

Camila Vieira Pinheiro¹; Irene Silveira Schrank²

¹ Laboratório de Microrganismos Diazotróficos. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

² Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia. Laboratório de Microrganismos Diazotróficos. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

INTRODUÇÃO

Mycoplasma hyopneumoniae é uma das menores bactérias existentes, tendo seu genoma reduzido e ausência de parede celular. Este microrganismo é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína, uma doença crônica que afeta rebanhos do mundo inteiro, tendo grande impacto na economia. Dentre as proteínas codificadas pelo seu genoma, muitas delas ainda são denominadas hipotéticas, assim como o produto funcional do gene MHP7448_0476. No entanto, estudos *in silico* apontam a presença de motivos proteicos, neste peptídeo, relacionados à síntese de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD). Os cofatores NAD juntamente com FAD (Flavina e Adenina Dinucleotídeo) exercem importante papel em várias reações bioquímicas envolvendo oxidação e redução desempenhando assim, uma função indispensável na manutenção do equilíbrio redox intracelular.

OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é clonar e expressar a sequência gênica de *M. hyopneumoniae* linhagem 7448, possivelmente relacionada à rota de síntese de NAD em vetor de clonagem (pUC18) e expressão (pGEX-4T3) de *Escherichia coli*.

METODOLOGIA

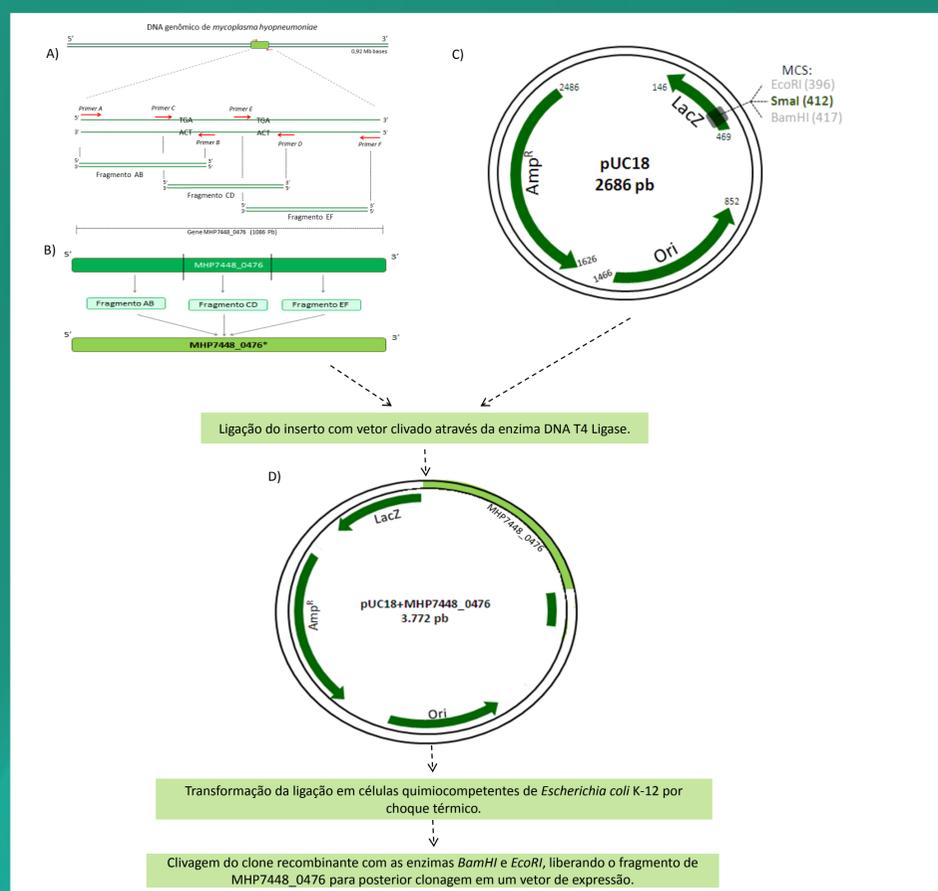


Figura 1: Representação esquemática da metodologia empregada. **A)** Procedimentos realizados para obtenção do inserto: A amplificação do gene MHP7448_0476 a partir do DNA genômico de *M. hyopneumoniae* foi feita através de mutação sítio-dirigida com a modificação dos códons TGA para TGG, uma vez que em *Mycoplasmas* o códon TGA codifica triptofano, diferentemente de *E. coli*, onde esse é o códon de término da tradução. **B)** Após, os fragmentos foram unidos novamente pela técnica de PCR. **C)** Linearização do vetor de clonagem com a enzima *SmaI*. **D)** Esquema representando o clone recombinante obtido (pUC18+MHP7448_0476).

RESULTADOS

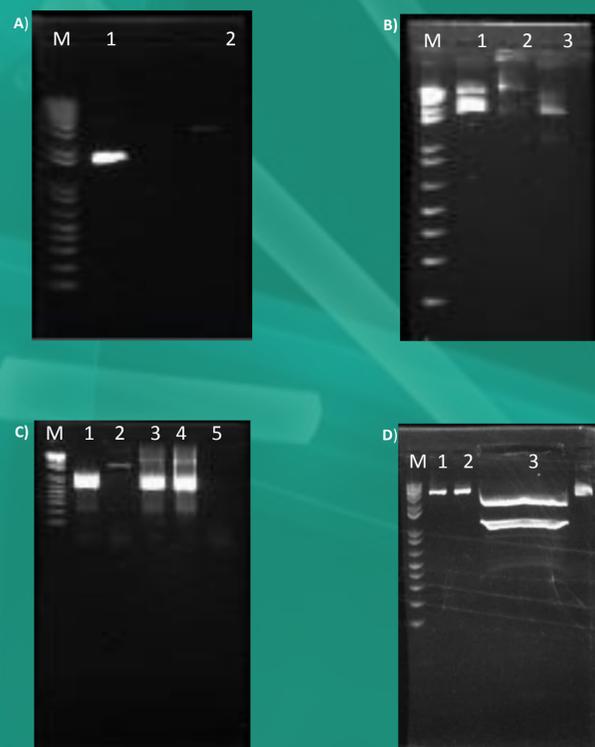


Figura 2: **A)** Gel de agarose 0,8% confirmando a clivagem do pUC18. M= Marcador 1Kb Plus DNA Ladder. 1= vetor pUC18 íntegro. 2 = vetor pUC18 clivado. **B)** Gel de agarose 0,8% representando a extração de DNA plasmidial das 02 colônias resultantes da ligação entre pUC18+MHP7448_0476. 1= vetor pUC18 íntegro. 2 e 3= DNA plasmidial das colônias transformantes. **C)** Das 02 colônias obtidas, confirmamos 01 clone recombinante através da técnica de PCR com primers específicos de MHP7448_0476 (1.086 pb). 1= DNA genômico de *M. hyopneumoniae*. 2= pUC18 íntegro. 3 e 4= clones (em duplicata); 5= controle da reação de PCR. **D)** Clivagem de pUC18+MHP7448_0476. 1= clivagem com a enzima *BamHI*. 2) clivagem com a enzima *EcoRI*. 3) clivagem com as enzimas *BamHI+EcoRI*, com consequente liberação do fragmento MHP7448_0476 para posterior clonagem em vetor de expressão pGEX-4T3. 4) pUC18+MHP7448_0476 íntegro.

PERSPECTIVAS

1- Clonar o gene MHP7448_0476 no vetor de expressão pGEX-4T3; 2- Expressar e purificar a proteína recombinante; 3- Realizar ensaios funcionais para a determinação da participação desta proteína na síntese de NAD em *M. hyopneumoniae*.

APOIO FINANCEIRO