



## CLONAGEM DO GENE *ompX* DE *Salmonella* Enteritidis EM PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO EM EUKARIOTOS

**DE CARLI, Eduardo<sup>1</sup>; CONRAD, Neida Lucia<sup>2</sup>; SEHN, Carla Pohl<sup>3</sup>; MENDONÇA, Marcelo<sup>3</sup>; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo<sup>3</sup>; DA HORA, Vanusa Pousada<sup>3</sup>; DELLAGOSTIN, Odir Antonio<sup>3</sup>; ALEIXO, José Antonio Guimarães<sup>3</sup>; MOREIRA, Ângela Nunes<sup>3,4</sup>**

<sup>1</sup> Bolsista PIBIC/CNPq- Faculdade de Nutrição- Universidade Federal de Pelotas – RS;

<sup>2</sup> Bolsista PIBIC/CNPq- Faculdade de Biologia- Universidade Federal de Pelotas – RS;

<sup>3</sup> Programa de Pós-graduação em Biotecnologia- Universidade Federal de Pelotas –RS;

<sup>4</sup> Faculdade de Nutrição- Universidade Federal de Pelotas – RS; Campus Universitários – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. [angelanm@ufpel.edu.br](mailto:angelanm@ufpel.edu.br)

### 1. INTRODUÇÃO

O método de detecção convencional de salmonelas, um dos principais agentes de infecção alimentar em diversos países e responsável por sérios problemas de saúde pública e significativas perdas econômicas (NADVORNY et al, 2004), é baseado no seu isolamento, identificação bioquímica e sorológica. Devido às limitações da metodologia convencional e, principalmente, ao longo período de tempo requerido para a detecção de salmonelas em alimentos (4 - 7 dias), diversos métodos rápidos vêm sendo propostos nos últimos anos (BLACKBURN, 1993). Os métodos imunológicos e os baseados em PCR são os que, geralmente, apresentam maior facilidade de execução, rapidez na obtenção de resultados e boa sensibilidade e especificidade quando comparados à metodologia convencional de cultivo (MOREIRA, 2005).

A utilização de anticorpos monoclonais (MAbs) contra antígenos de superfície específicos de salmonelas aumenta a especificidade de métodos imunológicos de detecção e facilita sua padronização. Além disso, os MAbs oferecem outras vantagens sobre os anticorpos policlonais, tais como a capacidade de serem continuamente produzidos “*in vitro*”, dispensando a necessidade de manutenção de animais doadores (CARDOZO, 2001).

MAbs podem ser produzidos utilizando a imunização clássica com proteínas extraídas ou recombinantes ou a imunização genética. Na produção de MAbs utilizando imunização genética, o gene que codifica para o antígeno de interesse é clonado em um plasmídeo de expressão em eucariotos, o plasmídeo é injetado no músculo dos animais e a proteína é expressa “*in vivo*” (TANG, DEVIT e JOHNSTON, 1992). Esse tipo de imunização gera respostas fortes, altamente específicas e os MAbs gerados, geralmente, reconhecem as formas nativa e recombinante da

proteína (LEINONEN et al., 2004; PUTTIKHUNT et al., 2003). Portanto, o objetivo do presente trabalho foi clonar o gene *ompX* de *Salmonella* Enteritidis em um plasmídeo de expressão em eucariotos visando a posterior produção de MAb's anti-salmonelas utilizando a imunização genética.

## 2. MATERIAS E MÉTODOS

### 2.1 Seleção do gene e desenho dos *primers*

Para a seleção do gene que codifica uma proteína de superfície específica de salmonela, uma extensa revisão bibliográfica e pesquisas em bancos de dados de DNA (GenBank e EMBL) foram realizadas. As seqüências pré-selecionadas foram comparadas com as de salmonelas e de outras bactérias depositadas nos bancos de dados através de alinhamento utilizando o programa BLAST N (National Center for Biotechnology Information - NCBI). *Primers* foram desenhados e avaliados com o auxílio do software Vector-NTI.

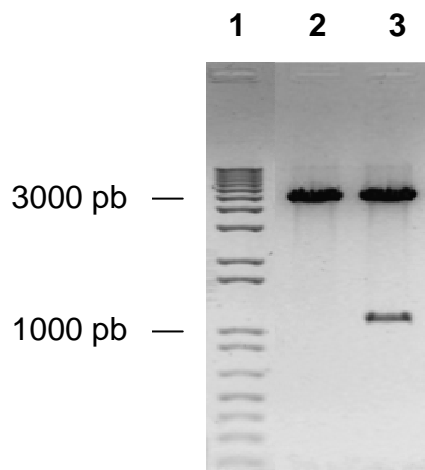
### 2.2 Clonagem do gene *ompX* no plasmídeo de expressão em eucariotos pcDNA3

O gene *ompX* (número de acesso no GenBank AAD518780), obtido a partir do DNA cromossomal de *S. Enteritidis* foi amplificado por PCR e clonado no vetor de expressão em eucariotos pcDNA3, utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). O produto da ligação (pcDNA3/*ompX*) foi usado para transformar células competentes de *E. coli* TOP10 (Invitrogen) por eletroporação e as colônias recombinantes selecionadas em ágar Luria Bertani (LB) (Acumedia) contendo ampicilina. O DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina e caracterizado pela digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI e amplificação por PCR. Para obtenção do plasmídeo pcDNA3/*ompX* em larga escala para imunização genética dos camundongos, foi utilizado o kit Perfectprep Plasmid Midi (Eppendorf). A concentração do plasmídeo purificado foi estimada através da comparação com o marcador de DNA  $\lambda$ DNA/*Hind*III após eletroforese em gel de agarose 0,8% e por espectrofotometria a 260 e 280 nm.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

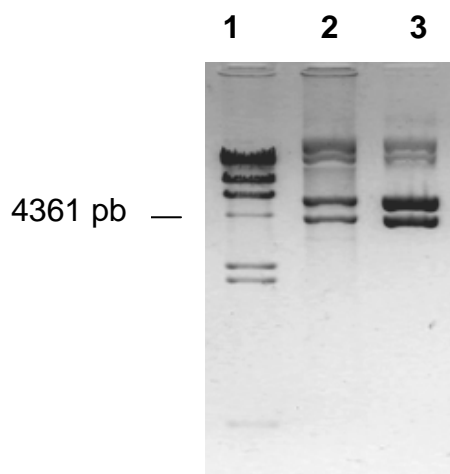
O gene *ompX* que codifica uma proteína de membrana externa de *S. Enteritidis* específica de salmonelas, foi o selecionado para ser clonado no pcDNA3. O par de *primers* foi desenhado visando à clonagem direcional do gene inteiro, para aumentar a chance da expressão da proteína em sua conformação tridimensional nativa e, assim, produzir MAb's que reconheçam a proteína nativa.

O gene foi clonado com sucesso no vetor de expressão em eucariotos, visto que, na caracterização do plasmídeo utilizando as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI, foram obtidos os 2 fragmentos esperados, um referente ao inserto (*ompX*) e outro ao vetor pcDNA3 (Fig. 1). Além disso, um produto de aproximadamente 1140 pb, correspondendo ao gene *ompX* de *S. Enteritidis* foi obtido por PCR utilizando pcDNA3/*ompX* como DNA molde.



**Figura 1.** Caracterização do pcDNA3/*ompX* através de digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI. 1 – Marcador de DNA de 1 kb; 2 - pcDNA3 digerido; 3 - pcDNA/*ompX* digerido.

O plasmídeo pcDNA3/*ompX* foi obtido em larga escala e está sendo utilizado na imunização dos camundongos. A concentração obtida desse plasmídeo foi de 1,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Fig. 2). Novas expansões desse plasmídeo estão sendo realizadas, visando à obtenção de quantidade adequada do plasmídeo para a imunização de camundongos com esse DNA.



**Figura 2.** Quantificação do DNA plasmideal em gel de agarose 0,8%. 1 - marcador de DNA  $\lambda$ DNA/*Hind*III; 2 – pcDNA/*ompX* obtido por extração em pequena escala; 3 - pcDNA/*ompX* obtido por extração em larga escala com kit diluído 1:10.

#### 4. CONCLUSÕES

A clonagem do gene *ompX* de *Salmonella* Enteritidis no plasmídeo de expressão em eucariotos foi realizada com sucesso. O plasmídeo pcDNA/*ompX* está sendo utilizado na imunização de camundongos através de imunização genética visando a produção de MAbs anti-salmonelas.

#### 5. AGRADECIMENTO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 100836/2009-9 pelo suporte financeiro.

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLACKBURN, C. W. Rapid and alternative methods for detection of salmonellas in foods. **Journal of Applied Bacteriology**, 1993, vol. 75, p. 199-214.

CARDOZO, R.M., N.R.S. MARTINS, J.S, RESENDE, M, RESENDE, A.A.P, TEIXEIRA, M.A, JORGE, M.B, SOUZA, E.O.B, EIPHANIO. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2001, vol. 53, p. 290-298.

LEINONEN, J.; NIEMELÄ, P.; LÖVGREN, J.; BOCCHI, L.; PETTERSSON, K.; NEVANLINNA, H.; STENMAN, U-H. Characterization of monoclonal antibodies against prostate specific antigen produced by genetic immunization. **Journal of Immunological Methods**, 2004, vol. 289, p. 157-167.

MOREIRA, A.N **Development of immunological and molecular methods for detection of salmonella in foods**. Pelotas, 2005, Dissertação (Doutorado em Biotecnologia Agrícola), Universidade Federal de Pelotas, 2005.

NADVORNY A. FIGUEIREDO D.M.S. & SCHMIDT V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul, em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2004, vol. 32, p. 47-51.

PUTTIKHUNT, C.; KASINRERK, W.; SRISA-AD, S.; DUANGCHINDA, T.; SILAKATE, W.; MOONSOM, S.; SITTISOMBUT, N.; MALASIT, P. Production of anti-dengue NS1 monoclonal antibodies by DNA immunization. **Journal of Virological Methods**, 2003, vol. 109, p. 55- 61.

TANG, D.; DEVIT, M.; JOHNSTON, S.A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. **Nature**, 1992, vol. 356, p. 152-154.