

103

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA TIOL-PEROXIDASE DE MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE EM ESCHERICHIA COLI.** Claudio Xavier Machado, Paulo Marcos Pinto, Ana Paula Metz Costa, Arnaldo Zaha, Henrique Bunselmeyer Ferreira (orient.) (UFRGS).

*Mycoplasma hyopneumoniae* é a bactéria causadora da pneumonia enzoótica suína, que afeta o rebanho suíno em nível mundial. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas durante o metabolismo celular e também durante o processo de infecção, quando o sistema imune do organismo infectado gera EROs na tentativa de neutralizar o patógeno. As EROs são conhecidas por causarem uma variedade de lesões celulares. Os patógenos, por sua vez, desenvolveram mecanismos de defesa para minimizar os efeitos nocivos das EROs. *M. hyopneumoniae* possui um sistema de proteção contra EROs deficiente, sem antioxidantes importantes. Entretanto, a partir dos dados do seqüenciamento do genoma de uma cepa patogênica (7448) de *M. hyopneumoniae*, foi identificada a seqüência codificadora (CDS) de uma tiol-peroxidase (TPx), possivelmente envolvida no sistema de proteção contra EROs. O objetivo deste trabalho é a clonagem e a expressão em *E. coli* desta TPx, para sua avaliação quanto a aspectos funcionais. Como em *M. hyopneumoniae* o códon UGA (de terminação em *E. coli*) codifica triptofano e há um códon UGA na CDS da TPx, está sendo utilizada uma estratégia de mutagênese sítio-dirigida baseada em PCR para amplificação da seqüência a ser clonada. Utilizando um *primer* direto incluindo a mutação (UGA→UGG) e um *primer* anti-senso, foi amplificado, a partir de um dos clones utilizados no seqüenciamento do genoma, um fragmento de 234 pb correspondente à porção 3' da CDS da TPx. Este fragmento foi então utilizado como *megaprimer*-anti-senso para a amplificação da CDS completa (495 pb) incluindo a mutação desejada. O amplicon gerado foi clonado no vetor pUC18 e seqüenciado para confirmação da mutação. A CDS mutada será clonada em vetore pGEX, para expressão da proteína recombinante correspondente em *E. coli*.