

CONSTRUÇÃO DE UM VETOR RECOMBINANTE PARA A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA gE DO HERPES VÍRUS BOVINO TIPO 5 EM SISTEMA PROCARIOTO

BRUNO MOISÉS DE MATOS¹; BIANCA SICA SIEDLER²; THAIS FARIAS COLLARES²; LEONARDO GARCIA MONTE²; DAIANE DRAWANZ HARTWIG²; CLÁUDIA PINHO HARTLEBEN³

Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento tecnológico, Núcleo Biotecnologia.

¹ Laboratório de Imunodiagnóstico – brunomoisesdematos@gmail.com

² Laboratório de Imunodiagnóstico – bssiedler@gmail.com; collares.thais@gmail.com; leonardogmonte@hotmail.com; Laboratório de Vacinologia – daianehartwig@gmail.com

³ Laboratório de Imunodiagnóstico – hartlebenclaudia@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os herpes vírus bovino (BoHV) são vírus envelopados pertencentes à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (DAVIDSON et al 2009). Entre os BoHV, os tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) são responsáveis por diversas enfermidades bovinas, destacando-se a rinotraqueíte infecciosa bovina e a vulvovaginite postular infecciosa (RIJSEWIJK et al., 2000). Esses dois vírus apresentam alta similaridade genética e antigênica e suas proteínas tem sido alvo de extensa pesquisa visando o desenvolvimento de vacinas e diagnóstico (SÁ E SILVA et al., 2007).

Dentre os antígenos dos BoHV-1 e BoHV-5, destaca-se a glicoproteína de envelope E (gE) a qual está associada a propagação viral (CHOWDHURY et al. 2000). A gE é imprescindível na infecção das células do trato nasofaríngeo bovino, bem como nas infecções dos tecidos neurais, nos quadros de encefalite herpética bovina, associada principalmente a infecção por BOHV-5 (CAMPOS et al., 2010). Ademais, sua ausência resultou na incapacidade infecciosa do vírus (HUBNER et al., 2005).

A gE, juntamente às proteínas virais US9 e gI, foi alvo de deleção gênica em BoHV-5, no intuito do desenvolvimento de uma vacina eficaz e capaz de diferenciar vacinados e infectados quando associada a um teste de diagnóstico (FRANCO et al., 2007). Embora a construção vacinal seja uma realidade, esta carece de diagnóstico específico e, por este motivo, a produção da gE em sua forma recombinante (rgE) é uma alternativa para o desenvolvimento de um teste de diagnóstico diferencial para animais vacinados e infectados (DIVA).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi a obtenção de um vetor recombinante visando a expressão da proteína gE de BoHV-5 em sistema procarioto (*Escherichia coli*).

2. METODOLOGIA

Uma Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) foi realizada para a amplificação da sequência codificadora para a glicoproteína gE a partir de um plasmídeo cedido por FRANCO e colaboradores. Para a amplificação da sequência gênica correspondente a gE utilizou-se os seguintes *primers*:

PR: 5'–GTCTGAAGGTACCGGACTGCAGCCGCACCGAGAG–3';

PF: 5'–ACACCGGGGATCCGCCCGGCCGGCGCGGTCTTCA–3'. A PCR foi realizada em 35 ciclos de variação de temperatura de 8 min, e à sua composição foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%, no intuito de minimizar a

resistência do conteúdo GC do gene viral à desnaturação térmica, tornando a reação mais eficaz. O produto foi analisado através eletroforese em gel de agarose 1%, e a presença das bandas revelada através de radiação UV.

A propagação do plasmídeo pAE foi realizada através de transformação por eletroporação de bactérias *E. coli* cepa TOP10. As bactérias foram então inoculadas em sucessivos cultivos até o volume final de 20 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido contendo ampicilina 0,1% e, quando a densidade óptica (D.O.₅₆₀) de 0,6 foi atingida, o cultivo foi submetido à extração plasmidial através de kit comercial (Invitrogen™), cujos produtos também foram analisados por eletroforese.

No processo de digestão do pAE e do produto da PCR (gene codificador da gE somado a sequência alvo para as enzimas *BamHI* e *KpnI* contidas no par de primers, utilizou-se a enzima de restrição *BamHI* (Invitrogen™) seguida da enzima *KpnI* (Invitrogen™), em dois protocolos de digestão intercalados por uma purificação do DNA digerido na primeira reação. Os produtos digeridos finais foram analisados em corrida eletroforética e imediatamente submetidos ao protocolo de ligação com a enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs) em incubação *overnight* à 4° C.

O produto da ligação foi utilizado para transformar a bactéria *E. coli* cepa DH5α por eletroporação. Dos 500 µL de cultivo dos submetidos a eletroporação, 100 µL foram semeados em LB contendo 1,5% de ágar bacteriológico e ampicilina 0,1%. O restante do cultivo foi centrifugado por 1 min a 3.000 × *g*, os *pellets* ressuspensos em 100 µL de meio LB líquido e então semeados em LB contendo 1,5% de ágar bacteriológico e ampicilina 0,1%. Após incubação foram selecionadas 18 colônias, às quais foi aplicado um protocolo de triagem de clones recombinantes através da técnica de lise rápida com fenolclorofórmio, seguida de corrida eletroforética em gel de agarose 1%. Todas as colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina 0,1% e, após incubação *overnight*, 5 desses cultivos foram selecionados com base nos resultados da triagem e tiveram seus plasmídeos extraídos e verificados através de eletroforese em gel de agarose 1%. Finalmente, os plasmídeos extraídos desses 5 cultivos de colônias selecionadas foram submetidos ao mesmo protocolo de PCR aplicado no início dos experimentos, para a real confirmação da presença do gene referente à proteína viral gE no vetor pAE.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de vetores bacterianos como pET16b (Novagen) e pAE, já foi aplicada para a produção de proteínas recombinantes de BoHV, incluindo a gE (OLIVEIRA et al., 2013; SEKULOVICH et al., 1988). A utilização de tais vetores na expressão protéica em *E. coli* já se mostrou muito satisfatória, apresentando bons resultados na identificação dos produtos protéicos produzidos em teste de ELISA. A propagação do plasmídeo pAE gerou as bandas esperadas, após purificação, para os 2.790 pb que o compõem.

Os primers construídos para a amplificação do gene correspondente à gE apresentaram especificidade em suas ligações gerando um produto de 707 pb. As digestões do produto amplificado e do plasmídeo pAE foram eficazes, sendo possível a visualizar a linearização do plasmídeo em gel de agarose sob luz UV. O plasmídeo recombinante permaneceu estável, sendo comprovado após a transformação bacteriana, selecionadas pela resistência a ampicilina. Dentre as 18 colônias selecionadas aleatoriamente das placas de *E. coli* cepa DH5α transformadas, 11 foram consideradas possíveis recombinantes quando

submetidas ao protocolo de lise rápida, pois continham plasmídeos de peso molecular esperado de aproximadamente 3.500 pb (Fig.1). Das 11 colônias possíveis recombinantes selecionadas, 5 foram aleatoriamente escolhidas para extração plasmidial (colônias 2, 4, 10, 13 e 18) e 4 destas continham um plasmídeo com peso molecular esperado. Os resultados da PCR demonstraram que os 4 plasmídeos selecionados (2, 4, 10 e 13) continham a sequência de interesse (Fig.2), sendo a PCR uma metodologia eficaz para confirmação de recombinantes.

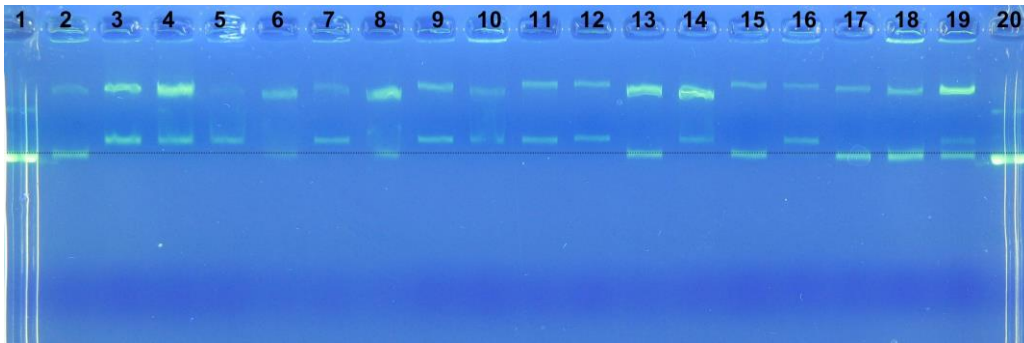


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose (1%) com o DNA de *E. coli* para a triagem das colônias recombinantes pAE/gE. Colunas 1 e 20: plasmídeo pAE digerido sem a sequência gE; Colunas 2 - 19: produto da lise das colônias recombinantes selecionadas.

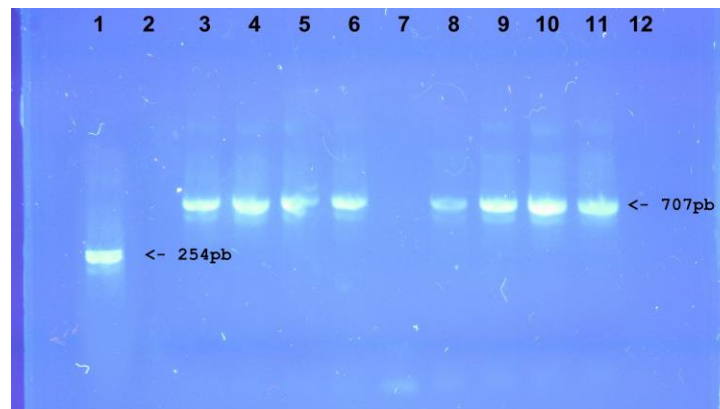


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose (1%) com o DNA plasmidial extraído das colônias recombinantes de *E. coli*. Controle positivo (sequência não relacionada de 254pb); 2- controle negativo (PCR sem DNA molde); Colunas 3 - 7: Produto da PCR com as colônias 2, 4, 10, 13 e 18 (1,5 µL de DNA molde); Colunas 8 - 12- Produto da PCR com as colônias 2, 4, 10, 13 e 18 (2,5 µL de DNA molde).

A produção de proteínas recombinantes em sistema procarioto inclui os passos de clonagem, no qual o plasmídeo recombinante é obtido e avaliado quanto a sua capacidade de transformar bactérias, e de expressão das proteínas contidas nos vetores plasmidiais. Neste trabalho descreve-se a primeira etapa da obtenção da proteína recombinante rgE de BoHV-5, tendo sido possível construir plasmídeos recombinantes pAE/gE os quais geraram 61% de colônias recombinantes após eletroporação.

4. CONCLUSÕES

O vetor recombinante contendo a sequência codificadora de gE foi construído com sucesso. O plasmídeo obtido neste estudo será usado para a produção de rgE em sistema de expressão procarioto visando o desenvolvimento de uma DIVA para o vírus BoHV-5.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMPOS, F.S.; DEZEN, D.; ANTUNES, D.A.; SANTOS, H.F.; ARANTES, T.S.; CENCI, A.; GOMES, F.; LIMA, F.E.S.; BRITO, W.M.E.D.; FIHO, H.C.K.; BATISTA, H.B.C.R.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; RIJSEWIJK, F.A.M.; ROEHE, P.M.; Efficacy of an inactivated recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) vaccine. **Veterinary Microbiology**, Genebra, v. 148, p. 18-26, 2011.
- CHOWDHURY, S.I.; LEE, B.J.; OZKUL, A.; WEISS, M.L.; Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. **Journal of Virology**, Irvine, v. 74, p. 94-106, 2000.
- DAVISON, A.J.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G.S.; MCGEOCH, D.J.; MINSON, A.C.; PELLETT, P.E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M.J.; THIRY, E. The order Herpesvirales. **Archives of Virology**, Genebra, v. 154, p. 171-177, 2009.
- FRANCO, A.C.; HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, A.P.; BATISTA, H.B.C.R.; ROEHE, P.M.; RIJSEWIJK, F.A.M. Construction and characterization of a bovine herpesvirus 5 mutant with A deletion of the gI, gE and us9 genes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 667-673, 2007.
- HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, A.P.; FRANCO, A.C.; ESTEVES, P.A.; SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; RIJSEWIJK, F.A.M.; ROEHE, P.M.; Experimental infection of calves with a gI, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Genebra, v. 28, p. 187-196, 2005.
- OLIVEIRA, S.A.M.; BRUM, M.C.S.; ANZILIERO, D.; DELLAGOSTIN, O.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; Prokariotic expression of a truncated form of bovine herpesvirus 1 glycoprotein E (gE) and its use in an ELISA for gE antibodies. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Seropédica, v. 33, n. 10, p. 41-46, 2013.
- RIJSEWIKI, F.A.M.; KAASHOEK, M.J.; LAGEVELD, J.P.M.; MARIS-VELDHUIS, M.A.; MAGDALENA, J. VERSCHUREN, S.B.E.; MELOEN, R.H.; VAN OIRSCHOT, J.T. Epitopes on glycoprotein E and on the glycoprotein E/glycoprotein I complex of bovine herpesvirus 1 are expressed by all of 222 isolates and 11 vaccine strains. **Archives of Virology**, Genebra, v. 154, p. 921-936, 2000.
- SÁ E SILVA, M.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-sul do Brasil, Argentina e Uruguai. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Seropédica, v. 27, n. 10, p. 403-408, 2007.
- SEKULOVICH, R.E.; LEARY, K.; SANDRI-GOLDIN, R.M.; The herpes simplex virus type 1 α protein ICP27 can act as a trans-repressor or a trans-activator in a combination with ICP40 and ICP0. **Journal of Virology**, Irvine, v. 62, n. 12, p. 4510-4522, 1988.