



SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA XXVIII SIC

paz no plural



Evento	Salão UFRGS 2016: SIC - XXVIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2016
Local	Campus do Vale - UFRGS
Título	Clonagem e expressão de gene relacionado com a síntese de NAD em Mycoplasma hyopneumoniae
Autor	CAMILA VIEIRA PINHEIRO
Orientador	IRENE SILVEIRA SCHRANK

Clonagem e expressão de gene relacionado com a síntese de NAD em *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Camila Vieira Pinheiro
Prof. Dr (a). Irene Silveira Schrank
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Mycoplasma hyopneumoniae é uma bactéria com genoma de tamanho diminuto e ausência de parede celular. Este micro-organismo é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína, doença que afeta criações de suínos do mundo inteiro e que acarreta grandes perdas econômicas nesta área. O genoma anotado de *M. hyopneumoniae* ainda possui muitos genes cujos produtos são anotados como hipotéticos, dentre eles o gene denominado MHP7448_0476. Contudo, análises *in silico* para o gene MHP7448_0476 indicam a presença de motivos proteicos relacionados à síntese de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD). O cofator NAD juntamente com o cofator Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) são responsáveis por importantes reações de oxirredução em micro-organismos e até o momento não foram identificados no genoma de *M. hyopneumoniae*. Assim, o objetivo do presente estudo é clonar e expressar o gene MHP7448_0476 de *M. hyopneumoniae* 7448 para futuros ensaios de caracterização funcional da proteína recombinante obtida. A metodologia utilizada, pode ser dividida como segue: i) Clonagem do gene MHP7448_0476 em vetor de clonagem pUC18: a sequência de MHP7448_0476, de 1.086 pares de bases (pb), foi amplificada com *primers* específicos através da técnica de PCR e após, suas extremidades foram tratadas com o fragmento de *Klenow* da DNA polimerase I. O vetor pUC18, linearizado pela enzima *SmaI*, e o fragmento amplificado e purificado foram ligados com a enzima T4 DNA Ligase e a construção obtida foi transformada em células quimiocompetentes de *Escherichia coli* K-12 por choque térmico. As colônias recombinantes foram repicadas e tiveram seu DNA plasmidial extraído, sendo a confirmação da clonagem realizada pelo padrão de bandeamento em gel de agarose 0,8% (peso molecular) e pela técnica de PCR com os *primers* específicos do gene em estudo; ii) Clonagem do gene MHP7448_0476 em vetor de expressão pGEX-4T3: o fragmento MHP7448_0476, anteriormente clonado em pUC18, foi clivado e liberado do vetor com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*. O vetor de expressão pGEX-4T3 também foi linearizado com as mesmas enzimas. A ligação de ambos foi realizada através da enzima DNA T4 ligase e os demais passos de transformação, extração do DNA plasmidial e confirmação da ligação procederam como descritos anteriormente; iii) Ensaios de expressão da proteína recombinante: o clone obtido do gene em estudo no vetor pGEX-4T3 foi transformado em diferentes cepas de *E. coli* BL21 para indução da expressão proteica pela adição de 0,1 mM de *Isopropyl-β-D-thiogalactoside* (IPTG) ao cultivo, por 3 horas, em diferentes temperaturas e sob agitação. Foram obtidas duas colônias recombinantes de pGEX-4T3:MHP7448_0476, confirmadas por padrão de bandeamento e reação de PCR. Os ensaios de determinação das condições de indução da proteína heteróloga estão em andamento. Após a expressão e purificação da proteína de interesse, a mesma será empregada em ensaios enzimáticos buscando a determinação da sua participação na síntese de NAD em *M. hyopneumoniae*.