

MUCHA, S. G.<sup>1</sup>; REOLON, L. A.<sup>1</sup>; SCHRANK, I. S.<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia, <sup>2</sup>Depto. Biologia Molecular e Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS.

(scheilagm@yahoo.com.br)

## INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma atividade de grande importância para a região sul do Brasil. Com a intensificação da produção suínica, alguns agentes microbianos passaram a ter importância por causarem significativas perdas econômicas no setor. Dentre eles destaca-se o *Mycoplasma hyopneumoniae*, agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína.

Os organismos do gênero *Mycoplasma*, entre eles o *M. hyopneumoniae*, são os menores organismos auto-replicativos conhecidos, sendo seu estudo de grande importância para entendimento do genoma bacteriano mínimo. Até o momento, três cepas desta espécie já tiveram o seu genoma seqüenciado. Porém, pouco se sabe sobre as regiões que regulam o início da transcrição nesses microrganismos. Como estes possuem um genoma rico em A/T, a definição *in silico* de promotores é dificultada, uma vez que a predição destas têm sido predominantemente baseadas em dados disponíveis para *Escherichia coli*. Sendo assim, faz-se necessária a criação de ferramentas que auxiliem na caracterização *in vivo* destas regiões controladoras.

Para isso, foi utilizado nesse trabalho o vetor pOSM (figura 1), uma construção intermediária de pOSTM, um vetor anteriormente desenvolvido em nosso laboratório, o primeiro plasmídeo construído com a oriC de *M. hyopneumoniae*, objetivando a replicação nessa bactéria.

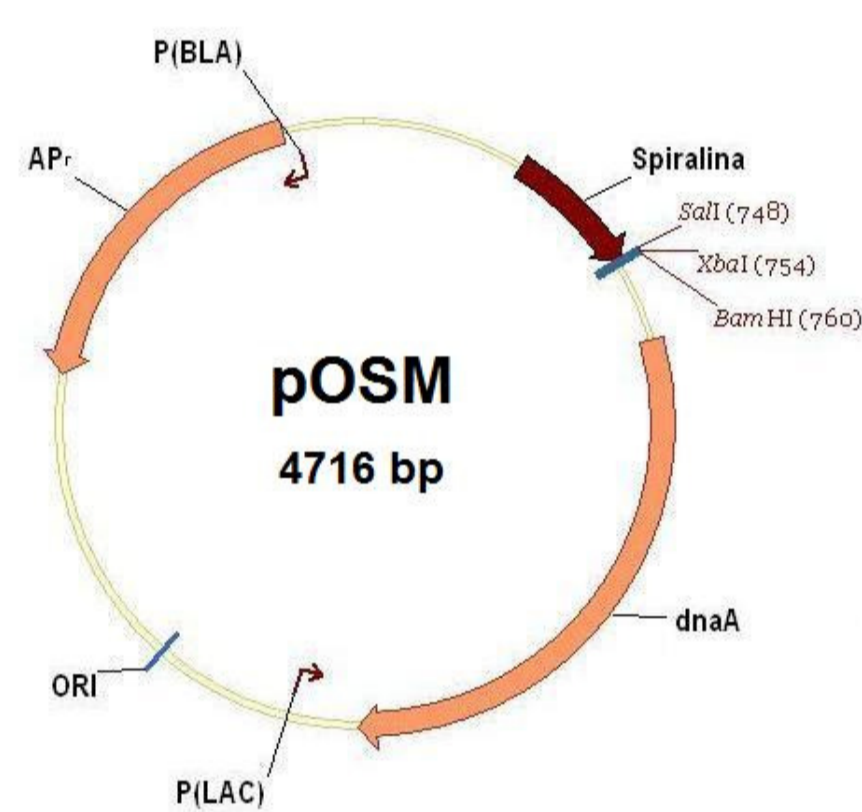


Fig 1. Plasmídeo pOSM.

## OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo analisar a viabilidade da transformação de *M. hyopneumoniae* pela técnica de eletroporação através da construção de um vetor pOSM modificado com o gene repórter EYFP, que tem por característica a produção de fluorescência. Posteriormente, tem-se o objetivo de testar regiões promotoras candidatas de *M. hyopneumoniae* através de sua clonagem na região 5' do gene repórter.

## METODOLOGIA

O vetor pOSM foi clivado com a enzima de restrição *Xba*I, tratado com a enzima T4 DNA polimerase para preenchimento das extremidades e defosforilado com a enzima SAP. Por sua vez, o gene EYFP foi obtido através de clivagem do plasmídeo pEYFP com as enzimas *Pvu*II e *Eco*RI (figura 2). O fragmento de 913 pb foi purificado, tratado com T4 DNA polimerase para preenchimentos das extremidades e ligado em pOSM previamente tratado.

Os clones obtidos foram submetidos a PCR com primers específicos para o gene EYFP para confirmar sua clonagem. Aqueles que foram positivos para clonagem foram clivados com a enzima *Eco*RI para definir a orientação do gene. A clivagem do vetor desenvolvido com enzima *Eco*RI produz bandas de tamanhos diferentes dependendo da orientação da clonagem de EYFP. Os clones que apresentaram bandas de 1731 pb e 3963 pb tinham a orientação desejada e foram transformados em *E. coli* para que fosse analisada a produção de fluorescência com a excitação por luz ultravioleta. O promotor de pEYFP será retirado por clivagem com a enzima *Sma*I e o vetor será transformado em *M. hyopneumoniae*.

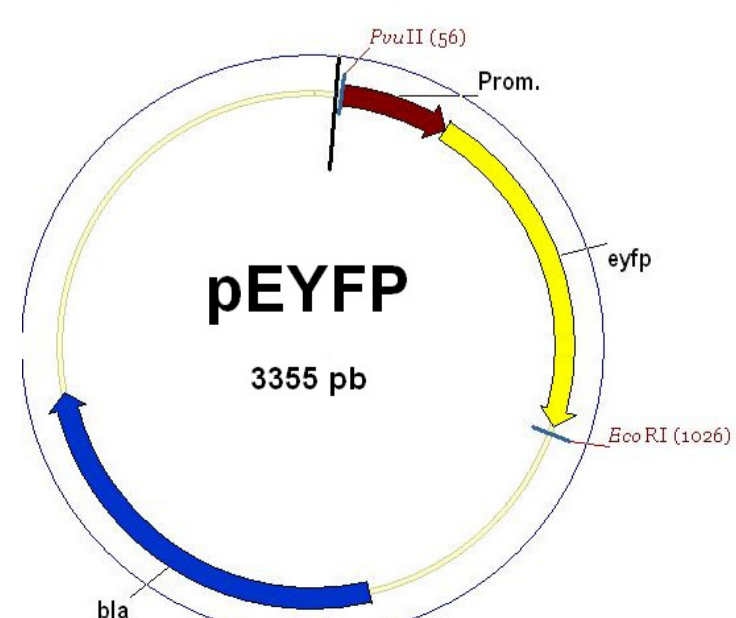


Fig 2. Plasmídeo pEYFP. Em destaque as enzimas usadas na clivagem para liberar o gene EYFP.

## RESULTADOS

### Confirmação da clonagem de EYFP no vetor pOSM.

A figura 3 mostra uma PCR dos clones obtidos a partir da ligação de EYFP no vetor pOSM. Foram utilizados primers específicos para o gene clonado. Os clones 8 e 9 apresentaram banda de 758 pb, indicando a presença do gene.

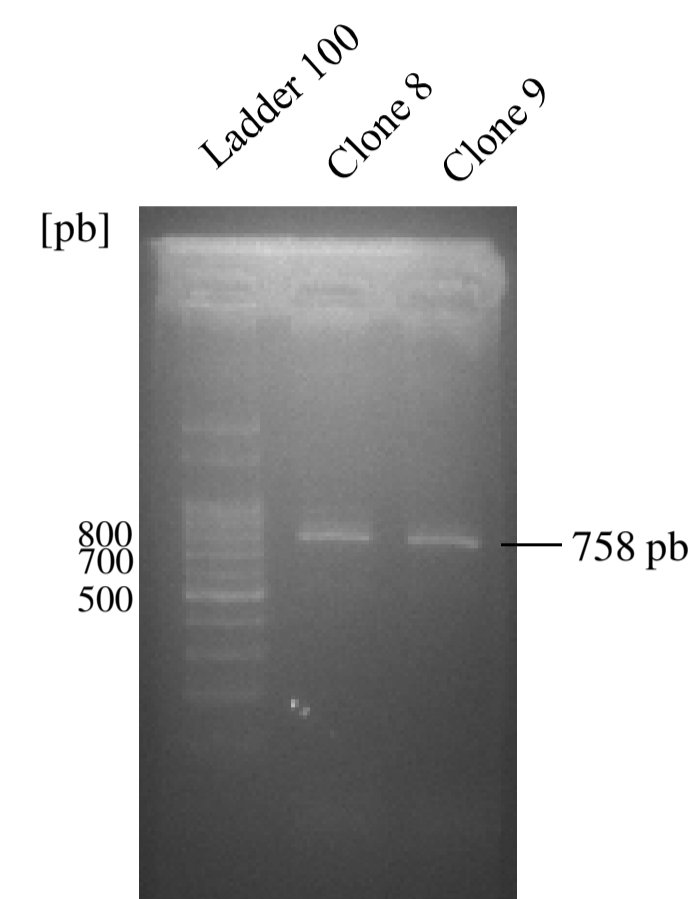


Fig 3. Produto da PCR dos clones 8 e 9 de pOSM-EYFP com primers específicos para EYFP. Eletroforese em gel de agarose 1,2% demonstrando a amplificação de uma banda de 758 pb. Marcador de 100 pb.

### Determinação da orientação de EYFP.

A figura 4 mostra a clivagem dos clones 8 e 9 com a enzima *Eco*RI para determinação da orientação de EYFP clonado em pOSM. O clone 9 apresentou a orientação desejada com bandas de 1731 e 3963 pb.

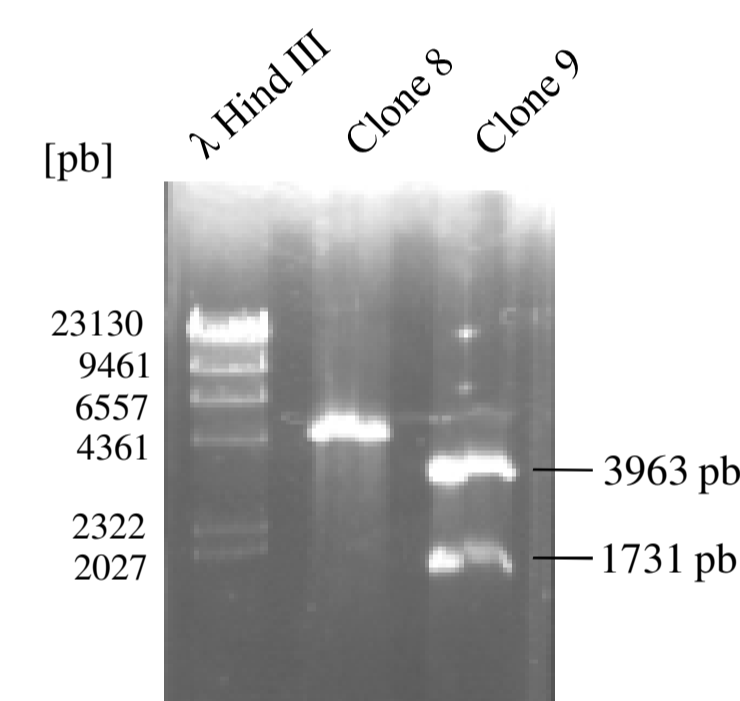


Fig 4. Produto da clivagem dos clones 8 e 9 de pOSM-EYFP com a enzima *Eco*RI. Eletroforese em gel de agarose 0,8% demonstrando bandas de 1731 pb e 3963 pb. Marcador: lambda hind III.

### Análise da produção de fluorescência pelo plasmídeo.

A figura 5 mostra uma lâmina a fresco de *E. coli* transformada com o clone 9, com luz normal (fig. 5a) e excitada com luz ultravioleta para emitir fluorescência (fig. 5b).

A figura 6 mostra à esquerda uma placa de Petri de células de *E. coli* transformada com pOSM e à direita uma placa de células de *E. coli* transformada com o clone 9. A figura 6a mostra as placas vistas em luz normal e a figura 6b mostra as placas excitadas com luz ultravioleta.

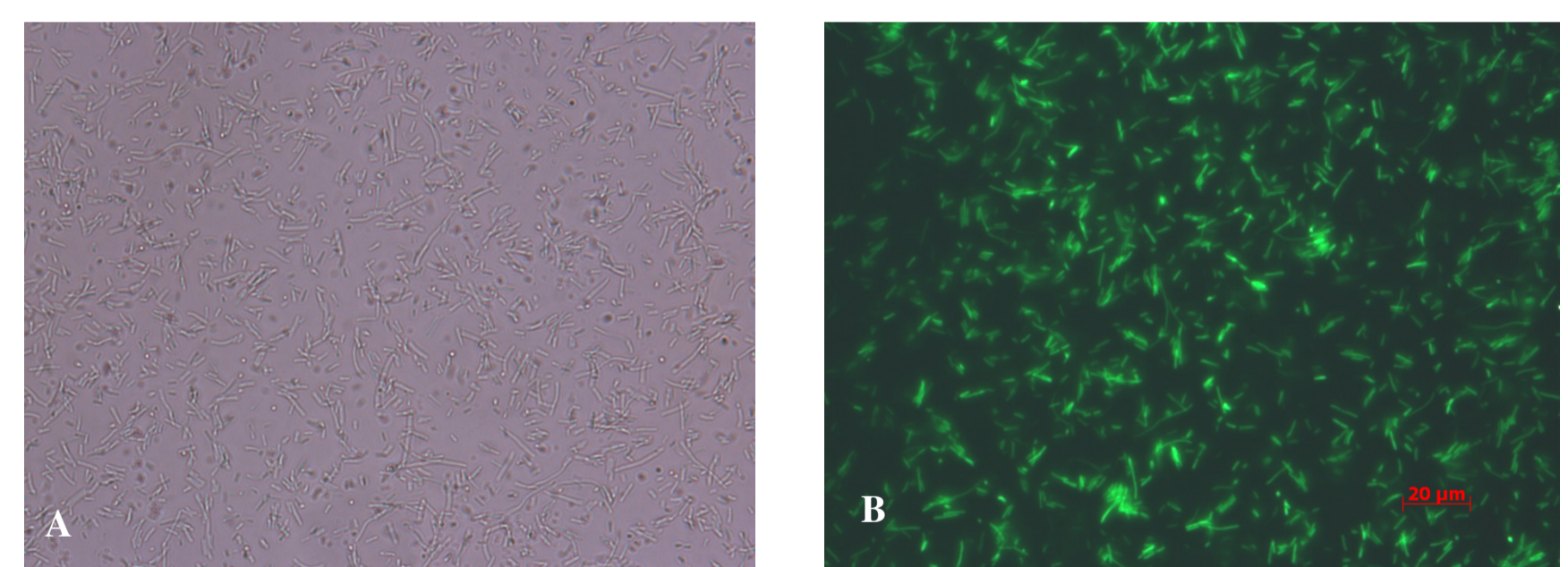


Fig 5. Lâmina a fresco de *E. coli* transformada com o clone 9. A – células vistas com luz normal. B – células excitadas com luz ultravioleta, emitindo fluorescência. Aumento de 40X.

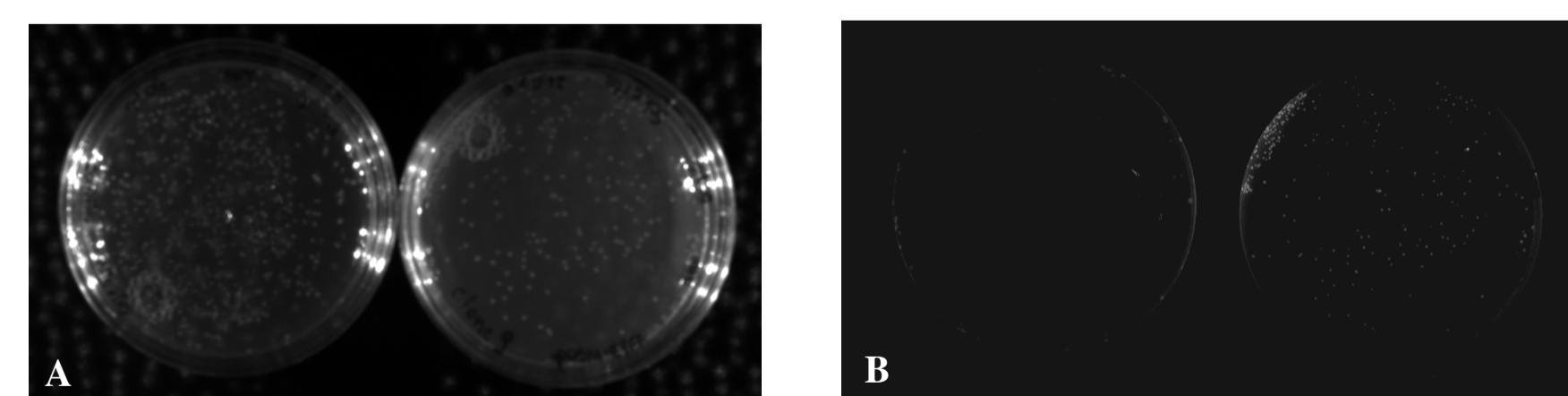


Fig 6. Placas de *E. coli* transformadas com pOSM (esquerda) e clone 9 (direita). A – placas vistas com luz normal. B – placas vistas com luz ultravioleta. A placa da esquerda, com células transformadas com pOSM, não apresenta colônias fluorescentes. A placa da direita, com células transformadas com o clone 9, apresenta colônias fluorescentes.

## PERSPECTIVAS

No momento, o promotor do gene EYFP está sendo clivado do plasmídeo. Após a clivagem, o vetor será religado e este será transformado em *M. hyopneumoniae*, possibilitando a análise da eficiência da técnica de eletroporação para esse microrganismo.