

CLONAGEM DO GENE *cp0126* DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

HENRIQUE RAMOS ANGELO¹; ANDREA DE FÁTIMA SILVA REZENDE²; ALEXANDRE BRUM²; SILVESTRE BRILIANTE²; SIBELE BORSUK³

¹Universidade Federal de Pelotas – henriquerosangel@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – andreabiomedica@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – alex.brum@bol.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – silvestrebrilhante@gmail.com

³Nome da Instituição do Orientador – sibeleborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC) é causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, e é uma doença crônica debilitante que acomete principalmente caprinos e ovinos. É caracterizada pela formação de abscessos principalmente em gânglios linfáticos superficiais, podendo afetar também órgãos e linfonodos internos (ALVEZ et al., 2007).

Os prejuízos econômicos gerados pela LC vão desde a depreciação da pele e lã à redução na produção de carne e leite em pequenos ruminantes promovendo perdas econômicas significativas na ovinocaprinocultura em diversos países do mundo incluindo o Brasil (Pepin et al. 1989; Sting et al. 1998; Paule et al. 2003). O Brasil é o 8º maior criador de ovinos e caprinos do mundo com cerca de 26 milhões de cabeças sendo 34% de caprinos e 66% de ovinos. A maior parte do rebanho se localiza na região Nordeste, onde se concentram aproximadamente 17 milhões de animais (IBGE 2012).

Vários estudos tem sido realizados com a finalidade de descobrir alvos em potencial para o desenvolvimento de uma vacina completamente eficaz já que as que existem no mercado não conferem uma proteção adequada (Dorella et al., 2009).

A clonagem de DNA é um método rápido e eficiente para obtenção das sequências de DNA desejadas, e estas podem ser propagadas utilizando vetores plasmidiais de maneira a se obter uma maior quantidade destas sequências para utilização futura no tratamento de doenças (Klug et al., 2010).

A partir de dados de sequenciamento de *C. pseudotuberculosis*, foram identificados alguns alvos em potencial como proteínas imunogênicas. Dentre elas pode-se destacar a proteína CP0126 que é uma provável proteína hipotética identificada através de uma análise de pan-exoproteoma de cinco cepas de *C. pseudotuberculosis* (1002, C231, I19, FRC41, e PAT10) (SANTOS, et al 2012) e também por uma identificação de epitopos MHC.

Assim, O objetivo deste trabalho foi realizar a clonagem do gene *cp0126* para a futura expressão e purificação da proteína recombinante CP0126 e a avaliação de teste de imunodiagnóstico pelo método de ELISA indireto.

2. METODOLOGIA

2.1. Clonagem do gene em vetor pAE

A amplificação do gene foi realizada através da PCR utilizando quantidades de 1 µl de DNA de *C. pseudotuberculosis*, 25 µl de Master Mix, 22 µl de H₂O, 1 µl de primer F com sequência 5'ATCGGTACCTCATGCACTTCAA3' e primer R com sequência 5'ATCGGTACCTCATGCATTCAA3', para um volume final de 50 µL. A PCR foi realizada inicialmente com um ciclo de 5 minutos a 95°C, seguido de 1 min a 95°C, 1 min. a 55°C e 1 min a 72°C, repetidos por 30 vezes, após uma

extensão final de 7 minutos a 72°C. Em seguida, ao produto da PCR foi submetido a eletroforese de gel de agarose 1%, para confirmar a amplificação do gene, e logo após a purificação foi realizada através do kit ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Health Care).

2.2 Digestão e Ligação

O gene *cp0126* e o 1 µg do vetor pAE foram digeridos previamente por 2 horas a 37°C com 1U das enzimas de restrição *KpnI* e *HindIII*. A ligação do gene ao vetor pAE foi realizada a temperatura ambiente durante 2 h com 200 ng vetor pAE e 400 ng do gene *cp0126* com auxílio da enzima T4 DNA ligase.

2.3 Transformação e seleção dos clones recombinantes

O vetor pAE/*cp0126* foi utilizado para transformação de células eletrocompetentes de *E. Coli TOP 10*, as células foram cultivadas a 37°C por 16 horas meio LB (*Luria broth*) sólido e 100 µg/mL de ampicilina. As colônias recombinantes foram selecionadas através de lise rápida por fenol-clorofórmico (v/v) e posterior eletroforese em gel de agarose. Após foram cultivadas em 5 ml de meio LB líquido e 100 µg/mL de ampicilina. A extração dos possíveis plasmídeos recombinantes foi realizada utilizando Kit ilustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Health Care). Após, a caracterização dos clones recombinantes foi realizada por digestão enzimática com as enzimas *kpnI* e *HindIII*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através dos experimentos realizados demonstraram que o gene *cp0126* de *C. pseudotuberculosis* foi amplificado com sucesso através da técnica de PCR, como mostrado na figura 1.

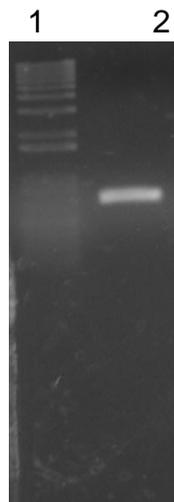


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a amplificação do PCR demonstrando a amplificação do gene *cp0126*. 1. Marcador 1Kb (Invitrogen); 2. Gene *cp0126*.

Após prévia digestão enzimática, o gene *cp0126* e o vetor pAE foram ligados, a cepa *E. coli TOP10* foi transformada com o produto desta ligação. Os

possíveis clones recombinantes foram selecionados e posteriormente caracterizados enzimaticamente como mostra na figura 2.

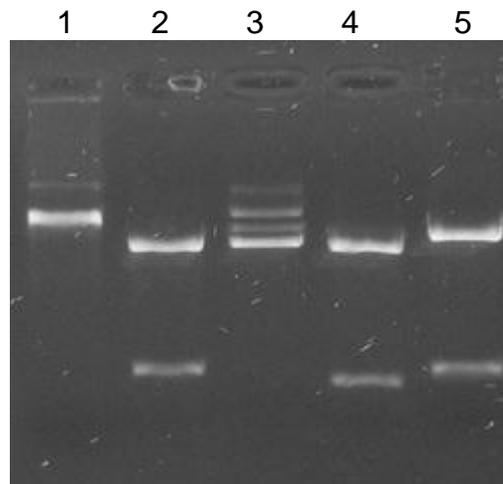


Figura 2: Caracterização dos possíveis recombinantes. Eletroforese em gel de agarose demonstrando os clones recombinantes: 1. pAE não digerido, 2 a 5 possíveis clones recombinantes.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os experimentos realizados o gene *CP0126* foi clonado com sucesso. Posteriormente será realizada a expressão da proteína recombinante e a caracterização imunogênica por ELISA.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, FSF; SANTIAGO, LB; PINHEIRO, RR; Linfadenite Caseosa: O estado da Arte; Embrapa Caprinos 2007.

KLUG, WS; CUMMINGS, MR; SPENCER, CA; PALLADINO, MA **Conceitos de Genética**. Pearson Education inc Artmed, 2010 9° v.

SANTOS, AR; CARNEIRO, A; GALA-GARCIA, A; PINTO, A; BARTH, D; BARBOSA, E; ABURJAILE, F; DORELLA, F; ROCHA, F; GUIMARÃES, L; ZURITA-TURK, M; RAMOS, R; ALMEIDA, S; SOARES, S; PEREIRA, U; SILVA, A; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V; The Corynebacterium pseudotuberculosis in silico predicted pan-exoproteome. **BMC Genomics**.

DORELLA, F.A., PACHECO, L.G., SEYFFERT, N., PORTELA, R.W., MEYER, R., MIYOSHI, A. AND AZEVEDO, V. (2009) Antigens of Corynebacterium pseudotuberculosis and prospects for vaccine development. **Expert. Rev. Vaccines**. 8, 205-213.

IBGE. (2012) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 24/07/2014.

PEPIN, M., BOISRAME, A. AND MARLY, J. (1989) *Corynebacterium pseudotuberculosis*: biochemical properties, production of toxin and virulence of ovine and caprine strains. **Ann. Rech. Vet.** 20, 111-115.

STING, R., STENG, G. AND SPENGLER, D. (1998) Serological studies on *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats using enzyme-linked immunosorbent assay. *Zentralbl. Veterinarmed.* B 45, 209-216.

PAULE, B.J., AZEVEDO, V., REGIS, L.F., CARMINATI, R., BAHIA, C.R., VALE, V.L., MOURA-COSTA, L.F., FREIRE, S.M., NASCIMENTO, I., SCHAEER, R., GOES, A.M. AND MEYER, R. (2003) Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-gamma production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 96, 129-139.