

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



CLONAGEM E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE MHP0198 DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EXPRESSA EM *Escherichia coli*

**GOMES, Charles K¹; SIMIONATTO, Simone¹; MARCHIORO, Silvana B.¹; GALLI,
Vanessa¹; FISCH, Andressa¹; DELLAGOSTIN, Odir A¹.**

¹Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia/UFPEL, Campus Capão do Leão, Caixa Postal 354 – Pelotas – RS, CEP 96010-900. charlesklazer@uol.com.br

1. INTRODUÇÃO

O *Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma doença respiratória contagiosa que acomete suínos no mundo todo, causando grandes perdas econômicas ao setor suinícola (Sobestiansky et al., 1999). Embora existam vacinas comerciais (bacterinas) usadas no controle desta doença, as mesmas não são produzidas no Brasil e apresentam um elevado custo de produção (Ross, 1999). Em virtude disso, torna-se cada vez mais relevante e necessária à implementação de medidas de controle mais efetivas para a PES. Entretanto, o repertório de proteínas antigênicas caracterizadas e disponíveis para utilização em testes vacinais ainda é bastante restrito (Lin et al., 2003; Cheen et al., 2008; Sibila et al., 2009). Com o seqüenciamento e a análise proteômica complementar de duas cepas de *M. hyopneumoniae* (Vasconcelos et al., 2005), foi possível a identificação de sequências codificadoras (CDS) de proteínas antigênicas e/ou envolvidas na patogenicidade desse agente e, possivelmente, com potencial para utilização no desenvolvimento de vacinas e testes de imunodiagnóstico. Porém, como os experimentos de desafio em suínos apresentam custo elevado, é importante a seleção prévia de antígenos candidatos a vacinas que se apresentem imunogênicos em animais de laboratório. Posteriormente, os antígenos que forem capazes de induzir uma resposta imune significativa poderão ser avaliados no animal alvo deste estudo, os suínos.

Este trabalho teve por objetivo a clonagem e purificação da proteína hipotética MHP0198 de *M. hyopneumoniae* expressa em *Escherichia coli*. A realização deste estudo permitirá a identificação e caracterização de uma nova proteína deste patógeno, a qual poderá ser utilizada no desenvolvimento de uma vacina de subunidade, sendo, portanto, um passo importante na definição de estratégias alternativas para produção de insumos eficientes no controle da PES.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amplificação da CDS MHP0198 de *M. hyopneumoniae*

A CDS MHP0198 selecionada corresponde a uma proteína hipotética (Vasconcelos et al., 2005). Os *primers* utilizados na amplificação do gene correspondente a esta CDS foram desenhados com o auxílio do programa Vector NTI (Invitrogen) a partir da seqüência depositada no GenBank®, números de acesso NC_007332. A amplificação do gene foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir do DNA genômico de *M. hyopneumoniae* cepa 7448.

2.2 Clonagem

O produto amplificado por PCR foi ligado no vetor de expressão em *E. coli* Champion pET200D/TOPO His-tag (Invitrogen) através de uma ligação direcional no sítio CACC deste vetor. O produto desta ligação foi utilizado para transformar células de *E. coli* TOP10F eletrocompetentes. A triagem dos clones recombinantes foi realizada através da técnica de *microprep* (Jouglard et al., 2002). Os plasmídios selecionados foram expandidos em caldo Luria-Bertani (LB, Difco) suplementado com 100 µg de canamicina, seguido de uma extração de DNA e caracterização enzimática.

2.3 Expressão e purificação da proteína hipotética MHP0198

Os plasmídios recombinantes caracterizados enzimaticamente foram transformados na cepa de expressão *E. coli* BL21DE3 Codon Plus RIL. As células transformadas foram cultivadas, em meio LB contendo o antibiótico canamicina, até a fase log de crescimento e induzidas por 3 h com 0,3 mM de IPTG. A expressão protéica foi avaliada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. A proteína recombinante MHP0198 (rMHP0198) foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de sepharose (HisTrap™) previamente carregada com sulfato de níquel, fazendo uso do sistema de purificação de proteínas automatizado ÄKTA-Prime (GE Healthcare). A pureza da proteína rMHP0198 foi avaliada através SDS-PAGE 12% e a concentração foi determinada utilizando o kit BCA™ Protein Assay (Pierce).

2.4 Inoculação em camundongos

A rMHP0198 purificada foi inoculada em camundongos BALB/c fêmeas. Foram administradas duas doses de 50 µg de proteína adsorvida em hidróxido de alumínio 15%, por via intramuscular, com 21 dias de intervalo entre as doses. O título de anticorpos sistêmicos dos camundongos será monitorado por ELISA indireto utilizando como antígeno a proteína recombinante. O soro dos camundongos será confrontado com extratos de *M. hyopneumoniae* através da técnica de *Western blot* para avaliar a capacidade da rMHP0198 em induzir uma resposta imune humoral que reconheça a proteína nativa do *M. hyopneumoniae*. A rMHP0198 purificada também será avaliada quanto ao reconhecimento por anticorpos produzidos durante a infecção natural, através das técnicas de *Western blot* e ELISA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação e caracterização de novas proteínas de *M. hyopneumoniae* é um importante passo para o desenvolvimento de vacinas e testes de imunodiagnóstico. O fragmento de DNA correspondente a CDS selecionada MHP0198, foi amplificado eficientemente por PCR o que permitiu a clonagem deste no vetor de expressão em *E. coli* Champion pET200D/TOPO His-tag. A proteína rMHP0198 foi expressa em *E. coli* BL21DE3 Codon Plus RIL. No entanto, neste sistema

de expressão, esta proteína foi expressa na forma insolúvel sendo utilizado 8 M de uréia como solução de solubilização. A purificação da rMHP0198 realizada apresentou um rendimento de 20 mg/L de cultivo com alto grau de pureza, conforme pode ser observado na Figura 1. A quantidade obtida da proteína foi suficiente para os estudos de imunogenicidade realizados em camundongos bem como, para os testes de antigenicidade que serão realizados com os soros de suínos.

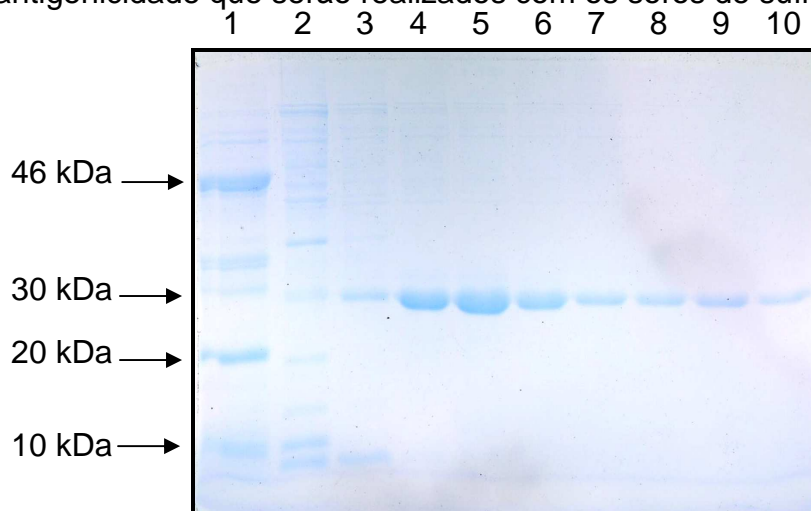


Figura 1. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12% corado com Coomassie blue demonstrando a purificação da proteína rMHP0198 de *M. hyopneumoniae*. Coluna 1, Marcador de peso molecular; de coluna 3 a 10, frações da proteína rMHP0198 de 30 kDa purificada.

4. CONCLUSÃO

Estes resultados permitem concluir que a estratégia de clonagem direcional no vetor Champion pET200D/TOPO Hist-tag é eficiente. O gene clonado expressa a proteína de interesse em *E. coli*, permitindo a purificação da mesma. Esta proteína está sendo avaliada em quanto à antigenicidade utilizando soro de suínos naturalmente infectados para determinar sua capacidade de reagir com anticorpos produzidos durante a infecção. Portanto, este estudo permitirá a caracterização de um novo antígeno de *M. hyopneumoniae* até então não explorado, contribuindo para o desenvolvimento de novas vacinas de subunidade contra a PES.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEN, A.Y.; FRY, S.R.; DAGGARD, G.E.; MUKKUR, T.K.S. Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice. **Vaccine**, 26, 4372-4378, 2008.
- JOUGLARD, S.D.; MEDEIROS, M.A.; VAZ, E.K.; BASTOS, R.G.; CUNHA, C.W.; ARMOA, G.R.G.; DELLAGOSTIN, O.A. An Ultra-Rapid and Inexpensive Plasmid Preparation Method for Screening Recombinant Colonies. **Abstracts American Society for Microbiology**, 2002, H 71, p.234.
- LIN, J.H.; WENG, C.N.; LIAO, C.W.; YEH, K.S.; PAN, M.J. Protective Effects of Oral Microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* Vaccine Prepared by Co-Spray Drying Method. **Journal Veterinary Medicine Science**, 2003, 65, p. 69-74.

ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. In: STRAW BE, D'ALLAIRE S, MENGELING WL, TAYLOR DJ. **Diseases of Swine**. Iowa State University Press, Ames, 1999. Cap.36, p. 495–505.

SIBILA, M.; PIETERS, M.; MOLITOR, T.; MAES, D.; HAESEBROUCK, F.; SEGALÉS, J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **The Veterinary Journal**, v. 181, p. 221–231, 2009.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; et al. 1999. Pneumonia enzoótica. In: **Clínica e Patologia Suína**. 2^a ed., Art 3 Impressos Especiais, Goiânia, Goiás, p.359.

VASCONCELOS, A.T.R.; FERREIRA, H.B.; BIZARRO, C.V.; et al. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. **Journal of Bacteriology**, 2005, 187, p. 5568-5577.