

Os organismos do gênero *Mycoplasma* são os menores organismos auto-replicativos conhecidos. *Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína, uma doença de rebanho crônica que causa importantes perdas econômicas no agronegócio. Apesar do seqüenciamento de algumas cepas, pouco se sabe sobre as regiões que regulam a transcrição em *M. hyopneumoniae*. Isso é decorrente da constituição do seu genoma, que é rico em adenina/timina, o que dificulta a definição *in silico* de promotores, uma vez que a predição destes tem sido predominantemente baseada em dados disponíveis para *Escherichia coli* (como por exemplo, TATA box). Dessa forma é necessário o desenvolvimento de ferramentas para análise *in vivo* de *M. hyopneumoniae*. Nesse trabalho foi desenvolvido um plasmídeo baseado em uma construção intermediária de pOSTM, anteriormente desenvolvido em nosso laboratório, e o gene de fluorescência EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*). O vetor pOSM (pOSTM sem a inserção do gene da tetraciclina) foi clivado com a enzima de restrição XbaI, tratado com a enzima T4 DNA polimerase para preenchimento das extremidades e defosforilado com a enzima SAP. No plasmídeo tratado foi clonado o gene EYFP. O gene EYFP foi obtido através da clivagem do plasmídeo pEYFP (Clontech) com as enzimas PvuII e EcoRI, e o fragmento obtido da clivagem foi tratado com T4 DNA polimerase. Os clones de pOSM-EYFP obtidos serão confirmados por PCR e clivados com a enzima SalI para determinar a orientação do gene EYFP. Com essa construção objetiva-se a clonagem de diferentes regiões promotoras de *M. hyopneumoniae* na região 5' do gene EYFP, vindo estas a promoverem a expressão do gene, desenvolvendo a sua fluorescência e confirmando-se como região promotora.