

O GENE APXIV DE ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE: EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA EM E.COLI. Shana de Souto Weber, Irene Silveira Schrank, Sergio Ceroni da Silva (*orient.*) (UFRGS).

A pleuropneumonia suína é uma doença infecto-contagiosa, causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), um importante patógeno de suínos. Quinze sorotipos de App já foram descritos, os quais expressam variavelmente três diferentes exotoxinas pertencentes à família das toxinas RTX: ApxI, ApxII e ApxIII. Nos últimos anos, uma nova RTX foi identificada e caracterizada, sendo denominada de ApxIV. Estudos indicam que esta é uma proteína antigênica, expressa somente "*in vivo*", sendo o gene *apxIV* encontrado em todos os sorotipos e especificamente em *A. pleuropneumoniae*. Com o objetivo de produzir um antígeno para a identificação de App através de teste de ELISA, foi selecionada uma região altamente conservada do gene *apxIV*, a região que codifica a porção carboxi-terminal da toxina. O fragmento contendo a região C-terminal do gene *apxIV* foi obtido após amplificação a partir do DNA total de *A. pleuropneumoniae* (sorotipo 5) com *primers* específicos, os quais continham os sítios de restrição para *NdeI* e *EcoRI*, possibilitando a clonagem do peptídeo em fase no vetor pET15b. O fragmento de 2 kb, tratado com Klenow e polinucleotídeo quinase para o preenchimento das extremidades e fosforilação da extremidade 5', foi subclonado no vetor pUC18-*SmaI* defosforilado. O clone recombinante pUCtoxIV foi totalmente seqüenciado para determinar a integridade o fragmento clonado. O plasmídeo pUCtoxIV, então, foi digerido com *NdeI* e *EcoRI* e o fragmento de 2 kb purificado e subclonado no vetor de expressão pET15b, que foi digerido com as mesmas enzimas. A análise da expressão da região C-terminal do gene *apxIV* será analisada em gel SDS-PAGE após indução com IPTG. A purificação do peptídeo será realizada por métodos padrões e utilizada na padronização de um ELISA específico para identificar App. (BIC).