



Transformação de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) com os genes recombinantes 35SHBsAg e 35SHBsAgER do vírus da hepatite B

Juliana Martins Ribeiro^{1*}

Débora Costa Bastos²

Eduardo Alves Gamosa de Oliveira¹

Jackson Antônio Marcondes de Souza³

Márcio dos Santos Teixeira Pinto¹

Ekkehard Ernst Theodor Hansen⁴

¹Laboratório de Biotecnologia, Embrapa Semiárido
BR 428, km 152, Zona Rural, CEP 56300-970, Petrolina – PE, Brasil

²Produção Vegetal, Embrapa Semiárido, Petrolina – PE, Brasil

³Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas
Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – SP, Brasil

⁴Laboratório de Biotecnologia, Centro de Biociências e Biotecnologia
Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes – RJ, Brasil

*Autor para correspondência

juliana.ribeiro@cpatsa.embrapa.br

Submetido em 20/09/2009

Aceito para publicação em 02/12/2009

Resumo

O antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) recombinante, purificado de plantas transgênicas, mostrou-se bastante eficiente quando utilizado para a indução da produção de anticorpos anti-HBs para a prevenção da hepatite B. Devido ao importante papel demonstrado pelo antígeno HBsAg para a prevenção da hepatite B, a sequência codificadora do antígeno HBsAg, adicionada ou não da sequência carboxi-terminal para retenção da proteína no retículo endoplasmático, foi ligada ao promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor, à sequência líder Ω do vírus do mosaico do tabaco, e à sequência terminadora da transcrição. O objetivo deste trabalho foi realizar a clonagem do gene quimérico 35SHBsAgER no vetor de expressão em plantas pGPTV/Kan/Asc. O plasmídeo resultante, denominado pG35SHBsAgER, e um plasmídeo produzido anteriormente em nosso laboratório, denominado pG35SHBsAg, foram transferidos para *Agrobacterium tumefaciens* e folhas de tabaco, cultivar SR1, foram utilizadas como explantes para transformação genética. Foram obtidas 21 plantas completas, dez para a construção pG35SHBsAg, e 11 para a construção pG35SHBsAgER. O DNA genômico de todas as plantas foi analisado por PCR e foi observada a presença do transgene em todas as plantas.

Unitermos: antígeno HBsAg, plantas como biorreatores, sequência de retenção no retículo endoplasmático

Abstract

Transformation of tobacco plant (*Nicotiana tabacum* L.) with the recombinant hepatitis B virus genes 35SHBsAg and 35SHBsAgER. The recombinant surface antigen of hepatitis B virus (HBsAg), purified from transgenic plants, proved to be efficient when utilized for raising anti-HB antibodies for the prevention of hepatitis B. Because of the important role of the HBsAg antigen in hepatitis B prevention, the coding sequence of HBsAg antigen, with or without the addition of the carboxi-terminus sequence for protein retention in the endoplasmic reticulum, was linked to cauliflower mosaic virus 35S promoter, tobacco mosaic virus leader sequence Ω , and the transcription terminator sequence. The aim of this work was to clone the chimeric gene 35SHBsAgER in the plant expression vector pGPTV/Kan/Asc. The resulting plasmid, called pG35SHBsAgER, and another plasmid produced previously in our laboratory called pG35SHBsAg, were transferred to *Agrobacterium tumefaciens*, and tobacco leaves, of the SR1 cultivar were used as explants for genetic transformation. Twenty-one fully regenerated plants were obtained (10 for the pG35SHBsAg construction and 11 for the pG35SHBsAgER construction). The genomic DNA of all plants was analyzed by PCR, and the presence of the transgene was confirmed in all plants.

Key words: endoplasmic reticulum retention sequence, HBsAg antigen, plants as bioreactors

Introdução

A hepatite B é considerada um problema mundial de saúde pública, sendo responsável por elevados índices de mortalidade em alguns países. O vírus da hepatite B (HBV) é o maior responsável pelas doenças do fígado em todo o mundo, incluindo hepatites crônicas, cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC). As regiões afetadas pela hepatite B são divididas mundialmente de acordo com os seus níveis de prevalência. Regiões onde mais de 8% da população é portadora do vírus da hepatite B são denominadas regiões de alta endemicidade; regiões nas quais 2-7% da população é portadora do HBV são denominadas regiões de endemicidade intermediária; e regiões onde menos de 2% da população é portadora do HBV são denominadas de baixa endemicidade (Fagan e Harrison, 2000).

O Brasil inclui-se nas regiões denominadas de endemicidade intermediária; entretanto, altos índices de infecção pelo vírus da hepatite B são encontrados na região Norte, principalmente nas comunidades indígenas da Amazônia. De uma maneira geral, a maior parte das pessoas soropositivas para o HBsAg são nativas de países mais pobres e estão na faixa etária de um a vinte anos (Kane, 1998; Clemens et al., 2000).

Grande parte das vacinas utilizadas para a prevenção da hepatite B é obtida através de técnicas de engenharia genética e possuem em sua composição o antígeno HBsAg recombinante. Entretanto, a necessidade de

doses estimulatórias aumenta os custos relacionados às campanhas de vacinação limitando sua realização em países mais pobres.

A biotecnologia oferece novas estratégias para a vacinação, baseadas em técnicas que tornam possível o isolamento de genes de vírus patogênicos ou bactérias e o uso de plantas para a expressão destes genes. Assim como os animais, a utilização de plantas para a produção de imunoprofiláticos e imunoterápicos permite o uso de subunidades selecionadas dos organismos causadores de uma doença específica para gerar uma resposta imune no hospedeiro, evitando o risco de reativação do organismo, e conseqüentemente, o aparecimento da doença (Hansen e Kawashima, 2000).

Alguns estudos já foram realizados mostrando a eficiência de antígenos produzidos em plantas transgênicas em gerar uma resposta imune, tanto em animais quanto em seres humanos. Richter et al. (2000) transformaram geneticamente tubérculos de batata com o gene HBsAg, e as plantas transgênicas obtidas foram administradas oralmente a camundongos, os quais responderam imunologicamente ao antígeno com a produção de anticorpos específicos. Entretanto, os primeiros ensaios clínicos foram realizados por Tacket et al. (1998) utilizando batatas transgênicas expressando o antígeno LT-B de *E. coli*. Os resultados mostraram um aumento no título de anticorpos contra o antígeno, tanto no sangue quanto no trato digestivo

dos indivíduos tratados com as plantas transgênicas. Em todos os voluntários, as plantas transgênicas foram bem toleradas.

Para a produção economicamente viável de vacinas utilizando plantas como biorreatores, um fator muito importante é a obtenção de altos níveis de expressão da proteína na planta transgênica. Uma das estratégias que pode ser utilizada visando aumentar a expressão de determinado gene é a retenção da proteína heteróloga em um compartimento celular específico por meio da adição de seqüências de ancoramento ao inserto. Baseados nestes dados, Munro e Pelham (1987) fizeram um estudo utilizando três proteínas distintas residentes no retículo endoplasmático, cujas seqüências eram conhecidas, com o objetivo de elucidar o mecanismo pelo qual

a célula distingue as proteínas residentes no retículo endoplasmático daquelas a serem secretadas. Os autores observaram que a presença da seqüência Lys-Asp-Glu-Leu na região carboxi-terminal era determinante para a retenção das proteínas no retículo endoplasmático.

Baseado nestas informações, o objetivo da presente pesquisa foi isolar o gene quimérico *35SHBsAgER* a partir do plasmídio *p35SHBsAgER* (Figura 1), cloná-lo no vetor binário *pGPTV/Kan/Asc* (Figura 2), para a obtenção do vetor recombinante *pG35SHBsAgER* e transformar geneticamente plantas de tabaco com o vetores binários recombinantes *pG35SHBsAgER* (com a seqüência de retenção no retículo endoplasmático) e *pG35SHBsAg* (sem a seqüência de retenção no retículo endoplasmático) (Kawashima et al., 2001) (Figura 3).

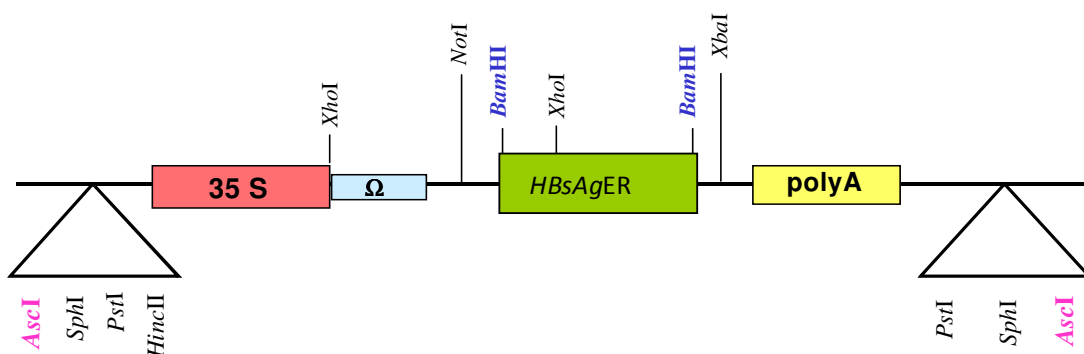


FIGURA 1: **Plasmídio p35SHBsAgER.** **35S:** promotor do vírus do mosaico da couve-flor. **Ω:** seqüência líder Ω do vírus do mosaico do tabaco. **HBsAgER:** seqüência codificadora do antígeno HBsAg ligada a uma seqüência de retenção no retículo endoplasmático ER. **polyA:** seqüência terminadora da transcrição (Marcondes e Hansen, comunicação pessoal). |: sítios de restrição para as endonucleases de restrição: *XhoI*, *NotI*, *BamHI* e *XbaI* e Δ: sítios de restrição para as endonucleases de restrição *AscI*, *SphI*, *PstI*, *HincII*.

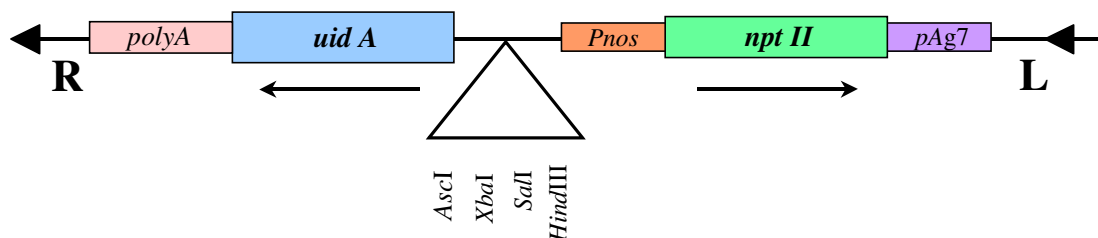


FIGURA 2: **Plasmídio pGPTV-Kan-Asc.** **R e L:** seqüências das bordas direita (R) e esquerda (L) do T-DNA. **uid A:** seqüência codificadora do gene da β-glucuronidase. **Pnos:** promotor da nopalina sintase. **npt II:** seqüência codificadora do gene da neomicina fosfortransferase II. **pAg7:** seqüência terminadora da transcrição (Uberlacker e Weer, 1996). Δ: sítios de restrição para as endonucleases de restrição *AscI*, *SalI*, *XbaI*, *HincII*.

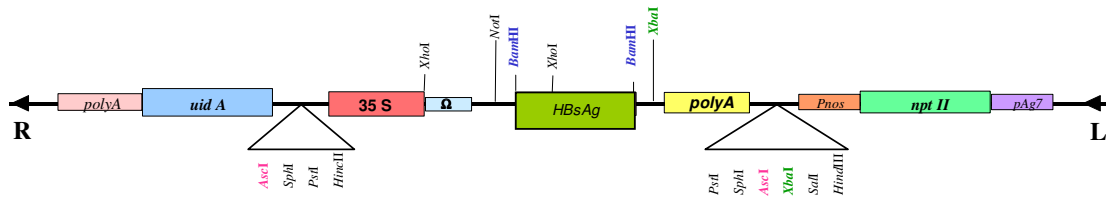


FIGURA 3: Plasmídeo pG35SHBsAg (Kawashima et al., 2001). **R e L**: seqüências das bordas direita (R) e esquerda (L) do T-DNA. **uid A**: seqüência codificadora do gene da β -glucuronidase. **Pnos**: promotor da nopalina sintase. **npt II**: seqüência codificadora do gene da neomicina fosfotransferase II. **pAg7**: seqüência terminadora da transcrição. **35S**: promotor do vírus do mosaico da couve-flor. **Ω** : seqüência líder Ω do vírus do mosaico do tabaco. **HBsAg**: seqüência codificadora do antígeno HBsAg. **polyA**: seqüência terminadora da transcrição. |: sítios de restrição para as endonucleases de restrição: *XhoI*, *NotI*, *BamHI* e *XbaI* e Δ : sítios de restrição para as endonucleases de restrição *AscI*, *SphI*, *PstI*, *HincII*, *XbaI*, *SalI* e *HindIII*.

Material e Métodos

1) Preparo do gene recombinante 35SHBsAgER e do vetor binário pGPTV/Kan/Asc para a reação de ligação

a) Restrição dos plasmídios p35SHBsAgER e pGPTV/Kan/Asc com AscI

Para restrição do plasmídeo p35SHBsAgER foram utilizados, aproximadamente, 2 μ g de DNA plasmidial, 3 μ L de tampão *AscI* (concentrado 10 vezes) e 1 μ L de enzima *AscI* (10U/ μ L), resultando em um volume final de 30 μ L. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C durante 4h. Paralelamente, para a restrição do DNA plasmidial do vetor pGPTV/Kan/Asc foram utilizados, aproximadamente, 7 μ L de DNA plasmidial, 15 μ L de tampão *AscI* (concentrado 10 vezes) e 2 μ L de enzima *AscI* (10U/ μ L), resultando em um volume final de 150 μ L. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C durante 14h.

b) Isolamento do gene recombinante 35S Ω HBsAgER e do vetor pGPTV/Kan/Asc digeridos com AscI, a partir do gel de agarose

As reações de restrição dos plasmídios p35SHBsAgER e pGPTV/Kan/Asc foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Após a visualização das bandas, procedeu-se ao isolamento das bandas de interesse para recuperação de DNA. Para isso, foram feitas duas incisões no gel de agarose com uma lâmina de bisturi, uma acima e

outra abaixo da banda de interesse; um pedaço de papel DE-81 foi inserido em cada incisão e, através de eletroforese, a banda contendo o DNA de interesse foi transferida para papel DE-81 e a corrida foi feita a 100V por 30min; o papel contendo o DNA foi incubado em 400 μ L de tampão de eluição por 30min a 68°C; após rápida agitação, a solução foi pipetada, tendo o cuidado de empurrar o papel para o fundo do tubo, transferida para outro tubo e centrifugada a 13.000rpm durante 15min; o sobrenadante foi retirado cuidadosamente, evitando-se pegar fiapos do papel; 2 μ L de MgCl₂ 2M foram adicionados ao sobrenadante, sendo o DNA precipitado com etanol; o DNA foi deixado secar em estufa a 37°C e, em seguida, foi diluído em 30 μ L de água ultrapura.

c) Desfosforilação do vetor pGPTV/Kan/Asc linearizado com AscI

Para que não ocorresse sua recircularização, o vetor pGPTV/Kan/Asc, previamente linearizado com *AscI*, foi tratado com a enzima fosfatase alcalina intestinal de vitela (CIP – “calf intestinal fosfatase”), que desfosforila a extremidade 5' do DNA. As reações de desfosforilação foram feitas em duplicata, em tubos de 1,5mL, ambos contendo 44 μ L do plasmídeo pGPTV/Kan/Asc (~34ng/ μ L), 5 μ L de tampão da enzima (concentrado 10 vezes) e 1 μ L de CIP (20U/ μ L). Os dois tubos foram incubados a 37°C durante 60min. Após este tempo, procedeu-se à inativação da enzima adicionando-se 3 μ L de EDTA 0,5M, pH 8,6, ao volume de cada tubo. O conteúdo dos dois tubos foi misturado em um só tubo, resultando em um volume final de 106 μ L, sendo este incubado em banho-maria a 85 °C por 15min.

d) Purificação do vetor pGPTV/Kan/Asc

Ao volume de 106µL, resultante da reação de desfosforilação, foram adicionados 94µL de água ultrapura para formar um volume final de 200µL, de maneira a facilitar a retirada da fase superior aquosa na etapa de purificação do DNA. A este volume foram acrescentados 200µL da solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico:Tris-HCl 100mM pH 8,0 preparada nas proporções 25:24:1:1. Após agitação por 50s, a mistura foi centrifugada a 13.000rpm durante 10min para recuperação da fase aquosa. Uma nova centrifugação do sobrenadante foi realizada para se evitar qualquer contaminação com fenol. Foram recuperados 180µL, aos quais foram adicionados 19,8µL de acetato de sódio 3M pH 5,2; o tubo foi submerso em gelo por 5min e após este período foi adicionado o mesmo volume de álcool isopropílico absoluto a -20°C. A amostra foi homogeneizada por inversão do tubo, incubada a -70°C durante 30min, e centrifugada a 13.000rpm durante 10min para sedimentação do DNA. O sedimento foi lavado com 1mL de etanol 70% (v/v) a -20°C, através de inversões do tubo. Novamente, a amostra foi centrifugada a 13.000rpm durante 10min, descartado o sobrenadante e sendo o sedimento seco em estufa a 37°C. A massa de DNA precipitada e seca foi diluída em 25µL de água ultrapura.

e) Reação de ligação do gene recombinante 35SΩHBsAgER no vetor pGPTV/Kan/Asc

Para a reação de ligação foram utilizados 1U de T4 DNA Ligase, 1µL do tampão da enzima (10 vezes concentrado), 100ng do vetor e 40ng do inserto. Os valores citados anteriormente foram calculados para um volume final de 10µL. Os tubos foram incubados em banho-maria a 16°C durante, aproximadamente, 17h. Como controle, foi realizada uma reação de ligação sem a presença do inserto.

f) Transformação de *E.coli* e seleção dos clones recombinantes

Tubos contendo 200µL de suspensão de células competentes da bactéria *E. coli*, foram retirados de freezer a -70°C e mantidos no gelo por 30min para que pudessem

atingir uma condição em que a amostra se apresentasse de forma líquida. Aos tubos foram adicionados, em câmara de fluxo laminar, 10µL da reação de ligação A e 15µL da reação de ligação B, sendo os tubos mantidos em gelo por um período de 30min e, em seguida, a uma temperatura de 42°C durante 90s; este choque térmico leva a entrada dos plasmídios recombinantes nas células bacterianas. Posteriormente ao choque térmico, os tubos foram mantidos no gelo por 2 a 3min, sendo adicionados 800µL de meio LB, seguido de incubação a 37°C durante uma hora. As amostras foram centrifugadas por 1min a 13.000rpm, retirando-se 800µL do sobrenadante com uma pipeta, os quais foram descartados. O volume restante, contendo o sedimento com as bactérias, foi homogeneizado e espalhado em superfície de meio LB sólido, em placas de Petri, contendo 50µg/mL de canamicina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16h. As colônias resistentes ao antibiótico foram inoculadas em 100mL de meio LB líquido acrescido de 50µg/mL de canamicina e o cultivo foi incubado por 16 horas a 37°C, para que pudesse ser feita a posterior extração de DNA plasmidial.

g) Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

O DNA plasmidial dos clones resistentes ao antibiótico foi extraído utilizando-se o kit Concert Rapid Plasmid Miniprep System (Life Technologies).

h) Restrição com *AscI* para verificação da ligação

O DNA plasmidial extraído foi submetido à reação de restrição com a enzima *AscI* para a verificação da clonagem do gene recombinante 35SHBsAgER no vetor de expressão em plantas pGPTV/Kan/Asc. Em um tubo, foram adicionados 100ng de DNA plasmidial, extraído, 11µL de água ultrapura, 3µL de tampão da enzima (concentrado 10 vezes) e 1µL de *AscI* (10U/µL). O tubo foi incubado a 37°C durante 4h.

2) Conjugação triparental

Células de *A. tumefaciens*, *E. coli* helper e *E. coli* (transformadas com cada um dos plasmídios recombinantes p35SHBsAgER e p35SHBsAg

[Kawashima et al., 2001]) foram inoculadas em 5mL de meio YEB líquido suplementado com rifampicina (100µg/mL), LB suplementado com canamicina (25µg/mL) e LB suplementado com canamicina (100µg/mL) respectivamente e incubadas a 28°C (*A. tumefaciens*) e 37°C (*E. coli*) durante a noite. Um volume de 100µL de cada cultura foi espalhado na superfície de uma placa de Petri com YEB sólido sem antibiótico e incubada a 28°C durante 48h. Após o tempo de incubação 4mL de tampão de diluição foram adicionados à superfície da placa de modo a suspender as colônias que cresceram. Utilizando a suspensão de células gerada pela adição de tampão na placa foram feitas quatro diluições. Na primeira, 50µL do líquido foram misturados em 5mL de tampão de diluição. As diluições subsequentes (2, 3 e 4ª) foram geradas sempre se utilizando 50µL da diluição anterior em 5mL de tampão de diluição. Um volume de 100µL de cada diluição foram aplicados placas de meio YEB sólido (uma placa para cada diluição) suplementado com canamicina e rifampicina (100µg/mL) e mantidas a 28°C por 48h.

3) Extração de DNA plasmidial de *Agrobacterium tumefaciens*

Duzentos µL de dez colônias de *Agrobacterium tumefaciens* recombinantes, de cada uma das construções (pG35SHBsAg e pG35SHBsAgER), oriundas da placa de Petri resultante da quarta diluição, foram inoculadas em 5mL de meio YEB adicionado de 5µL de canamicina e 5µL de rifampicina (100µg/mL). Os tubos foram incubados durante a noite a 28°C. Um volume de 1,5mL de cada cultura foi centrifugado durante 10min a 13.000rpm, descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi suspenso em 100µL de solução I (500mM de glicose, 25mM de Tris-HCl, 10mM de EDTA pH 8), sendo adicionados a esta suspensão 8µL de lisozima (50µg/mL). A mistura foi agitada em agitador por 15s, incubada durante 15min a 37°C, após o que foram adicionados 200µL de solução de lise (NaOH 0,2M e SDS 1%) seguido de agitação por inversão do tubo. Na sequência, 200µL de solução de neutralização (acetato de sódio 3M pH 5,2) foram adicionados e o tubo foi invertido para misturar. Finalmente, um volume de 200µL de clorofórmio foi adicionado, sendo a solução

misturada e centrifugada durante 10min. A fase aquosa foi transferida para outro tubo, sendo a ela adicionados 2,5 volumes de etanol absoluto. Após repouso de 5min em gelo, a amostra foi centrifugada por 5min, descartando-se o sobrenadante. Ao sedimento foram adicionados 400µL de água ultrapura esterilizada e 2,5 volumes de etanol absoluto, centrifugando-se por 5min. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foram adicionados 500µL de etanol 70%, seguido de centrifugação por 10min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi deixado a secar em estufa a 37°C. O sedimento seco foi diluído em 20µL de TE-RNase (10U/µL).

4) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para verificação da conjugação

Foram feitas duas reações de PCR, uma para a construção pG35SHBsAgER e outra para a construção pG35SHBsAg. Ambas as reações foram feitas utilizando-se 10µL de solução de DNA isolado dos clones supostamente recombinantes. A este volume foram adicionados 2µL de iniciador HBsAg 3' (25pmoles), 2µL de iniciador HBsAg 5' (25pmoles), 5µL de tampão da enzima (concentrado 10 vezes), 2µL de MgCl₂ (25mM), 8µL de dNTP (1,25mM), 0,5µL de *Taq* Polimerase (5U/µL) e água ultrapura q. s. p. 50µL. As condições da PCR foram 94°C por 5min (desnaturação), seguida de 35 ciclos de 94°C por 1min (desnaturação), 58°C por 1min (anelamento) e 72°C por 1min (síntese). As sequências dos iniciadores foram as seguintes:

- ♦ sense: 5' – GCG **GGA TCC CAT GGA CAT** CAC ATC AGG A – 3'
- ♦ antisense: 5' – GCG **GGA TCC TCA TAG CTC ATC TTT CTC AGA** CAT GGA CAT CAC ATC AGG A – 3'

As sequências coloridas em azul representam os nucleotídeos existentes na sequência do gene *HBsAg*, os nucleotídeos marcados em negrito representam o sítio de restrição *Bam*HI, e a sequência colorida em vermelho representa a sequência de retenção no retículo endoplasmático.

5) Micropropagação de tabaco (cv. SR1) *in vitro*

As culturas foram mantidas em meio de cultura composto pelos sais MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas White (White, 1943), 100mg.L⁻¹ de i-inositol, 30g.L⁻¹ de sacarose, 8g L⁻¹ de Agar, sem reguladores de crescimento, esterilizados por autoclavagem (121°C, 1,05kg.cm², por 15min). A cada trinta dias, as culturas foram subcultivadas utilizando como explantes caules com aproximadamente dois centímetros de comprimento, com no mínimo duas folhas.

6) Transformação de plantas de tabaco

Células de *Agrobacterium tumefaciens*, contendo os plasmídios recombinantes pG35SHBsAgER ou pG35SHBsAg (Kawashima et al., 2001), foram inoculadas em meio YEB líquido, adicionado dos antibióticos rifampicina e canamicina (100µg/mL) e incubadas a 28°C por 48h. Após o crescimento das bactérias, folhas de plantas de tabaco crescidas em ambiente estéril foram cortadas em pedaços, retirando-se a nervura central, e colocadas em uma placa de Petri contendo meio MS líquido para evitar ressecamento.

Os explantes foram, então, transferidos para uma placa de Petri contendo MS líquido com uma alíquota da cultura de *Agrobacterium tumefaciens* recombinantes (meio de infecção). Os explantes submetidos ao meio de infecção durante dois dias, na ausência de luz, à temperatura de 26°C. Após este período, os explantes foram transferidos para uma placa contendo meio nutritivo (descrito no item 5) adicionado dos antibióticos canamicina (100µg/mL) e cefotaxima (250µg/mL) e dos reguladores de crescimento AIA (2µg/mL) e BAP (0,2µg/mL), responsáveis pela indução de calos.

Após a formação dos calos, os explantes foram transferidos para placas contendo meio nutritivo (descrito no item 5) adicionado de vitaminas (100µg/mL), dos antibióticos canamicina (100µg/mL) e cefotaxima (250µg/mL) e dos reguladores de crescimento AIA (0,2µg/mL) e BAP (2µg/mL), responsáveis pela indução de brotos. Após a formação dos brotos, os explantes foram transferidos para placas contendo meio nutritivo (descrito no item 5)

adicionado de vitaminas (100µg/mL) e dos antibióticos canamicina (100µg/mL) e cefotaxima (250µg/mL), sem adição dos reguladores de crescimento, para que houvesse a indução de raízes. Todas as manipulações foram realizadas na câmara de fluxo laminar.

7) Extração de DNA vegetal

Para este procedimento, foi utilizado o kit Biogreen DNA Purification (Biotools).

8) Quantificação do DNA vegetal extraído

O DNA genômico extraído das plantas transformadas e 25, 50 e 100ng de λ-DNA não digerido foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 0,8% para a quantificação aproximada através da comparação visual entre a intensidade das bandas de DNA, bem como para a avaliação da qualidade do DNA extraído.

9) PCR para verificação da transformação das plantas

O DNA das vinte e duas plantas obtidas (incluindo uma planta controle) foi extraído e utilizado como molde em uma reação de PCR. Foram utilizados 60ng do DNA vegetal extraído, 2µL de iniciador HBsAg 3' (25pmoles), 2µL de iniciador HBsAg 5' (25pmoles), 5µL de tampão da enzima (concentrado 10 vezes), 2µL de MgCl₂ (25mM), 8µL de dNTP (1,25mM), 0,5µL de *Taq* Polimerase (5U/µL) e água ultrapura q. s. p. 50µL. As condições do PCR foram 94°C por 5min (desnaturação), seguida de 35 ciclos de 94°C por 1min (desnaturação), 58°C por 1min (anelamento) e 72°C por 1min (síntese).

Resultados e Discussão

Após a reação de ligação do gene quimérico 35SHBsAgER ao vetor de expressão em plantas pGPTV/Kan/*Asc*, realizou-se restrição com a enzima *Asc*I para verificação da clonagem. A Figura 4, raias 3 e 4, mostra os fragmentos de DNA plasmidial, obtidos por restrição com a enzima *Asc*I, de dois clones obtidos após transformação de *E. coli* competentes com o plasmídio recombinante pG35SHBsAgER. A clonagem do gene

quimérico *35SHBsAgER* no vetor de expressão em plantas foi confirmada na raia 4 por meio da liberação de fragmentos de DNA com pesos moleculares correspondentes aos do vetor pGPTV/Kan/*Asc*, com, aproximadamente, 13kb, e ao do inserto *35SHBsAgER*, com, aproximadamente, 1700bp (1,7Kb).

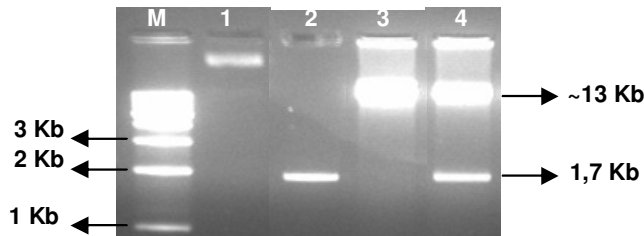


FIGURA 4: Análise da clonagem do gene recombinante *35SHBsAgER* no plasmídeo pGPTV/Kan/*Asc*. M: marcador de DNA 1 Kb (300ng). 1: pGPTV/KAN/*Asc*. 2: gene quimérico *35SHBsAgER*. 3: DNA plasmidial clone B1 digerido com *AscI*. e 4: DNA plasmidial clone B2 digerido com *AscI*.

O gene *HBsAg* do capsídeo do vírus da hepatite B já foi utilizado em experimentos de transformação genética de plantas. Richter et al. (2000) transformaram geneticamente tubérculos de batata com o gene supracitado, utilizando o plasmídeo pPAT como vetor binário. As plantas transgênicas obtidas, expressando o gene citado, foram administradas oralmente aos camundongos, os quais responderam imunologicamente ao antígeno com a produção de anticorpos específicos. Ao final do trabalho, foi feita uma consideração sugerindo a ligação do gene *HBsAg* a uma sequência de retenção no retículo endoplasmático, de modo a garantir uma expressão mais elevada e estável da proteína heteróloga. Tal consideração foi realizada no presente trabalho e o gene *HBsAgER* foi clonado com sucesso no vetor binário pGPTV/Kan/*Asc*.

Os plasmídios recombinantes pG35SHBsAgER e pG35SHBsAg (Kawashima et al., 2001) foram inseridos em *Escherichia coli* competentes via choque térmico e transferidos para *Agrobacterium tumefaciens* via conjugação triparental. Após esse procedimento, o DNA plasmidial das colônias de *A. tumefaciens* resistentes ao antibiótico canamicina foi isolado e utilizado como molde no método da PCR, na qual foram utilizados iniciadores específicos para as extremidades do gene *HBsAg*. A Figura 5 (raias 3 a 12) mostra a amplificação

de fragmentos de DNA com tamanhos correspondentes aos genes recombinantes *35SHBsAg* (Figura 5A) e *35SHBsAgER* (Figura 5B) de dez clones obtidos após conjugação triparental, confirmando a transferência dos plasmídios recombinantes pG35SHBsAg e pG35SHBsAgER para *A. tumefaciens* LBA4404.

A transformação genética de plantas de diferentes espécies utilizando *Agrobacterium tumefaciens* é uma técnica muito difundida por possuir protocolos de simples execução, com satisfatória eficiência de transformação e por apresentar um baixo custo quando comparada com outras técnicas, como a biobalística, por exemplo. A porcentagem de plantas transgênicas obtida em outros trabalhos utilizando essa tecnologia foi de 82% em uma espécie de gramínea (*Festuca pratensis* Huds.) (Gao et al., 2009), 86% em cevada (Hensel et al., 2009), de 60 a 80% no fungo *Mortierella alpine* (Ando et al. 2009), de 78% em plantas de arruda (*Ruta graveolens* L.) (Lièvre et al., 2009), entre outros.

Após a conjugação triparental, foram realizadas sete séries de experimentos de transformações genéticas de plantas de tabaco utilizando as construções pG35SHBsAg e pG35SHBsAgER, com aproximadamente 135 explantes para cada construção. Dois dias após a transformação, os explantes foram transferidos para meio MS sólido contendo vitaminas, cefotaxima (bacteriostático), canamicina (para seleção dos transformantes) e reguladores de crescimento responsáveis pela indução de calos (Figura 6A). Os calos obtidos em meio de calejamento foram transferidos para meio MS sólido contendo vitaminas, cefotaxima, canamicina e reguladores de crescimento responsáveis pela indução de brotos (Figura 6B). A Figura 6B mostra a formação de brotos após, aproximadamente, um mês de transferência dos calos para o meio de brotamento. Os brotos induzidos no meio de brotamento foram transferidos para meio MS contendo vitaminas, cefotaxima e canamicina. A Figura 6C mostra a formação de raízes nos brotos um mês após transferência para meio de enraizamento. Ao final do processo de transformação, foram obtidas 10 plantas completas para as transformações feitas com a construção pG35SHBsAg e 11 plantas para as transformações feitas com a construção pG35SHBsAgER.

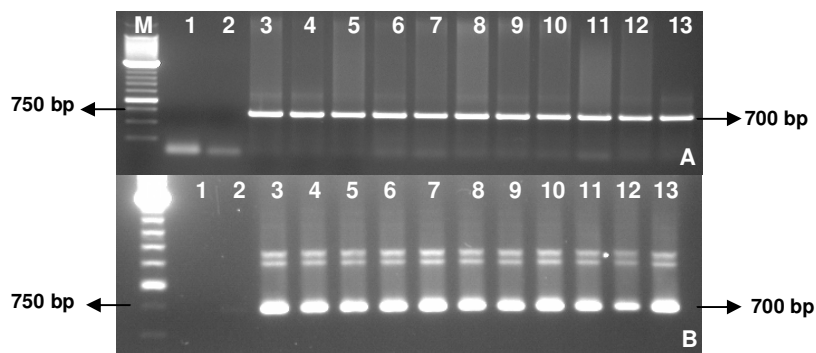


FIGURA 5: (A) Análise da amplificação do fragmento *HBsAg* através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. M: marcador de DNA 250bp (2 μ g); 1: controle negativo (sem DNA); 2: Controle negativo (LBA4404 desarmada); 3-12: DNA plasmidial dos clones 1 a 10. 13: Controle positivo (pG35SHBsAg). (B) Análise da amplificação do fragmento *HBsAgER* através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. M: marcador de DNA 250bp ladder (2 μ g); 1: controle negativo (sem DNA); 2: Controle negativo (LBA4404 desarmada); 3-12: DNA plasmidial dos clones 1 a 10; 13: Controle positivo (pG35SHBsAgER).



FIGURA 6: (A) Formação de calos em explantes colocados em meio de calejamento. (B) Formação de brotos em calos transferidos para meio de brotamento. (C) Formação de raízes em brotos colocados em meio de enraizamento.

O DNA genômico das plantas foi extraído e utilizado como molde no método da PCR utilizando iniciadores específicos para as extremidades do gene *HBsAg*. Conforme ilustrado na Figura 7 (A e B), a transformação das plantas de tabaco foi confirmada através da amplificação de fragmentos de DNA de peso molecular correspondente aos genes *35SHBsAg* e *35SHBsAgER* (700bp). Das 11 plantas completas, obtidas após a transformação com o plasmídeo recombinante pG35SHBsAgER, em 100% delas foi verificada a presença do transgene pela amplificação de um fragmento de DNA com tamanho correspondente ao tamanho de gene *HBsAgER* (Figura 7A). Da mesma maneira, das 10 plantas completas obtidas após a transformação com o plasmídeo recombinante pG35SHBsAg (Kawashima et al., 2001), em 100% delas foi verificada a presença do transgene pela amplificação de um fragmento de DNA com tamanho correspondente ao tamanho de gene *HBsAg* (Figura 7B).

De maneira geral, o tabaco é uma planta que possui métodos de transformação, regeneração e cultivo *in vitro* bem estabelecidos, sendo, por isso, muito utilizado com planta teste em diferentes experimentos. Assim como no presente trabalho, vários autores obtiveram êxito quando utilizaram o tabaco como receptor de transgenes. Zhang et al. (2009) promoveram a super expressão do gene *GmERF3* de soja em plantas de tabaco, e observaram que as plantas transgênicas desenvolveram tolerância aos estresses salino e hídrico, além de se tornarem resistentes à infecção por *Ralstonia solanacearum*, *Alternaria alternata* e ao vírus do mosaico do tabaco (TMV). Kern et al. (2009) isolaram o gene *chit1* do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e o transferiram para o DNA de plantas de tabaco. Após a transformação genética, observou-se que as plantas de tabaco expressando o transgene passaram a apresentar resistência ao patógeno *Rhizoctonia solani*. Wan et al.

(2009) introduziram o gene codificador de uma oxalato oxidase de trigo em plantas de tabaco e observaram que as plantas transgênicas passaram a apresentar tolerância ao estresse oxidativo.

Cheung et al. (2009) transformaram geneticamente plantas de tabaco com uma construção gênica contendo um gene codificador de um fator de crescimento humano ligado a uma sequência de retenção no vacúolo celular. Ao final dos experimentos, os autores observaram que a construção gênica supracitada estava sendo expressa nas sementes das plantas transgênicas e que a proteína heteróloga estava sendo acumulada no vacúolo. Os autores concluíram que plantas de tabaco podem ser consideradas biorreatores eficientes para a produção de proteínas heterólogas de valor farmacêutico.

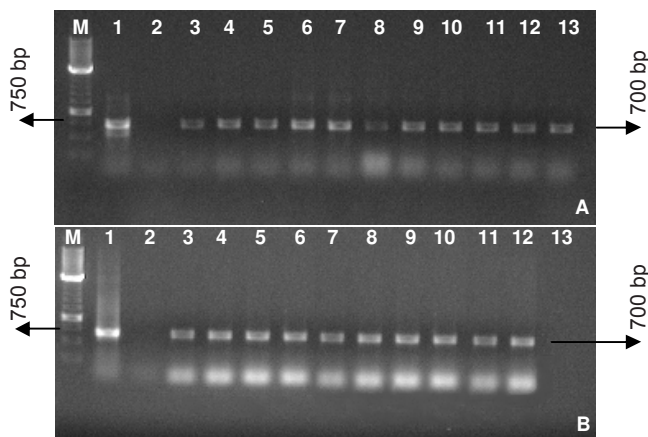


FIGURA 7: (A) Análise da amplificação dos fragmentos *HBsAgER* através de eletroforese em gel de agarose. (B) Análise da amplificação de fragmentos *HBsAg* através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. M: marcador de DNA 250bp (0,5µg); 1: controle positivo (pG35SHBsAgER e pG35SHBsAg, respectivamente); 2: Controle negativo (DNA de planta não transformada); 3 – 13 (A): amostras de DNA extraídas de plantas transformadas com a construção pG35SHBsAgER; 3 – 12 (B): Amostras de DNA extraídas de plantas transformadas com a construção pG35SHBsAg.

Colgan et al. (2009) utilizaram o tabaco para otimizar condições de cultivo de plantas transgênicas. Para tal propósito, os autores analisaram o efeito que a temperatura, quantidade de luz, quantidade de compostos nitrogenados, irradiação e a densidade da planta provocavam sobre a expressão da proteína heteróloga nas plantas transgênicas. Ao final dos experimentos,

os autores observaram que a temperatura era a única variável que estava afetando a quantidade da proteína heteróloga nas plantas transgênicas de tabaco, havendo um aumento da concentração nas temperaturas mais baixas.

Além de ser considerada uma planta modelo em experimentos de transformação genética, por não ser uma planta comestível, o tabaco pode ser utilizado somente como sistema de produção da proteína de interesse, fazendo-se necessário o uso de métodos eficazes de extração da proteína recombinante. Além disto, sob considerações atuais de Biossegurança, recomenda-se evitar a utilização de plantas comestíveis como vacinas orais em possíveis experimentos de campo ou futuros plantios para a comercialização, como uma forma de impedir o seu consumo indevido.

De maneira geral, pode-se concluir com os resultados obtidos na presente pesquisa que o plasmídeo pGPTV/Kan/*Asc* apresenta-se bastante eficiente como vetor binário, desde a etapa de inserção de genes quiméricos em seu sítio múltiplo de clonagem, até seleção dos transformantes em bactérias e plantas. Quanto ao método para transformação de plantas de tabaco, a utilização de *Agrobacterium tumefaciens* resulta em porcentagens satisfatórias da integração do transgene nas plantas transformadas. Em relação à escolha da planta teste, o tabaco apresenta alto potencial para utilização como biorreatores na produção do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), visto que possui protocolos de transformação genética de fácil execução, integra o transgene em seu DNA genômico em porcentagens satisfatórias e é regenerado *in vitro* sem dificuldades.

Referências

- Ando, A.; Sumida, Y.; Negoro, H.; Suroto, D. A.; Ogawa, J.; Sakuradani, E.; Shimizu, S. 2009. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4 and its application for eicosapentaenoic acid-producer breeding. **Applied and Environmental Microbiology**, **75** (17): 5529-5535.
- Cheung, S. C.; Sun, S. S.; Chan, J. C.; Tng, P. C. 2009. Expression and subcellular targeting of human insulin-like growth factor binding protein-3 in transgenic tobacco plants. **Transgenic Research**, **18** (no prelo).

- Clemens, S. A.; Fonseca, J. C.; Azevedo, T.; Cavalcanti, A.; Silveira, T. R.; Castilho, M. C.; Clemens, R. 2000. Soroprevalência para hepatite A e hepatite B em quatro centros no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **33** (1) “no prelo”.
- Colgan, R.; Atkinson, C. J.; Paul, M.; Hassan, S.; Drake, P. M.; Sexton, A. L.; Santa-Cruz, S.; James, D.; Hamp, K.; Gutteridge, C.; Ma, J. K. 2009. Optimisation of contained *Nicotiana tabacum* cultivation for the production of recombinant protein pharmaceuticals. **Transgenic Research**, **18** (no prelo).
- Fagan, E. A.; Harrison, T. J. 2000. **Viral hepatitis: A handbook for clinicians and scientists**. 1st ed. Springer Verlag, New York, EUA, 311pp.
- Gao, C.; Liu, J.; Nielsen, K. K. 2009. *Agrobacterium*-mediated transformation of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.). **Plant Cell Reports**, **28** (no prelo).
- Hansen, E. E.; Kawashima, C. 2000. Delivery of imunoprofilatics in transgenic plants. **BioDrugs**, **13** (6): 381-390.
- Hensel, G.; Kastinger, C.; Oleszczuk, S.; Riechen, J.; Kumlehn, J. 2009. *Agrobacterium*-mediated gene transfer to cereal crop plants: Current protocols for barley, wheat, triticale, and maize. **International Journal of Plant Genomics**, **209**: 1-12.
- Kane, M. A. 1998. Status of hepatitis B immunization programmes in 1998. **Vaccine**, **16**: 104-108.
- Kawashima, C. G.; Babá E. H.; Hansen E. 2001. Expression of recombinant hepatitis B virus antigen HBsAg in transgenic plant callus. **Protein & Peptide Letters**, **48**: 97-100.
- Kern, M. F.; Maraschin, S. D.; Endt D. D.; Schrank, A.; Vainstein, M. H.; Pasquali, G. 2009. Expression of a chitinase gene from *Metarhizium anisopliae* in tobacco plants confers resistance against *Rhizoctonia solani*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **152** (no prelo).
- Lièvre, K.; Tran T. L.; Doerper, S.; Hehn A.; Lacoste, P.; Thomasset, B.; Bourgaud, F.; Gontier, E. 2009. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Ruta graveolens* L. **Methods in Molecular Biology**, **547**: 235-248.
- Munro, S.; Pelham, H. R. B. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. **Cell**, **48** (5): 899-907.
- Murashige, T.; Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, **15**: 473-497
- Richter, L. J.; Thanavala, Y.; Arntzen, C. J.; Mason, H. S. 2000. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. **Nature Biotechnology**, **18** (11): 1167-1171.
- Tacket, C. O.; Mason, H. S.; Losonsky, G.; Clements, J. D.; Levine, M. M.; Arntzen, C. J. 1998. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in transgenic potato. **Nature Medicine**, **4**: 607-609.
- Uberlacker, B.; Werr, W. 1996. Vectors with rare-cutter restriction enzyme sites for expression of open reading frames in transgenic plants. **Molecular Breeding**, **2**: 193-295.
- Wan, X.; Tan, J.; Lu, S.; Lin, C.; Hu, Y.; Guo, Z. 2009. Increased tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco expressing a wheat oxalate oxidase gene via induction of antioxidant enzymes is mediated by H₂O₂. **Journal of Plant Physiology**, **136** (1): 30-44.
- White, P. R. 1943. Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient medium for cultivation of excised tomato roots. **Growth**, **7**: 53-65.
- Zhang, G.; Chen, M.; Li, L.; Xu, Z.; Chen, X.; Guo, J.; Ma, Y. 2009. Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. **Journal of Experimental Botany**, **60**: 2-16.