

## CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UMA QUIMERA RECOMBINANTE PARA USO COMO ANTÍGENO VACINAL BIVALENTE CONTRA *Clostridium perfringens*

RAFAEL LOPES ROSA<sup>1</sup>; GUSTAVO MARÇAL SCHMIDT GARCIA MOREIRA<sup>2</sup>;  
CARLOS EDUARDO POUHEY DA CUNHA<sup>3</sup>; CLÓVIS MOREIRA JR.<sup>4</sup>; MARCELO  
MENDONÇA<sup>5</sup>; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CDTec, UFPel – [rafaelbiotec@gmail.com](mailto:rafaelbiotec@gmail.com)

<sup>2</sup> Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CDTec, UFPel – [moreira.gmsg@gmail.com](mailto:moreira.gmsg@gmail.com);

<sup>3</sup> Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CDTec, UFPel – [cpouey@gmail.com](mailto:cpouey@gmail.com);

<sup>4</sup> Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CDTec, UFPel – [clovismoreirajr@live.com](mailto:clovismoreirajr@live.com);

<sup>5</sup> Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CDTec, UFPel –  
[marcelomendoncavet@yahoo.com.br](mailto:marcelomendoncavet@yahoo.com.br)

<sup>6</sup> Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CDTec, UFPel –  
[fabricio.rochedo@ufpel.edu.br](mailto:fabricio.rochedo@ufpel.edu.br)

### 1. INTRODUÇÃO

*Clostridium perfringens* é um bacilo anaeróbio formador de esporos presente no meio ambiente e no trato gastrointestinal de animais e humanos (GONÇALVES et al., 2009; TITBALL et al., 1999). Essa espécie é classificada em cinco tipos, de acordo a produção de quatro toxinas principais: Alpha, Beta, Épsilon e Iota. O *C. perfringens* tipo A, produtor apenas da toxina Alpha, tem sido implicado como causa de doenças entéricas, principalmente a diarreia em leitões, mais frequente até os primeiros quatro dias de vida (YAEGER et al., 2007). O tipo C, produtor de ambas toxinas Alpha e Beta pode ser ainda mais grave, acometendo leitões ainda mais precocemente e causando enterite necrótica hemorrágica (SONGER et al., 2005). É possível a utilização de antibióticos como medida preventiva dessa doença, porém seu uso acarreta em seleção de cepas mais resistentes, tornando esse método inadequado. Assim, o método mais eficiente de prevenção é através de vacinação (HAESEBROUCK et al., 2005). As vacinas atuais utilizadas para a prevenção de clostridioses são oriundas de toxinas nativas inativadas por formaldeído (toxoides), o que envolve um processo trabalhoso e instável, uma vez que o cultivo do organismo anaeróbio é difícil e a produção de toxina é imprevisível. Considerando tais obstáculos, a utilização de proteínas recombinantes tem sido considerada uma alternativa promissora. Em um trabalho prévio de nosso grupo (Laboratório de Imunologia Aplicada, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel), essa estratégia foi utilizada com sucesso na vacinação de porcas pré-parto objetivando transferir imunidade de forma passiva via colostro para os leitões (SALVARANI et al., 2013).

Considerando o sucesso prévio de nosso grupo, o objetivo do presente estudo é a produção de uma quimera recombinante, contendo as toxinas Alpha e Beta de *C. perfringens*, na mesma molécula, que seja capaz de mostrar resultados semelhantes aos da vacina anterior.

### 2. METODOLOGIA

#### Desenho do gene e clonagem molecular

As sequências de aminoácidos referentes às proteínas Alpha e Beta foram obtidos do GenBank (códigos 40620 e 410019, respectivamente). As sequências codificadoras dessas proteínas foram encomendadas da empresa

Epoch Life Science, contendo códons preferenciais para a expressão em *Escherichia coli* com os sítios de restrição *XhoI* e *KpnI* nas extremidades 5' e 3', respectivamente. Além disso, o gene contava com a sequência codificadora de uma região flexível rica em Glicina que conecta os dois genes. O plasmídeo contendo o gene quimérico (pBSK-*ab*) foi propagado em *E. coli* TOP10 seguindo o protocolo descrito por SAMBROOK e RUSSEL (2012). A obtenção do gene foi feita pela clivagem do plasmídeo com *XhoI* e *KpnI* (Thermo Scientific), sendo a banda relativa ao gene de interesse (~2.100 pb) purificada diretamente do gel após eletroforese em gel de agarose 0,8%. O gene foi, então, subclonado para o vetor pAE de expressão em *E. coli*, clivado com as mesmas enzimas, através da reação com T4 DNA Ligase (Thermo Scientific). O produto da ligação foi transformado em *E. coli* TOP10, a qual foi cultivada em placa de Luria-Bertani (LB) contendo 100 µg/mL de ampicilina a 37 °C por 16 h. A triagem das colônias recombinantes foi feita pelo método de fenol-clorofórmio. Os clones selecionados foram cultivados em LB contendo Ampicilina por 16 h a 37 °C e tiveram seus plasmídeos extraídos por lise alcalina (SAMBROOK & RUSSEL, 2012). A confirmação da inserção do gene no vetor pAE foi feita por digestão utilizando as mesmas enzimas de clonagem, as quais foram corridas em gel de agarose 0,8%.

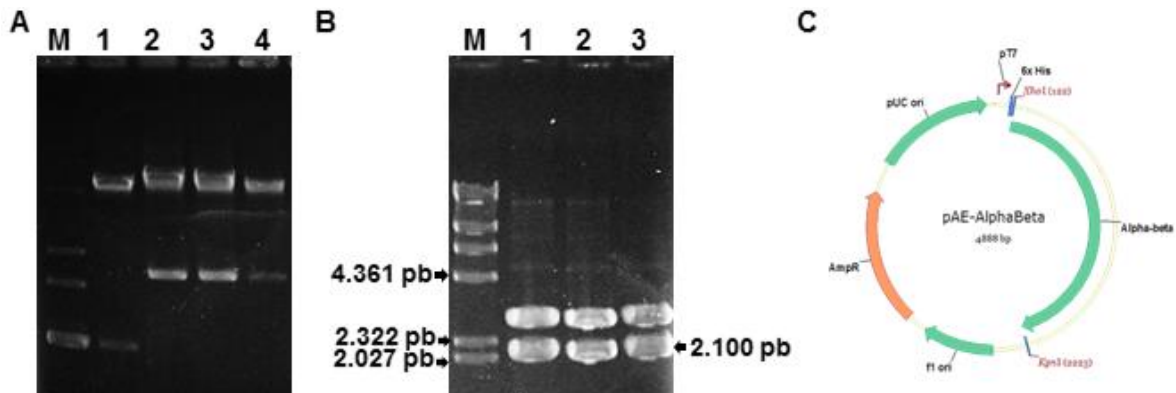
### Expressão, caracterização e purificação da proteína Alpha-Beta

O plasmídeo pAE-*ab* caracterizado por digestão foi utilizado para transformar a cepa de expressão *E. coli* BL21 (DE3) Star por choque térmico. O produto dessa transformação foi cultivado em 50 mL do meio de cultivo LB contendo 100 µg/mL de ampicilina em incubadora 150rpm a 37 °C por 16 h. Após essa etapa, o volume foi transferido para um erlemeyer contendo 450 mL de LB contendo ampicilina, até atingir a densidade óptica relativa à metade da fase *log* ( $DO_{600}=0,5-0,8$ ). Nesse momento, o cultivo foi induzido com isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a uma concentração de 0,5 mM por 4 h nas mesmas condições. Em seguida, o cultivo foi centrifugado (16.000 g; 4 °C; 10 min), o *pellet* foi suspenso em 20 mL de tampão de lise (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M; NaCl 0,5 M; Imidazole 10 mM) com 100 µg/mL de lisozima e incubado por 2 h a 4 °C. As células foram rompidas por sonicação em três ciclos de 20 s e centrifugadas do mesmo modo anterior. O sobrenadante dessa centrifugação foi separado e o *pellet* foi suspenso nos tampões de solubilização I (tampão de lise + N-lauroilsarcosine 0,2%), solubilização II (tampão de lise + N-lauroilsarcosine 0,4%) e solubilização III (solubilização I + ureia 8 M), sendo que para cada tampão o *pellet* foi deixado sob agitação de 24 h a 4 °C, seguido de centrifugação. Todas as frações de solubilização foram avaliadas em SDS-PAGE 12% quanto a presença da proteína Alpha-Beta, sendo que as continham foram purificadas manualmente por cromatografia de afinidade ao Ni<sup>+2</sup>, utilizando a coluna HisTrap HF crude de 1 mL (GE Healthcare). A confirmação dessa purificação foi feita através de *Western blot* utilizando o anticorpo monoclonal Anti-Histidina (Sigma Aldrich). Essas frações foram misturadas e dialisadas em PBS + Triton X-100 0,05% (v/v) por 24 h a 4 °C. O produto da diálise foi quantificado com o *kit BCA Protein Assay* (Thermo Scientific) e liofilizado para uso posterior.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

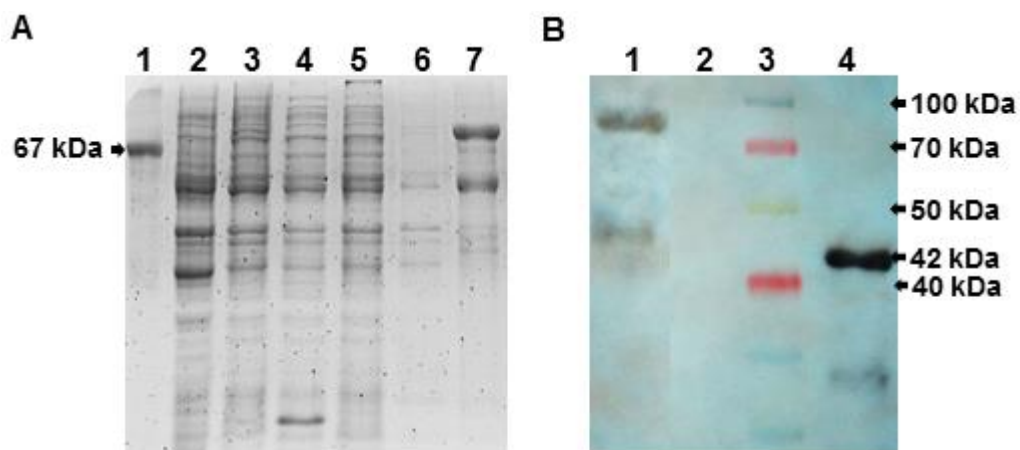
O produto da ligação para a montagem do plasmídeo pAE-*ab* mostrou diversas colônias recombinantes, das quais 3 foram selecionadas (Fig. 1A). Após a extração desses 3 plasmídeos, eles foram digeridos com as mesmas enzimas

utilizadas para a subclonagem. Assim, uma banda de aproximadamente 2.100 pb, relativa ao gene *ab* foi identificada (Fig. 1B). Desse modo, confirmou-se que o plasmídeo construído se tratava do pAE-*ab* (Fig. 1C), utilizado para a etapa de expressão.



**Figura 1** - Etapas de clonagem do plasmídeo pAE-*ab*. (A) Gel de agarose da triagem dos clones recombinantes de pAE-*ab*. M- pAE circular; 1-4- clones 1-4. (B) Gel de agarose de clones pAE-*ab* digeridos com *XhoI* e *KpnI*. M- marcador 1Kb (Thermo Scientific) 1-3- clones pAE-*ab* 1-3 digeridos. (C) Imagem do plasmídeo pAE-*ab*, mostrando sua orientação e sítios de restrição para *XhoI* e *NcoI*.

A proteína Alpha-Beta obtida foi avaliada quanto sua solubilidade em diferentes tampões sendo as frações coletadas avaliadas por SDS-PAGE 12% (Fig. 2A). Foi constatado que a proteína era expressa insolúvel, sendo presente na fração obtida utilizando tampão que contém ureia 8M. Essa fração insolúvel foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni<sup>2+</sup> e as frações foram misturadas e dialisadas. A confirmação de que a banda insolúvel se tratava da proteína *ab* foi confirmada por *Western blot*, com anti-Histidina, onde apresentou massa aparente de 80,4 kDa (Fig. 2B).



**Figura 2** - Análise da solubilidade da *ab* em diferentes tampões e *Western blotting* anti-Histidina. (A) SDS-PAGE 12% das suspensões resultantes da solubilização. 1- 1 µg BSA; 2- Extrato de *E. coli* Star (C-); 3- *E. coli* pAE-*ab* ind. 4h; 4- *E. coli* pAE-*ab* sobrenadante da lise; 5- *E. coli* pAE-*ab* NLS 0,2%, 6- *E. coli* pAE-*ab* 0,4%; 7- *E. coli* pAE-*ab* ureia 8M. (B) *Western blotting* das frações contendo Alpha-Beta. 1- *E. coli* pAE-*ab* ureia 8M; 2- Extrato de *E. coli* Star (C-); 3- Marcador; 4- Proteína com 42 kDa (controle positivo).

No estudo anterior a esse, a administração em coelhos da toxina Alpha e da Beta, separadamente, foram obtidos títulos de antitoxinas satisfatórios (SALVARANI et al., 2013). Para a Alpha, foi obtido o título de 9,6 UI/mL, dobro do limite mínimo estabelecido pela USDA (4 UI/mL), enquanto a Beta resultou em

20,4 UI/mL, dobro do determinado pela Farmacopeia Europeia (10 UI/mL). Ambos são valores mínimos são exigidos pela legislação brasileira. Esses resultados foram obtidos com a administração de uma dose consideravelmente menor que os 5,6 mg recomendados pelo Instituto Nacional da Inglaterra de Padrões Biológicos e Controle (NIBSC). Dentre os avanços principais do projeto atual, é a diminuição no tempo de produção da nova vacina, cortando o tempo de produção pela metade.

Como perspectiva, espera-se que os resultados nos testes em coelhos feitos com o antígeno quimérico Alpha-Beta sejam equivalentes aos testes feitos com as proteínas administradas separadamente (SALVARANI et al., 2013). Trabalho o qual está será conduzido em parceria com a Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA).

#### 4. CONCLUSÕES

O antígeno quimérico contendo as toxinas Alpha e Beta clonada e expressa no sistema de expressão em *E. coli*, foi purificada e caracterizada, permitindo diminuir a complexidade do processo de produção da vacina. A partir de agora, a eficiência dessa molécula como antígeno vacinal será avaliada em coelhos, esperando ultrapassar os pré-requisitos exigidos pela legislação brasileira.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GONÇALVES, L. A.; LOBATO, Z. I. P.; SILVA, R. O. S.; SALVARANI, F. M.; PIRES, P. S.; ASSIS, R. A.; LOBATO, F. C. F. Selection of a *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin producer via dot-blot test. **Archives of microbiology**, v.191, p. 847-51, 2009.

HAESEBROUCK, F; PASMANS, F; CHIERS, K; MAES, D; DUCATELLE, R; DECOSTERE, A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? **Veterinary Microbiology**, n. 100, p. 255-268, 2004.

SALVARANI, F.M.; CONCEIÇÃO, F.R.; CUNHA, C.E.; MOREIRA, G.M.; PIRES, O.S.; SILVA, R.O; ALVES, G.G. LOBATO, F.C. Vaccination with recombinant *Clostridium perfringens* toxoids  $\alpha$  and  $\beta$  promotes elevated antepartum and passive humoral immunity in swine. **Vaccine**, v. 31, n. 38, p. 4152-5, 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. **4ª Ed. New York: Cold Spring Harbor**, 2001.

SONGER J.G.; UZAL, F.A. Clostridial enteric infections in pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p. 528-536, 2005.

TITBALL, R. W.; NAYLOR, C. E.; BASAK, A. K. The *Clostridium perfringens* alpha-toxin. **Anaerobe**, v.5, p.51-64, 1999.

YAEGER, M.Y. Prospective and retrospective studies on *Clostridium perfringens* type A enteritis in neonatal swine. **38th ANNUAL MEETING AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIAN**, v.38, p. 101-103, 2007.