

Amanda Malvessi Cattani¹; Franciele Maboni Siqueira²; Irene Silveira Schrank³

¹ Laboratório de Microrganismos Diazotróficos. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.
² Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Laboratório de Microrganismos Diazotróficos. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.
³ Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia. Laboratório de Microrganismos Diazotróficos. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Mycoplasma* pertencem à classe dos Mollicutes e abrangem cerca de 100 espécies. São normalmente encontrados associados a hospedeiros eucarióticos. Em especial a espécie *Mycoplasma hyopneumoniae*, encontra-se associada a suínos, causando uma doença respiratória denominada pneumonia enzoótica suína. Essa enfermidade vem trazendo perdas a produção de suínos e causando grandes danos econômicos à indústria suinícola. Como característica geral micoplasmas possuem um genoma limitado e conseqüentemente apresentam um repertório restrito de proteínas. Análises estruturais *in silico*, de proteínas anteriormente anotadas como hipotéticas (sem função conhecida), revelaram a presença de motivos proteicos relacionados a atividades metabólicas, como a rota de síntese de NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e FAD (flavina e adenina dinucleotídeo), consideradas inexistentes em *M. hyopneumoniae* pela anotação do genoma.

OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é clonar e expressar as seqüências gênicas de *M. hyopneumoniae* linhagem 7448, relacionadas à rota de síntese de NAD e FAD em vetores de expressão de *Escherichia coli* e empregar as proteínas recombinantes purificadas em ensaios enzimáticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

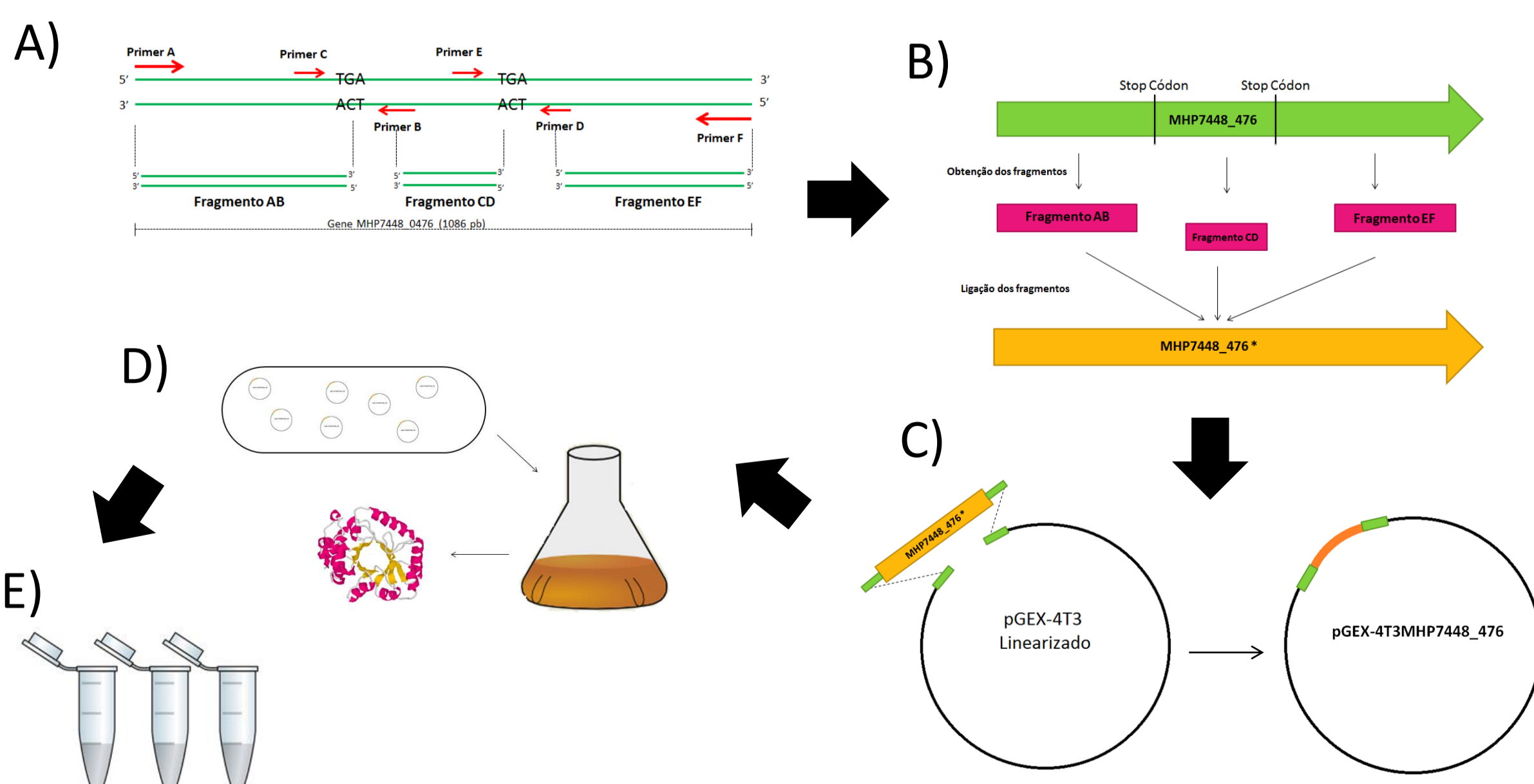


Figura 1: Esquema representativo demonstrando a metodologia total a ser desenvolvida neste trabalho para um dos genes (MHP7448_476). (A) Representação da localização de primers contendo as mutações sítio-dirigidas para modificação dos códons TGA para TGG, uma vez que em micoplasmas o códon TGA codifica triptofano, diferentemente de *E. coli*, onde esse é códon de termino da tradução. (B) A utilização dos primers mutagênicos contendo os sítios de restrição de EcoRI e XhoI, permite que os fragmentos amplificados através de PCR, sejam unidos por meio da mesma técnica. (C) Visão simplificada da clonagem das ORFs por meio de recombinação homóloga realizada no vetor de expressão pGEX-4T3. (D) Representação da expressão das proteínas recombinantes e purificação que será realizada com o emprego de resina contendo glutationa. (E) Ensaios enzimáticos para a predição da função das proteínas adquiridas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho três genes estão sendo estudados: MHP7448_0476, MHP7448_0394 e MHP7448_0278, todos codificando proteínas consideradas hipotéticas. No entanto, as duas primeiras apresentam motivos de proteínas da rota biossintética de NAD e a última de FAD. Os fragmentos dos genes foram amplificados por PCR, e purificados. A união dos mesmos foi realizada, novamente com o emprego da PCR, obtendo-se os três genes completos, com suas respectivas mutações sítio-dirigidas estando aptos a serem clonados no vetor. As amplificações são mostradas na Figura 2. Os fragmentos gerados são possíveis de serem unidos, pois apresentam regiões de sobreposição onde se anelam, durante a reação de PCR. A clonagem por recombinação homóloga *in vivo* dos genes íntegros e mutados em *E. coli* linhagem KC8, a partir do vetor de expressão pGex-4T3 está sendo realizada.

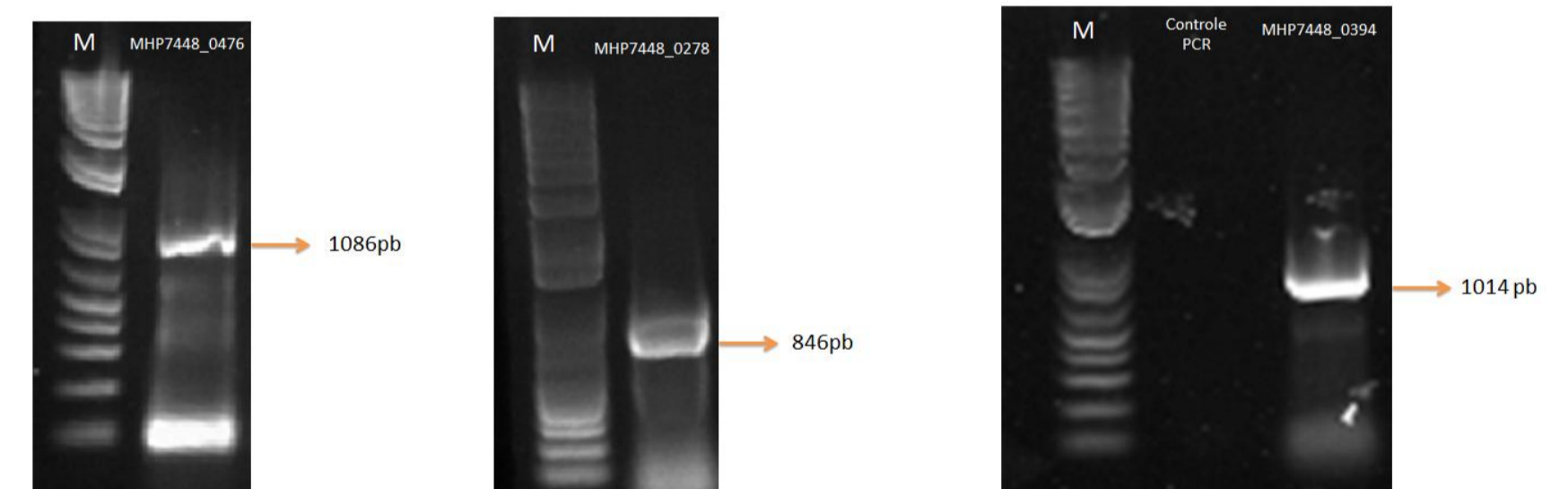


Figura 2: Amplificação dos fragmentos contendo as mutações sítio-dirigidas dos códons TGA para TGG, através da PCR dos 3 genes MHP7448_0476 (1086 pb), MHP7448_0394 (1014 pb) e MHP7448_0278 (846 pb). Visualização através de uma eletroforese em gel de agarose 0,8%. M: 1Kb Plus DNA Ladder.

PERSPECTIVAS

- Obtenção de clones por recombinação homóloga;
- Expressão e purificação das proteínas recombinantes;
- Ensaios enzimáticos para avaliar o comportamentos das proteínas em diferentes situações;

APOIO FINANCEIRO