

Boletim de Pesquisa 188 **e Desenvolvimento** ISSN 1676 - 340 Novembro, 2007

**Transformação estável da linhagem
celular BTI-Tn-5B1-4 utilizando o gene
25KFP do baculovirus AgMNPV**



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

ISSN 0102 0110
Novembro, 2007

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 188

Transformação estável da linhagem celular BTI-Tn-5B1-4 utilizando o gene 25KFP do baculovirus AgMNPV

Ayeska Espeschit Maia
Zilda Maria de Araújo Ribeiro
Caren Cristina Dalmolin
Bergmann Morais Ribeiro
Marlinda Lobo de Souza
Maria Elita Batista de Castro

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2007

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

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

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Marante*
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*
Editoração eletrônica:

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

T 772 Transformação estável da linhagem celular BTI-Tn-5B1-4 utilizando o gene 25KFP do baculovirus AgMNPV. / Ayeska Espeschit Maia ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
14 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 188)

1. Baculovirus – inseticida químico. 2. AgMNPV. 3. Inseto. 4. Controle biológico.
5. BTI-Tn-5B1-4 - célula. 6. Gene 25KFP. I. Maia, Ayeska Espeschit. II. Série.

628.9657 – CDD 21.

Transformação estável da linhagem celular BTI-Tn-5B1-4 utilizando o gene *25KFP* do baculovirus AgMNPV

Ayeska Espeschit Maia¹
Zilda Maria de Araújo Ribeiro²
Caren Cristina Dalmolin²
Bergmann Morais Ribeiro³
Marlinda Lobo de Souza⁴
Maria Elita Batista de Castro⁴

Resumo

Os baculovirus ocorrem naturalmente em populações de insetos atuando como agentes de controle de biológico. O uso de baculovirus como alternativa aos inseticidas químicos é vantajoso devido a sua alta especificidade, sendo inofensivo a microrganismos, vertebrados, plantas e invertebrados não hospedeiros. Também podem ser utilizados como vetores de expressão de proteínas heterólogas, atingindo altos níveis de expressão em células de insetos infectadas ou como vetores de terapia gênica. Um dos obstáculos da produção de baculovirus em larga escala é o acúmulo de alterações no genoma dos baculovirus, através de ciclos de replicação em culturas de células ou em bioreatores, chamado de efeito passagem. Uma das mutações mais frequentes, em decorrência do efeito passagem, é a formação de mutantes FP (*few polyhedra* ou *few plaque mutants*). O gene *25KFP* é fundamental para a formação do poliedro e oclusão dos vírions e sua deleção é suficiente para produzir o fenótipo mutante FP. No presente trabalho, o objetivo é a produção de células de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) estavelmente transformadas expressando o gene *25KFP*, para posterior análise da estabilidade dessas células com base na utilização de mutantes FP, decorrentes das várias passagens do vírus AgMNPV.

¹ Bióloga, graduanda BSc., Universidade de Brasília – UnB

² Bióloga, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Biólogo, Ph.D., Universidade de Brasília – UnB

⁴ Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Abstract

The baculoviruses occur naturally in insect populations acting as biological control agents. The use of baculovirus as an alternative to chemical pesticides is advantageous because of its high specificity, being harmless to microorganisms, vertebrates, plants and non-host invertebrates. They can also be used as expression vectors to heterologous proteins, reaching high levels of expression in infected insect cells or as possible vectors in gene therapy. One of the obstacles for large scale production of baculovirus is the accumulation of alterations in the baculovirus genome, through cycles of replication in cell culture or bioreactors, known as a passage effect. One of the most frequent mutations, caused by passage effect, is FP mutants (*few polyhedra* or *few plaque mutants*) formation. The *25KFP* gene is essential for polyhedra formation and virion occlusion, and its depletion alone can produce the FP mutant phenotype. The present work's goal is the production of stably transformed cells (BTI-Tn-5B1-4) expressing the *25KFP* gene, for future analysis of these cells' stability based on possible FP mutants formation, derived from serial passages of the AgMNPV virus.

Introdução

Os Baculovirus são vírus da família *Baculoviridae* que ocorrem naturalmente em insetos principalmente da ordem Lepidoptera (Theilmann *et al.*, 2005). Apresentam como principal característica no ciclo de replicação a formação de dois fenótipos, os vírus extracelulares BV (*budded viruses*), que são produzidos no início da infecção e transmitem a infecção célula-célula dentro do inseto hospedeiro ou em culturas de células de insetos, e os OB (*occlusion bodies*), formados no final da infecção, responsáveis pela infecção inseto-inseto. São altamente específicos e virulentos sendo, por isso, muito usados como inseticidas biológicos no controle de pragas. São também excelentes vetores de expressão gênica para produção de proteínas recombinantes em células de insetos e, mais recentemente, de mamíferos.

Nestes últimos 20 anos, linhagens celulares de insetos têm sido estabelecidas e disponibilizadas com um aumento aproximado de 50 novas linhagens por década. Embora já se tem documentadas mais de 260 linhagens celulares derivadas de várias espécies de lepidópteros, o que constitui um vasto suprimento de material para pesquisa em baculovirus (Lynn, 2007), quando se trata de baculovirus recombinantes, muitas dessas linhagens não são hospedeiras suscetíveis ou não são capazes de proporcionar uma replicação produtiva do vírus.

A transformação estável de linhagens celulares de insetos, em que genes heterólogos são integrados no genoma da célula, surgiu como uma alternativa vantajosa frente aos sistemas convencionais de infecção baculovirus/células de inseto, representando uma nova extensão da tecnologia de expressão gênica em células de insetos (Patterson *et al.*, 1995, Lynn 2007, Harrison & Jarvis, 2007). As células estávelmente transformadas são capazes de expressar genes sob controle de promotores ativos em células de lepidópteros, constitutiva ou indutivamente (Cartier *et al.*, 1994), independentemente do processo de infecção (Jarvis *et al.*, 1990). Desta forma, elas constituem uma importante ferramenta para o estudo de muitos processos celulares. Servem também para propagar baculovirus mutantes que perderam genes essenciais e como hospedeiros geneticamente modificados para a produção de proteínas codificadas por vetores de baculovirus recombinantes (Jarvis *et al.*, 1990; Jarvis, 1993, Jarvis & Finn, 1996).

Mesmo não fornecendo altos níveis de expressão quando comparadas ao sistema baculovirus, as células estávelmente transformadas constituem uma fonte de expressão da proteína de interesse, sem a necessidade da infecção, que posteriormente mata a célula. E ainda, em decorrência da ausência de efeitos citopáticos, permitem que a secreção de glicoproteínas ocorra de forma mais eficaz que no sistema baculovirus (Jarvis *et al.*, 1990). Esses sistemas têm também potencial para outras aplicações como análise de receptores

de superfície celular, no processo de modificação de proteínas do hospedeiro e no desenvolvimento de agentes de controle biológico mais eficazes (Jarvis *et al.*, 1990). Com a crescente utilização dos baculovirus limitações têm surgido quando se objetiva desenvolver sua produção, principalmente, em sistemas *in vitro*. Em ciclos de replicação de vírus em culturas de células de insetos, em frascos ou em bioreatores, é comum a ocorrência de alterações no genoma dos baculovirus sendo esse evento chamado de efeito passagem (Krell, 1996). As mutações mais freqüentes, causadas pelo efeito passagem, são formações de partículas interferentes defectivas (DIP) e de mutantes *FP* (*few polyhedra*).

Os mutantes *FP* podem ser caracterizados pela produção reduzida de poliedros (OB – *occlusion bodies*), oclusões que não contém vírions ou com vírions de morfologia alterada, envelopamento intranuclear dos ODV (*occlusion derived viruses*) também anormal ou reduzido, aumento da liberação de vírus extracelulares (BV- *budded virus*) e diminuição da porcentagem de células que produzem OB.

A oclusão viral e a formação das partículas OB constituem um processo complexo que envolve vários genes virais, como o da *poliedrina*, *p10*, *PEP* e *25KFP* (Slavicek *et al.*, 1998). O gene *25K FP* é essencial para a formação correta do OB e oclusão dos vírions e sua deleção é suficiente para a aparição do fenótipo mutante *FP* (Beames & Summers, 1988, 1989).

As mutações *FP* estão correlacionadas a deleções no genoma viral ou inserções do DNA hospedeiro, o que pode ser detectado por digestão com endonucleases de restrição (Beames & Summers, 1988; Fraser *et al.*, 1983; Wang *et al.*, 1989).

O grau do efeito passagem depende do sistema célula-vírus em questão, mas freqüentemente aparece até a décima passagem do vírus em cultura de células (Chakraborty & Reid, 1999). Estudos preliminares com AgMNPV (isolado Ag-2D), passado serialmente em cultura de células UFL-AG-286, mostraram que já na sexta passagem há uma redução na produção de OB, com a conversão parcial da população com fenótipo *MP* para o fenótipo *FP* (Castro *et al.*, 2002). O gene *25K FP* já foi localizado nesse baculovirus e sequenciado, totalizando 627 nucleotídeos que codificam uma proteína de 208 aminoácidos (Souza *et al.*, 2003).

O objetivo deste trabalho é transformar de forma estável uma linhagem celular de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) utilizando o gene *25K FP* de *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV).

METODOLOGIA

Construção do plasmídeo pIBV5His 25KFP

O gene *25K FP* foi amplificado via reação de PCR utilizando primers específicos:

- Primer forward para amplificar o gene *25K FP*
5'-AATCATGACAACGCGTGC - 3' (T_m = 82)
- Primer reverso para amplificar o gene *25K FP*
5'-GACTTTTATTTATTCCAAGGACGG-3' (T_m = 66)

A reação procedeu-se em termociclador, Minicicler M J Research, segundo o seguinte programa: 94°C – 5 min (desnaturação inicial); 94°C – 1 min (desnaturação); 54°C – 1 min (anelamento); 72°C – 1 min (elongação); 72°C – 7 min (elongação final); 4°C (fim da reação). Para uma amplificação exponencial, os ciclos de desnaturação, anelamento e elongação foram repetidos 35 vezes. Em seguida, o material foi quantificado em gel de agarose. O produto de PCR foi clonado no vetor pIB/V5-His (Invitrogen) contendo o gene de resistência para o antibiótico blasticidina. Para confirmação da seqüência nucleotídica correta do produto amplificado, o plasmídeo construído foi seqüenciado utilizando primers para o gene *25K FP*.

Para que ocorra o processo de ligação, a proporção da quantidade inserto:vetor de 3:1 foi determinada segundo a fórmula: $n^{\circ} \text{ de extremidades (pMol)} = (2 \times \eta g \times 10^3) / pb \times 679$

Após a determinação da proporção, o fragmento de interesse (25K FP) e o vetor (pIBV5His) foram adicionados a um sistema com volume final de 10µl contendo o complexo T4 DNA ligase e seu respectivo tampão. A incubação procedeu-se a 4°C, overnight. Finalizada esta etapa, o vetor contendo o fragmento de interesse foi amplificado em células competentes. Para a transformação de células competentes foi utilizada a linhagem XL-1 blue de *E. coli*, previamente tratada com cloreto de cálcio, pela técnica de choque térmico. Foram adicionados 10µl do sistema plasmídeo/ fragmento às células competentes (100µl) e incubados no gelo por 30 min. Foi dado um choque térmico de 42°C por 90s e novamente o sistema foi incubado no gelo por 2 min. Adicionou-se então, 1ml de meio de cultura (LB), sem ampicilina, e incubou-se à 37°C por 1 hora para restabelecimento e crescimento das células transformadas. As células foram precipitadas a baixa centrifugação (3000 rpm/ 2 min), resuspendidas em 300µl de LB e plaqueadas em diferentes quantidades (50, 100, 150µl) em LB sólido contendo ampicilina (100µg/ml), X-gal (25µg/ml), IPTG (20µg/ml) e incubadas a 37°C durante 12-15 h para seleção das colônias com os plasmídeos recombinantes.

As colônias selecionadas, ou seja, as colônias brancas foram isoladas em meio LB sólido também seletivo e crescidas novamente em meio LB líquido com ampicilina, para extração do DNA plasmidial pelo método de lise alcalina (Maniatis *et al*, 1989). Posteriormente,

cerca de 0,8 a 1µg de DNA foi clivado com as enzimas de restrição correspondentes para confirmação da clonagem através da liberação do inserto, sob condições adequadas de temperatura e tempo. As amostras resultantes foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para visualização dos fragmentos de DNA..

Transfecção de células BTI-Tn-5B1-4 com o plasmídeo pIBV5His 25K FP

A contagem das células BTI-Tn-5B1-4 foi feita seguindo o procedimento usual de contagem utilizando um hemacitômetro e um microscópio de contraste de fase para a visualização. A equação utilizada para a determinação do número de células por ml foi:

- média de células em 4 quadrados x 10^4 x fator de diluição = nº de células/ml
(o fator de diluição foi igual a 1)

Em cada poço de uma placa 6 *wells* foram adicionados 0,5ml de células (contendo aproximadamente $0,3 \times 10^6$ células/ml) e 1,5ml de meio TNMFH completo. A placa foi incubada a 27°C (*overnight*). As células foram transfectadas com o plasmídeo de acordo com as instruções do fabricante da cellfectina (Invitrogen). A transfecção foi feita na placa 6 wells, sendo que foram usados 3 poços: (1) somente células BTI-Tn-5B1-4 - controle negativo; (2) pIBV5His *GFP* - plasmídeo previamente construído contendo o gene *GFP* (*green fluorescence protein*) que codifica uma proteína que emite fluorescência; (3) pIBV5His 25 *KFP*- plasmídeo contendo o gene 25 *KFP*.

Para confirmação da transfecção, após 48h, o poço contendo o plasmídeo pIBV5His *GFP* foi observado em microscópio de contraste de fase, sob luz UV para visualização de células com fluorescência.

Seleção com blasticidina de células estavelmente transformadas

Após 48h de transfecção, o meio foi substituído por meio TNMFH completo com blasticidina (50µg/ml). A placa ficou incubando em estufa à 27°C por 15 dias.

As células do controle negativo morreram pois não possuem resistência à blasticidina. As células contendo o plasmídeo pIBV5His *GFP* (controle positivo) e as células contendo o plasmídeo pIBV5His 25*KFP* sobreviveram, porém somente estas com o gene 25*KFP* foram transferidas e mantidas em cultivo (garrafas T-25).

Para confirmação da estabilidade das células transformadas Tn5B1-4-25*KFP* o cultivo será mantido até no mínimo 50 passagens. As células estão sendo repicadas duas vezes por semana e mantidas em meio TNMFH completo com blasticidina na concentração de 50µg/ml.

Confirmação da presença do gene *25K FP* por PCR

Foram realizadas reações de PCR para a confirmação da presença do gene *25KFP* nas células BTI-Tn-5B1-4 transformadas. O DNA genômico das células, para ser utilizado em reações de PCR, foi extraído segundo o protocolo descrito por Aljanabi & Martinez (1997). Resumidamente, as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min. O pellet foi então resuspendido em 400 μ l de tampão de lise salina, 1mg/ml de proteinase K, e SDS 2%, e incubado a 50°C por 1h e a 37°C *overnight*. Em seguida, foram adicionados ao tubo 400 μ l de NaCl 6M, misturados por vortex (gentilmente) e centrifugados a 12000 rpm por 20 min. Ao sobrenadante foi adicionado o mesmo volume de isopropanol e a amostra ficou a -20°C por 1h, sendo novamente centrifugada a 14000 rpm por 20 min. O pellet foi lavado com etanol 70% (centrifugado a 14000 rpm por 10 min), seco a temperatura ambiente e resuspendido em 50 μ l de TE com adição de RNase A (40 μ g/ml).

O gene *25K FP* foi amplificado via reação de PCR utilizando primers específicos:

- Primer forward para amplificar o gene *25K FP*
5'-AATCATGACAACGCGTGCGCGTG - 3' (T_m = 63)
- Primer reverso para amplificar o gene *25K FP*
5'-GACTTTTATTTATTCCAAGGACGG - 3' (T_m = 52)

A reação procedeu-se em termociclador, Minicicler M J Research, utilizando o mesmo programa já descrito, exceto a alteração feita na temperatura de anelamento para 57 °C. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 0,8%.

Criopreservação de células

As células viáveis foram contadas e preparadas para uma concentração final de 2 a 5x10⁶ células/ml. As células foram então transferidas para tubos corning de 50 ml, sedimentadas por centrifugação a 1000 rpm por 3 min e o sobrenadante foi coletado em um tubo separado e mantido no gelo. As células sedimentadas também foram mantidas no gelo. Ao pellet celular foi adicionada uma solução de congelamento (10% DMSO, 40% meio de cultivo fresco, 50% sobrenadante) e alíquotas de 1,5 ml desta suspensão foram então transferidas para tubos criogênicos e estocados a -80°C (*overnight*). No dia seguinte os tubos foram transferidos para nitrogênio líquido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene *25K FP* foi amplificado via reação PCR, utilizando primers específicos, e o produto clonado no vetor pIB/V5-His, plasmídeo que contém o gene de resistência ao antibiótico blasticidina (Fig. 1). A clonagem do gene *25K FP* no vetor pIB/V5-His foi confirmada por

digestão com endonucleases de restrição (*Sac I* e *Sac II*), resultando em dois fragmentos com aproximadamente 800 pb (gene *25K FP*) e 3.500 pb (plasmídeo) (Fig.2). O plasmídeo pIB/V5-His *25K FP* foi então amplificado em células bacterianas da linhagem *E. coli* XL-1 blue.

A linhagem celular transformada, Tn5B1-4-*25KFP*, foi construída pela transfecção de células Tn5B1-4 com o plasmídeo pIB/V5-His *25KFP*. A transfecção foi comprovada pela observação de várias células com fluorescência (células transfectadas com o plasmídeo pIB/V5-His *GFP*) e pela seleção com blasticidina (Fig. 3). Células transformadas foram resistentes ao antibiótico apresentando morfologia normal quando observadas por microscopia de contraste de fase, enquanto que células controle (somente Tn-5B1-4) apresentaram lise seguida de morte (Fig. 3).

Clones resistentes à blasticidina (50µg/ml) foram selecionados e amplificados antes da pressão seletiva ser relaxada.

A presença do gene *25K FP* na linhagem celular transfectada Tn5B1-4 foi verificada por reações de PCR (Fig. 4). Uma banda de ~800pb, correspondente ao gene *25K FP* da linhagem transformada, foi detectada por análise em gel de agarose 0,8% do produto amplificado por PCR.

A confirmação da presença do gene por reações de PCR não é suficiente para afirmar se as células são capazes de produzir a proteína de interesse pela expressão do gene *25K FP*. A ocorrência da expressão desse gene pela linhagem celular transformada será investigada por reações de RT-PCR e por infecções com base no uso de mutantes *FP* do vírus AgMNPV, obtidos de passagens virais sucessivas em cultura de células.

A geração de linhagens de células estavelmente transformadas pode ser útil na caracterização de baculovirus mutantes deficientes em algum gene essencial para replicação (Cartier *et al.*, 1994) e pode também facilitar o estudo da função de genes virais individuais sem infecção (McLachlin & Miller, 1997). Em se tratando do gene *25K FP*, e a sua participação no efeito passagem, estas células futuramente poderão ainda ser mais uma alternativa para a produção em larga escala do baculovirus AgMNPV, dada a importância prática de seu uso para o controle da praga da soja, *Anticarsia gemmatilis*.

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa PIBIC concedida à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Referências

Aljanabi, S. M.; Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25: 4692-4693.

Beames, B.; Summers, M. D. (1988). Comparisons of host cell DNA insertions and altered transcription at the site of insertions in few polyhedra baculovirus mutants. *Virology* 162: 206-220.

- Beames, B.; Summers, M. D. (1989). Location and nucleotide sequence of the 25K protein missing from baculovirus few polyhedra (FP) mutants. *Virology* 168:344-353.
- Cartier, J.L.; Hershberger, P.A.; Friesen, P.D. (1994). Suppression of apoptosis in insect cells stably transfected with baculovirus p35: dominant interference by N-terminal sequences p35. *Journal of Virology* 68: 7728-7737.
- Castro, M.E.B.; Araújo, S.; Ribeiro, Z.M.A.; Sihler, W.; Souza, M.L. (2002). Análise fenotípica de variantes de *Anticarsia gemmatalis* MNPV multiplicados durante passagem seriada em cultura de células. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, n. 24. 17p.
- Chakraborty, S., Reid, S. (1999). Serial Passage of a *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus in *Helicoverpa zea* cell cultures. *Journal of Invertebrate Pathology*. 73: 303–308.
- Fraser, M. J.; Smith, G. E.; Summers, M. D. (1983). Acquisition of host cell DNA sequences by baculoviruses: relationship between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis viruses. *Journal of Virology* 47:287–300.
- Harrison, R. L.; Jarvis, D. L. (2007) Transforming lepidopteran insect cells for continuous recombinant protein expression. *Methods Mol Biol*. 388:299-316.
- Jarvis, D.L. (1993). Continuous foreign gene expression in stably-transformed insect cells. In: *Insect cell culture engineering*. M.F.A. Goosen, A. Daugulis; P. Faulkner (Eds.). Marcel Dekker, Inc.: New York., 193–217.
- Jarvis, D. L., Finn, E. E. (1996). Modifying the insect cell N-glycosylation pathway with immediate early baculovirus expression vectors. *Nature-Biotechnology*. 14: 1288-1292.
- Jarvis, D. L.; Fleming, J. G. W.; Kovacs, G. R.; Summers, M. D.; Guarino, L. A. (1990). Use of early baculovirus promoters for continuous expression and efficient processing of foreign gene products in stably transformed lepidopteran cells. *Bio/Technology* 8: 956-995.
- Krell, P. J. 1996. Passage effect of virus infection in insect cells. *Cytotechnology* 20, 125–137.
- Lynn, D. E. Available Lepidopteran Insect Cell Lines. In: Murhammer, D. W. (Ed.). *Methods in Molecular Biology: Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols*, v. 338, Humana Press Inc., Totowa, NJ., 2007. p. 117-137.
- Maniatis, T.; Fritsch, E. F.; Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Second Edition. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1.21-1.39.
- MacLachlin, J.R., Miller, L.K., 1997. Stable transformation of insect cells to coexpress a rapidly selectable marker gene and an inhibitor of apoptosis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 33, 575-579.
- [Patterson R.M., Selkirk J.K., Merrick B.A.](#) (1995). Baculovirus and insect cell gene expression: review of baculovirus biotechnology. *Environ. Health Perspect*. 103:756-759.
- Slavicek, J. M.; Mercer, M. J.; Pohlman, D.; Kelly, M. E.; Bischoff, D.S. (1998). Identification of a novel *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus mutant that exhibits abnormal polyhedron formation and virion occlusion. *Journal of Invertebrate Pathology* 72: 28–37.
- Souza, M. L.; Castro, M.E.B.; Sihler, W.; Dalmolin, C.C.; Pedrini, M.R.S.; Da Silva, F.R. (2003). Caracterização do gene 25K FP de *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus.

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. n.44, 18p. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, D.F.

Theilmann, D.A., Blissard, G.W., Bonning, B., Jehle, J., O'Reilly, D.R., Rhormann, G. F., Thiem, S. & Vlak, J.M. (2005). In: *Baculoviridae. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Fauquet, C. M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball, L.A. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 1259p. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press. p.177- 186.

Wang, H. H.; Fraser, M. J.; Cary, L. C. (1989). Transposon mutagenesis of baculoviruses : analysis of TFP3 lepidopteran transposon insertions at the FP locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Gene* 81: 97-108.