sinérgico na atividade larvicida das proteínas de 26 e 65 kD da subespécie *israelensis* foi revelado por Wu e Chang (1985). As proteínas de 26 e 65 kD isoladas, mesmo em alta concentração, apresentaram fraca atividade larvicida, enquanto que ambas presentes em baixa concentração exibiram alta atividade larvicida. Efeitos sinérgicos também foram observados entre proteínas de 26 e 130 kD. Wu e Chang (1985) acreditam que a

atividade larvicida atribuída à proteína de 65 kD por Hurley et al (1985) deve ser devido ao efeito sinérgico causado por problemas de contaminação com a proteína de 26 kD pois no pH neutro utilizado por estes autores para separar a proteína de 65 kD, ocorre associação dessas duas proteínas.

Ibarra e Federeci (1986) determinaram a ultraestrutura do cristal protéico de uma linhagem de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e verificaram a presença de três tipos de inclusão, todos eles envoltos por membrana e variando quanto ao tamanho, forma e densidade eletrônica. Inclusões poliédricas foram isoladas por gradiente de densidade e análise em gel de poliacrilamida mostrou que estas inclusões são constituídas do polipeptídeo de 65 kD. Bioensaios e análise eletroforética do perfil protéico dessas inclusões durante diferentes estágios de purificação demonstraram uma correlação positiva entre a toxicidade da preparação e o grau de contaminação com a proteína de 28 kD. A toxicidade do peptídeo de 65 kD isolado é muito menor que do cristal intacto e os autores concluíram que esta proteína não é o principal peptídeo larvicida embora possa ocorrer um efeito sinérgico com os outros peptídeos.

Usando anticorpos monoclonais do peptídeo de 28 kD contra o cristal solubilizado da subespécie *israelensis*, Held et al (1986) conseguiram remover a fração correspondente a esta proteína da coluna de cromatografia. O peptídeo de 28 kD removido apresentou atividade hemolítica e a fração do cristal sem o peptídeo de 28 kD

eluída da coluna demonstrou reter a toxicidade a larvas.

Chilcott e Ellar (1988) purificaram os peptídeos de 130, 65, 53, 30-35, 28 e 25 kD do cristal de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e todos revelaram ser tóxicos a larvas de dípteros quando precipitados em citrato (pH 4,5) mas o polipeptídeo de 65 kD foi o mais tóxico. Os autores encontraram um efeito sinérgico na atividade tóxica dos peptídeos de 27 e 130 kD e não entre o de 27 e 65 kD descrito por Wu e Chang (1985). Todos os peptídeos purificados mostraram atividade citolítica.

O que parece ser consenso nos trabalhos é a atribuição da atividade hemolítica ao polipeptídeo de 28 kD mas a identificação do polipeptídeo larvicida é ainda sujeita a controvérsias. Essa questão é complicada pela própria heterogeneidade de polipeptídeos do cristal da subespécie *israelensis* como pela variedade de técnicas usadas para purificar os diferentes polipeptídeos.

Os trabalhos de clonagem molecular do gene do cristal vieram posteriormente tentar contribuir para a resolução dessa questão.

2.2.1.2 - Modo de ação da toxina

O estudo do modo de ação do cristal protéico de *B. thuringiensis* é complicado por vários fatores: 1 - o número de subespécies de patógenos e hospedeiros susceptíveis; 2 - a produção de mais de uma toxina pela bactéria; 3 - a possível interação de esporos e cristais na toxicidade em algumas larvas; 4 - as

evidências de que as toxinas poderiam agir em vários sítios nos hospedeiros a elas susceptíveis.

Jaquet et al (1987) acreditam que a toxicidade dos cristais de *B. thuringiensis* a diferentes espécies de insetos é influenciada basicamente por três fatores: 1 - a origem da toxina, ou seja, a linhagem a qual pertence; 2 - a capacidade do inseto de dissolver o cristal pela presença de pH e proteases apropriados; 3 - a susceptibilidade intrínseca do inseto a determinadas toxinas pela presença de células alvo com receptores específicos aos diferentes tipos de cristais.

Segundo Habib e Andrade (1986), as proteases seriam, entre outros fatores, responsáveis pela determinação do nível de susceptibilidade do inseto uma vez que as proteases e o grau de hidrólise do cristal promovidos por elas variam de uma espécie de inseto para outra em função do hábito alimentar e condições físico-químicas da luz intestinal.

Nas espécies de insetos nas quais o modo de ação da toxina do sorotipo H-14 tem sido estudado, os esporos não desempenham papel importante na toxicidade à larvas (Burgess, 1982).

Pfannenstiel et al (1987) mostraram que os cristais da subespécie *israelensis* contém uma fração de aminoaçúcares os quais estão covalentemente ligados aos principais peptídeos constituintes do cristal. Muthukumar e Nickerson (1987) demonstraram que esses aminoaçúcares tem um significado funcional na atividade larvicida do cristal. A toxicidade do cristal à larvas

diminui no tratamento com substâncias que afetam a estrutura e propriedades dos aminoaçúcares do cristal, como periodato e o antibiótico tunicamicina. Resultados obtidos por Muthukumar e Nickerson (1987) sugerem que a toxina da subspécie *israelensis* liga-se a um receptor semelhante a lecitina no trato digestivo das larvas de mosquito.

Padrões de ligação a lecitinas distintas exibidos pelos cristais ativos em dípteros e lepidópteros sugerem que a especificidade de *B. thuringiensis* é determinada, entre outros fatores, pela porção de carboidratos das glicoproteínas do cristal (Muthukumar e Nickerson, 1987).

Thomas e Ellar (1983 a) propõem um modelo para a atuação do peptídeo de 28 kD baseado no efeito citolítico do cristal. A toxina se ligaria a lipídios específicos da membrana plasmática causando um desarranjo na camada lipídica, resultando no rompimento da membrana plasmática. Tal modelo foi confirmado através de experimentos conduzidos *in vitro* com cultura de *Aedes albopictus*.

Chilcott et al (1983) demonstraram que a toxicidade dos cristais da subspécie *israelensis* pode estar relacionada com a atividade proteolítica de proteases endógenas do cristal. Usando o cristal como seu próprio substrato, os a encontrado no intestino médio de mosquitos e simuliídeos e que as condições que inativam a atividade proteolítica do cristal reduzem a toxicidade do mesmo. Este resultado pode ter um significado

biológico pois as proteases endógenas do cristal poderiam ser ativadas no intestino das larvas.

Habib (1982) detectou várias alterações em órgãos e tecidos de larvas de *Culex declarator* infectadas por *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Após a ingestão do cristal, a camada epitelial afasta-se da membrana basal e da musculatura intestinal. Ocorre desintegração das microvilosidades e das paredes celulares. Degeneração das células nervosas e relaxamento da musculatura esquelética também foram observadas. As alterações no sistema nervoso e muscular explicariam, segundo Habib (1982), a incapacidade das larvas em manterem-se na superfície da água acabando por afundar e morrerem por asfixia.

A avaliação da patogenicidade das linhagens de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* é feita através de bioensaios. A quantificação do inóculo dos bioensaios geralmente é efetuada através da contagem do número de esporos viáveis ou dos parâmetros LC_{50} (concentração que provoca 50% de mortalidade na população teste) e LT_{50} (tempo em que ocorre 50% de mortalidade na população teste) (Habib e Andrade, 1986). Para a padronização dos bioensaios foi depositado no Instituto Pasteur a linhagem IPS 78 da subespécie *israelensis* com um título arbitrário de 1000 UI (Unidade Internacional) por mg de peso seco do inóculo para larvas de *A. aegypti* (Habib, 1986). As mortalidades larvais das preparações devem ser comparadas com o padrão IPS 78 através da fórmula de Mechalas e Anderson (1964):

$$\text{Título da preparação (UI)} = \frac{\text{LC}_{50} \text{ do padrão} \times 1000}{\text{LC}_{50} \text{ da preparação}}$$

2.2.2 - Clonagem molecular do gene do cristal

O perfil plasmidial de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* varia conforme a linhagem e a técnica de extração empregadas. De acordo com diversos trabalhos, a subespécie *israelensis* pode conter três (Faust et al, 1983), cinco (Lereclus et al, 1982), sete (Kamdar e Jayaraman, 1983), oito (Gonzalez e Carlton, 1982) e nove plasmídios (Ward e Ellar, 1983).

Ward e Ellar (1983) e Gonzalez e Carlton (1982) através de cura plasmidial e transferência de plasmídios em várias linhagens de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* concluíram que a síntese do cristal protéico está associada com a presença de um plasmídio de 72-75 Md, o que equivale aproximadamente a 110 kb.

Com o advento das técnicas de biologia molecular, os trabalhos com clonagem do gene do cristal da subespécie *israelensis* foram se sucedendo na tentativa de localizar o gene do cristal e estabelecer as atividades biológicas dos produtos gênicos clonados, uma vez que a clonagem dos genes dos peptídeos isoladamente permitiria a resolução da controvertida atribuição das atividades hemolítica e larvívica na ausência de outros peptídeos. Dos três principais polipeptídeos de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, os polipeptídeos de 28 e 130 kD têm sido os mais estudados pelas pesquisas com biologia molecular.

Ward et al (1984) clonaram o gene do cristal de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* a partir de fragmentos do plasmídeo de 72-75 Md inseridos no plasmídeo vetor pUC 12. O plasmídeo recombinante, PIP 173, quando introduzido em *E. coli* produziu um peptídeo de 26 kD com atividade tóxica para larvas de mosquito e citolítica para cultura de células de mosquito *in vitro*.

McLean e Whiteley (1987) através de clonagem do DNA plasmidial da subespécie *israelensis* no plasmídeo vetor pUC 9, conseguiram isolar um plasmídeo recombinante que codificava para o peptídeo de 27 kD. Este peptídeo foi hemolítico para eritrócitos humanos e tóxico para larvas de mosquitos.

Estes trabalhos de clonagem do gene do peptídeo de 26-27 kD atribuem a este peptídeo as atividades larvicida, hemolítica e citolítica do cristal e corroboram os resultados obtidos por Davidson e Yamamoto (1984) e Armstrong et al (1985) através do teste das atividades biológicas dos peptídeos isolados por métodos bioquímicos. Entretanto, Hurley et al (1985) e Lee et al (1985) detectaram ausência de atividade larvicida nas preparações do peptídeo de 27 kD depois da solubilização do cristal em álcali. Entretanto, Ward et al (1986) observaram que a atividade larvicida do peptídeo de 27 kD estava presente quando se utilizava a proteína nativa produzida por células recombinantes de *B. subtilis* porém a solubilização alcalina eliminava a atividade larvicida do peptídeo ficando apenas a hemolítica. Isto poderia explicar os

resultados obtidos por Hurley et al (1985) e Lee et al (1985).

Bourgouin et al (1986) clonaram os genes das proteínas de 28 kD e de 130 kD e duas sequências codificadoras de proteínas a partir do plasmídio de 72 MDa da subespécie *israelensis*. Clones recombinantes de *E. coli* contendo o peptídeo de 130 kD foram altamente tóxicos à larvas de mosquito enquanto clones recombinantes de *B. subtilis* contendo o peptídeo de 28 kD foram somente hemolíticos para eritrócitos de carneiros. Posteriormente, Delecluse et al (1988) mostraram que ocorre um efeito sinérgico entre o peptídeo de 130 kD e o produto de uma das sequências codificadoras clonadas por Bourgouin et al (1986) para a ação tóxica contra larvas de *Culex pipiens*. Para outras espécies de insetos testadas somente o peptídeo de 130 kD foi responsável pela atividade larvicida. Um fragmento de 65 kD correspondente a região amino-terminal da proteína de 130 kD mostrou-se suficiente para produzir o efeito tóxico nestas espécies.

Sekar e Carlton (1985), usando o plasmídio purificado de 75 MD de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, clonaram o gene do cristal em um plasmídio bifuncional. Células de *B. megaterium* contendo o plasmídio recombinante produziram inclusões cristalinas com atividade tóxica para larvas de mosquito. Num trabalho posterior, Sekar (1986) demonstrou através de estudos imunológicos e bioquímicos que o produto gênico clonado era apenas o peptídeo de 130 kD e que esta é a proteína responsável pela atividade larvicida.

A toxicidade à larvas de mosquitos também foi atribuída ao peptídeo de 130 kD através de trabalhos com clonagem molecular a partir do plasmídeo de 72-75 MD por Angsuthanasombat et al (1987) e Ward e Ellar (1988).

Pao-intara et al (1988) realizaram uma série de deleções no gene do peptídeo de 130 kD clonado por Angsuthanasombat et al (1987). Os autores mostraram que um peptídeo truncado de 72 kD, resultante das deleções do gene do peptídeo de 130 kD, exibiu toxicidade a larvas de mosquitos semelhante a proteína intacta de 130 kD.

Dois genes homólogos do peptídeo de 130 kD foram clonados e expressos em *E. coli* e *B. subtilis* e mostraram atividade larvicida à mosquitos (Ward e Ellar, 1988). Comparação das sequências nucleotídicas desses dois genes indicaram que eles possuem alto grau de homologia na região C-terminal mas a região N-terminal é bastante diferente (Ward e Ellar, 1988). Um desses genes correspondeu ao mesmo clonado por Sekar e Carlton (1985), Bourguin et al (1986) e Angsuthanasombat et al (1987). O segundo gene apresenta homologia significativa com o gene do peptídeo de 72 kD clonado por Thorne et al (1986) e com o gene clonado do cristal da subespécie *kurstaki* ativa em lepidópteros (Schnepf et al, 1985).

Donovan et al (1988) isolaram um gene que codifica para um peptídeo de 72 kD, a partir da clonagem molecular do plasmídeo de 75 MD da subespécie *israelensis* usando como probe um

oligonucleotídeo baseado na sequência aminoterminal da proteína de 72 kD. Células de *B. megaterium* contendo este gene foram altamente tóxicas a larvas de mosquitos. Através da análise da sequência de DNA foi encontrado um segundo gene do cristal neste plasmídeo recombinante, o gene da proteína de 28 kD descrito por McLean e Whiteley (1987), o qual estava localizado a 1.5 Kb do gene de 72 kD e em orientação oposta (Donovan et al, 1988).

Um peptídeo de 58 kD tóxico à larvas de mosquitos foi produzido em células recombinantes de *B. subtilis* através da clonagem molecular do DNA plasmidial da subespécie *israelensis* (Thorne et al, 1986). Porém, quando este gene clonado era submetido a um sistema de transcrição e tradução *in vitro* o polipeptídeo resultante era de 72 kD. O tamanho da região codificadora de proteína revelou que o gene clonado codificava para um peptídeo de 72 kD. Estas evidências levaram os autores a supor que o peptídeo de 58 kD obtido em *B. subtilis* é resultado do processamento proteolítico *in vivo* de um peptídeo de 72 kD. Num trabalho posterior, Garduno et al (1988) transferiram o plasmídeo recombinante obtido por Thorne et al (1986) para uma linhagem acristalífera da subespécie *israelensis* e verificaram a produção de um peptídeo de 58 kD. Western-blot com anti-soro do peptídeo de 58 kD produzido em *B. subtilis* (Thorne et al, 1986) revelou que este peptídeo é acumulado na subespécie *israelensis* numa proporção menor que as toxinas principais de 130, 70 e 28 kD.

Garduno et al (1988) demonstraram também que o peptídeo de 58

kD é estruturalmente relacionado com o peptídeo de 130 kD e a comparação da sequência de DNA de ambos os genes revelou que estão separados por 2 Kb. Corroborando estes resultados, Bourguin et al (1986) mostraram através de mapas de enzimas de restrição que o gene do peptídeo de 72 kD (Thorne et al, 1986) pode estar localizado dentro do mesmo fragmento de restrição do peptídeo de 130 kD.

Nenhuma homologia foi encontrada entre o gene do peptídeo de 72 kD clonado por Thorne et al (1986) e o gene do peptídeo de igual tamanho clonado por Donovan et al (1988).

Tais resultados indicam que a subespécie *israelensis* mantém múltiplos genes das proteínas do cristal com atividade larvívora. Thorne et al (1986) sugerem que este fato pode ter significado evolutivo uma vez que a existência de genes de toxicidades diferentes porém relacionados numa única linhagem, forneceria à bactéria um maior potencial de variabilidade sem o risco de perder a atividade patogênica. O resultado desse mecanismo evolutivo seria o aumento do espectro de insetos susceptíveis a uma dada linhagem de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Thorne et al, 1986).

A variabilidade dos genes dos peptídeos tóxicos da subespécie *israelensis* pode ser ainda aumentada pela possível ocorrência de um mecanismo de transposição. Bourguin et al (1988) clonaram o gene do peptídeo de 125 kD e demonstraram que este gene contém dois elementos IR. Delecluse et al (1989) sequenciaram este gene e

confirmaram a hipótese de Bourgouin et al (1988) de que o gene do peptídeo de 125 kD poderia estar localizado dentro de um elemento de transposição.

3 - Materiais e Métodos

3.1 - Linhagens de bactérias e plasmídios

A linhagem GR de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* foi gentilmente cedida pelo Prof.Dr. T.Iizuka da Universidade de Hokkaido, Japão.

As linhagens de *Escherichia coli* utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Prof.Dr. Spartaco Astolfi Filho da Universidade de Brasília: JM101-supE, thi, F', tra D36, pro AB, lac Iq², ZAM15; TG1-Δ(lac⁻ pro), supE, thi, hsd D5, F', tra D36, pro AB, lac⁻ Iq, lac ZAM15.

O plasmídio usado como vetor de clonagem foi o pUC8 (Vieira e Messing, 1982), cujo esquema se encontra na figura 1. Possui marca de resistência ao antibiótico ampicilina e o gene estrutural lac Z que codifica para a enzima β-galactosidase. Contém um fragmento de poli-linker com vários sítios únicos para enzimas de restrição inserido no gene lac Z.

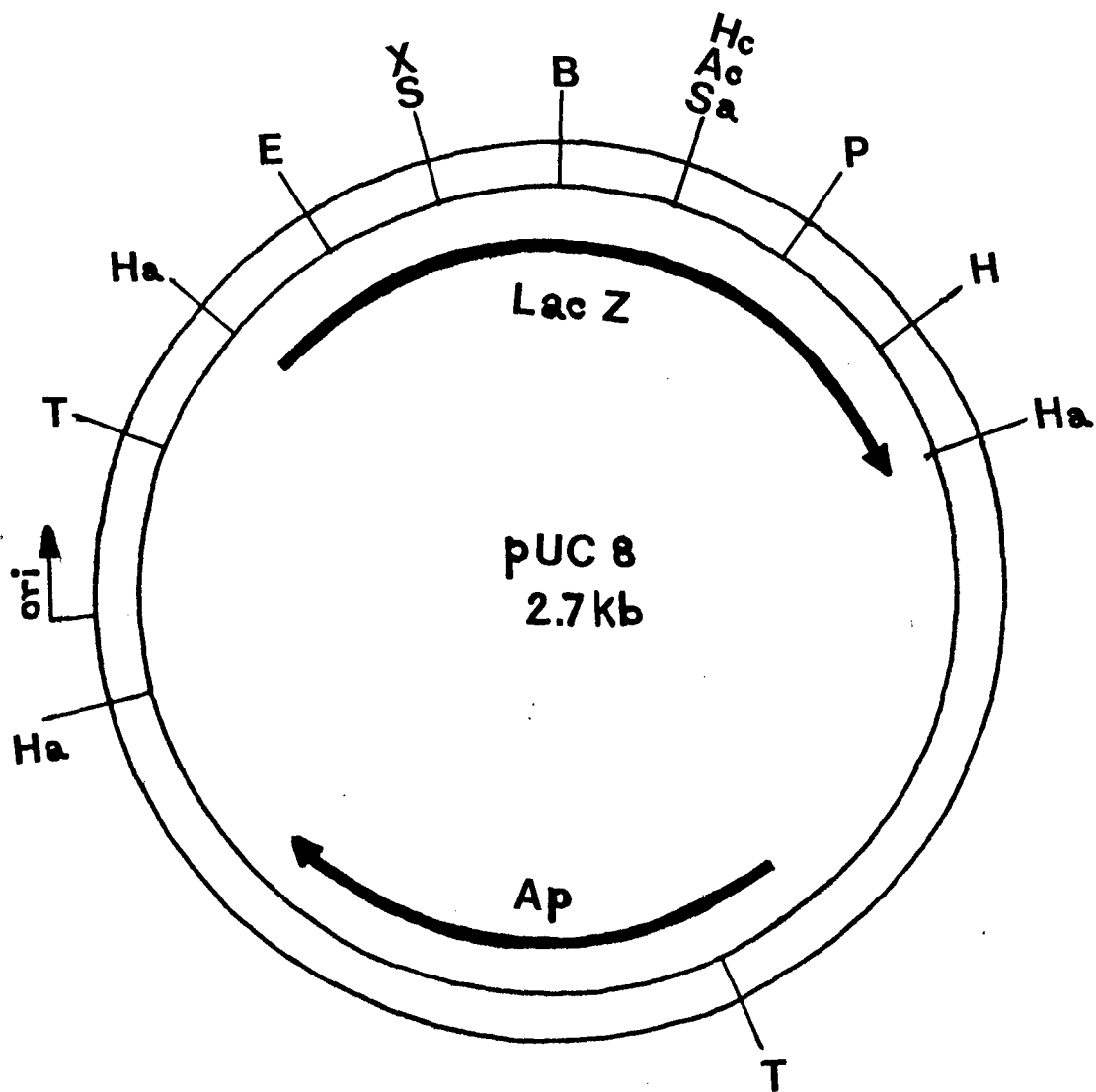


Figura 1 - Representação esquemática do plasmídeo pUC8 (Vieira e Messing, 1982)

ori - origem de replicação

Localização de sítios de enzimas de restrição:

Ac = Acc I, B = Bam HI, E = Eco RI, H = Hind III, Ha = Hae II,

Hc = Hind II, P = Pst I, S = Sma I, Sa = Sal I, T = Taq I,

X = Xma I.

3.2 - Insetos

Ovos de *Aedes fluviatilis* foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Rothaut B. Consoli do Instituto Oswaldo Cruz, Belo Horizonte. Esta espécie de mosquito é encontrada na América Central e do Sul, sendo amplamente distribuída pelo território brasileiro (Foratini, 1965). Os adultos fêmeas são hematófagos, entretanto não há nenhum dado que comprove que esta espécie seja vetor de doenças humanas (Foratini, 1965). A criação dos mosquitos foi mantida no laboratório de acordo com sugestões de Gerson A.R. da Silveira e Newton Goulart Madeira (comunicação pessoal).

Os ovos foram colocados em recipientes plásticos contendo água e os diferentes estádios de desenvolvimento larval foram separados em recipientes aos quais foi adicionado ração de peixe. A água dos recipientes foi trocada a cada dia para evitar a fermentação da ração com conseqüente diminuição do oxigênio o que poderia conduzir à mortalidade das larvas de *A. fluviatilis* as quais se desenvolvem preferencialmente em águas limpas.

Após a eclosão dos adultos, estes foram colocados em gaiolas (armação de ferro de 40x35x35 cm protegida por tela) nas quais manteve-se recipientes com água e açúcar para a alimentação dos mosquitos machos. Uma vez ao dia, foi colocado nas gaiolas um camundongo, cedido pelo Biotério Central da UNICAMP, para que os mosquitos fêmeas se alimentassem. Placas de petri contendo papel de filtro umedecidos em água foram mantidas nas gaiolas para a

oviposição. Os ovos eram, então, retirados do papel de filtro e colocados nos recipientes com água para a continuidade do ciclo de desenvolvimento.

3.3 - Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados neste trabalho serão descritos a seguir.

<u>Meio complexo LB</u>	<u>g/l</u>
Triptona	10.0
Extrato de levedura	5.0
NaCl	5.0
Ágar	15.0

Ajuste de pH para 7.2 . Autoclavagem a 120°C e 1 atm por 15 minutos.

<u>Meio Básico (MB)</u>	<u>g/l</u>
KH_2PO_4	6.8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.12
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.002
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.014
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0.02
$\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.183
Peptona	7.5
Glicose	1.0

Ajuste de pH para 7.2. Autoclavagem a 120°C e 1 atm por 15 minutos.

<u>Meio Ágar Sangue</u>	<u>g/l</u>
Extrato de carne	3.0
Peptona	5.0
NaCl	8.0
Ágar	15.0

Ajuste de pH para 7.2. Autoclavagem a 120°C e 1 atm por 15 minutos, tendo sido adicionado 5 a 10% de sangue de carneiro no meio de cultura a 45°C. O sangue foi coletado a fresco e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Tomomasa Yano.

3.4 - Bioensaios

A avaliação da patogenicidade da linhagem GR de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* foi feita através de bioensaios. As culturas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* foram crescidas em 20 ml de meio MB por 72 horas a 30°C com agitação. A esporulação das células e consequente produção do cristal protéico foram monitoradas através da observação em Microscópio Óptico de Contraste de Fase (Modelo 1, Zeiss).

As culturas foram centrifugadas à 5000g/10min/4°C em centrífuga da marca Beckman e o sedimento, constituído de esporos e cristais, ressuspendido em 1 ml de água destilada estéril.

Diluições apropriadas da suspensão de esporos e cristais

foram inoculadas em placas contendo LB-ágar, em triplicatas, e incubadas a 30°C por 24 horas. Após a germinação dos esporos procedeu-se à contagem do número de esporos viáveis.

O inóculo de esporos e cristais foi adicionado a recipientes com 200 ml de água destilada contendo larvas do quarto estágio de *A. fluviatilis* e mantidos a 25°C. Foi adicionada dieta nos recipientes no início do bioensaio e o experimento foi efetuado com 3 repetições contendo 55 larvas cada qual. O controle do bioensaio foi feito nas mesmas condições acima descritas sem, entretanto, receber nenhum inóculo de esporos e cristais.

A avaliação da mortalidade das larvas foi feita em intervalos de 1 hora até a obtenção de 100% de mortalidade. Os cálculos de LT_{50} (tempo em que ocorre 50% de mortalidade na população teste) foram feitos utilizando-se Análise de Probit (Finney, 1971) através de um programa de computador desenvolvido por Prof. Dr. O.H. Pavan.

3.5 - Extração do DNA plasmidial

3.5.1 - Extração do DNA plasmidial de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

Para a extração do DNA plasmidial em grande escala foi utilizada a técnica de extração alcalina descrita por Birnboim e Doly (1979) com algumas modificações.

Culturas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* foram crescidas em 200 ml de meio de cultura LB sob agitação a 30°C até atingir o início da fase estacionária.

A coleta das células foi feita através de centrifugação à 5000g/10min/4°C. Ressuspendeu-se e lavou-se o sedimento com 10 ml de salina 0.9% (p/v) e centrifugou-se novamente à 5000g/10min/4°C.

O sedimento foi ressuspendido em 2.5 ml de tampão TEN e depois de agitação vigorosa, foram adicionados mais 2.5 ml do mesmo tampão contendo 8 mg/ml de lisozima. O material foi incubado a 37°C por 30 minutos. Adicionou-se, então, 10 ml da solução II e inverteu-se o tubo várias vezes. O material foi incubado a 0°C por 10 minutos. Posteriormente foi adicionado 7.5 ml da solução III misturando-se levemente e incubando por mais 40 minutos à 0°C.

Em seguida foi feita uma centrifugação à 12000g/15min/4°C e ao sobrenadante foi adicionado igual volume de isopropanol, mantendo-se à temperatura ambiente por 5 minutos.

Coletou-se o sedimento resultante de nova centrifugação à 12000g/20min/4°C e secou-se à vácuo.

O sedimento foi, então, ressuspendido em 3 ml de tampão TE contendo 30 µl de RNase A e deixado à temperatura ambiente por 20 minutos. O material foi centrifugado à 12000g/20min/4°C e o sedimento ressuspendido em 1.0 ml de tampão TE.

A seguir, ajustou-se a concentração de acetato de sódio (pH 7.5) para 100 mM e adicionou-se 0.5% de sarcosil. Agitou-se a mistura vigorosamente.

Posteriormente, adicionou-se igual volume de clorofane, agitou-se e o material foi centrifugado à 12000g/5min. Repetiu-se mais uma vez esta extração com clorofane e uma terceira com clorofil.

Ajustou-se a concentração final de acetato de sódio (pH 7.5) para 300 mM e adicionou-se 2.5 vezes de volume de etanol 100%, deixando-se o material precipitar por 30 minutos à 0°C. O precipitado foi coletado por centrifugação à 12000g/15min/4°C e lavado com etanol 70% à -20°C, sem ressuspender. Centrifugou-se o material novamente à 12000g/5min/4°C. O sedimento foi ressuspendido em 100 µl de tampão R e estocado em alíquotas à -20°C.

A estimativa da concentração do DNA foi feita através de espectrofotometria, medindo-se a absorbância a 260 nm (1 unidade de absorbância a 260 nm equivale a 50 µg/ml de DNA) (Dugaiczky et al, 1975).

Para análise do material através de eletroforese, adicionou-se tampão de amostra TA(3x) e aplicou-se em gel de agarose 0.8%. O gel foi preparado com agarose do tipo II (Sigma) em tampão de corrida TEB(1x). A eletroforese foi feita à temperatura ambiente com corrente de 30 a 50 mA. Após a corrida do material, o gel foi corado com 1.0 µg/ml de brometo de etídeo dissolvido em tampão TEB(1x) por 20 minutos e observado sob luz ultravioleta.

3.5.2 - Preparo do vetor de clonagem por ultracentrifugação em gradiente de densidade de cloreto de céσιο-brometo de etídeo (Maxipreparação)

O procedimento utilizado para a extração do plasmídeo vetor pUC8 das células da linhagem JM101 de *E.coli* foi o mesmo descrito no item 3.5.1 até a etapa da centrifugação do material contendo as soluções TEN, II e III, onde a solução TEN foi substituída pela solução I.

Ao sobrenadante obtido adicionou-se sarcosil 1% e igual volume de clorofane para a extração. Agitou-se o material e centrifugou-se à 12000g/5min. Foi coletada a fase aquosa e adicionado igual volume de isopropanol, deixando-a à temperatura ambiente por 10 minutos. O precipitado foi coletado por centrifugação à 10000g/10min. O sedimento foi secado à vácuo e ressuspendido em 1.5 ml de tampão TE.

O material para ultracentrifugação foi colocado em dois tubos de nitrato de celulose (SW 50.1), sendo adicionados em cada tubo: 3 ml da solução IV ($\eta = 1.3780$) e 2 ml da solução V contendo DNA ($\eta = 1.4080$) esta última solução foi colocada no fundo do tubo com uma seringa hipodérmica procurando-se não misturar as duas soluções. A ultracentrifugação foi efetuada à 100000g/15h/20°C.

A banda contendo DNA plasmídial foi visualizada com lâmpada luz ultravioleta longa e coletada com uma seringa. Para remoção do brometo de etídeo foram realizadas três extrações com igual volume

de álcool isoamílico.

Para diluição do CsCl, adicionou-se três volumes de água destilada e dois volumes de etanol 100% deixando o DNA precipitar durante 1 hora à 0°C. O material foi centrifugado à 10000g/30 min/4°C, o sedimento secado à vácuo e ressuscendido em 100 µl de tampão R.

3.5.3 - Extração de DNA plasmidial de E. coli (minipreparação)

Para a extração de DNA plasmidial das células recombinantes de *E. coli* TG1 foi utilizada a técnica descrita por Holmes e Quigley (1981) com algumas modificações apresentadas no curso pós-congresso do I Congresso Iberoamericano sobre Biotecnologia realizado em Havana, Cuba, 1989.

As culturas foram crescidas em 5 ml de meio de cultura LB contendo 100 µg/ml do antibiótico ampicilina e mantidas a 37°C sob agitação durante a noite.

Foi coletado 3 ml das culturas por centrifugação à 12000g/5min e o sedimento foi ressuscendido em 350 µl do tampão TELT com 10 mg/ml de lisozima. Deixou-se à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, incubou-se o material em água fervente por 1 minuto e centrifugou-se a 12000g/10min. Adicionou-se ao sobrenadante 350 µl de tampão TELT, invertendo-se o tubo várias vezes. Posteriormente precipitou-se o material com 700 µl de isopropanol e incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente.

O precipitado foi coletado por centrifugação à 12000g/10min e secado à temperatura ambiente. O sedimento foi ressuspendido em 100 µl de tampão TE. Em seguida adicionou-se igual volume de clorofane e centrifugou-se a 12000g/3min. Repetiu-se este procedimento mais uma vez com clorofane e uma terceira com clorofil. À fase aquosa foi adicionado 1/2 volume de acetato de amônio 7.5 M (pH 7.5) e 2 volumes de etanol 100%, deixando-a por 30 minutos à -20°C.

O precipitado foi coletado por centrifugação à 12000g/15min/4°C, secado à temperatura ambiente e ressuspendido em 30 µl de tampão TE.

O material foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

3.5.4 - Soluções e tampões utilizados na extração de DNA plasmidial

Solução I

Tris-HCl	25 mM	pH 8.0
EDTA	10 mM	
Glicose	50 mM	

Solução II

NaOH	0.2 N
SDS	1% (p/v)

Solução III

Acetato de sódio 3 M
Ácido acético 2 M pH 4.8

Solução IV

Cloreto de césio 6 g
Tampão TE 7 ml

Índice de refração ajustado para $\eta = 1.3780$

Solução V

DNA (em TE) 2.4 ml
CsCl 4.2 g
Brometo de etídeo 0.4 g

Índice de refração ajustado para $\eta = 1.4080$

Solução de RNase A

RNase A 10 mg/ml
Acetato de sódio 50 mM pH 4.8
Fervura em banho-maria por 10 minutos

Fenol Saturado

Fenol 1V
Tris-HCl 1M pH 8.0 1/5V
8-hidroxiquinolina 0.1% (p/v)
 β -mercaptoetanol 0.2%

Solução equilibrada com: Tris-HCl 100 mM (pH 8.0); EDTA 1.0mM
e NaCl 200 mM.

Clorofane

Clorofórmio: fenol saturado 1V/1V
8-hidroxiquinolina 0.05% (p/v)
 β -mercaptoetanol 0.5% (p/v)

Solução equilibrada com Tris-HCl 50 mM (pH 7.5); NaCl 100 mM;
EDTA 2mM.

Clorofil

Clorofórmio 24 V
Álcool isoamílico 1 V

Tampão TE

Tris-HCl 25 mM pH 8.0
EDTA 0.1 mM

Tampão R

Tris-HCl 20 mM pH 7.5
EDTA 0.1 mM

Tampão TEN

Tris-HCl	50 mM	pH 8.0
EDTA	100 mM	
NaCl	100 mM	

Tampão de eletroforese (TEB 10x)

Tris-base	0.89 M
Ácido bórico	0.89 M
EDTA	0.08 M

Ajuste de pH para 8.4.

Tampão de amostra (TA 3x)

TEB 3x

Ficoll	20% (p/v)
Azul de bromofenol	0.1% (p/v)

3.6 - Digestão com enzimas de restrição e extração da enzima

Os protocolos de digestão do DNA com enzimas de restrição foram conduzidos conforme descrito por Maniatis et al (1982).

Os volumes finais dos sistemas de digestão variaram de 20 a 50 μ l e continham tampão de reação adequado à enzima de restrição utilizada. O volume final dos sistemas foi completado com água destilada sendo 10 vezes maior que o volume de enzima adicionado. A proporção enzima/DNA seguiu o critério sugerido pelo catálogo da

New England Biolabs (USA).

A incubação dos sistemas foi feita a 37°C por 3 horas. Aliquotas dos sistemas digeridos foram retiradas para serem analisadas por eletroforese em gel de agarose.

Amostras do DNA plasmidial de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* e do plasmídeo pUC8 digeridos com enzima de restrição foram reunidos num só sistema cujo volume foi completado para 100µl de tampão R. A concentração de NaCl foi ajustada para 100 mM e a seguir efetuou-se duas extrações com clorofane e uma com clorofil, conforme o procedimento descrito no item 3.5.1.

Ajustou-se a concentração do NaCl da fase aquosa para 300 mM e a precipitação do DNA foi feita como descrito no item 3.5.1. O sedimento foi ressuspendido em 10 µl de tampão R.

Tampão de reação 2 (Hind III)

Tris-HCl	50 mM	pH 8.0
MgCl ₂	10 mM	
NaCl	50 mM	

3.7 - Ligação de fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA foram ligados pela enzima T₄ DNA ligase (40 UD na presença do tampão de ligação para um volume final de 20 µl. O sistema foi incubado a 16°C por cerca de 12 horas sendo, então, utilizado para transformar células de *E. coli*.

Tampão de ligação (10x)

Tris-Hcl	500 mM	pH 7.4
MgCl ₂	100 mM	
DTT	100 mM	
Espermidina	10 mM	
ATP	10 mM	

3.8 - Transformação de células de E.coli

Células de *E.coli* foram transformadas pelo método do Tris-cálcio, descrito por Darget e Ehrlich (1979), com algumas modificações.

Inoculou-se um clone isolado de *E.coli* em 5 ml de meio LB a 37°C durante a noite, sob agitação. Tomou-se 1 ml desse pré-inóculo e inoculou-se em 50 ml de meio LB. A cultura foi incubada a 37°C com agitação até atingir, aproximadamente, $2 \cdot 10^7$ células/ml (0.2-0.3 DO, 650 nm).

Células de 30 ml de cultura foram coletadas por centrifugação à 4000g/10min/4°C e o sedimento ressuspendido em 15 ml de solução Tris-cálcio a 0°C, esterilizada por filtração, e incubado a 0°C por 20 minutos.

O material foi novamente centrifugado à 4000g/10min/4°C e o sedimento ressuspendido em 1 ml da solução Tris-cálcio a 0°C e incubado por 1 hora a 0°C.

Para a transformação das células competentes, foi adicionado de 0.1 a 0.3 μg do sistema de ligação para 100 μl de suspensão de células. A mistura foi incubada a 0°C por 30 minutos e em seguida foi dado um choque térmico de 37°C por 5 minutos. Adicionou-se, então, 1 ml de meio LB para cada 100 μl de células, incubando-as por mais 1 hora a 37°C. As células foram plaqueadas em meio seletivo adequado e incubadas a 37°C durante a noite.

Solução Tris-Cálcio

Tris-HCl	20 mM	pH 7.0
CaCl ₂	100 mM	

3.9 - Seleção e análise de recombinantes

Os procedimentos utilizados para a seleção e análise dos clones resultantes da transformação de *E.coli* serão descritos a seguir.

3.9.1 - Clones portadores do plasmídio híbrido contendo DNA de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

A seleção dos clones transformantes foi feita inicialmente através de plaqueamento em meio LB com 150 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina, 20 $\mu\text{g/placa}$ de X-gal 2% e 20 $\mu\text{l/placa}$ de IPTG 100 mM. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite. Os clones transformantes

portadores de plasmídios híbridos foram detectados pela reação negativa ao X-gal e isolados através de repicagem para placas contendo meio LB e 150 µg/ml de ampicilina.

3.9.2 - Detecção de atividade hemolítica

Os clones transformantes foram testados quanto à capacidade de produzir halos de hemólise através de inoculação por ponto dos mesmos em placas com meio Ágar Sangue contendo 150 µg/ml de ampicilina, incubadas a 37°C por 18 horas.

Posteriormente, alguns clones com reação positiva ao teste de hemólise acima descrito, foram retestados usando-se extratos celulares. Culturas de 200 ml em meio LB com 100 µg/ml de ampicilina, foram crescidas a 37°C sob agitação até atingir fase estacionária (0.9 DO, 650 nm). Centrifugou-se a 5000g/10min/4°C e o sedimento ressuspendido em 1ml de água destilada estéril.

A suspensão de células foi, a seguir, sonicada por períodos de 15 segundos à máxima intensidade no sonicador da marca Thornton (Inpec). Aliquotas do material foram liofilizadas e ressuspendidas em tampão de bicarbonato de sódio 0.1 M (pH 10.5) contendo 0.01 U/ml de protease (Sigma). O material assim preparado foi incubado a 37°C por 1 hora e, então, inoculado em placas com meio Ágar Sangue contendo 150 µg/ml de ampicilina, mantidas a 37°C por 18 horas.

Em ambos os testes de atividade hemolítica realizados,

utilizou-se a linhagem GR e a *Escherichia coli* TG1 com o pUC8 como controles, preparadas do mesmo modo que os clones testados.

3.9.3 - Detecção de atividade larvicida

Foram realizados bioensaios para a determinação da atividade larvicida dos clones recombinantes. A preparação dos extratos celulares foi feita conforme descrito no item 3.9.2.

Foi adicionado 500 μ l do material sonicado a copos plásticos contendo 20 larvas do segundo estágio de *A. fluviatilis* em 50 ml de água destilada. Adicionou-se dieta das larvas no início do bioensaio. Todos os testes foram feitos em duplicatas e a contagem da mortalidade foi feita num período de até 48 horas. O controle do bioensaio foi feito nas mesmas condições acima descritas sem no entanto receber nenhum inóculo. Extrato celular de *Escherichia coli* TG1 com o pUC8 intacto e da linhagem GR foram utilizados como controles dos bioensaios.

3.9.4 - Hibridização com sonda do gene da proteína de 28 kD

3.9.4.1 - Transferência do DNA plasmidial para a membrana de nitrocelulose

A transferência do DNA plasmidial dos clones recombinantes digeridos com Hind III para a membrana de nitrocelulose (Hybond-C)

foi feita de acordo com especificações da Amersham (Amersham International, U.K.) e da metodologia descrita por Maniatis et al (1982).

Após eletroforese em gel de agarose 0.8%, o gel foi lavado duas vezes com água destilada estéril e incubado por 1 hora à temperatura ambiente na solução de desnaturação. O gel foi, então, novamente lavado com água destilada estéril e incubado por 1 hora à temperatura ambiente na solução de neutralização.

Preparou-se uma cuba de eletroforese horizontal com tampão SSC (20x) nos reservatórios e com 3 folhas de papel de filtro Whatman 3MM conectando os 2 reservatórios. O gel foi retirado da solução de neutralização e colocado sobre a camada de papel de filtro. Colocou-se a membrana, previamente umedecida em SSC 2x, em cima do gel e acima dela 4 folhas de papel Whatman. Sobre as folhas de papel Whatman foi colocada uma camada de 10 cm de papel toalha. No topo da camada de papel toalha colocou-se uma placa de vidro com um peso em cima. A transferência foi feita durante a noite.

Após o processo de transferência, a membrana foi incubada com SSC 6x por 5 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, colocada sobre o papel de filtro para secagem. Posteriormente, a membrana foi incubada em estufa a 80°C por 2 horas e, então, guardada até a hibridização com a sonda.

3.9.4.2 - Marcação da sonda

A sonda utilizada foi um oligonucleotídeo de 20 MER, sintetizada por Prof.Dr. Spartaco Astolfi Filho (Universidade de Brasília, DF) a partir de sequência do gene da proteína de 28 kD clonado por Waalwijk et al (1985). A sequência da sonda sintetizada foi a seguinte: 5'-GCCCTACGCTTTAGTATGCC-3'.

A reação de marcação da sonda foi preparada como se segue: oligonucleotídeo- 2 μ l (20 ng); tampão quinase 10x- 2 μ l; γ -³²P ATP-4 μ l; polinucleotídeo quinase - 2 μ l (18u); água - 10 μ l.

3.9.4.3 - Hibridização da membrana

A hibridização da sonda com DNA plasmidial foi feita de acordo com as especificações da Amersham com modificações sugeridas pelo Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho (comunicação pessoal).

A pré-hibridização foi feita colocando-se a membrana em cuba na qual foi adicionada 10 ml de solução de pré-hibridização, mantendo-se a 40°C por 2 horas sob leve agitação.

A solução de pré-hibridização foi retirada e colocou-se a solução de hibridização contendo a sonda marcada, previamente fervida em banho-maria por 2 minutos. A membrana foi incubada nesta solução a 40°C por 15 horas.

Após a hibridização, a membrana foi lavada por 2 vezes em solução de lavagem à temperatura ambiente por 10 minutos, sob leve

agitação. Em seguida, fez-se mais 2 lavagens com solução de lavagem a 37°C por 1 hora com leve agitação.

A membrana foi, então, colocada para secar sobre papel de filtro e posteriormente exposta a filme de raio X (Hyperfilm-MP, Amersham) a -70°C por 96 horas.

3.9.4.4 -Soluções e tampões utilizados na hibridização com sonda radioativa

Solução de desnaturação

NaCl	1.5 M
NaOH	0.5 M

Solução de neutralização

Tris-HCl	1.0 M	pH 7.2
NaCl	1.5 M	
EDTA	1 mM	

Solução SSC (20x)

NaCl	3.0 M
Citrato de sódio	0.3 M
Ajuste de pH 7.0.	

Solução Denhardt's (DRT'S)(100 x)

Albumina de soro bovino (BSA)	2% (p/v)
Ficoll	2% (p/v)
Polivinil pirolidona	2% (p/v)

Solução de DNA de esperma de salmão (DSD)

DNA de esperma de salmão	5 mg/ml
--------------------------	---------

Solução fervida em banho-maria por 10 minutos e sonicada.

Solução de pré-hibridização

SSC (20x)	3.0 ml
DRT'S (100x)	0.5 ml
SDS 20% (p/v)	0.25 ml
Pirofosfato de sódio 5% (p/v)	0.1 ml
DSD (5 mg/ml)	0.2 ml
H ₂ O	6.0 ml

Solução de hibridização

SSC (20x)	3.0 ml
DRT'S (100x)	0.5 ml
Pirofosfato de sódio 5%	0.1 ml
H ₂ O	6.4 ml

3.9.5 - Análise imunológica das proteínas produzidas pelos clones recombinantes de E.coli

3.9.5.1 - Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

As proteínas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* foram analisadas através de eletroforese em gel gradiente de 5 a 20% de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970) com algumas modificações.

As soluções de 5 e 20% de poliacrilamida foram preparadas separadamente em provetas e então colocadas numa cuba de formação de gradiente ligada em uma bomba peristáltica (Incibrás, BP-100). Ligou-se a bomba peristáltica em velocidade máxima e as soluções de acrilamida foram misturadas com auxílio de um agitador magnético, fluindo para o molde das placas de vidro formando um gradiente linear de 5 a 20% de poliacrilamida. Após a polimerização do gel de resolução foi adicionado o gel de empacotamento.

Soluções e tampões utilizados no preparo e eletroforese dos géis de SDS-PAGE

Solução de acrilamida

Acrilamida	30% (p/v)
bis-acrilamida	0.8% (p/v)

Solução filtrada em papel Whatman número 1 e mantida em frasco escuro a 4°C.

Tampão de resolução

Tris-HCl	3.0 M	pH 8.8
----------	-------	--------

Tampão de empacotamento

Tris-HCl	0.5 M	pH 6.8
----------	-------	--------

Solução de dodecil sulfato de sódio (SDS)

SDS	10% (p/v)
-----	-----------

Solução de persulfato de amônia (PSA)

PSA	1.5% (p/v)
-----	------------

Tampão de amostra (3x)

Tris-HCl	0.5 M	pH 6.8
Glicerol	10% (p/v)	
β -mercaptoetanol	5% (p/v)	
SDS	2% (p/v)	

Solução de azul de bromofenol

Azul de bromofenol 0.1% (p/v)

Tampão de reservatório

Tris 25 mM
Glicina 0.192 M
SDS 0.1% (p/v)

Solução de coloração

Coomassie Blue R 250 0.25% (p/v)
Metanol 90%
Ácido acético 10%

Solução de descoloração

Metanol 30%
Ácido acético 7%

Gel de SDS-PAGE de gradiente 5 a 20% (SDS-PAGE)

<u>Gel de resolução</u>	5%	20%
Solução de acrilamida	1.6 ml	6.6 ml
Tampão de resolução	1.25 ml	1.25 ml
SDS 10%	90 μ l	90 μ l
Persulfato de amônio 1.5%	230 μ l	230 μ l
Glicerol	-----	1.0 ml
TEMED	3.3 μ l	3.3 μ l
H ₂ O qsp	10 ml	10 ml

Gel de SDS-PAGE 12.5%

Gel de resolução

Solução de acrilamida	12.5 ml
Tampão de resolução	3.75 ml
SDS 10%	300 μ l
Persulfato de amônio 1.5%	1.5 ml
H ₂ O	12 ml

Gel de empacotamento

Solução de acrilamida	1.25 ml
Tampão de empacotamento	2.5 ml
SDS 10%	100 μ l
Persulfato de amônio 1.5%	0.5 ml
TEMED	7 μ l
H ₂ O	5.6 ml

3.9.5.2 - Preparo das amostras para eletrofore em gel de SDS-PAGE

A cultura de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* foi crescida em 200 ml de meio MB a 30°C sob agitação até obtenção de esporos e cristais livres (aproximadamente 72 horas). A esporulação das células e consequente produção do cristal proteico foram monitoradas através da observação em Microscópio Óptico de

Contraste de Fase (Modelo 1, Zeiss). As células foram centrifugadas à 5000g/10min/4°C. O sedimento ressuspenso em 1 ml de água destilada estéril e a seguir sonicado por períodos de 15 segundos à máxima intensidade no sonicador Thornton (Inpec).

Adicionou-se tampão (3x) e solução de azul de bromofenol 0.1% em alíquotas das amostras sonicadas. Em seguida as amostras foram fervidas em banho-maria por 5 minutos e colocadas no gel gradiente de 5 a 20% de SDS-PAGE.

A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente a 100 Volts até que a frente de azul de bromofenol atingisse o final do gel. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado por 2 horas com solução de coloração e em seguida colocado na solução de descoloração.

3.9.5.3 - Purificação das proteínas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

As proteínas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* foram preparadas conforme descrito no item 3.9.5.2 e purificadas em larga escala em géis de 12.5% de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (Laemli, 1970) compostos por um gel de resolução 12.5% de acrilamida e um gel de empacotamento.

Um total de 400 µl de amostra foi colocado nos géis sendo que foram obedecidas as mesmas condições de corrida eletroforética descritas no item 3.9.5.2. Após a eletroforese os géis foram

retirados das placas e colocados em recipientes plásticos limpos. Os géis foram, então, lavados com água destilada gelada e corados com uma solução de KCl 0.25 M e DTT 1 mM gelada (Hager e Burges, 1980). As bandas foram visualizadas, cortadas dos géis e estocadas a -20°C.

3.9.5.4 - Preparo dos antisoros contra proteínas do *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

Anticorpos contra as principais proteínas do cristal *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* foram produzidos separadamente em coelhos brancos de linhagens puras. Os coelhos foram injetados subcutaneamente com o antígeno dissolvido em 1.5 ml de água destilada estéril e emulsificado em igual volume de adjuvante Freund completo (Difco). Após um intervalo de 15 dias, os coelhos foram injetados novamente nas mesmas condições acima descritas usando-se agora adjuvante Freund incompleto (Difco). Após 15 dias, foram coletados 15 ml de sangue de cada coelho. O sangue coletado foi mantido a 5°C durante a noite e centrifugado a 4000 rpm em uma centrífuga de mesa (Fanem, Excelsa Baby) por 15 minutos. Coletou-se o sobrenadante contendo o antisoro que foi aliquoteado e estocado a -20°C.

A imunopurificação dos antisoros foi efetuada utilizando-se extrato celular de *Escherichia coli* TG1 com o pUC8 intacto. Cultura de *Escherichia coli* TG1 em 500 ml de meio LB com 100 µg/ml de

ampicilina foi crescida a 37°C sob agitação durante a noite. Células foram centrifugadas a 5000g/10min/4°C e o sedimento ressuspendido em 10 ml de água estéril. A seguir, a suspensão de células foi sonicada por períodos de 15 segundos à máxima intensidade no sonicador da marca Thornton (Inpec). Duas tiras (2x10 cm) de membrana de nitrocelulose (Hybond-C) foram incubadas por 10 minutos no extrato celular, obtido através da sonicação, diluído 1:10 em tampão Tris salino (TBS). As tiras de nitrocelulose foram, então, lavadas por 3 vezes com 5 minutos cada, em solução de TBS-Tween 20 (TBS-T). Em seguida, uma tira de nitrocelulose foi incubada por 20 minutos sob agitação em solução de tampão TBS contendo 5% de leite desengordurado (Molico) e o antisoro diluído 1:50. Posteriormente, a outra tira de nitrocelulose foi incubada por mais 20 minutos na solução acima descrita. As tiras de nitrocelulose foram descartadas e a solução contendo o antisoro imunopurificado, utilizada na análise imunológica descrita a seguir.

3.9.5.5 - Análise imunológica das proteínas produzidas pelos clones recombinantes de E.coli

Os extratos celulares dos clones recombinantes de *E.coli* foram preparadas conforme descrito no item 3.10.5.2, excetuando-se as condições de crescimento. As culturas de *E.coli* foram crescidas em 200 ml de meio LB a 37°C durante a noite.

Amostras dos extratos celulares dos clones recombinantes de *E.coli* e de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-PAGE 12.5% preparado como descrito no item 3.9.5.3. Após a eletroforese, o gel foi incubado em 250 ml de tampão de transferência por 1 hora à temperatura ambiente.

A transferência das proteínas do gel foi feita em uma unidade de transferência Multiphor Novablot (LKB) segundo especificações da LKB (Produkter, Bromma, Sweden).

As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham, Hybond-C Extra) colocada sobre 9 folhas de papel de filtro umedecidas com tampão de transferência. Colocou-se o gel sobre a membrana e acima dele foi colocado mais 9 folhas de papel de filtro umedecidas com o tampão de transferência. A transferência procedeu-se a 0.8 mA/cm^2 por um período de 2 horas.

Após a transferência, a membrana foi colocada em solução bloqueadora e incubada a 37°C sob lenta agitação por 1 hora. Em seguida, substituiu-se a solução bloqueadora por solução composta de antisoro imunopurificado diluído 1:50 em tampão TBS contendo 5% de leite desengordurado (Molico) (item 3.9.5.4). A membrana foi incubada durante a noite sob lenta agitação.

A membrana foi, então, lavada 2 vezes brevemente e 3 vezes por 5 minutos com solução de TBS-T. Após as lavagens a membrana foi incubada por 1 hora com o conjugado Proteína A-peroxidase

(Amersham), diluído 1:5000 em TBS. A membrana foi novamente lavada com TBS-T e incubada com solução reveladora até o aparecimento da coloração desejada. Lavou-se, então, a membrana com água destilada e incubou-se novamente em solução bloqueadora para a reação com outro anticorpo.

3.9.5.6 - Soluções e tampões utilizados na transferência de proteínas do gel

Tampão de transferência

Tris	48 mM
Glicina	30 mM
SDS	0.035% (p/v)
Metanol	20%

Tampão TBS (10x)

Tris	200 mM
NaCl	1.37 M

Ajuste de pH para 7.6.

Solução TBS_Tween 20 (TBS-T)

Tampão TBS contendo 0.1% de Tween 20

Solução Bloqueadora

Tampão TBS contendo 0.1% de Tween 20 e

leite desengordurado 5% (p/v)

Solução reveladora

Tampão Acetato	0.05 M	pH 4.5
H ₂ O ₂	100 µl	
Dimetilformamida	3 ml	
3-amino-9-etilcarbazol	50 mg	

4 - Resultados

4.1 - Avaliação da atividade larvicida de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e caracterização de proteínas

Os bioensaios realizados com larvas do quarto estágio de *A. fluviatilis* demonstraram que a linhagem GR de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* é patogênica à larvas deste mosquito. A tabela 1 mostra os dados de mortalidade larval obtidos com a inoculação da suspensão de cristais e esporos de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Nos tratamentos controle não se obteve nenhuma larva morta. Os dados de mortalidade acumulada para cada repetição nos intervalos de 1 hora do bioensaio, foram submetidos à análise de variância (Tabela 2) para verificação da homogeneidade dos valores obtidos para cada repetição. O valor de F, obtido para as médias de mortalidade larval acumulada de cada uma das três repetições do experimento, foi não significativo, nível de 5%, o que nos permitiu trabalhar com dados médios da mortalidade larval acumulada para o cálculo do LT_{50} .

O valor do LT_{50} obtido para a dose de 10^5 cels/ml foi de 5 horas e 38 minutos.

Tendo-se obtido atividade larvicida positiva procedeu-se a seguir à caracterização das proteínas apresentadas por este isolado afim de contrastar com aquelas descritas na literatura.

A caracterização do perfil proteico da linhagem GR foi feita

através de gel gradiente de 5 a 20% de poliacrilamida (figura 2). O padrão eletroforético revelou a presença de 4 polipeptídeos principais de pesos moleculares de 68, 38, 28 e 17 kD.

4.2 - Construção do banco plasmidial de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*

A construção do banco plasmidial de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* foi feita segundo estratégia esquematizada na figura 3.

Aproximadamente 5.0µg do DNA plasmidial de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* e 7.5 µg do plasmídeo pUC8 foram digeridos com a enzima de restrição Hind III. A digestão do DNA plasmidial da subespécie *israelensis* gerou fragmentos de DNA cujos tamanhos variaram de aproximadamente 2 a 9.5 Kb, sendo que os fragmentos de 6 a 9.5 Kb apresentaram-se em maior concentração e número.

Os fragmentos de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* e do pUC8 digeridos com Hind III foram ligados e utilizados para transformar *E.coli* TG1. Obteve-se frequência de transformação da ordem de 10^4 células/µg de DNA. Os transformantes foram inicialmente selecionados quanto a resistência ao antibiótico ampicilina e a capacidade de degradar o substrato cromogénico X-gal. Clones azuis possuíam o plasmídeo pUC8 intacto e os clones brancos correspondiam à reação X-gal negativa sendo portanto,

clones recombinantes portadores de fragmentos de DNA inserido no sítio Hind III do pUC8 resultando em uma β -galactosidase não funcional.

Foram isolados 850 colônias recombinantes. Assumindo-se que o peso molecular dos fragmentos inseridos seja, em média, 8 Kb e que o peso molecular do genoma de *B. thuringiensis* seja o mesmo que o de *E. coli*, 4200 Kb, calculou-se através da fórmula desenvolvida por Clarke e Carbon (1976), que haveria 80% de chance que uma determinada sequência de DNA estivesse representada neste banco. O número de recombinantes necessários para que uma determinada sequência estivesse representada neste banco com 95% de chance seria de 1500. Isso foi calculado através da expressão Clarke e Carbon (1976):

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-f)}$$

onde: N é o número de transformantes;

p é a probabilidade de uma certa frequência ser representada entre os recombinantes;

f é o tamanho médio dos fragmentos de restrição como uma fração do tamanho total do genoma.

Tabela 1 - Mortalidade causada por *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* linhagem GR em larvas de *Aedes fluviatilis*

Repetições	Mortalidade larval acumulada (horas)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0	2	9	26	44	50	53	55
2	0	1	9	27	44	48	53	55
3	0	2	12	26	40	43	48	55

Dose: 10^5 cels/ml de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*

Tabela 2: Análise de variância dos valores de mortalidade acumulada obtidos para cada repetição do bioensaio de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* em larvas de *A. fluviatilis*.

	SQ	GL	QM	F
Tratamentos(1)	10923.70	7	1560.520	451.24
Blocos (2)	12.25	2	6.125	1.77 NS
Resíduo	48.42	14	3.458	
Total	10984.30	23		

(1) - Intervalos de 1 hora

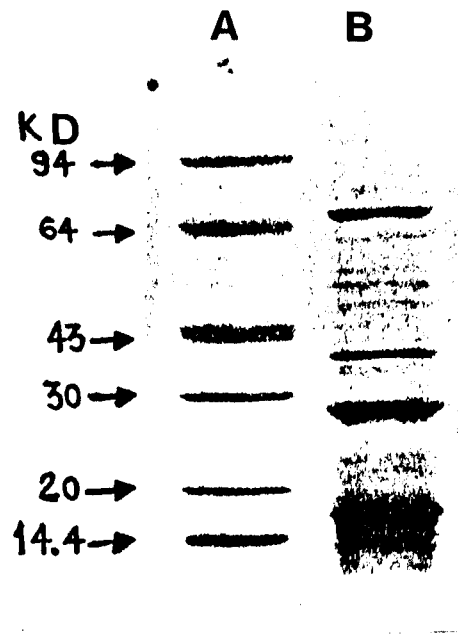


Figura 2 - Proteínas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*.
em gel gradiente de 5 a 20% de SDS-PAGE

A = Padrão de peso molecular (fosforilase b de músculo de coelho, 94 kD; albumina de soro bovino, 67 kD; ovalbumina de clara de ovo, 43 kD; anidrase carbônica de eritrócitos bovinos, 30 kD; inibidor de tripsina de soja, 20.1 kD; α -lactalbumina de leite bovino, 14.4 kD); B = extrato celular de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* linhagem GR.

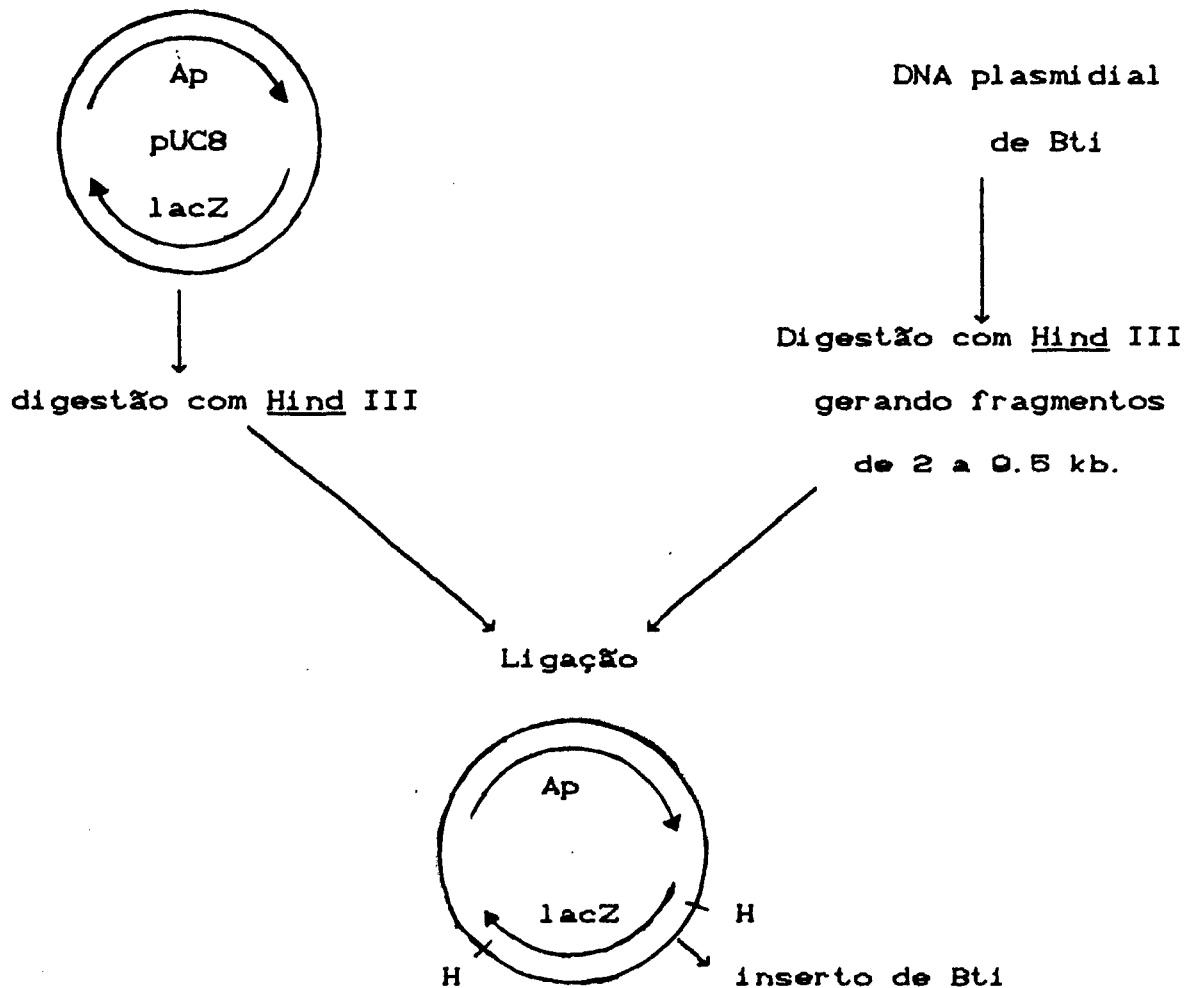


Figura 3 - Etapas utilizadas para a construção do banco plasmidial.

Bti - *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

Na representação esquemática do pUC8 só estão assinalados os genes e sítios de restrição de interesse.

4.3 - Caracterização dos clones recombinantes

A caracterização dos clones recombinantes a partir do banco plasmidial foi efetuada através de várias estratégias: 1 - atividade hemolítica; 2 - atividade larvicida; 3 - hibridização com o gene da proteína de 28 kD; 4 - análise imunológica dos peptídeos produzidos pelos genes clonados.

4.3.1 - Caracterização da atividade hemolítica

Os clones recombinantes de *E.coli* TG1 foram plaqueados em meio Ágar Sangue contendo ampicilina. Após o crescimento a 37°C por 18 horas, verificou-se que alguns clones produziam halo de hemólise porém muito pequeno (inferior a 1 mm), visualizados com auxílio de um negatoscópio. De um total de 850 colônias testadas 8.2% apresentaram halo de hemólise. Posteriormente, extratos celulares de 9 clones recombinantes hemolíticos, escolhidos pela nitidez do halo, foram liofilizados e solubilizados em bicarbonato de sódio 0.1 M contendo 0.01 U/ml de protease (Sigma). Quando crescidos em meio Ágar Sangue a 37°C por 18 horas, verificou-se a produção de halo de hemólise aumentado em relação ao produzido no teste anterior em 8 dos 9 clones recombinantes de *E.coli* (figura 4). A *E.coli* que recebeu o plasmídeo vetor pUC8 intacto, foi utilizada como controle e não apresentou formação de halo em nenhum dos testes de hemólise.

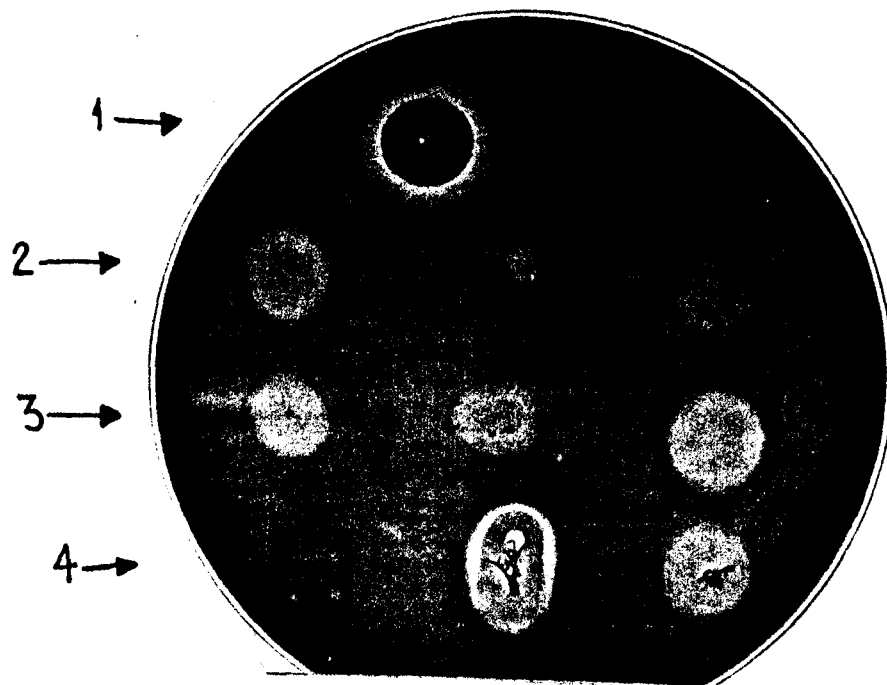


Figura 4 - Clones recombinantes com atividade hemolítica.

Da esquerda para direita extratos celulares de: linha 1: *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (à esquerda) e de *E. coli* TG1 contendo plasmídeo pUC8 intacto (à direita); linha 2: clones recombinantes CR1, CR2 e CR3; linha 3: clones recombinantes CR4, CR5 e CR6; linha 4: clones recombinantes CR7, CR8 e CR9.

4.3.2 - Caracterização da atividade larvicida

Os clones recombinantes de *E.coli* hemolíticos positivos selecionados na etapa anterior com as células intactas foram testados em bioensaios para avaliação da atividade larvicida em larvas do segundo estágio de *A. fluviatilis*. Foram testados 70 clones e selecionados 9 com atividade larvicida, os quais correspondem aos 9 clones testados para atividade hemolítica com extratos celulares solubilizados. A Tabela 2 mostra os dados de mortalidade larval acumulada causada pelos clones recombinantes nos intervalos de 24 e 48 horas de bioensaio. No tratamento controle onde foi inoculado a *E.coli* TG1 portadora do plasmídeo pUC8 intacto não houve mortalidade larval. Os clones recombinantes de *E.coli* TG1 receberam a denominação CR e a respectiva numeração de 1 a 9. Dos 9 clones larvicidas, somente o CR7 não apresentou atividade hemolítica no teste realizado com extrato celular.

4.3.3 - Análise dos fragmentos de DNA clonados de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*

Os plasmídios híbridos dos clones recombinantes de CR1 à CR9 foram extraídos em pequena escala, digeridos com a enzima de restrição Hind III e analisados após corrida eletroforética.

A digestão dos plasmídios híbridos apresentou fragmentos de DNA cujos tamanhos aproximados variaram de 700 pb a 2.26 kb e

estão apresentados na figura 4.

Os plasmídios dos clones recombinantes CR3, CR5 e CR6 apresentaram insertos de DNA de mesmo tamanho, aproximadamente 2.26 kb. Os clones CR7 e CR9 apresentaram plasmídios com insertos de aproximadamente 1.75 kb e 700 pb, respectivamente. A digestão com Hind III dos plasmídios dos clones CR1, CR2 e CR4 não resultou em liberação de fragmentos visíveis pela análise em gel de agarose. Na figura 5 o plasmídio híbrido do clone CR8 não se apresenta digerido porém resultados de outras digestões mostraram que este plasmídio não libera fragmentos visíveis pela análise em gel de agarose.

4.3.4 - Hibridização com o gene da proteína de 28 kD

O experimento de hibridização com a sonda do gene da proteína de 28 kD de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* foi realizado com os 9 clones recombinantes de *E. coli* larvicidas e hemolíticos. Nenhum dos clones testados apresentou homologia com o oligonucleotídeo sintetizado a partir da sequência do gene da proteína de 28 kD (Waalwijk et al, 1985).

Entretanto, o oligonucleotídeo apresentou homologia com o vetor de clonagem pUC8 utilizado, pois em todos os clones testados houve hibridização com o vetor.

Tabela 3 - Mortalidade causada pelos clones recombinantes de *E. coli* (a)

LINHAGENS	MORTALIDADE LARVAL ACUMULADA			
	24 h		48 h	
	Núm.	%	Núm.	%
CR1	6	30	14	70
CR2	0	0	0	45
CR3	8	40	16	80
CR4	3	15	16	80
CR5	5	25	17	85
CR6	0	0	11	55
CR7	4	20	19	95
CR8	4	20	16	80
CR9	1	5	16	80
TG1/pUC8	0	0	0	0
GR	20	100	20	100

(a) Número de larvas testadas/linhagem = 20.

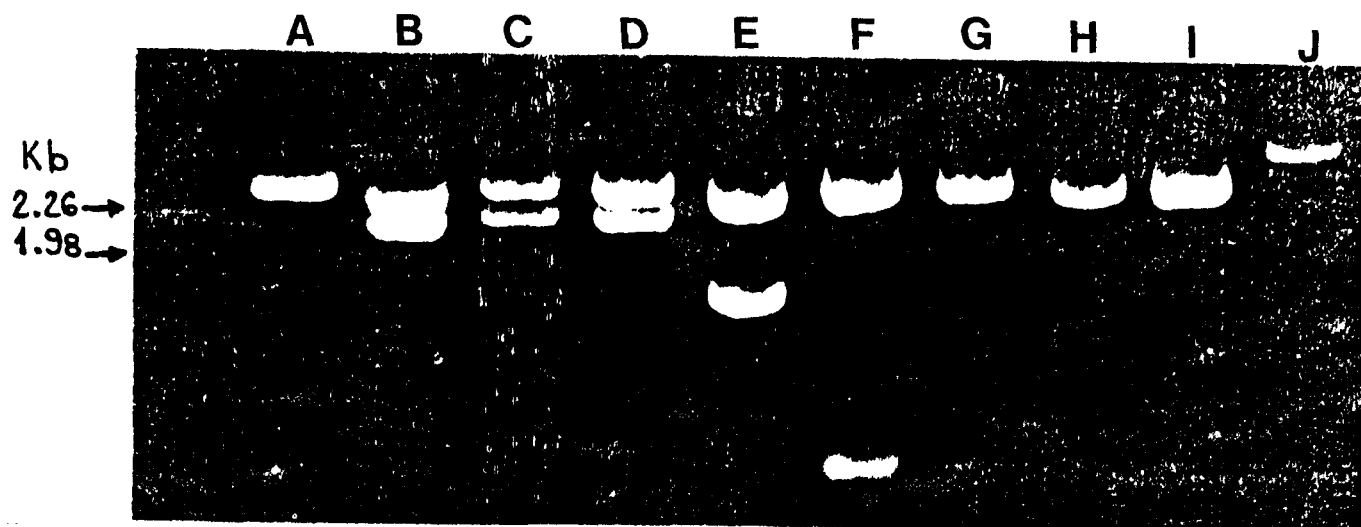


Figura 5 - Perfil eletroforético da restrição com Hind III do plasmídeo pUC8 e dos clones recombinantes de *E. coli*.

A = pUC8/Hind III; de B a J, clones recombinantes: CR3, CR5, CR6, CR7, CR9, CR1, CR2, CR4 e CR8. Padrão de peso molecular à esquerda: λ /Hind III

4.3.5- Análise imunológica das proteínas produzidas pelos clones recombinantes de E.coli

Foram produzidos anticorpos contra as principais frações polipeptídicas de 68, 38 , 28 e 17 kD de *B.thuringiensis* subsp. *israelensis* isoladamente. Os antisoros preparados foram utilizados na análise imunológica (Western-blot) das proteínas produzidas pelos clones recombinantes de *E.coli* larvicidas e hemolíticos positivos.

Não foi efetuado um título prévio dos antisoros e a diluição utilizada foi baixa tendo sido obtida, portanto, fraca reação com os anticorpos. Apesar dos antisoros terem sido utilizados separadamente na reação com as proteínas imobilizadas na membrana, registrou-se apenas o resultado final da análise imunológica (figura 6). Houve reação inespecífica com algumas proteínas provavelmente devido à existência prévia de anticorpos para *E.coli* e à ineficiência da imunopurificação realizada.

Na tabela 4 estão sumarizados os resultados obtidos com a análise imunológica (figura 6). O anticorpo contra a proteína de 68 kD reagiu com a fração protéica correspondente da linhagem GR da subespécie *israelensis*, mas não reconheceu nenhum polipeptídeo dos extratos celulares dos clones recombinantes. O anticorpo contra a proteína de 38 kD reconheceu um polipeptídeo de tamanho semelhante na linhagem GR e em todos os clones testados porém, apresentou reação cruzada com um peptídeo de 33 kD nos clones CR3,

CR5, CR6 e CR8. O anticorpo contra a proteína de 28 kD reconheceu um peptídeo de 28 kD em todos os clones testados e na linhagem GR.

Selecionou-se somente os clones CR3, CR5, CR6, CR7 e CR8 para a análise imunológica pois pretendia-se verificar os peptídeos produzidos pelos três primeiros que apresentaram inserto de DNA do mesmo tamanho (figura 5); os peptídeos produzidos por um clone não hemolítico, CR7, e por um clone que não havia liberado fragmento visível pela análise em gel de agarose, CR8, (figura 5).

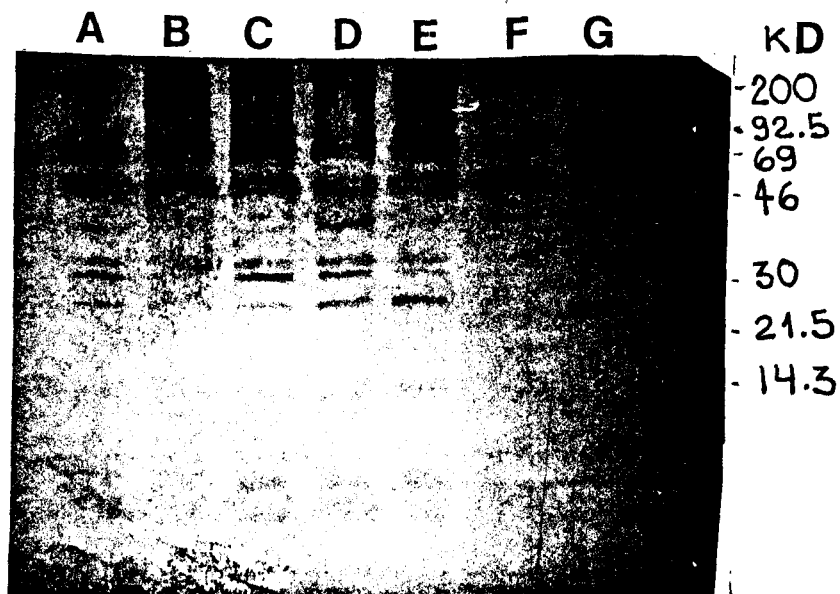


Figura 6 - Reação imunológica das proteínas produzidas pelos clones recombinantes de *E. coli*.

De A a E, extratos celulares dos clones recombinantes de *E. coli*: CR8, CR7, CR6, CR5 e CR3; F = extrato celular de *E. coli* TG1 portadora do plasmídeo pUC8 intacto; G = extrato celular de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* linhagem GR. Padrão de peso molecular à esquerda: miosina, 200 kD; fosforilase, 92.5 kD; albumina de soro bovino, 69 kD; ovalbumina, 46 kD; anidrase carbônica, 30 kD; inibidor de tripsina, 21.5 kD; lisozima, 14.3 kD.

Tabela 4 - Reação das proteínas produzidas pelos clones recombinantes com os anticorpos contra proteínas de *Bacillus thuringiensis*

Linhagem ou clone	Anticorpo (kD)				
	68	38	33 ^a	28	17
GR	+	+	-	+	-
CR3	-	+	+	+	-
CR5	-	+	+	+	-
CR6	-	+	+	+	-
CR7	-	+	-	+	-
CR8	-	+	+	+	-

(a) - Não foi preparado anticorpo contra essa proteína.

5 - Discussão

O presente trabalho teve por objetivo a clonagem molecular dos genes do cristal protéico de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* para posterior determinação dos papéis biológicos dos peptídeos produzidos pelos clones recombinantes.

A linhagem GR utilizada para a extração de DNA plasmidial contendo o gene do cristal protéico, demonstrou ter atividade tóxica para larvas de *A. fluviatilis* e atividade hemolítica para eritrócitos de carneiro. Esta linhagem apresentou atividades biológicas características do cristal protéico da subespécie e, portanto, adequou-se aos nossos interesses de estudo.

Segundo Klier e Rapoport (1987) os cristais da subespécie *israelensis* são constituídos de 3 polipeptídeos principais de 28, 68 e 130 kD. Entretanto, Ibarra e Federeci (1986) mostraram que quando os cristais da subespécie *israelensis* são solubilizados em condições alcalinas antes de serem analisados através de SDS-PAGE, há um aumento considerável no número das proteínas do cristal, aparecendo polipeptídeos de 53, 38 e 24 kD entre outros polipeptídeos adicionais. Vários outros autores relataram a ocorrência de polipeptídeos adicionais (Davidson e Yamamoto, 1984; Yamamoto et al, 1983; Thomas e Ellar, 1983; Pfannenstiel et al, 1984; Lee et al, 1985; Chilcott e Ellar, 1988) e Davidson e Yamamoto (1984) sugeriram que estes polipeptídeos resultam da proteólise dos 3 polipeptídeos principais pela ação das proteases associadas ao cristal protéico.

O padrão eletroforético obtido para as proteínas do extrato total da linhagem GR da subespécie *israelensis*, revelou a ausência do polipeptídeo de 130 kD e a presença de 4 polipeptídeos principais de 68, 38, 28 e 17 kD. Como não foi efetuada a solubilização das proteínas em pH alcalino este resultado contraria o que foi dito por Ibarra e Federeci (1986), sugerindo que talvez nesta linhagem GR o cristal protéico seja constituído por estas frações principais. Outras frações protéicas também foram obtidas inclusive a de 53 kD, a qual Ibarra e Federeci (1986) atribuíram ser resultado da clivagem proteolítica da proteína de 130 kD. Estes mesmos autores sugeriram que o polipeptídeo de 38 kD também é resultante de quebra proteolítica de uma proteína de 65 kD. O peptídeo de 17 kD encontrado no perfil eletroforético da linhagem GR não encontra citação correspondente na literatura.

A maioria dos trabalhos de clonagem molecular do gene do cristal protéico da subespécie *israelensis* utiliza como vetor de clonagem, plasmídios da série pUC que se constituem bons vetores de expressão. O uso do pUC8 como vetor de clonagem no presente trabalho, proporcionou um bom sistema de seleção direta de clones recombinantes através da marca de resistência ao antibiótico ampicilina e da reação negativa ao X-gal devido à inserção de DNA exógeno no gene estrutural da β -galactosidase.

A detecção de atividade hemolítica entre os clones recombinantes de *E. coli* foi feita inicialmente através do inóculo dos mesmos em meio Ágar Sangue. Através deste experimento, pôde-se selecionar alguns

clones com atividade hemolítica apesar dos halos de hemólise produzidos serem muito pequenos. A baixa atividade hemolítica detectada poderia ser atribuída à insuficiência da secreção da proteína produzida ou à reduzida expressão do gene clonado. Procurou-se, então, obter extratos celulares através da sonicação das células dos clones recombinantes para que se obtivesse a proteína do gene clonado livre.

Utilizando-se as condições sugeridas por Sandler et al (1985) para o preparo dos extratos celulares dos clones recombinantes de *E.coli*, verificou-se um aumento da expressão da atividade hemolítica, resultando num halo de hemólise maior. A exceção ocorreu com o clone CR7 que, muito embora tenha sido considerado positivo no primeiro teste de hemólise, apresentou-se negativo para a formação do halo de hemólise no segundo teste com extrato celular. As condições utilizadas para esse ensaio *in vitro* requerem o uso de pronase em condições alcalinas para uma maior atividade de hemólise. Num sistema *in vivo*, entretanto, a ativação do peptídeo relacionado com a atividade hemolítica pode ocorrer por ação de enzimas proteolíticas existentes no trato intestinal da larva (Sandler et al, 1985).

Os resultados obtidos com os testes de atividade hemolítica demonstraram, então, que os genes clonados relacionados com a atividade hemolítica tem um bom nível de expressão em *Escherichia coli* porém não são eficientemente secretados para o exterior da célula. Os trabalhos de Emr (1984) e Tommassen (1985) com estudos de fusão gênica com o gene da β -galactosidase, presente no pUC8, corroboram os

resultados obtidos nesse trabalho pois os autores citados não obtiveram sucesso na secreção dessa enzima para o exterior da célula.

Para verificação da atividade larvicida nos clones recombinantes de *E.coli* também foi encontrado o problema da secreção da proteína produzida pelo gene clonado. Bioensaios realizados com células intactas dos clones recombinantes de *E.coli* não resultaram em mortalidade das larvas. Da mesma forma, bioensaios realizados com os extratos celulares dos clones recombinantes, solubilizados em tampão alcalino (Na_2CO_3 50 mM, pH 10.5) conforme sugerido por Ward et al (1984), não resultaram em mortalidade larval (dados não apresentados). Visser et al (1986) mostraram que após solubilização o cristal da subespécie *israelensis* tem sua toxicidade reduzida de 50 até 100 vezes e sugeriram que esta redução não é devida à perda da toxicidade mas à redução do nível de ingestão de partículas menores pelas larvas dos insetos. Chilcott e Ellar (1988) corroboraram esta hipótese precipitando em pH 4.5 as proteínas solubilizadas do cristal da subespécie *israelensis* e obtendo um aumento de 3 vezes na toxicidade.

No presente trabalho, os bioensaios foram realizados com extratos celulares dos clones recombinantes de *Escherichia coli* obtidos através de sonicação e sem solubilização. Os resultados obtidos revelaram atividade larvicida cujos níveis de mortalidade variaram de 45 a 95% em 48 horas.

Quando comparada com a linhagem GR a mortalidade causada pelos clones recombinantes obtidos foi inferior pois aquela, na mesma dosagem, causou 100% de mortalidade em 30 minutos (dado não

apresentado). Apesar dos resultados obtidos no presente trabalho mostrarem níveis de atividade larvicida menores, todos os clones podem ser considerados como positivos quando comparados ao controle. A comparação do nível de mortalidade causada pelos clones recombinantes com os obtidos com outros genes clonados em diversos trabalhos foi dificultada pois na maioria deles, a mortalidade é expressa através do parâmetro LC_{50} . Entretanto, pôde-se observar em alguns trabalhos (Ward et al, 1986; McLean e Whiteley, 1987) que o LC_{50} dos recombinantes é muitas vezes superior ao LC_{50} de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.

A análise imunológica com anticorpos produzidos contra as proteínas de 68, 38, 28 e 17 kD da linhagem GR foi feita somente com alguns clones recombinantes obtidos, os clones CR3, CR5, CR6, CR7 e CR8. Desses recombinantes o clone CR7 é larvicida positivo mas não é hemolítico, os demais são todos positivos para as duas atividades biológicas testadas.

O anticorpo contra a proteína de 68 kD não reagiu com nenhuma fração proteica dos clones analisados e portanto esta proteína não é produzida pelos clones obtidos. O antisoro da proteína de 17 kD não reagiu com o *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* indicando que esta fração protéica é pouco imunogênica uma vez que ela se apresentou mais concentrada que as demais no gel de SDS-PAGE e conseqüentemente foi utilizado proporcionalmente mais proteína para o preparo do antisoro contra essa fração.

Os resultados da análise imunológica mostraram que o anticorpo

contra a proteína de 38 kD apresentou reação positiva com um polipeptídeo de 38 kD e reação cruzada com um peptídeo de 33 kD nos clones CR3, CR5, CR6 e CR8. Somente o clone CR7 não apresentou o peptídeo de 33 kD. Este peptídeo de 33 kD também não é detectado na subespécie *israelensis* ou pelo menos não o é como produto principal. Este resultado da análise imunológica sugeriu a possibilidade da proteína de 33 kD ser um produto da ação de proteases dos clones recombinantes de *E.coli* sobre o peptídeo de 38 kD. Provavelmente, o gene da proteína de 38 kD deve codificar para uma sequência específica de clivagem para o peptídeo de 33 kD.

O clone CR7 mostrou atividade larvicida mas não atividade hemolítica e a análise imunológica revelou a presença dos dois polipeptídeos de 28 e 38 kD. Estes resultados sugerem que a expressão da atividade hemolítica do cristal protéico da linhagem GR estudada em *E.coli* pode ser dependente da presença de um peptídeo de 33 kD, entretanto, um maior número de casos semelhantes devem ser examinados afim de se comprovar tal conclusão.

A análise do perfil eletroforético dos plasmídios dos clones CR3, CR5, CR6 e CR7, mostrou a presença de um inserto de 2.26 Kb para os três primeiros clones e um inserto de 1.75 Kb para o CR7. Os resultados obtidos pela análise imunológica e pela análise do perfil eletroforético sugerem que o clone CR7 pode não apresentar a região específica de clivagem acima sugerida no gene do peptídeo de 38 kD. Conseqüentemente, neste clone o peptídeo de 38 kD não pode ser processado e assim resultar no peptídeo de 33 kD.

Os resultados obtidos neste trabalho, entretanto, não permitiram a atribuição da atividade hemolítica nem ao peptídeo de 38 kD nem ao de 28 kD pois em nenhum dos clones analisados imunologicamente foram obtidos esses peptídeos isoladamente. A proteína de 28 kD tem sido associada com a atividade hemolítica em alguns trabalhos (Davidson e Yamamoto, 1984; Armstrong et al., 1985; Hurley et al., 1985; Held et al., 1986; Ibarra e Federeci, 1986; McLean e Whiteley, 1987). Dessa forma, o isolamento de clones produtores dessa proteína era de certa forma prevista desde que a seleção inicial foi efetuada considerando-se essa característica. Entretanto, a associação com a proteína de 38 kD foi inesperada. Essa associação ocorreu com todos os quatro clones analisados imunologicamente, exceção feita ao CR7 já discutido anteriormente, sugerindo a possibilidade dos genes que codificam para os peptídeos de 28 e 38 kD serem contíguos na linhagem GR.

Com relação à atividade larvicida, a análise imunológica somente pôde nos sugerir que ela pode ser produto da ação ou do peptídeo de 28 kD ou de 38 kD. Entretanto, não se pode excluir um efeito sinérgico entre as proteínas de 28 e 38 kD. A análise do perfil eletroforético dos plasmídios dos clones CR3, CR5, CR6 mostrou a presença de um inserto de aproximadamente 2.26 kb. Entretanto, os bioensaios realizados com larvas de *A. fluviatilis* mostraram que apesar dos clones CR3 e CR5 terem apresentado um mortalidade semelhante entre si, o clone CR6 causou um nível de mortalidade inferior. Estes resultados sugerem que o clone CR6 pode ter um inserto diferente dos clones CR3 e CR5.

O experimento de hibridização com o oligonucleotídeo sintetizado a partir da sequência do gene da proteína de 28 kD clonado por Waalwijk et al (1985), mostrou que o gene da proteína de 28 kD presente nos clones CR3, CR5, CR6, CR7 e CR8, não tem homologia com este gene clonado. Como discutido no item 2.2.2 a ausência de homologia entre os genes clonados dos peptídeos do cristal foi detectada por diversos autores através de hibridização com oligonucleotídeos, sugerindo a existência de regiões variáveis dentro dos genes. A sonda do gene do peptídeo de 28 kD pode corresponder a uma região variável do gene sequenciado por Waalwijk et al (1985). A ocorrência dessas regiões variáveis dentro dos genes, resultando na síntese de peptídeos diferentes, deve estar relacionada com a especificidade toxina-inseto. Para uma melhor confirmação, a sequência de 20 MER sintetizada deverá ser pesquisada quanto à possibilidade de apresentar homologia com o pUC8 através de programa computador.

Os resultados obtidos com este trabalho de tese abrem a perspectiva de se utilizar o teste de hemólise em placa de Ágar Sangue como método de seleção direta para clones recombinantes contendo o gene da proteína hemolítica da subespécie *israelensis*. Muito embora o trabalho não tenha conseguido ser conclusivo a respeito da atribuição das atividades biológicas de cada peptídeo do cristal protéico, espera-se que a análise imunológica dos clones recombinantes CR1, CR2, CR4 e CR9 possa esclarecer esta questão. A inibição dos peptídeos de 28 e 38 kD pelos respectivos antisoros nos extratos celulares dos clones recombinantes poderia determinar a ausência ou alterações nas

atividades biológicas do extrato celular com determinado peptídeo inibido e assim atribuir as atividades hemolítica e larvicida aos peptídeos responsáveis.

Pretende-se posteriormente realizar o mapeamento de restrição dos plasmídios híbridos na tentativa de se verificar se os clones CR3 e CR5 contendo o mesmo tamanho de inserto de DNA de *B. thuringiensis* possuem o mesmo fragmento de DNA clonado. Também verificar, através de mapa de restrição, se os clones que não mostraram fragmentos após a restrição na análise em gel de agarose apresentam inserto de mesmo tamanho do plasmídio vetor.

Pretende-se também realizar bioensaios com larvas de outras espécies de mosquitos para a determinação da toxicidade dos genes clonados afim de se verificar a existência de especificidade toxina-inseto.

Os plasmídios construídos poderão ser utilizados como sonda para verificação de homologia dos genes do *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* com as demais linhagens de *Bacillus thuringiensis* disponíveis no laboratório.

Concluindo, podemos dizer que: 1) Foram clonados dois genes do cristal protéico da subespécie *israelensis* que codificam para os peptídeos de 28 e 38 kD; 2) Os resultados preliminares obtidos com clone CR7 sugerem que a expressão da atividade hemolítica em *E. coli* pode ser dependente de um peptídeo de 33 kD.

6 - Resumo

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* é uma bactéria entomopatogênica que produz cristais protéicos durante o processo de esporulação.

Com o objetivo de se determinar a atividade biológica das proteínas constituintes do cristal foi feita a clonagem molecular dos genes da toxina. A estratégia de clonagem consistiu-se na inserção de fragmentos de DNA plasmidial de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* no plasmídeo pUC8, resultando em plasmídios híbridos. Foram obtidos 8 clones recombinantes com atividade contra larvas de *A. fluviatilis* e hemolíticos para eritrócitos de carneiros e um clone recombinante com atividade larvicida e não hemolítico.

Após análise imunológica com anticorpos produzidos contra as principais frações protéicas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, verificou-se a produção dos peptídeos de 28, 33 e 38 kD nos clones recombinantes larvicidas e hemolíticos e a ausência do peptídeo de 33 kD no clone não hemolítico.

7 - Summary

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* is a bacteria entomopathogenic that produce proteins crystals during the process of sporulation.

The molecular cloning of the toxin genes was carried out to determine the biological activities of the crystal proteins . Fragments of DNA plasmids of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* were inserted in the vector pUC8 and cells of *Escherichia coli* were transformed with the hybrid plasmids. Eight of the recombinants obtained were active against larvae of *A. fluviatilis* and hemolytic for sheep red blood cells, while one of the recombinants showed larvicidal activity but did not show hemolytic activity.

Antibodies were produced against the major proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal and the immunodection test showed the presence of three types of proteins with 28, 33 and 38 kD, respectively. While the clones with larvicidal and hemolytic activity contained all three types of proteins, the one with no hemolytic activity lacked the 33 kD protein.

8 - Referências Bibliográficas

Angsuthanasombat, C., Chungjatupornchai, W., Kertbundit, S., Luxananil, P., Settasatian, C., Wilairat, P. e Panyim, S., 1987. Cloning and expression of 130 kD mosquito - larvicidal δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 208:384-389.

Armstrong, J.L., Rohrmann, G.F. e Beaudreau, G.S., 1985. Delta-Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J. Bacteriol. 161(1):39-46.

Aronson, A.I., Beckman, W. e Dunn, P., 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol. Rev. 50(1):1-24.

Bergey, D.H. Endospore-forming rods and cocci. In:-----
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8.ed., Baltimore, The Williams & Wilkins, 1974. pT15, 529-575.

Betchel, D.B., e Bulla, L.A., 1976. Electron microscopic study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol. 127:1472-1481.

Birboim, H.C. e Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids. Res. 7:

1513-1523.

Bonnefoi, A. e De Barjac, H., 1983. Classification des souches du groupe *Bacillus thuringiensis* par la détermination de l'antigène flagellaire. Entomophaga, 8:223-229.

Bourgoin, C., Klier, A. e Rapoport, G., 1986. Characterization of the genes encoding the haemolytic toxin and the mosquitocidal delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Mol. Gen. Genet. 205: 300-307.

Bourgoin, C., Delécluse, A., Ribier, J., Klier, A., e Rapoport, G., 1988. A *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* gene encoding a 125-kilodalton larvicidal polypeptide is associated with inverted repeat sequences. J. Bacteriol. 170(8): 3575-3583.

Burges, H.D., 1975. Teratogenicity of the thermostable beta-entoxins of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella*. J. Invertebr. Pathol. 26: 419-420.

Burges, H.D., Thomson, E.M., e Latchford, R.A., 1976. Importance of spores and beta endotoxin protein crystal of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella*. J. Invertebr. Pathol. 27: 87-94.

Burges, H.D., 1982. Control of insect by bacteria. Parasitology 94: 79-117.

Calabrese, D.M., Mickerson, K.W., 1980. A comparison of protein crystal subunit sizes in *Bacillus thuringiensis*. Can. J. Microbiol. 28:1006-1010.

Chilcott, C.N., Kalmakoff, J. e Pillai, J.S., 1983. Characterization of proteolytic activity associated with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystals. FEMS Microbiol. Lett. 18:37-41.

Chilcott, C.N. e Ellar, D.J., 1988. Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*. J. Gen. Microbiol. 134:2551-2558.

Clarke, L. e Carbon, J., 1986. A cloning bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *Escherichia coli* genome. Cell 9:91-99.

Darget, M. e Erlich, S.D., 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. Gene 6:23-28.

Davidson, E.W. e Yamamoto, T., 1984. Isolation and assay of the toxic component from the crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Curr. Microbiol. 11:171-174.

De Barjac, H., 1978. Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustiques: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serotype 14. Acad.Sci.Paris série D 286:797-800.

Debabov, V.G., Azizbekyan, R.R., Khlebalina, O.I., Dyaklenko, V.V., Galuska, F.P. e Belykh, R.A., 1977. Isolation and preliminary characterization of extra chromosomal elements of *Bacillus thuringiensis* DNA. Genetika 13:496-501.

Delecluse, A., Bourgouin, C., Klier, A. e Rapoport, G., 1988. Specificity of action on mosquito larval of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins encoded by two different genes. Mol.Gen.Genet. 214:42-47.

Delecluse, A., Bourgouin, C., Klier, A. e Rapoport, G., 1989. Nucleotide sequence and characterization of a new insertion element IS240, from *Bacillus thuringiensis israelensis*. Plasmid 21:71-78.

Donovan, W.P., Dankocsik, C. e Gilbert, M.P., 1988. Molecular characterization of a gene encoding a 72-kilodalton mosquito-toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. J.Bacteriol. 170(10):4732-4738.

Dugaiczky, A., Boyer, H.W. e Goodman, H.M., 1975. Ligation of

EcoRI endonuclease generated DNA fragments into linear and circular structures. J.Mol.Biol. 96:171-184.

Dulmage, H.T.. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potencial for pest control. In: Burges, H.D. (ed). Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980. London, Academic Press, 1981. 193-222.

Emr, S.D., Schauer, I., Hanser, W., Esmon, P. e Scheckman, R., 1984. Invertase β -galactosidase hybrid proteins fail to be transported from the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol.Cell.Biol. 4: 2347-2355.

Faust, R.M., Abe, K., Held, G.A., Iizuka, T., Bulla, L.A. e Meyers, C.L., 1983. Evidence for plasmid-associated crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Plasmid 9:98-103.

Finney, D.J., 1971. Probit Analysis. 3.ed. Cambrigde, Cambridge University Press, v.11.

Foratini, O.P.. Gênero *Aedes* e *Psorophora*. In: Entomologia Médica. 2^o vol. São Paulo, Ed. Universidade de São Paulo, 1965. pT II, 230-406.

Garduno, F., Thorne, L., Walfield, A.M. e Pollock, T.J., 1988.

Structural relatedness between mosquitocidal endotoxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Appl. Environ. Microbiol. 54(1):277-279.

Geiser, M., Schweitzer, S. e Grimm, C., 1986. The hypervariable region in the genes coding for entomopathogenic crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: nucleotide sequence of the kurhd1 gene of subsp. kurstaki HD1. Gene 48:109-118.

Goldberg, L.J. e Margalit, J., 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles segenti*, *Uranotaenia unguolata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosq. News 37:355-358.

Gonzales Jr., J.M., Dulmage, H.T. e Carlton, B.C., 1981. Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin in *Bacillus thuringiensis*. Plasmid 5:351-365.

Gonzales Jr., J.M. e Carlton, B.C.. Plasmid transfer in *Bacillus thuringiensis*. In: Streips, U.N. et al (eds). A celebration and a new generation. New York, Dekker, 1982. 85-95.

Habib, M.E.M., 1982. Patogenicidade de duas variedades de *Bacillus thuringiensis* Berliner para larvas de Lepidoptera e Diptera. Tese de Livre-Docência, Unicamp, 163pp..

Habib, M.E.M.. Padronização de inseticidas microbianos. In: Alves, S.B.(ed). Controle Microbiano de Insetos. 1.ed. São Paulo, Manole, 1986. pT 15. 289-296.

Habib, M.E.M. e Andrade, C.F.S.. Bactérias entomopatogénicas. In: Alves, S.B.(ed). Controle Microbiano de insetos. 1.ed.. São Paulo, Manole,1986.Pt7,127-170.

Hager, D.A. e Burges, R.R., 1980. Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, what germ DNA topoisomerase, and other enzymes. Anal.Biochem. 109:76-86.

Held, G.A., Huang, Y.S. e Kawanishi, C.Y.,1986. Effect of removal of the cytotoxic factor of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on mosquito toxicity. Biochem.Biophys.Res.Commun. 141(3):937-941.

Höfte, H., de Greve, H., Sewnick, J., Janses, S., Mahillon, J., Ampe, C., Van de Kerckove, J., Vanderbruggen, H., Van Montagu, M., Zabeau, M. e Vaeck, M., 1986. Structural and functional analysis of a cloned delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner 1715. Eur.J.Biochem. 161:273-280.

Holmes, K.C. e Monro, R.E., 1965. Studies on the structure of

parasporal inclusions from *Bacillus thuringiensis*. J.Mol.Biol. 14:572-581.

Holmes, D.S. e Quigley, M., 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal.Biochem. 114:193.

Huber, H.E., Lüthy, P., Ebersold, H.R. e Cordier, J.L., 1981. The subunits of the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*: size, linkage and toxicity. Arch.Microbiol. 129:14-18.

Hurley, J.M., Lee, S.G. e Andrews JR., R.E., 1985. Separation of the cytolytic and mosquitocidal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Biochem.Biophys.Res.Commun. 126(2):961-965.

Ibarra, J.E. e Federeci, B.A., 1986. Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J.Bacteriol. 165(2):527-533.

Jaquet, F., Rüther, R. e Lüthy, P., 1987. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Appl.Environ.Microbiol. 53(3):500-504.

Kamdar, H. e Jayaraman, K., 1983. Spontaneous loss of a high molecular weight plasmid and the *Bacillus thuringiensis* var.

israelensis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 100(2):477-482.

Klier, A., Fargette, F., Ribier, J. e Rapoport, G., 1982. Cloning and expression of the crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain berliner 1715. EMBO J. 1:791-799.

Klier, A. e Rapoport, G., 1987. *Bacillus* larval toxin crystal protein. Microbiol. Sci. 4(9):274-276.

Krywienczyk, J., Dulmage, H.T. e Fast, P.G., 1978. Occurrence of two serologically distinct groups within *Bacillus thuringiensis* serotype 3 ab var. *kurstaki*. J. Invertebr. Pathol. 31:372-375.

Krywienczyk, J. e Fast, P.G., 1980. Serological relationships of the crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. J. Invertebr. Pathol. 36:139-140.

Krywienczyk, J., Dulmage, H.T., Hall, I.M., Beagle, C.C., Arakawa, K.Y. e Fast, P.G., 1981. Occurrence of *kurstaki* K-1 crystal activity in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* serovar (H14). J. Invertebr. Pathol. 37:62-65.

Kronstad, J.W. e Whiteley, H.R., 1986. Three classes of homologous crystal protein genes. Gene 43:29-40.

Laemli, U.K., 1970. Cleavage of structural protein during the

assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 227:680-685.

Lecadet, M.M. e Dedonder, R., 1967. Enzymatic hydrolysis of the crystals of *Bacillus thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae*:I Preparation and fractionation of the lysates. J.Invertebr.Pathol. 9:310-321.

Lee, S.G., Eckblad, W. e Bulla Jr., L.A., 1985. Diversity of protein inclusion bodies and identification of mosquitocidal protein in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Bioch.Bioph.Res.Comm. 126(2):953-960.

Lereclus, D., Lecadet, M.M., Ribier, J. e Dedonder, R., 1982. Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains. Mol.Gen.Genet. 186:301-308.

Lereclus, D., Menou, G., Lecadet, M.M., 1983. Isolation of a DNA sequence related to several plasmids from *Bacillus thuringiensis* after a mating involving the *Streptococcus faecalis* plasmid pAM β 1. Mol.Gen.Genet. 191:307-313.

Lereclus, D., Mahillon, J., Menou, G., e Lecadet, M.M.,1986. Identification of Tn 4430, a transposon of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli*. Mol.Gen.Genet. 204:52-54.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. e Sambrook, J.. Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1982. 328-387.

McLean, K.M. e Whiteley, H.R., 1987. Expression in *Escherichia coli* of a cloned crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J.Bacteriol. 169(3):1017-1023..

McPherson, S.A., Perlak, F.J., Fuchs, R.L., Marrone, P.G., Lavrik, P.B. e Fishhoff, D.A., 1988. Characterization of the coleopteran-specific protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. Biotechnol. 6:61-66.

Mechalas, B.J. e Anderson, N.B., 1984. Bioassay of *Bacillus thuringiensis berliner* - based microbial insecticides. II Standardization. J.Insect.Pathol. 6:218-224.

Mikkola, A.R., Carlberg, G.A., Vaara, T. e Gyllenberg, H.G., 1982. Comparison of inclusions in different *Bacillus thuringiensis* strains. An electron microscope study. FEMS Microbiol.Lett. 13:401-408.

Minnich, S.A. e Aronson, A.I., 1984. Regulation of protoxin synthesis in *Bacillus thuringiensis*. J.Bacteriol. 158:447-454.

Muthukumar, G. e Nickerson, K.W., 1987. The glycoprotein toxin

of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* indicates a lectinlike receptor in the larval mosquito Gut. Appl. Environ. Microbiol. 53(11):2650-2655.

Norris, J.R. e Burges, H.D., 1963. Esterases of crystalliferous bacteria pathogenic for insects epizootioloical applications. J. Insect Pathol. 5:460-472.

Norris, J.R., 1964. The classification of *Bacillus thuringiensis*. J. Appl. Bacteriol. 27:439-447.

Pao-intara, M., Angsuthanasombat, C. e Panyim, S., 1988. The mosquito larvicidal activity of 130 kDa Delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* resides in the 72 kDa amino-terminal fragment. Biochem. Biophys. Res. Comm. 153(1):294-300.

Pfannenstiel, M.A., Muthukumar, G., Couche, G.A. e Nickerson, K.W., 1987. Amino sugars in the glycoprotein toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J. Bacteriol. 160:798-801.

Sandler, N., Zomper, R., Keynem, A. e Margalit, J., 1985. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal hemolysis as a possible basis for an assay of larval toxicity. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23:47-53.

Schenepf, H.E. e Whiteley, H.R., 1981. Cloning and expression

of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein in *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:2893-2897.

Schenepf, H.E., Wong, H.C. e Whiteley, H.R., 1985. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* deduced form the DNA sequence. Biol.Chem. 260:6264-6272.

Sekar, V. e Carlton, B.C., 1985. Molecular cloning of delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Gene 33:151-158.

Sekar, V., 1986. Biochemical and immunological characterization of the cloned crystal toxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 137(2):748-751.

Somerville, H.J., 1978. Insect toxin in spores and protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. Trends Biochem. Sci. 3:108-110.

Stahly, D.P., Dingman, D.W., Bulla Jr., L.A. e Aronson, I.A., 1978. Possible origin and function of the parasporal crystals in *Bacillus thuringiensis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 84(3):581-588.

Thomas, W.E. e Ellar, D.J., 1983 a. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* insecticidal δ -endotoxin.

FEBS Letters 154(2):362-368.

Thomas, W.E. e Ellar, D.J., 1983 b. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ -endotoxins effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. J.Cell.Sci. 60:181-197.

Thorne, L., Garduno, F., Thompson, T., Decker, D., Zounes, M., Wild, M., Walfield, A.M. e Pollock, T.J., 1988. Structural similarity between the lepidoptera - and diptera - specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *israelensis*. J.Bacteriol. 166(3):801-811.

Tommassen, J., Leunissen, J., Van Damme-Jongsten e Overduin, M.P., 1985. Failure of *Escherichia coli* K-12 to transport PhoE-lacZ hibrid protein out of the cytoplasm. EMBO J. 4:1041-1047.

Toumanoff, C., 1953. Description de quelques soucher entomophytes de *Bacillus cereus* Fr. e Fr. avec remarques sur le jaune d'oeuf. Ann.Inst.Pasteur 85:90-99.

Tyrell, D.J., Davidson, L.I., Bulla Jr., L.A. e Ramoska, W.A., 1979. Toxicity of parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquitos. Appl.Environ Microbiol. 38:656-658.

Vieira, J. e Messing, J., 1982. The pUC plasmids, an

M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19(3):259-268.

Visser, B., Workum, M., Dulleman, A. e Waalwijk, C., 1986. The mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* is associated with the Mr 230000 and 130000 proteins. FEMS Microbiol.Lett. 30:211-214.

Visser, B., Van der Salm, T., Van der Brink, W. e Folkers, G., 1988. Genes from *Bacillus thuringiensis entomocidus* 80.5 coding for insect-specific crystal proteins. Mol.Gen.Genet. 212:219-224.

Visser, B., 1989. A screening for the presence of four different crystal protein gene types in 25 *Bacillus thuringiensis* strains. FEMS Microbiol.Lett. 58:121-124.

Waalwijk, C., Dullemans, A.M., Van Workum, M.E.S. e Visser, B., 1985. Molecular cloning and the nucleotide sequence of the M_r 28000 crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, Nucl.Ac.Res. 13(22):8207-8217.

Ward, E.S. e Ellar, D.J., 1983. Assignment of the δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to a specific plasmid by curing analysis. FEBS Letters 158(1):45-49.

Ward, E.S., Ellar, D.J. e Todd, J.A., 1984. Cloning and

expression in *Escherichia coli* of the insecticidal δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. FEBS Letters 175(2):377-382.

Ward, E.S., Ridley, A.R., Ellar, D.J. e Todd, J.A., 1986. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* δ -endotoxin. Cloning and expression of the toxin in sporogenic and asporogenic strains of *Bacillus subtilis*. J. Mol. Biol. 191:13-22.

Ward, E.S. e Ellar, D.J., 1988. Cloning and expression of two homologous genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* wich encode 130-kilodalton mosquitocidal proteins. J. Bacteriol. 170(2):727-735.

Whiteley, H.R. e Schnepf, H.E., 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. Ann. Rev. Microbol. 40:549-576.

Wu, D. e Chang, F.N., 1985. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. FEBS Letters 100(2):232-236.

Yamamoto, T., Iizuka, T. e Aronson, J.N., 1983. Mosquitocidal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: identification and parcial isolation of protein. Curr. Microbiol. 9:279-284.