

Camila Vieira Pinheiro<sup>1</sup>; Irene Silveira Schrank<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Microrganismos Diazotróficos. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia. Laboratório de Microrganismos Diazotróficos. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

## INTRODUÇÃO

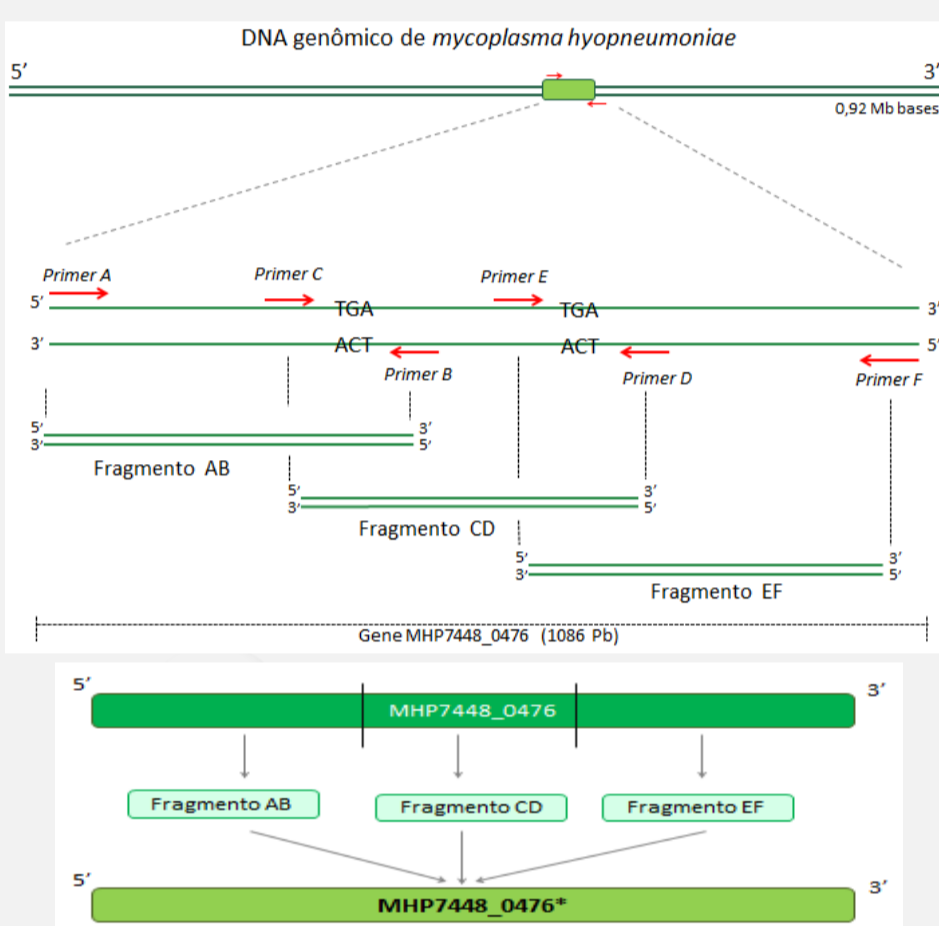
*Mycoplasma hyopneumoniae* é uma bactéria com genoma de tamanho diminuto e ausência de parede celular. Este micro-organismo é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína, doença que afeta criações de suínos do mundo inteiro e que acarreta grandes perdas econômicas nesta área. O genoma anotado de *M. hyopneumoniae* ainda possui muitos genes cujos produtos são anotados como hipotéticos, dentre eles o gene denominado MHP7448\_0476. Contudo, análises *in silico* para o gene MHP7448\_0476 indicam a presença de motivos proteicos relacionados à uma enzima envolvida na síntese de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD). O NAD é um cofator responsável por importantes reações de oxirredução em micro-organismos e até o momento não foram identificados os genes responsáveis por enzimas para biossíntese de NAD em *M. hyopneumoniae*.

## OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é clonar e expressar o gene MHP7448\_0476 de *M. hyopneumoniae* 7448 para ensaios de caracterização funcional da proteína recombinante obtida.

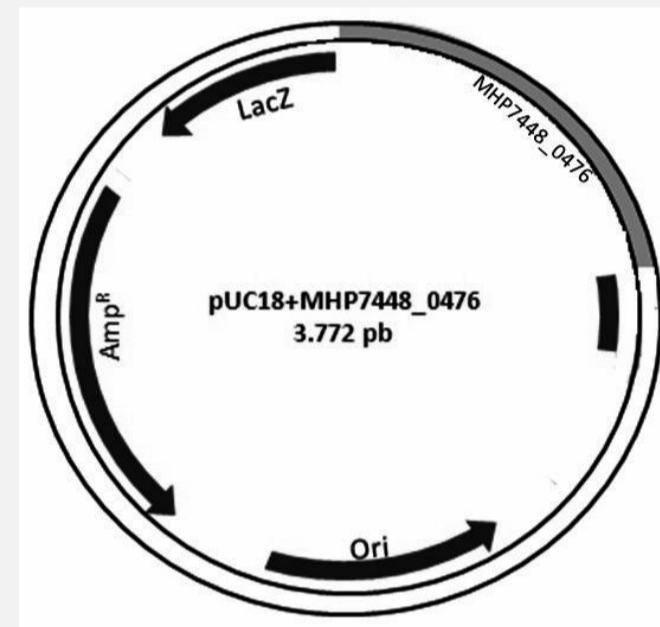
## METODOLOGIA

### I) Preparação do fragmento MHP7448\_0476



A amplificação do gene MHP7448\_0476 a partir do DNA genômico de *M. hyopneumoniae* foi feita através da reação de PCR com primers específicos do gene. Após, foi realizada mutação sítio-dirigida com a modificação dos códons TGA para TGG, uma vez que em *Mycoplasmas* o códon TGA codifica triptofano, diferentemente de *Escherichia coli*, onde esse é o códon de término da tradução. Após, os fragmentos foram unidos novamente pela técnica de PCR e purificado para as demais etapas.

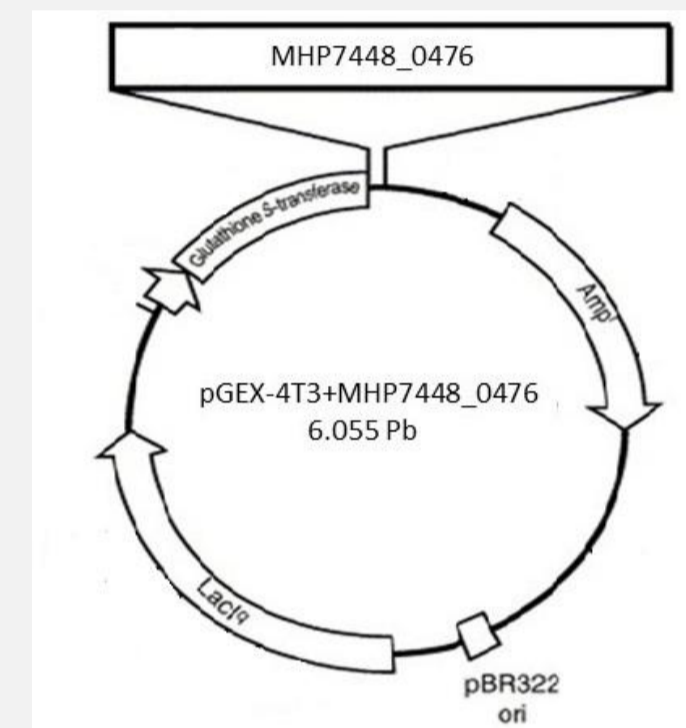
### II) Clonagem do gene MHP7448\_0476 em vetor de clonagem pUC18



Ligação do fragmento amplificado (1.086 Pb) no vetor pUC18 linearizado pela enzima *SmaI*. Transformação da ligação em células quimiocompetentes de *E. coli* K-12 por choque térmico.

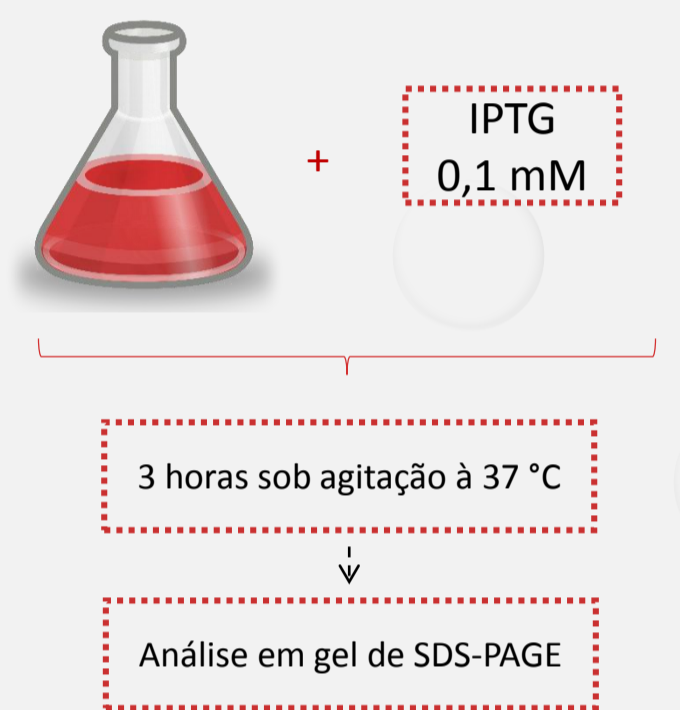
Clivagem do clone recombinante com as enzimas de restrição *BamHI* e *EcoRI*, liberando o fragmento de MHP7448\_0476 para posterior clonagem em um vetor de expressão clivado com as mesmas enzimas de restrição.

### III) Clonagem do gene MHP7448\_0476 em vetor de expressão pGEX-4T3

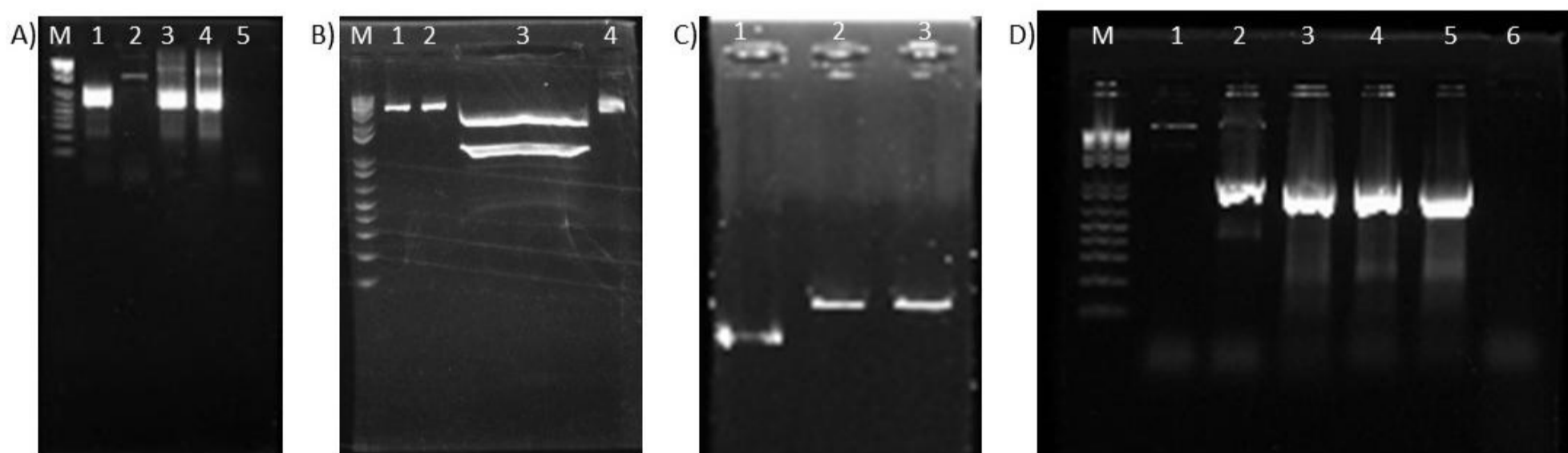


Transformação da ligação em células quimiocompetentes de 4 cepas diferentes de *Escherichia coli* BL-21 por choque térmico.

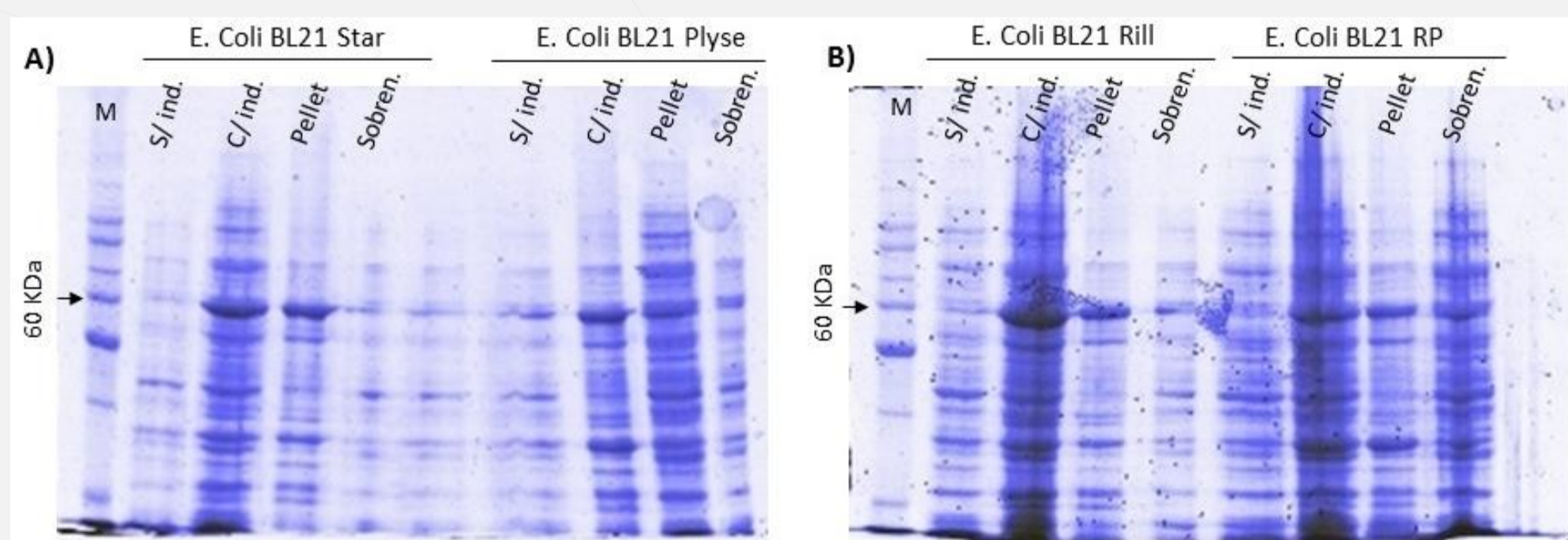
### IV) Ensaios de expressão da proteína recombinante



## RESULTADOS

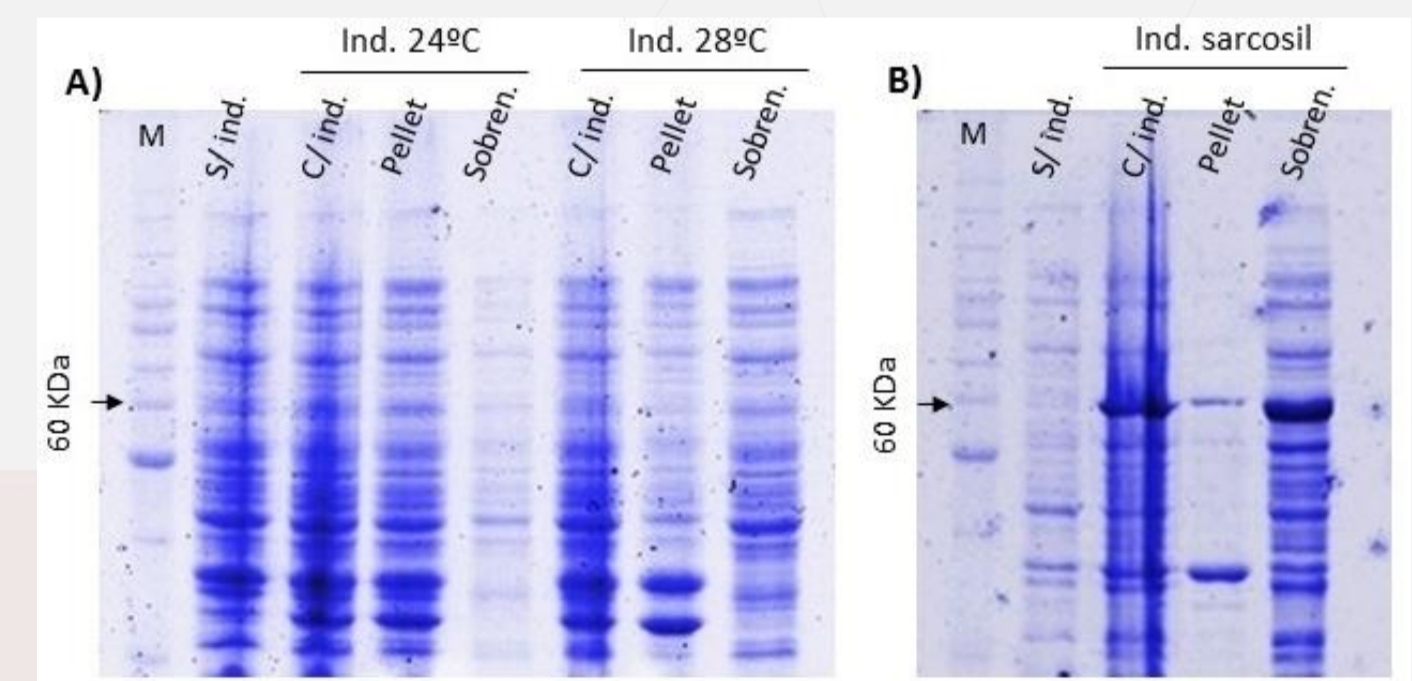


**Figura 1: Resultados relativos às clonagens.** A) Confirmação da clonagem no vetor pUC18 através da técnica de PCR com primers específicos de MHP7448\_0476 (1.086 pb). M= Marcador 1Kb Plus DNA Ladder. 1= DNA genômico de *M. hyopneumoniae* (controle +). 2= pUC18 íntegro. 3 e 4= clones obtidos; 5= controle negativo da reação de PCR. B) Clivagem de pUC18-MHP7448\_0476. 1= clivagem com a enzima *BamHI*. 2= clivagem com a enzima *EcoRI*. 3= clivagem com as enzimas *BamHI+EcoRI*, com consequente liberação do fragmento MHP7448\_0476 para posterior clonagem em vetor de expressão pGEX-4T3. 4= pUC18-MHP7448\_0476 íntegro. C) Clivagem do vetor de expressão pGEX-4T3. 1= pGEX-4T3 íntegro. 2= pGEX-4T3 clivado com *BamHI*. 3= pGEX-4T3 clivado com *EcoRI*. D) Confirmação da clonagem no vetor pGEX-4T3 através da técnica de PCR com primers específicos de MHP7448\_0476 (1.086 pb). 1= pGEX-4T3 íntegro. 2 e 3= clones obtidos. 4= DNA genômico de *M. hyopneumoniae* (controle +). 5= gene purificado MHP7448\_0476. 6= controle negativo da reação de PCR.



**Figura 2: Resultados relativos à expressão do clone pGEX-4T3-MHP7448\_0476 em 4 cepas diferentes de *E. coli*.** O extrato proteico foi avaliado em diferentes condições: Células sem indução de expressão (s/ind); com indução através de IPTG 1mM a 37°C por 3 horas (c/ind). Após a indução, as frações insolúvel (Pellet) e solúvel - sobrenadante (Sobren) também foram avaliadas. A) Expressão em *E. coli* BL21 Star e Plyse. B) Expressão em *E. coli* BL21 Rill e RP.

❖ As 4 cepas testadas, mostraram capacidade de induzir a expressão da proteína de interesse (68 KDa), porém a cepa Star apresentou, mesmo que sutilmente, melhores resultados se comparada às demais. Outro resultado observado é que em todas as 4 cepas, a proteína se encontra na fração insolúvel (pellet) em condições padrão de expressão (0,1 mM IPTG / 3 horas / 37 °C / 200 rpm). Logo foi necessário realizar testes de solubilização da proteína de interesse para que então a mesma possa ser purificada.



**Figura 3: Testes de solubilização da proteína recombinante.** A) Indução da expressão da proteína de interesse a 24 °C e 28 °C por 16 horas em *E. coli* BL21 Star, através da adição de 0,1 mM de IPTG. B) Indução da expressão da proteína em condições padrões (0,1 mM IPTG / 3 horas / 37 °C / 200 rpm), porém com adição de 0,5% de sarcosil ao lisado celular.

❖ Como podemos observar, os testes com diferentes temperaturas de indução não alteram os resultados anteriormente vistos a 37 °C, a proteína permaneceu na fração insolúvel. Contudo, ao utilizar sarcosil (um detergente iônico) foi possível obter a proteína na fração solúvel (sobrenadante).

## PERSPECTIVA

Purificar a enzima recombinante obtida e realizar ensaios funcionais para a determinação da participação da mesma na síntese de NAD em *M. hyopneumoniae* 7448.