

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências  
Curso de Graduação em Biotecnologia

**Clonagem e expressão de genes relacionados com a biossíntese de NAD e  
FAD de *Mycoplasma hyopneumoniae***

Amanda Malvessi Cattani

Porto Alegre  
2013

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências  
Curso de Graduação em Biotecnologia

**Clonagem e expressão de genes relacionados com a biossíntese de NAD e  
FAD de *Mycoplasma hyopneumoniae***

Trabalho de conclusão de curso de graduação  
apresentado ao Instituto de Biociências da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como  
requisito parcial para obtenção do título de Bacharel  
em Biotecnologia.

**Amanda Malvessi Cattani**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Irene Silveira Schrank**

Porto Alegre, julho de 2013

## **Agradecimentos**

À professora Irene Silveira Schrank pela orientação, dedicação e ajuda durante os trabalhos realizados em seu laboratório, acolhimento nos momentos de dificuldade e sua atenção incondicional aos alunos.

A todos os professores que ministraram as disciplinas do curso de Biotecnologia, em especial aos professores integrantes do Centro de Biotecnologia pelos conselhos e ensinamentos durante o período da graduação.

Aos colegas do laboratório 222 – Fran, companheira e amiga de trabalho, sempre disposta a me ajudar em todos os momentos; Scheila – pelo ensinamento das primeiras técnicas de biologia molecular e por sua alegria contagiante; Tiago – sempre disposto a uma conversa, agradeço pelo convívio diário, cooperação e amizade.

Aos colegas dos laboratórios 217, 220, 210 e 206 pela cooperação e auxílio sempre que necessário.

Às minhas colegas e amigas Cristine, Luiza, Mayara e Thaianne pelo apoio incondicional em todas as situações, pelos estudos em conjuntos, festas, RUs, jantares, agradeço pela amizade e alegria que me traziam todos os dias de aula.

Ao meu namorado, Ben-Hur, pela paciência nos momentos de estudos constantes, por me fazer fugir do mundo da graduação e me fazer feliz todos os dias.

Aos meus pais e meu irmão pelo apoio incondicional, pela confiança em mim, nos meus sonhos e me proporcionarem essa oportunidade de ensino, sempre me valorizando e acolhendo nos momentos de dificuldades.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino de qualidade e ao apoio financeiro da CAPES e CNPq.

## SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS .....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 O gênero <i>Mycoplasma</i> .....	12
1.2 A espécie <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	13
1.3 Rotas metabólicas em micoplasmas.....	15
1.4 Rotas metabólicas em <i>M. hyopneumoniae</i> e a importância dos cofatores NAD e FAD.....	17
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3. METODOLOGIA .....	22
3.1 Genes analisados.....	22
3.2 Linhagens bacterianas, condições de cultivo e multiplicação. ....	22
3.3 Cultivo e extração de DNA de <i>M. hyopneumoniae</i> .....	23
3.4 Projeção dos <i>primers</i> .....	23
3.5 Mutações sítio-dirigidas, ampliações por PCR e condições de termociclagem.....	25
3.6 Purificação e visualização dos fragmentos de DNA.....	30
3.7 Extração de DNA plasmidial.....	30
3.8 Quantificação de DNA e proteína .....	31
3.9 Clivagem e enzimas de restrição.....	31
3.11 Transformação dos clones recombinantes em linhagens de expressão de <i>E.coli</i> .....	33

3.12	Indução da expressão gênica .....	33
3.13	Teste de solubilidade .....	34
3.14	Purificação das proteínas recombinantes fusionadas a GST .....	34
3.15	Gel SDS-PAGE .....	35
4.	RESULTADOS .....	37
4.1	Amplificações dos genes e mutações sítio-dirigidas .....	37
4.2	<i>Overlapping</i> PCR .....	39
4.3	Clonagem por recombinação homóloga e o uso de <i>primers</i> com maior região de homologia .....	40
4.4	Expressão das proteínas recombinantes .....	43
4.5	Teste de solubilidade .....	45
4.6	Purificação da proteína recombinante .....	50
5.	DISCUSSÃO .....	52
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59
7.	ANEXOS .....	63
7.1	Construção do vetor pGEX 4T3 com o gene de interesse .....	63
7.2	Protocolo de extração de DNA genômico de <i>M. hyopneumoniae</i> .....	64

**ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES**

°C	graus Celsius
A	adenina
Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
ATP	trifosfato de adenosina
BSA	Albumina de soro bovino
C	citosina
CaCl <sub>2</sub>	cloreto de cálcio
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
FAD	dinucleotido de flavina-adenina
FMN	mononucleotídeo de flavina
fmol	fentomol
G	guanina
GST	glutathiona S-transferase
h	horas
HCl	ácido clorídrico
IPTG	β-D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
Kb	quilobase (1000 pares de bases)
KCl	cloreto de potássio
kDa	quilodalton
µg	micrograma
µL	microlitro
mL	mililitro
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
min	minutos
mM	milimolar
NaAD	Ácido nicotínico adenina dinucleotídeo
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado; NAD <sup>+</sup>
NadA	Quinolato sintase
NadB	L-aspartato oxidase

NadC	Ácido quinólico fosforribosiltransferase
NadD	Ácido nicotínico mononucleotídeo adenililtransferase
NadE	NAD sintetase
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NadR	Nicotinamida ribonucleosídeo quinase e nicotinamida mononucleotídeo adenililtransferase
NadV	Nicotinamida fosforribosiltransferase
NaMN	Ácido nicotínico mononucleotídeo
nm	Nanômetro
NMN	Nicotinamida mononucleotídeo
NAPRTase	Ácido nicotínico fosforribosiltransferase
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanograma
OD	densidade ótica
ORF	fase aberta de leitura
pb	par de bases
PBS	tampão fosfato salino
PCR	reação em cadeia da polimerase
PEP	fosfoenolpirufato
pH	potencial de hidrogênio
pmol	picomol
mRNA	RNA mensageiro
rpm	revoluções por minuto
SAP	Fosfatase alcalina de camarão
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
T	timina
TCA	ciclo do ácido cítrico
Tm	temperatura de fusão
tRNA	RNA transportador
U	unidade
V	volt

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Vias biossintéticas do NAD. ....	19
Figura 2. Esquema representativo da construção dos <i>primers</i> mutagênicos. ...	26
Figura 3. Amplificação do gene MHP7448_0394. ....	37
Figura 4. Mutagênese sítio-dirigida do gene MHP7448_0278. ....	38
Figura 5. Mutagênese sítio-dirigida do gene MHP7448_0476. ....	39
Figura 6. <i>Overlapping</i> PCR dos genes MHP7448_0278 e MHP7448_0476. ...	40
Figura 7: Confirmação da clonagem do gene MHP7448_0394 por recombinação homóloga no vetor de expressão pGEX-4T3. ....	41
Figura 8. Amplificação dos fragmentos e <i>Overlapping</i> PCR com a utilização de novos <i>primers</i> com região de homologia maior ao vetor. ....	42
Figura 9. Confirmação da clonagem do gene MHP7448_0278 por recombinação homóloga no vetor de expressão pGEX-4T3. ....	43
Figura 10. Ensaio da expressão com diferentes linhagens bacterianas do gene MHP7448_0394. ....	44
Figura 11. Ensaio da expressão com diferentes linhagens bacterianas do gene MHP7448_0278. ....	45
Figura 12. Teste de solubilidade da proteína MHP7448_0394 com a linhagem <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysE. ....	46
Figura 13. Teste de solubilidade da proteína MHP7448_0394 com a linhagem <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Star. ....	47
Figura 14. Teste de solubilidade para a proteína hipotética MHP7448_0278 em condições padrões de indução. ....	48
Figura 15. Ensaio da expressão da proteína hipotética do gene MHP7448_0278 a 28°C. ....	49
Figura 16. Teste de solubilidade para a proteína hipotética MHP7448_0278 a 28°C. ....	49
Figura 17. Purificação da proteína MHP7448_0394. ....	50
Figura 18. Purificação da proteína MHP7448_0394 (eluições). ....	51
Figura 19. Obtenção dos genes passíveis de serem clonados ao vetor de expressão. ....	54

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Linhagens bacterianas utilizadas nesse trabalho .....	23
Tabela 2: <i>Primers</i> utilizados neste trabalho.....	24
Tabela 3: <i>Primers</i> projetados com maior região de homologia com o vetor.....	25
Tabela 4: Reação de PCR para amplificação dos fragmentos .....	27
Tabela 5: Reação para o <i>Overlapping</i> PCR do gene MHP7448_0278 .....	27
Tabela 6: Reação para o <i>Overlapping</i> PCR do gene MHP7448_0476 .....	28
Tabela 7: Condições de termociclagem para a amplificação de DNA.....	29
Tabela 8: Reação de clivagem com a enzima de restrição XhoI (Promega)....	31
Tabela 9: Reação de clivagem com a enzima EcoRI (Promega) .....	32

## RESUMO

Bactérias do gênero *Mycoplasma* compreendem um grupo de mais de 200 espécies que se caracterizam principalmente por seu tamanho diminuto, ausência de parede celular e por serem parasitas obrigatórios de uma ampla gama de organismos incluindo humanos, plantas e animais. A espécie *Mycoplasma hyopneumoniae* encontra-se normalmente associada a suínos, causando uma doença respiratória denominada pneumonia enzoótica suína, que caracteriza-se por ser crônica porém não muito severa, podendo se agravar por infecções oportunistas de outras bactérias, gerando grandes perdas econômicas às indústrias suinícolas. Neste trabalho 3 genes que codificam proteínas anotadas como hipotéticas (MHP7448\_0278, MHP7448\_0394 e MHP7448\_0476), e que revelaram a presença de motivos proteicos relacionados a atividades metabólicas, como a rota de biossíntese de FAD e NAD, respectivamente, foram selecionados, amplificados por PCR e clonados em vetores de expressão de *Escherichia coli*. A expressão, solubilidade e rendimento das proteínas recombinantes foram analisados. A clonagem com o gene MHP7448\_0394 resultou em uma colônia recombinante. Para o gene MHP7448\_0278 três colônias recombinantes foram obtidas e para o gene MHP7448\_0476 a clonagem ainda não foi bem sucedida. A expressão ocorreu em linhagens de *E. coli* BL21 e foi induzida com a adição de IPTG. As melhores linhagens para a expressão da proteína codificada pelo gene MHP7448\_0394 foram *E. coli* BL21 (DE3) pLysE e *E. coli* BL21 (DE3) Star, e para a proteína codificada pelo gene MHP7448\_0278 as melhores cepas foram *E. coli* BL21 (DE3) pLysE e *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus Rill. O teste de solubilidade proteica foi realizado nas duas melhores linhagens de expressão de MHP7448\_0394 e ambas mostraram a proteína na sua fração solúvel em condições padrões de indução, sendo então purificada a partir de cromatografia de afinidade. A proteína codificada pelo gene MHP7448\_0278 mostrou-se insolúvel nas condições padrões. As proteínas purificadas terão suas estruturas analisadas e função caracterizada.

## ABSTRACT

Bacteria from *Mycoplasma*'s genus comprise a group of more than 200 species that are characterized mainly by their diminutive size, lack of cell wall and by their obligate parasites' lifestyle of a wide range of organisms including humans, plants and animals. The species *Mycoplasma hyopneumoniae* is usually associated with pigs, causing a respiratory disease denominated swine enzootic pneumonia, which is characterized as chronic but not severe, and could be worsened by opportunistic infections of other bacteria, causing great economic losses to swine industries. In this work 3 genes that encode for proteins annotated as hypothetical (MHP7448\_0278, MHP7448\_0394 and MHP7448\_0476), which revealed the presence of protein motifs related to metabolic activities, such as the route of NAD and FAD biosynthesis, respectively, were selected, amplified by PCR and cloned into *Escherichia coli* expression vectors. Recombinant protein expression, solubility and yields were analyzed. The MHP7448\_0394 gene cloning resulted in one recombinant colony. For the gene MHP7448\_0278 three recombinant colonies were obtained, and for the MHP7448\_0476, gene cloning has not yet been successful. The expression occurred in strains of *E. coli* BL21 and was induced with the addition of IPTG. The best strains for the protein encoded by the MHP7448\_0394 gene were *E. coli* BL21 (DE3) pLysE and *E. coli* BL21 (DE3) Star and the protein encoded by the gene MHP7448\_0278 the best strains are *E. coli* BL21 (DE3) pLysE and *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus Rill. The protein solubility test was conducted on the two best strains of MHP7448\_0394 expression and both showed protein in the soluble fraction in standard induction conditions, that was then purified from affinity chromatography. The MHP7448\_0278 gene protein proved to be insoluble under standard conditions. The purified proteins will have their structures reviewed and their function analyzed.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O gênero *Mycoplasma*

O gênero *Mycoplasma* compreende um grupo de mais de 200 espécies que se caracterizam principalmente por seu tamanho diminuto e ausência de parede celular. São os menores microrganismos auto-replicativos e por esse motivo, por vários anos, pensou-se que fossem vírus, uma vez que ultrapassavam filtros bacterianos. Após a descoberta de bactérias L-formes, os micoplasmas foram agregados a essa categoria, porém sem consenso comum, uma vez que bactérias L-formes são microrganismos que perderam parcialmente ou totalmente sua parede celular. O fim da controvérsia ocorreu no fim dos anos 1960s onde o primeiro dado de análise genômica foi realizado e não se estabeleceu relação com bactérias L-formes (Razin & Hayflick, 2010).

A principal diferença entre as duas está relacionada com o fato de que a perda da parede celular de micoplasmas aparentemente foi apenas um passo no longo processo de evolução desses organismos, que envolve muitas etapas mais, resultando em diminuição marcada do genoma. As atuais bactérias L-formes são na verdade artefatos de laboratório produzidos pela remoção parcial ou total da parede celular, com mínimas alterações no genoma da bactéria parental (Razin *et al.*, 1992). A ausência total de parede celular explica as características únicas de micoplasma: sensibilidade a choques osmóticos e detergentes, resistência a penicilina e formação de uma morfologia de colônia peculiar, similar a “ovos fritos” (Razin *et al.*, 2010). A reprodução acontece como na maioria dos procariontes por fissão binária.

Este gênero caracteriza-se por ser parasita obrigatório de uma ampla gama de organismos incluindo humanos, plantas e animais (Razin *et al.*, 1998) e amplamente dependente de fatores do meio de crescimento, como aminoácidos, purinas, pirimidinas e componentes de membrana. Essa dependência pode ser explicada pelo tamanho diminuto do genoma dos micoplasmas, que gera um metabolismo limitado e poucas vias de biossíntese

(Thacker & Minion, 2010). Micoplasmas normalmente apresentam especificidades de tecido hospedeiro estrito, provavelmente devido a suas necessidades nutricionais, um resultado direto da redução de genoma que provavelmente ocorreu como consequência da complementaridade metabólica de seus hospedeiros (Razin, 1992).

As bactérias do gênero micoplasma possuem genomas pequenos (580–1350 kb) com um alto conteúdo A + T (em torno de 70%) (Simionatto *et al.*, 2013). Existem micoplasmas patogênicos e aqueles que fazem parte da microbiota natural do hospedeiro. No caso de micoplasmas patogênicos, infecções raramente são do tipo fulminante (Razin *et al.*, 1998), mas sim seguem um curso crônico e podem se agravar por infecções secundárias.

## **1.2 A espécie *Mycoplasma hyopneumoniae***

*Mycoplasma hyopneumoniae* é o principal patógeno da pneumonia enzoótica, uma doença respiratória crônica em suínos. Infecções com *M. hyopneumoniae* são altamente prevalentes em suínos (variando entre 38% e 100%) em praticamente quase todas as áreas de produção em todo o mundo, causando significativas perdas econômicas devido ao aumento no uso de medicação e diminuição do desempenho do animal. (Maes *et al.*, 2008; Simionatto *et al.*, 2013).

A infecção por *M. hyopneumoniae* é principalmente transmitida horizontalmente de suínos infectados para companheiros de habitat não infectados, mas também é verticalmente transmitida de animais fêmea para sua prole pelo contato frequente e estreito de nariz a nariz e durante o período de aleitamento (Nathues *et al.*, 2013). O estabelecimento da infecção por *M. hyopneumoniae* ocorre com a sua aderência ao epitélio ciliado respiratório, que inicialmente causa ciliostase, destruição dos cílios, e possivelmente causa morte da célula epitelial (Debey *et al.*, 1994)

A adesão da bactéria ao epitélio respiratório, a estimulação de uma reação inflamatória prolongada, a supressão e a modulação das respostas

imune inatas e adaptativas são reconhecidos como passos importantes na colonização e infecção deste organismo (Thacker & Minion, 2010). Assim, os animais infectados encontram-se mais suscetíveis a infecções secundárias, agravando ainda mais o caso.

A produção de carne suína é uma potencia econômica no Brasil e gera grandes movimentos de investimentos todos os anos. O Brasil está no quarto lugar no *ranking* de produção e exportação mundial de carne suína e a cada ano cresce em torno de 4%. Os principais estados produtores são Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul. O Brasil representa 10% do volume exportado de carne suína no mundo, chegando a lucrar mais de US\$ 1 bilhão por ano (dados de 2010 do Ministério da Agricultura Brasileira). Visto a importância econômica dessa cadeia produtiva brasileira é de suma importância o controle de doenças que possam dificultar o manejo e gerar prejuízos no processo produtivo.

A infecção causada por *M. hyopneumoniae* pode ser controlada através da combinação de vários fatores tais como a otimização de práticas de gestão, medidas de biossegurança e condições de habitação, além do uso de antibióticos e vacinação (Simionatto *et al.*, 2013). Antibióticos como tetraciclina e macrolídeos são frequentemente usados para tratar doenças respiratórias tais como a pneumonia enzoótica suína (Vicca *et al.*, 2004)

Apesar do sucesso dos programas de medicamentos no controle das infecções de *M. hyopneumoniae*, muitas vezes apenas proteção parcial é alcançada. Os resultados podem ser inconsistentes, uma vez que os surtos são possíveis quando o tratamento é interrompido (Thacker & Minion, 2010). Também, a medicação preventiva ou estratégica de suínos com antimicrobianos deve ser minimizada tanto quanto possível para evitar o desenvolvimento de resistência aos medicamentos (Simionatto *et al.*, 2013).

Outro método de controle que vem sendo utilizado no combate de *M. hyopneumoniae* é a vacinação. Todas as vacinas comercialmente disponíveis são feitas a partir de culturas de micoplasma inativadas (mortas) - bacterinas (Simionatto *et al.*, 2013). A eficácia da vacinação tem sido demonstrada em muitos estudos diferentes. Embora ela confira efeitos benéficos em suínos infectados, estes efeitos são variáveis entre rebanhos. Essa instabilidade pode resultar de diferentes fatores como o nível e a idade da infecção, fatores

complicadores e a variabilidade entre diferentes isolados de *M. hyopneumoniae* (Villarreal *et al.*, 2011). Por isso há a busca constante de novos alvos antimicrobianos para essas bactérias a fim de otimizar o seu controle, visto que um único método ainda não foi capaz de eliminar por completo a infecção de forma rápida e eficiente.

Isolados de *M. hyopneumoniae* apresentam uma variabilidade no tamanho do genoma que compreende entre 890 a 930 kb, com um conteúdo G+C em torno de 28% e sendo a maioria de sua sequência nucleotídica codificante para proteínas. O genoma de *M. hyopneumoniae* isolado 7448 contém 920.079 pares de bases e 716 genes codificantes de proteínas, das quais 418 codificam proteínas com funções conhecidas. Da mesma forma, quase 42% dos genes previstos de *M. hyopneumoniae* 7448 correspondem às proteínas anotadas como hipotética (Vasconcelos *et al.*, 2005).

As características encontradas na anotação do genoma geraram questões particularmente intrigantes. Muitos componentes, incluindo vias metabólicas importantes e essenciais, presentes em outros organismos não foram identificados em micoplasmas (Hutchison *et al.*, 2011). Com a ausência dessas informações e visto a importância de *M. hyopneumoniae* há um grande empenho da academia científica no estudo desse organismo. Quatro linhagens já foram sequenciadas de *M. hyopneumoniae* (232, J, 7448 e 168) (Minion *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011) e o seu estudo vem sendo realizado a fim de reunir esforços para elucidar os mecanismos os quais compreendem a funcionalidade dessas bactérias tão simples e importantes.

### **1.3 Rotas metabólicas em micoplasmas**

O genoma reduzido de micoplasmas limita a presença de uma ampla atividade metabólica nesses organismos e, quando existente, parece principalmente estar associada com a geração de energia, em vez de fornecer substratos para as vias sintéticas.

Todos os Mollicutes examinados até agora parecem ter sistemas respiratórios truncados, pois não possuem um completo ciclo do ácido cítrico e

não têm quinonas e citocromos, descartando a via de fosforilação oxidativa (altamente efetiva) como um mecanismo de geração de ATP (Pollack *et al*, 2002). Assim, as rotas de rendimento energético dos Mollicutes produzem baixas concentrações de ATP e quantidades relativamente altas de produtos finais metabólicos, esgotando em alguns casos, os tecidos do hospedeiro, com a utilização do substrato específico metabolizado. Isso pode ser um fator que influencia a patogenicidade de micoplasmas, visto a dependência desses organismos com seus hospedeiros (Razin & Hayflick, 2010).

Com base na sua capacidade de metabolizar carboidratos, os Mollicutes dividem-se em organismos fermentativos e não fermentativos (Razin & Hayflick, 2010). Pesquisas indicaram que a glicólise foi a principal fonte de energia para onze micoplasmas fermentativos (Pollack *et al.*, 1983; Tourtellotte *et al*, 1960). Já os micoplasmas não fermentativos obtêm sua energia mais provavelmente pela via de arginina dihidrolase. A degradação de arginina por esta via é acoplada à geração equimolar de ATP pela fosforilação a nível de substrato, – uma forma não tão eficaz de produção de energia. Justamente pela pouca capacidade de geração de energia pela via da arginina dihidrolase, há ainda muitos questionamentos sobre a presença desta via realmente como a única fonte de energia em micoplasmas não fermentativos. Essa questão permanece ainda sem resposta e estudos mais rigorosos devem ser realizados a fim de se obter uma conclusão mais consistente sobre o assunto (Razin & Hayflick, 2010)

Outro mecanismo possível para a geração de ATP em micoplasmas foi proposto por Kahane *et al* (1978). Este mecanismo baseia-se na geração de ATP a partir de acetil fosfato e adenosina 5'-difosfato pela acetato quinase, juntamente com formação de fosfato de acetil do Acetil Coenzima A (acetil-CoA) pela fosfato acetiltransferase. As duas enzimas são comumente encontradas em micoplasmas fermentativos e não fermentativos (Kahane *et al*, 1978).

Mollicutes aparentemente não carboxilam PEP (fosfoenolpiruvato) ou piruvato e, portanto, não podem entrar no ciclo TCA (ciclo do ácido cítrico) da glicólise através de oxaloacetato. A fim de compensar estas e outras deficiências, como a ausência de um sistema de transporte de elétrons que contenha citocromo, bem como os valores de energia relativamente baixos

durante a fase exponencial de crescimento, além da incapacidade presumida de sintetizar de novo adenilatos de glicose, os Mollicutes exigem um ambiente compensatório, como um meio rico, ou um tecido vivo ou ainda substâncias com grupos de alto potencial de transferência de energia como fosfoenolpiruvato, fosforibosilpirofosfato, ou pirofosfato. Essas deficiências além de outras já conhecidas ainda distinguem os Mollicutes dos demais procariotos (Pollack *et al.*, 1983).

#### **1.4 Rotas metabólicas em *M. hyopneumoniae* e a importância dos cofatores NAD e FAD**

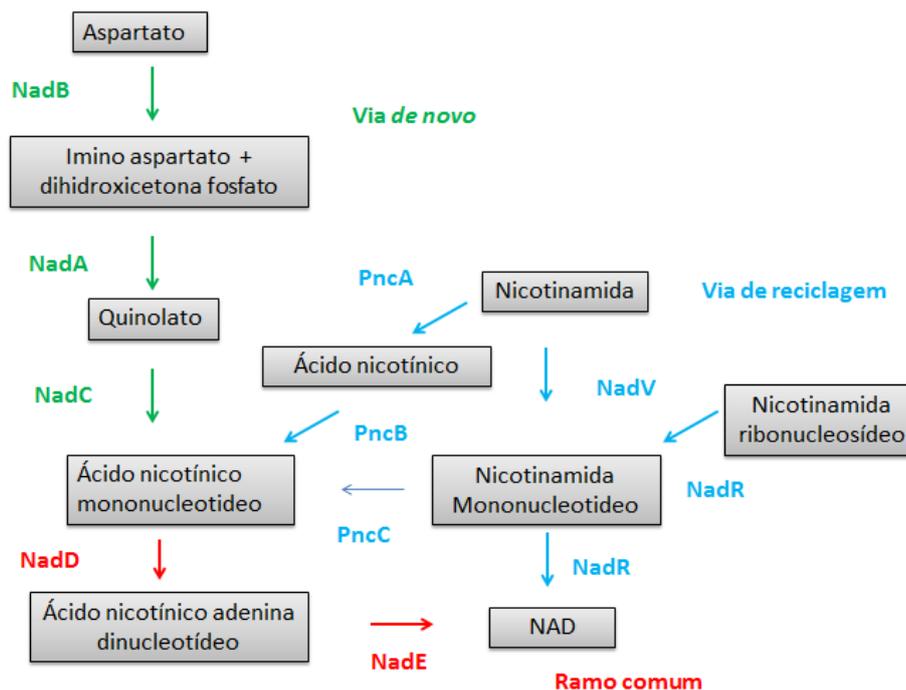
Novas abordagens utilizando ferramentas de bioinformática podem ser usadas para prever potenciais antígenos *in silico*, estreitando-se o universo a ser testado. Além disso, essa abordagem tem a vantagem de revelar as proteínas, independentemente de sua abundância e sem a necessidade de multiplicar microrganismos *in vitro*. Estes alvos selecionados podem ser expressos em sistemas heterólogos, purificados e então avaliados em relação seu potencial como drogas antimicrobianas ou antígenos para a fabricação de vacinas (Wang *et al.*, 2005).

Fonseca e colaboradores (2012) realizaram uma análise *in silico* para 298 proteínas anotadas como hipotéticas em *M. hyopneumoniae* e, por meio de vários recursos computacionais, revelaram a estrutura e função de cinco proteínas, sendo das quais, três envolvidas em rotas metabólicas. As três proteínas foram caracterizadas como envolvidas na rota de biossíntese de NAD (enzimas NadD e NAPRTase) e na biossíntese de FAD (FAD sintetase). Até então, sequências do genoma de micoplasmas não foram anotadas para atividades relacionadas com a utilização de ATP, síntese de NAD e NADH e a utilização de aminoácidos derivados de piruvato. No entanto, devem existir genes correspondentes a essas atividades, caso contrário suas atividades enzimáticas não seriam encontradas. Esta discrepância sugere que as metodologias baseadas em sequências para identificar a função de proteínas

podem não ser apropriadas para micoplasmas em alguns casos (Fonseca et al., 2012), gerando uma ausência de conhecimento na área, atrasando a utilização dessas vias para estudos da sua funcionalidade e vitalidade no sistema patógeno-hospedeiro.

NAD é uma coenzima essencial, envolvida em um grande número de reações redox em todas as formas de vida celular. Além disso, o NAD é utilizado como um co-substrato em uma variedade de reações não redox, desempenhando um papel importante na replicação e reparo do DNA, ligação ao RNA, diferenciação celular e transdução de sinal celular (Houtkooper *et al.*, 2010). Os nucleotídeos podem também ser usados como substratos nas reações de ribosilação de ADP, biossíntese de ADP-ribose cíclico e como um agente desidratante para DNA ligase (Hilz, 1997; Lee, 2000; Singleton et al., 1999)

Existem várias vias metabólicas para a biossíntese de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>) em bactérias (Figura 1).



**Figura 1. Vias Biosintéticas do NAD.**

Esquema mostrando as vias de síntese de NAD encontradas nos procariontos. Via *de novo* (em verde): genes envolvidos: L- aspartato oxidase (NadB), quinolato sintase (NadA), ácido quinóico fosforribosiltransferase (NadC). Via comum (em vermelho) genes envolvidos: ácido nicotínico mononucleotídeo adenililtransferase (NadD) e NAD sintetase (NadE). Vias de reciclagem (em azul) genes envolvidos: nicotinamida deamidase (PncA), ácido nicotínico fosforribosiltransferase (PncB), nicotinamida fosforribosiltransferase (NadV) e a proteína multifuncional NadR, que tem atividade nicotinamida ribonucleosídeo quinase e nicotinamida mononucleotídeo adenililtransferase (modificado de Stanček *et al.*, 2005).

A biossíntese deste cofator pode ocorrer por uma via *de novo* e a partir de vias de reciclagem, sendo que estas vias podem convergir para um ramo comum, do qual NadE catalisa a última etapa. O composto chave para a síntese de NAD pela via *de novo* é o quinolato. Para ser transformado em NAD, este composto precisa ser fosforribosilado, depois adenililado e, em seguida, amidado. O quinolato pode ser produzido em procariontos a partir do aspartato (Kurnasov *et al.*, 2003).

O ramo comum da via tem como composto inicial o ácido nicotínico mononucleotídeo (NaMN). Na via de reciclagem podem ser utilizados como substratos a nicotinamida, o ácido nicotínico, ou a nicotinamida ribonucleosídeo (Kurnasov *et al.*, 2003).

A síntese de FAD é mais simplificada que a de NAD, sendo realizada pela FAD sintetase, uma enzima bifuncional em procariontos que catalisa duas

reações: riboflavina quinase e adeniltransferase de mononucleotídeo de flavina (FMN). A FAD sintetase está presente em todos os reinos de organismos vivos. Organismos superiores utilizam enzimas distintas para formação de FMN e FAD, porém em organismos mais simples essa enzima é bifuncional (Wang *et al.*, 2005).

A biossíntese de FAD pela FAD sintetase se dá em duas etapas: primeiro agindo como uma quinase convertendo riboflavina em FMN, na presença de ATP e então age como uma transferase de nucleotidil usando um segundo ATP para converter a FMN e FAD (Mashhadi, 2010).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Considerando-se que muitos mecanismos relacionados a rotas metabólicas em *M. hyopneumoniae* ainda não foram elucidados, o objetivo do presente estudo é clonar e expressar as sequências gênicas de *M. hyopneumoniae* linhagem 7448, possivelmente relacionadas à rota de síntese de NAD e FAD em vetores de expressão de *E. coli* a fim de avaliar sua função enzimática.

### 2.2 Objetivos específicos

- Amplificação das sequências codificadoras dos genes MHP7448\_0278, MHP7448\_0394 e MHP7448\_0476.
- Mutagênese sítio-dirigida dos códons TGAs encontrados nos genes.
- Ensaio de recombinação homóloga em *E. coli* KC8.
- Expressão heteróloga dos genes em *E. coli*.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Genes analisados**

Os critérios de seleção dos genes neste estudo se deram em virtude de análises *in silico* realizadas por Fonsêca *et al.* (2012) demonstrarem que as proteínas codificadas por essas sequências nucleotídicas apresentaram motivos proteicos relacionados à biossíntese de NAD e FAD. São eles: MHP7448\_0278 (biossíntese de FAD), MHP7448\_0394 (biossíntese de NAD) e MHP7448\_0476 (biossíntese de NAD).

#### **3.2 Linhagens bacterianas, condições de cultivo e multiplicação.**

As linhagens bacterianas utilizadas nesse trabalho são mostradas na Tabela 1 e foram mantidas em meio sólido Luria Bertani (LB) (Sigma), sem a adição de antibióticos. No momento em que foram transformadas com o vetor pGEX 4T3 (GE Healthcare) foram mantidas também em LB sólido, porém com a adição de 100 µg/mL de ampicilina. O cultivo foi realizado em meio LB sólido e líquido à 37°C e sob agitação de 200 rpm (quando líquido), por 16 horas. Para a indução da expressão das proteínas recombinantes o meio utilizado foi Circle Grow (CG) (Q-BIOgene) (líquido) contendo 100 µg/mL de ampicilina e o crescimento bacteriano ocorreu a 37°C sob agitação de 200 rpm.

Tabela 1: Linhagens bacterianas utilizadas nesse trabalho

Linhagem bacteriana	Utilização	Referência
<i>E. coli</i> XL1- Blue	Preparação de plasmídeos	Stratagene
<i>E. coli</i> KC8	Recombinação	Parrish <i>et al</i> , 2004
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Star	Expressão	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Rosetta	Expressão	Novagen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysE	Expressão	Novagen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) RP	Expressão	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) CodonPus Rill	Expressão	Stratagene

### 3.3 Cultivo e extração de DNA de *M. hyopneumoniae*

*Mycoplasma hyopneumoniae* 7448, precedente da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC), foi isolado de um suíno infectado em Lindóia do Sul, SC, Brasil (Vasconcelos *et al*, 2005). O cultivo foi realizado em meio Friis líquido (Friis, 1975) a 37°C, sob leve agitação. O crescimento de *M. hyopneumoniae* é indicado com o surgimento de uma leve turbidez e alteração da coloração do meio de cultivo, que ocorre, pois o meio Friis contém o indicador de pH vermelho fenol. Conforme o microrganismo se multiplica, vai ocorrendo a oxidação de glicose e o meio de cultivo se acidifica, tornando-se amarelo (Kobisch & Friis, 1996).

A extração de DNA foi realizada a partir de 5 mL de cultivo e seguiu as etapas do protocolo em anexo [anexo 7.2].

### 3.4 Projeção dos *primers*

Os *primers* foram projetados a partir da sequência genômica da linhagem 7448 de *M. hyopneumoniae* (número de acesso no GenBank: NC\_007332), utilizando o *software* Vector NTI Advance™ 10.0 (Invitrogen). Os

oligonucleotídeos gerados contêm a sequência nucleotídica específica para a amplificação do gene (em torno de 20 pares de bases) adicionados de nucleotídeos homólogos ao vetor pGEX-4T3 (de 20 a 24 nucleotídeos), possibilitando a posterior recombinação. Os *primers* continham ainda, as mutações sítio-dirigidas (A → G) (Tabela 2).

**Tabela 2: Primers utilizados neste trabalho.**

Primer	Sequência (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)
<i>pGEX_MHP0278_A</i>	<u>TGGTTCCGCGTGGATCCCCGATGGTA</u> AAAGTTTATACTTATCCGT	72,9
<i>pGEX_MHP0278_B</i>	TGCTCTGGATT <b>C</b> CAACTAGCATTT	62,1
<i>pGEX_MHP0278_C</i>	AAATGCTAGTTG <b>G</b> AATCCAGAGCA	61,2
<i>pGEX_MHP0278_D</i>	<u>GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCATT</u> AAAAATCATTAAATTTTTTTATAATTT	67,1
<i>pGEX_MHP0394_5'</i>	<u>TGGTTCCGCGTGGATCCCCGATGTCT</u> AAATG <b>G</b> AACAAAAATAAAT	71,1
<i>pGEX_MHP0394_3'</i>	<u>GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCATT</u> ATTTTTCATCAACAAGACT	71,1
<i>pGEX_MHP0476_A</i>	<u>TGGTTCCGCGTGGATCCCCGATGACT</u> TTGAAAAAGATTGCTATTTAT	71,1
<i>pGEX_MHP0476_B</i>	TGATCTTTTGT <b>C</b> CATTTCTTTGT	55,6
<i>pGEX_MHP0476_C</i>	ACAAAGAAATG <b>G</b> ACAAAAGATCA	55,6
<i>pGEX_MHP0476_D</i>	ACATTTTAAAG <b>C</b> CAAATTGAAGC	55,6
<i>pGEX_MHP0476_E</i>	GCTTCAATTTG <b>G</b> CTTAAAAATGT	55,6
<i>pGEX_MHP0476_F</i>	<u>GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCATT</u> AATTTTGGTGTCTAGCATAAAT	41,6

A região sublinhada mostra os nucleotídeos homólogos ao vetor e salientado em preto está a mutação sítio-dirigida.

Ao longo do trabalho houve grande dificuldade na obtenção de clones recombinantes para os genes MHP7448\_0278 e MHP7448\_0476. Com o

objetivo de solucionar essa problemática a metodologia de projeção dos *primers* foi alterada, projetando-se novos oligonucleotídeos que anelam nas extremidades dos genes (regiões 5' e 3'), nas mesmas condições mencionadas acima, entretanto com uma região de similaridade ao vetor maior (40 nucleotídeos) (Tabela 3). Os *primers* internos (contendo as substituições A→G) foram mantidos sem nenhuma alteração.

**Tabela 3: Primers projetados com maior região de homologia com o vetor.**

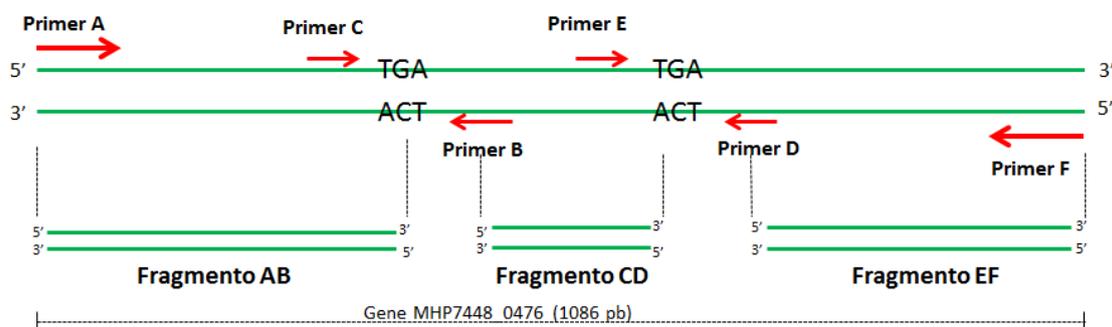
Primer	Sequência (5' - 3')	T <sub>m</sub> (°C)
0278_A_tag	<u>CCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCG</u>	70,1
	<u>TGGATCCCCGATGGTAAAAGTTTATACTTA</u> TCCGT	
0278_D_tag	<u>GTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGATCG</u>	67,2
	<u>TCAGTCAGTCATTAAAAATCATTAAATTTTTTT</u> ATAATTT	
0476_A_tag	<u>CATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGT</u>	69,5
	<u>GGATCCCCGATGACTTTGAAAAAGATTGCT</u> ATTTAT	
0476_F_tag	<u>GTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGATCG</u>	41,6
	<u>TCAGTCAGTCATTAATTTTTGGTGTCTAGCAT</u> AAAT	

A região sublinhada mostra os nucleotídeos homólogos ao vetor.

### 3.5 Mutações sítio-dirigidas, ampliações por PCR e condições de termociclagem

Uma característica importante de *M. hyopneunoniae* é a utilização do códon TGA para a codificação do aminoácido Triptofano, diferentemente de *E. coli* onde esse mesmo códon codifica para um códon de terminação. Para que a expressão correta das proteínas possa acontecer foram realizadas mutações

sítio-dirigidas, nos *primers* sintetizados, modificando os códons TGA para TGG (Figura 2).



**Figura 2. Esquema representativo da construção dos *primers* mutagênicos.**

A figura representa a construção dos *primers* de um dos genes (MHP7448\_0476), onde em cada códon TGA, um par de oligonucleotídeo foi projetado contendo a substituição A→G, gerando assim fragmentos, que posteriormente deverão ser unidos.

O gene MHP7448\_0278 apresenta um códon TGA e, portanto uma substituição foi necessária. A alteração de A → G aconteceu a partir da amplificação do gene em dois fragmentos, utilizando *primers* mutagênicos: fragmento 278AB (*primers*: pGEX\_MHP0278\_A e pGEX\_MHP0278\_B), fragmento 278CD (*primers*: pGEX\_MHP0278\_C e pGEX\_MHP0278\_D). As reações para a geração dos fragmentos foram feitas em um volume final de 25 µL (Tabela 4).

O gene MHP7448\_0476 possui dois códons TGA a serem substituídos, gerando três fragmentos com a utilização de *primers* mutagênicos: fragmento 476AB (*primers*: pGEX\_MHP0476\_A e pGEX\_MHP0476\_B), fragmento 476CD (*primers*: pGEX\_MHP0476\_C e pGEX\_MHP0476\_D) e fragmento 476EF (*primers*: pGEX\_MHP0476\_E e pGEX\_MHP0476\_F). As reações foram feitas em um volume final de 25 µL (Tabela 4).

Tabela 4: Reação de PCR para amplificação dos fragmentos

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
Água, livre de nuclease	Completar 25µL
<i>Primers</i>	30 pmol
<i>Buffer Pfu DNA Polymerase</i> contendo 20mM de MgSO <sub>4</sub> (Fermentas)	10X
dNTP	0,2 mM
<i>Pfu DNA Polymerase</i> (Fermentas)	1 U
DNA genômico de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448	100 ng

Os fragmentos gerados possuem regiões de sobreposição, e a partir de uma segunda reação de PCR (*Overlapping* PCR), os genes fragmentados foram unidos.

Os fragmentos 278AB e 278CD foram purificados a partir das reações de PCR e usados como molde para a *Overlapping* PCR. Os *primers* utilizados foram *pGEX\_MHP0278\_A* e *pGEX\_MHP0278\_D* e o volume final da reação foi de 25 µL (Tabela 5).

Tabela 5: Reação para o *Overlapping* PCR do gene MHP7448\_0278

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
Água, livre de nuclease	Completar 25µL
<i>Primers</i>	30 pmol
<i>Buffer Pfu DNA Polymerase</i> contendo 20mM de MgSO <sub>4</sub> (Fermentas)	10X
dNTP	0,2 mM
<i>Pfu DNA Polymerase</i> (Fermentas)	1 U
Fragmento 278AB	40 fmoles

Fragmento 278CD	40 fmoles
-----------------	-----------

Os fragmentos 476AB, purificados a partir do gel (devido a presença de bandas inespecíficas), e os fragmentos 476CD e 476EF, purificados a partir de reações de PCR, foram utilizados como molde para possibilitar a união dos mesmos na reação de *Overlapping* PCR. Os *primers* *pGEX\_MHP0476\_A* e *pGEX\_MHP0476\_F* foram utilizados e o volume final da reação foi de 25  $\mu$ L (Tabela 6).

**Tabela 6: Reação para o *Overlapping* PCR do gene MHP7448\_0476**

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
Água, livre de nuclease	Completar 25 $\mu$ L
<i>Primers</i>	30 pmol
<i>Buffer Pfu DNA Polymerase</i> contendo 20mM de MgSO <sub>4</sub> (Fermentas)	10X
dNTP	0,2 mM
<i>Pfu DNA Polymerase</i> (Fermentas)	1 U
Fragmento 476AB	40 fmoles
Fragmento 476CD	40 fmoles
Fragmento 476EF	40 fmoles

O gene MHP7448\_0394 possui um códon TGA, porém o nucleotídeo a ser alterado se encontra localizado próximo ao ATG. Portanto, o oligonucleotídeo utilizado para anelar na região 5' do gene já continha a mutação, amplificando o gene completo, sem a necessidade da sua fragmentação. Os *primers* *pGEX\_MHP0394\_5'* e *pGEX\_MHP0394\_3'* foram utilizados para a amplificação do gene na reação de PCR, com um volume final de 25  $\mu$ L (Tabela 4).

Como já descrito para os genes MHP7448\_0278 e MHP7448\_0476 novos *primers* foram sintetizados e utilizados nas reações de PCR, seguindo a mesma sequência de fragmentação dos genes, purificação dos fragmentos e união dos mesmos.

Para o gene MHP7448\_0278 foram gerados os fragmentos 278ABtag (*primers*: 0278\_A\_tag e pGEX\_MHP0278\_B) e 0278CDtag (pGEX\_MHP0278\_C e 0278\_D\_tag), com um volume da reação de PCR final de 25 µL (Tabela 4).

Os fragmentos do gene MHP7448\_0476 foram: 476ABtag (*primers*: 0476\_A\_tag e pGEX\_MHP0476\_B), fragmento 476CD (*primers*: pGEX\_MHP0476\_C e pGEX\_MHP0476\_D) – o mesmo utilizado na metodologia anterior e fragmento 476EFtag (*primers*: pGEX\_MHP0476\_E e 0476\_F\_tag). O volume da reação de PCR final foi de 25 µL (Tabela 4).

A reação de *Overlapping* PCR foi realizada utilizando os *primers* 0278\_A\_tag e 0278\_D\_tag para a união de MHP7448\_0278 (Tabela 5) e os *primers* 0476\_A\_tag e 0476\_F\_tag para união de MHP7448\_0476 (Tabela 6), utilizando como molde os novos fragmentos que carregam com eles uma região de similaridade muito maior com o vetor.

Todas as reações de PCR foram feitas em termociclador TC-3000 (Techne) (Tabela 7).

**Tabela 7: Condições de termociclagem para a amplificação de DNA**

	<b>MHP_0394</b>	<b>MHP_0278AB</b>	<b>MHP_0278CD</b>	<b>MHP_0278AD</b>
Desnaturação inicial	94°C por 5'	94°C por 5'	94°C por 5'	94°C por 5'
35 ciclos	94°C por 30''	94°C por 30''	94°C por 30''	94°C por 30''
	48°C por 30''	48°C por 30''	48°C por 30''	48°C por 30''
	72°C por 2'	72°C por 1'	72°C por 1'	72°C por 2'
Extensão final	72°C por 5'	72°C por 5'	72°C por 5'	72°C por 5'

	<b>MHP_0476AB</b>	<b>MHP_0476CD</b>	<b>MHP_0476EF</b>	<b>MHP_04768A F</b>
Desnaturação inicial	94°C por 5'	94°C por 5'	94°C por 5'	94°C por 5'
35 ciclos	94°C por 30''	94°C por 30''	94°C por 30''	94°C por 30''
	48°C por 30''	48°C por 30''	48°C por 30''	49°C por 30''
	72°C por 1'30''	72°C por 1'	72°C por 1'	72°C por 2'
Extensão final	72°C por 5'	72°C por 5'	72°C por 5'	72°C por 5'

### 3.6 Purificação e visualização dos fragmentos de DNA

Os fragmentos foram purificados a partir do kit PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit (Invitrogen), segundo indicações do fabricante.

Todos os produtos de PCR e clivagens foram checados em gel de agarose 0,8 – 1,2% contendo GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) na concentração de 3X. O marcador de tamanho molecular utilizado foi 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

### 3.7 Extração de DNA plasmidial

A extração de DNA plasmidial a partir de *E. coli* KC8 foi realizada em pequena escala segundo protocolo de Sambrook & Russell (2001).

A preparação do vetor pGEX 4T3 para sua utilização foi realizada transformando, por eletroporação, 100 ng do vetor em células de *E. coli* XL1-Blue eletrocompetentes, segundo protocolo de Sambrook & Russell (2001) e o seu DNA foi extraído a partir de midiprep pelo *Kit* QIAGEN Plasmid *Plus* Midi Kit (Qiagen).

### 3.8 Quantificação de DNA e proteína

A quantificação de DNA foi realizada com os *kits The Qubit® dsDNA BR Assay Kit* (Invitrogen), *The Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit* (Invitrogen) e a quantificação de proteína foi realizada pelo *kit The Qubit® Protein Assay Kit* (Invitrogen), ambas efetuadas de acordo com as instruções do fabricante. A leitura foi realizada utilizando o fluorímetro Qubit® Fluorometer (Invitrogen).

### 3.9 Clivagem e enzimas de restrição

O vetor pGEX 4T3 foi linearizado com as enzimas de restrições XhoI e EcoRI (Promega). A reação foi realizada em duas etapas, iniciando com a enzima XhoI (Promega) (Tabela 8).

**Tabela 8: Reação de clivagem com a enzima de restrição XhoI (Promega)**

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
pGEX 4T3 (DNA plasmidial)	3µg
<i>Buffer D</i> (Promega)	10X
Enzima XhoI (Promega)	50U
BSA (Promega)	0,1mg/mL
Água MILIQ	Completar 70µL

A reação foi incubada a 37°C por 2:30 hs. Com a reação concluída verificou-se se a clivagem foi eficiente (eletroforese em gel de agarose 0,8%). Confirmado o resultado se efetuou a segunda etapa, clivando o DNA com a segunda enzima de restrição EcoRI (Promega) (Tabela 9)

Tabela 9: Reação de clivagem com a enzima EcoRI (Promega)

Componente	Quantidade
Reação com a enzima XhoI	70µL
Buffer D (Promega)	10X
Enzima EcoRI (Promega)	50U
Água MILIQ	Completar 100 µL

A reação foi incubada novamente a 37°C por mais 2:30 hs. Concluída essa etapa duas unidades de SAP (Promega) foram adicionadas a reação e incubada por mais 40 min a 37°C. As enzimas foram inativadas a 65°C por 10 min. Ao final da reação confirmou-se a clivagem (eletroforese de gel de agarose 0,8%) e a purificação do vetor foi realizada a partir da precipitação do DNA com NaCl 5M, que realizou-se adicionando 2 volumes de etanol absoluto, e NaCl a uma concentração final de 5M e incubou-se por 16 hs a – 20°C. Após a incubação centrifugou-se a 13000 rpm por 10 min. Então adicionou-se 1 mL de etanol 70% e em uma nova centrifugação (13000 rpm por 3 min) recuperou-se o DNA plasmidial, e ressuspendeu-se em 70 µL de água ultrapura.

### 3.10 Clonagem por recombinação homóloga

Os genes amplificados e purificados foram clonados por recombinação homóloga *in vivo* em *E. coli* KC8 (Parrish *et al.*, 2004) no vetor pGEX 4T3 linearizado. Essa técnica se faz possível, uma vez que os fragmentos de PCR possuem uma região de homologia ao vetor, que na sua forma linear expõe essas regiões, e em condições adequadas, permite a ligação do gene de interesse à maquinaria do vetor. As células bacterianas foram transformadas obedecendo a proporção de 3:1 (para cada 50 ng de vetor, 150 ng de DNA do gene de interesse era utilizada) em 25 µL de tampão KCM 2X (200 mM KCl; 60 mM CaCl<sub>2</sub>; 100 mM MgCl<sub>2</sub>). Após choque térmico, as células foram incubadas em 500 µL de LB líquido a 37°C por 3 hs e semeadas em LB sólido com 100

$\mu\text{g/mL}$  de ampicilina e incubadas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 16 horas. As colônias formadas tiveram seu DNA plasmidial extraído e a partir da reação de PCR com *primers* específicos dos genes, além de *primers* específicos do vetor, se realizava a confirmação dos clones recombinantes.

### **3.11 Transformação dos clones recombinantes em linhagens de expressão de *E.coli***

O DNA plasmidial dos clones recombinantes confirmados foram transformados por choque térmico em cinco linhagens de expressão de *E.coli* (Tabela 1). Foram transformados  $3 \mu\text{g}$  de DNA em  $100 \mu\text{L}$  de células competentes. Elas foram incubadas em  $400 \mu\text{L}$  de LB líquido por 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$  e posteriormente semeadas em LB sólido contendo ampicilina.

### **3.12 Indução da expressão gênica**

Uma colônia de cada célula transformada, escolhida aleatoriamente, foi pré-inoculada em meio CG com  $100 \mu\text{g/mL}$  de ampicilina e cultivada a  $37^{\circ}\text{C}$  sob agitação de 200 rpm por 16 horas. Em um novo inóculo contendo 10 mL de meio CG foi adicionado 1% do pré-inóculo e cultivado a  $37^{\circ}\text{C}$  sob agitação de 200 rpm até que a  $\text{OD}_{600}$  atingisse de 0,8 a 1,0. A indução da expressão foi realizada em condições padrões: 0,1mM de IPTG a  $37^{\circ}\text{C}$  sob agitação de 200 rpm por 3 horas.

Para a análise da expressão da proteína de interesse uma alíquota de 1mL foi removida antes da indução (amostra não induzida) e outra alíquota de 1mL foi retirada após 3 hs de indução (amostra induzida). As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 min, ressuspendidas em  $75 \mu\text{L}$  de PBS 1x e adicionadas de  $25 \mu\text{L}$  de tampão de amostra 4X de eletroforese com  $\beta$ -

mercaptoetanol (125 mM Tris-HCl; 0,02% azul de bromofenol; 4% SDS; 40% glicerol; 400 mM  $\beta$ -mercaptoetanol).

As amostras então foram fervidas à 100°C por 5 min e posteriormente 5  $\mu$ L das amostras foram analisadas em gel de SDS-PAGE 12%.

### **3.13 Teste de solubilidade**

Para avaliar a solubilidade das proteínas recombinantes as induções foram realizadas em 100 mL de cultivo em meio líquido CG nas condições padrões (0,1mM de IPTG a 37°C sob agitação de 200 rpm por 3 horas). Após a indução as células foram centrifugadas a 7 krpm por 10 min e ressuspensas em 10 mL de PBS 1X. As células foram lisadas por ultra-som através de sonificador, efetuando-se de 6 a 10 pulsos de 30 s com amplitude de 60%. Após a lise, adicionou-se Triton X-100 20% (v/v) para a concentração final de 1% e se incubou por 30 min sob agitação. As células foram centrifugadas a 10000 g por 30 min. Uma alíquota do sobrenadante (fração solúvel) foi retirada (50  $\mu$ L) e adicionado 25  $\mu$ L de tampão de amostra 4X. O *pellet* (fração insolúvel) foi ressuspensado em 10 mL de PBS e uma alíquota foi também removida da mesma forma do sobrenadante. As amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE 12%

### **3.14 Purificação das proteínas recombinantes fusionadas a GST**

A purificação da proteína recombinante se baseia no fato dela estar fusionada à GST (Glutathione S-transferase), que através de cromatografia de afinidade em resina de glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare), permite sua purificação, uma vez que a resina possui alta afinidade por GST, desse modo a proteína de interesse se liga a resina e as demais podem ser eliminadas.

A fração solúvel do extrato celular, obtida a partir de 1 litro de cultivo, foi incubada com 2 mL de resina glutationa Sepharose 4B, sob agitação a 4°C por 16 horas. A resina foi então recuperada por centrifugação e assentada em uma coluna para cromatografia (Bio-Rad). Para que a proteína de interesse fosse liberada da resina realizou-se a clivagem com trombina. Para cada 1mL da resina foi adicionado 1 mL de tampão de clivagem contendo 1 U de trombina. A clivagem ocorreu durante 16 horas em temperatura de 20-24°C. Após a reação, cinco eluições da clivagem foram recuperadas.

A reutilização da coluna é possível e viável, sendo necessário, para isso, a remoção da GST ligada a ela, além de outras ligações inespecíficas. Essa remoção é feita com um tampão de glutaciona reduzida que para cada volume da coluna um volume de tampão de glutaciona reduzida (20 mM Glutaciona reduzida; 50 mM Tris-HCl – pH 8,0) é adicionado e incubado por 30 min a temperatura ambiente. Cinco eluições após tratamento com glutaciona reduzida foram recuperadas para posterior análise.

Alíquotas durante a purificação foram retiradas nas seguintes condições: i) fração solúvel do extrato celular após a ligação com a resina, ii) a resina após a ligação, iii) a resina após a clivagem com trombina, iv) a resina após o tratamento com a solução de glutaciona reduzida e v) as frações de eluições, após a clivagem com trombina e tratamento com resina de glutaciona. As alíquotas foram analisadas em SDS-PAGE 12%.

### **3.15 Gel SDS-PAGE**

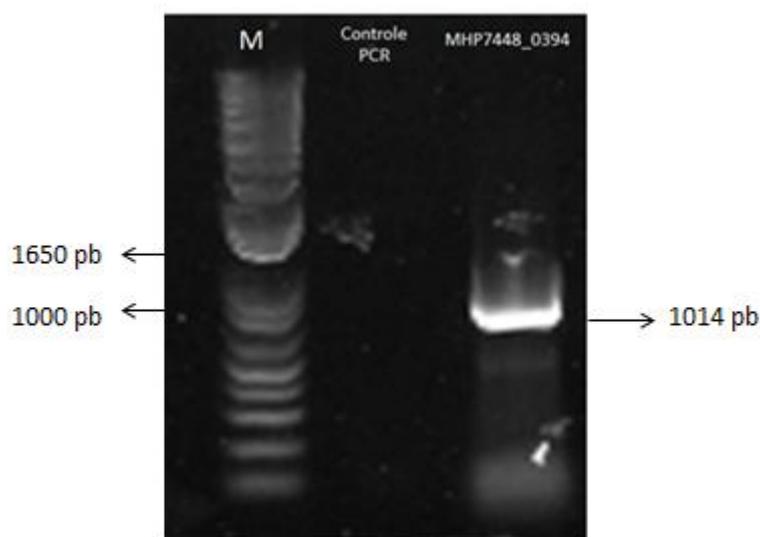
As proteínas foram resolvidas em gel de SDS-PAGE em eletroforese de cubas verticais (Bio-Rad). O tampão utilizado na migração do gel foi Tris-glicina/SDS (25 mM Tris; 250 mM glicina; 0,1 % SDS - pH 8,3) e a corrida ocorreu em voltagem constante de 100 v. O marcador de massa molecular utilizado foi LMW-SDS *Marker Kit* (GE Healthcare) e 5µL das amostras foram aplicadas no gel.

Após a corrida o gel foi corado com coomassie coloidal G250 (1,6% ácido ortofosfórico; 8% sulfato de amônio; 0,08% coomassie brilliant blue G-250; 20% metanol), que permite a visualização das proteínas sendo a incubação com o corante realizada sob agitação por 16 horas. A remoção do excesso de corante foi feita com ácido acético 5% sob agitação por 1 hora.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Amplificações dos genes e mutações sítio-dirigidas

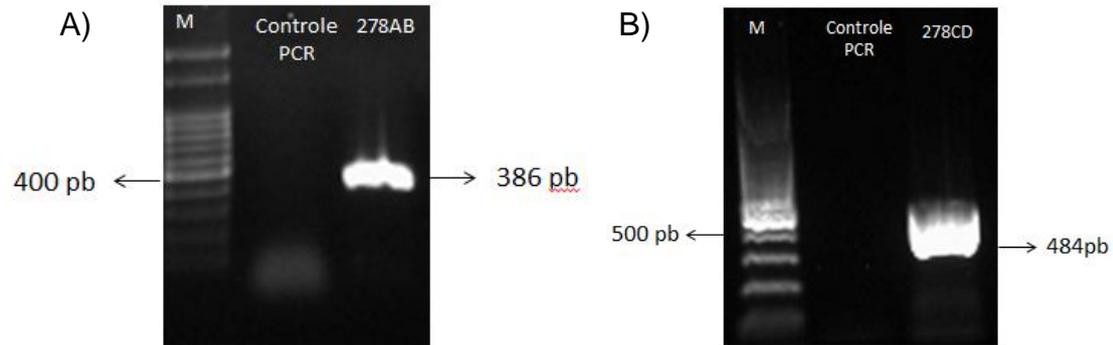
O gene MHP7448\_0394 (Nicotinamida fosforribosiltransferase) foi eficientemente amplificado a partir do DNA genômico de *M. hyopneumoniae* 7448 com o emprego da metodologia de PCR. A amplificação deste gene gerou um produto de 1014 pb (Figura 3).



**Figura 3. Amplificação do gene MHP7448\_0394.**

Visualização através de eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação do gene MHP7448\_0394 por PCR, gerando um produto de 1014 pb. M: marcador de tamanho molecular

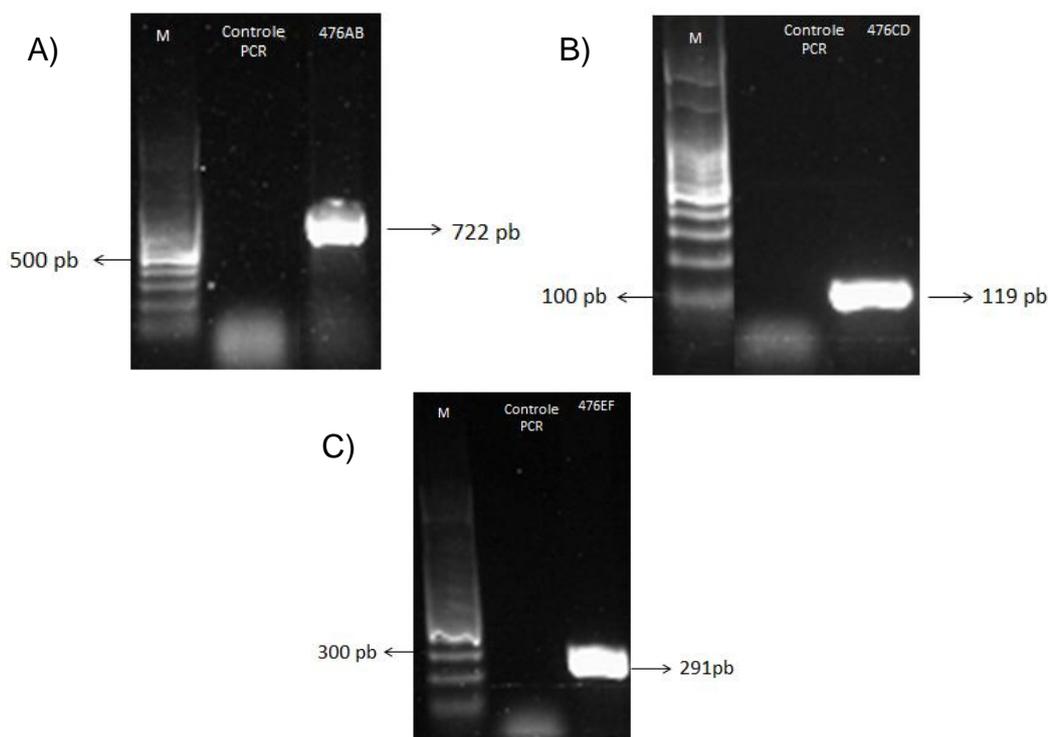
A proteína hipotética MHP7448\_0278 possui 281 aminoácidos, sendo um deles triptofano, codificado pelo códon TGA. Para possibilitar a expressão heteróloga dessa proteína em *E. coli* o códon TGA teve de ser substituído para TGG, a partir de *primers* mutagênicos contendo a substituição (A → G). Para tal, o gene foi dividido em duas partes: fragmento 278AB (386 pb) e fragmento 278CD (484 pb), amplificados eficientemente a partir de DNA genômico de *M. hyopneumoniae* 7448 (Figura 4).



**Figura 4. Mutagênese sítio-dirigida do gene MHP7448\_0278.**

Visualização através de eletroforese em gel de agarose 1,2% da amplificação dos fragmentos do gene MHP7448\_00278 por PCR, gerando o fragmento 278AB de 386 pb (A) e o fragmento 278CD de 484 pb (B) . M: marcador de tamanho molecular

A proteína MHP7448\_0476 (possível NadD) possui 361 aminoácidos e entre eles existem dois triptofanos. As duas substituições (A→G), alterando os códonos TGG para TGA, foram realizadas, gerando 3 partes distintas do gene: fragmento 476AB (722 pb), fragmento 476CD (119 pb), fragmento 476EF (291 pb), amplificados com sucesso a partir da técnica de PCR (Figura 5). Os fragmentos foram purificados e utilizados como molde na reação de *Overlapping PCR*.

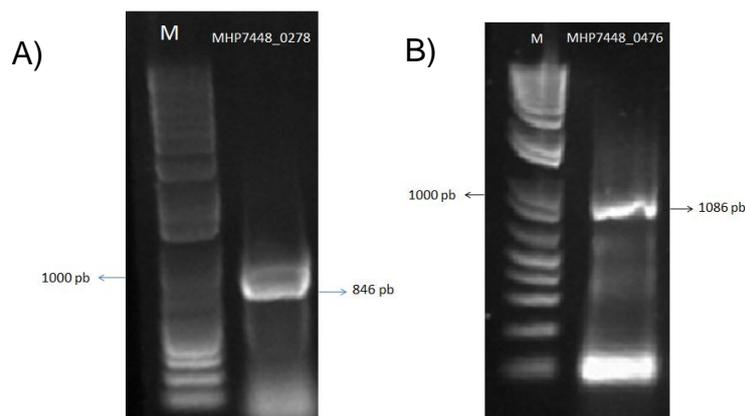


**Figura 5. Mutagênese sítio-dirigida do gene MHP7448\_0476.**

Visualização através de eletroforese em gel de agarose 1,2% da amplificação dos fragmentos do gene MHP7448\_0476 por PCR, gerando o fragmento 476AB de 722 pb (A), o fragmento 476CD de 119 pb (B) e o fragmento 476EF de 291 pb (C). M: marcador de tamanho molecular.

## 4.2 *Overlapping* PCR

Os fragmentos gerados pela mutação sítio-dirigida do gene que codifica a proteína hipotética MHP7448\_0278 possuem 23 nucleotídeos de complementariedade, que durante a reação de *Overlapping* PCR, se anelam e a DNA polimerase sintetiza a sequência nucleotídica do gene completa. A amplificação foi eficientemente realizada e o produto da reação de 846 pb foi visualizado (Figura 6A). O gene MHP7448\_0476 (possível *nadD*) possui duas regiões de complementariedade, uma com 22 nucleotídeos de similaridade e outra com 23, que da mesma forma, se uniram de maneira eficaz, através da reação de PCR, e gerando um produto de 1086 pb correspondendo ao gene íntegro (Figura 6B). As sequências gênicas foram purificadas e utilizadas na clonagem por recombinação homóloga.



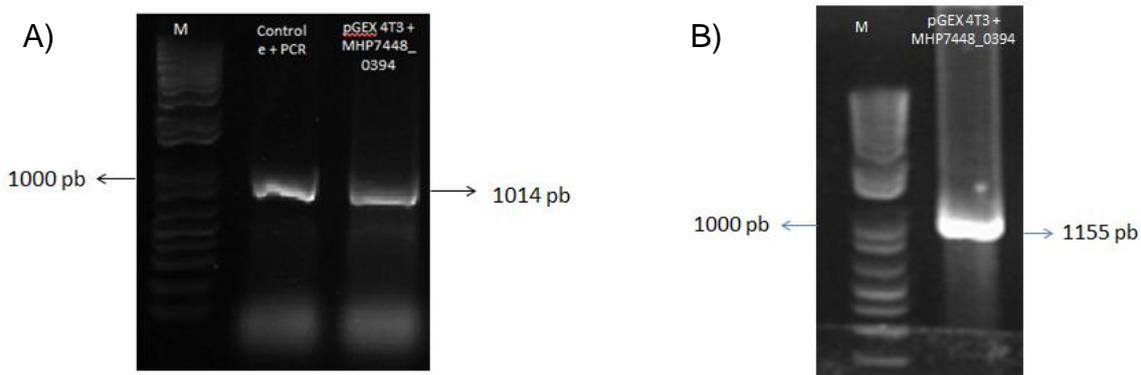
**Figura 6. *Overlapping* PCR dos genes MHP7448\_0278 e MHP7448\_0476.**

Visualização através de eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação do gene completo MHP7448\_0278 com 846 pb (A), e do gene MHP7448\_0476 de 1086 pb (B) M: marcador de tamanho molecular.

#### **4.3 Clonagem por recombinação homóloga e o uso de *primers* com maior região de homologia**

Tendo as sequências genicas passíveis de serem clonadas no vetor de expressão, se realizou a clonagem por recombinação homóloga.

Para o gene codificador da proteína MHP7448\_0394 (Nicotinamida fosforribosiltransferase) uma colônia foi obtida e confirmada ser recombinante com a metodologia de PCR a partir do emprego de *primers* específicos do gene e *primers* específicos do vetor pGEX 4T3. A reação mostrou um produto de 1014 pb e 1155 pb, respectivamente, tamanho do gene de interesse, representando a sua inserção no vetor pGEX 4T3 (Figura 7).

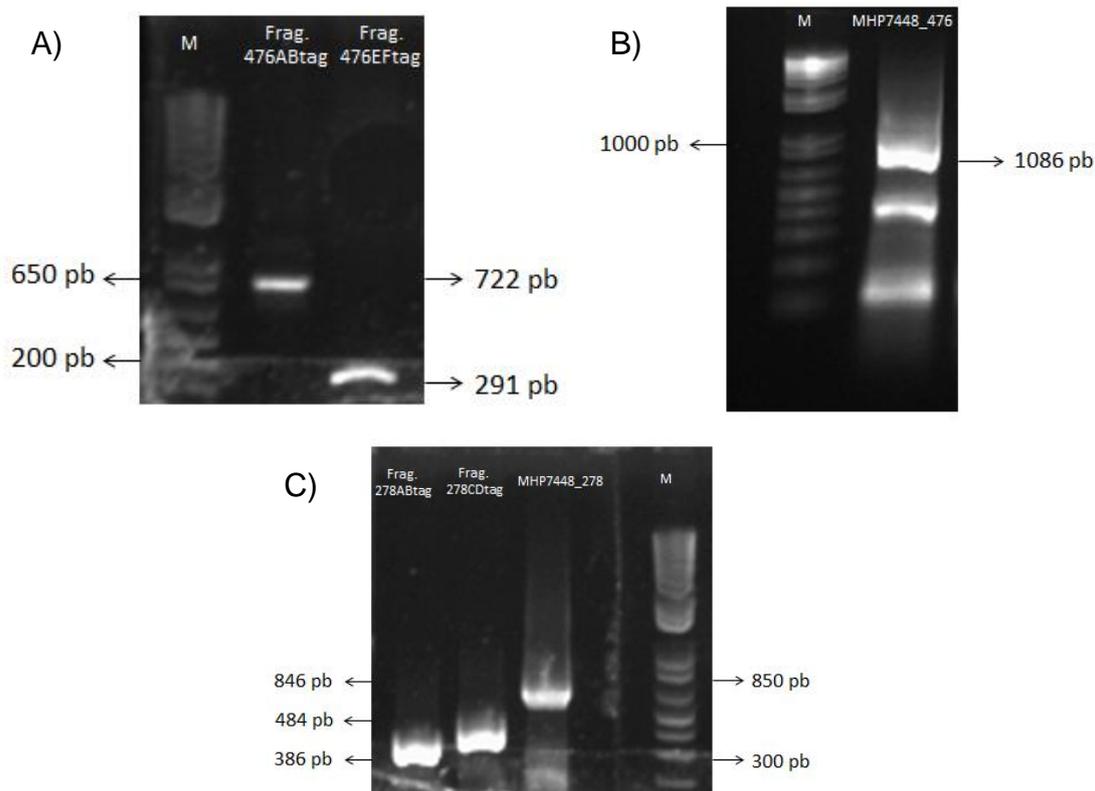


**Figura 7: Confirmação da clonagem do gene MHP7448\_0394 por recombinação homóloga no vetor de expressão pGEX 4T3.**

Amplificação da banda de 1014 pb correspondente ao tamanho do gene confirma que a colônia obtida é recombinante e contém o gene MHP7448\_0394 (utilização de *primers* específicos do gene) (A) e a banda de 1155 pb confirma a partir de *primers* específicos do vetor que a inserção ocorreu, possuindo alguns nucleotídeos do próprio pGEX 4T3 (B). Visualização através de uma eletroforese em gel de agarose 0,8%. M: marcador de tamanho molecular.

Para os genes codificantes da proteína MHP7448\_0278 (hipotética) e MHP7448\_0476 (possível NadD) nenhuma colônia transformante ou recombinante foi obtida, mesmo após inúmeras tentativas.

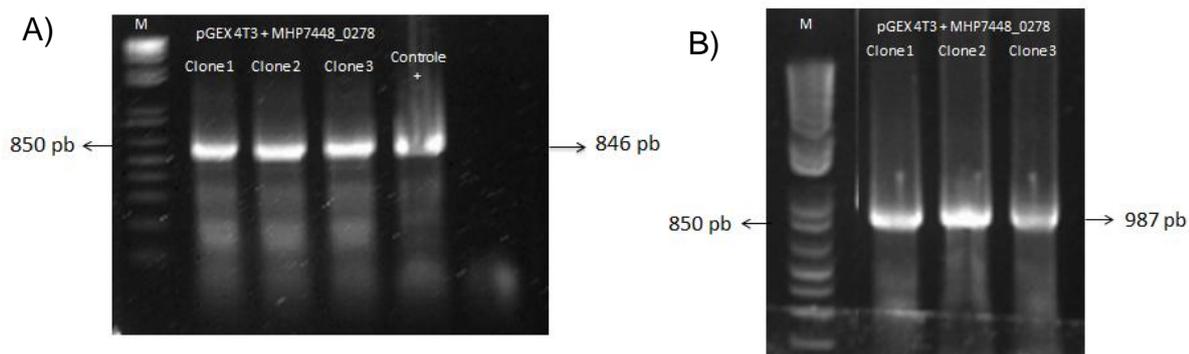
Com o objetivo de solucionar essa problemática, novos *primers* externos foram sintetizados para os genes MHP7448\_0278 e MHP7448\_0476 possuindo 40 nucleotídeos de homologia ao vetor. Aumentando a área possível de recombinação, aumenta-se a probabilidade que haja o anelamento das bases e a inserção do gene, através da recombinação. Os genes foram amplificados com eficiência da mesma maneira que na metodologia anterior (Figura 8) e uma nova clonagem foi realizada.



**Figura 8. Amplificação dos fragmentos e *Overlapping* PCR com a utilização de novos *primers* com região de homologia maior ao vetor.**

Visualização através de eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação dos fragmentos do gene MHP7448\_0476 por PCR, gerando o fragmento 476ABtag de 722 pb e 476Eftag de 291 pb (A), *Overlapping* PCR com novos fragmentos do gene MHP7448\_0476, gerando um produto de 1086 pb (gene completo) (B) e a amplificação dos fragmentos 278ABtag com 386 pb, 278CDtag com 484 pb e a junção desses fragmentos gerando o gene completo MHP7448\_0278 com 846 pb (C). M: marcador de tamanho molecular.

Com o emprego da nova metodologia, obteve-se maior eficiência na recombinação, uma vez que na primeira tentativa obteve-se para o gene MHP7448\_0278 (proteína hipotética) três colônias transformantes, onde as três foram confirmadas por PCR com *primers* específicos do gene com a amplificação de um produto de 846 pb (Figura 9A), correspondente ao tamanho do gene. Na reação de PCR de confirmação com o emprego de *primers* específicos do vetor houve a amplificação de uma banda de 987 pb (Figura 9B), assegurando a inserção do gene no vetor pGEX 4T3.



**Figura 9. Confirmação da clonagem do gene MHP7448\_0278 por recombinação homóloga no vetor de expressão pGEX 4T3.**

Amplificação da banda de 846 pb correspondente ao tamanho do gene confirma que as colônias obtidas são recombinantes e contém o gene MHP7448\_0394 (utilização de *primers* específicos do gene) (A) e a banda de 987 pb confirma a partir de *primers* específicos do vetor que a inserção ocorreu, possuindo alguns nucleotídeos do próprio pGEX 4T3 (B). Visualização através de uma eletroforese em gel de agarose 0,8%. M: marcador de tamanho molecular.

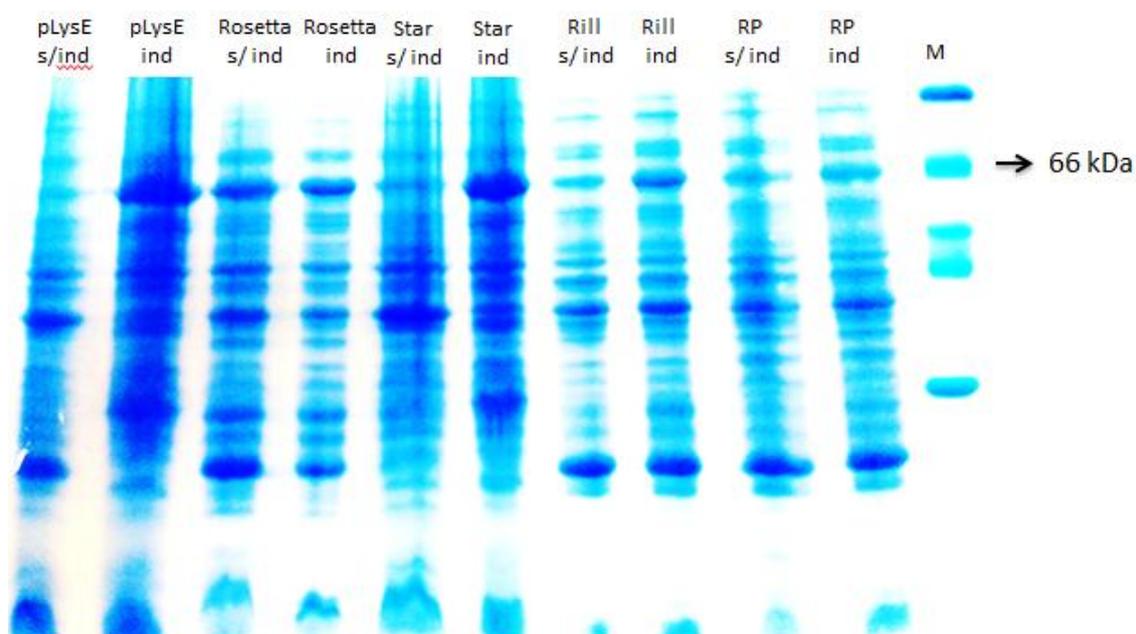
Entretanto para o gene MHP7446\_0476 (possível NadD), mesmo com a alteração da metodologia, ainda não se obtiveram colônias recombinantes, após algumas tentativas.

#### 4.4 Expressão das proteínas recombinantes

Com a construção do vetor de expressão mais o gene de interesse (pGEX 4T3+MHP7448\_0394 e pGEX 4T3+MHP7448\_0278) se iniciaram ensaios da indução da proteína a fim de se estabelecer o melhor resultado com a maior expressão da proteína e na sua presença na forma solúvel do extrato celular. Primeiramente o clone recombinante da proteína MHP74478\_0394 foi transformada com sucesso em cinco linhagens de expressão de *E.coli* (Tabela 1).

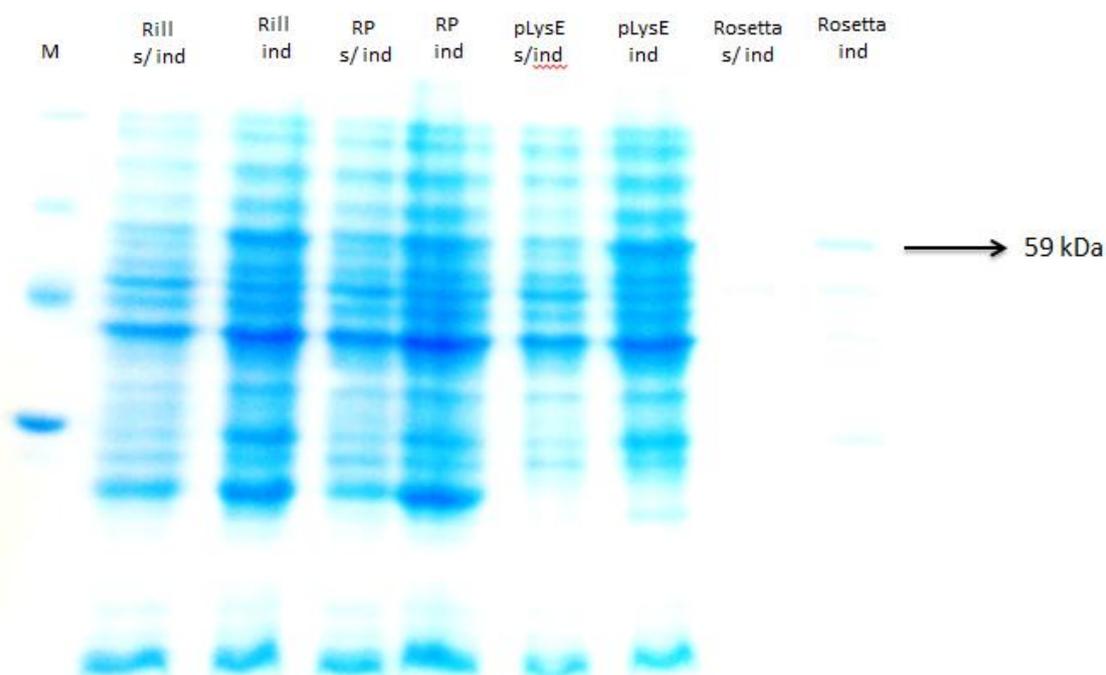
Com as linhagens bacterianas contendo o vetor de expressão realizou-se a indução da expressão em condições padrões com a adição 0,1 mM de IPTG por 3 horas a 37°C. Com esse ensaio inicial analisaram-se as linhagens que melhor expressam a proteína MHP7448\_0394. A indução desta proteína parece ter sido mais eficiente nas linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) pLysE e *E.*

*coli* BL21 (DE3) Star (Figura10). O mesmo teste foi realizado para a proteína hipotética MHP7448\_0278 e as melhores cepas de expressão foram *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus Rill e *E. coli* BL21 (DE3) pLysE (Figura 11).



**Figura 10. Ensaio da expressão com diferentes linhagens bacterianas do gene MHP7448\_0394.**

É possível perceber que a linhagem *E. coli* BL21 (DE3) Star e *E. coli* BL21 (DE3) pLysE apresentam uma expressão relativamente maior que as demais células. Ind: indução da expressão. s/ind: células sem indução da expressão. Rill: *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus Rill. RP: *E. coli* BL21 (DE3) RP. Rosetta: *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta. Star: *E. coli* BL21 (DE3) Star. pLysE: *E. coli* BL21 (DE3) pLysE. Proteína de interesse com peso molecular de 64 kDa. Visualização em gel SDS-PAGE 12%. M: marcado de peso molecular



**Figura 11. Ensaio da expressão com diferentes linhagens bacterianas do gene MHP7448\_0278.**

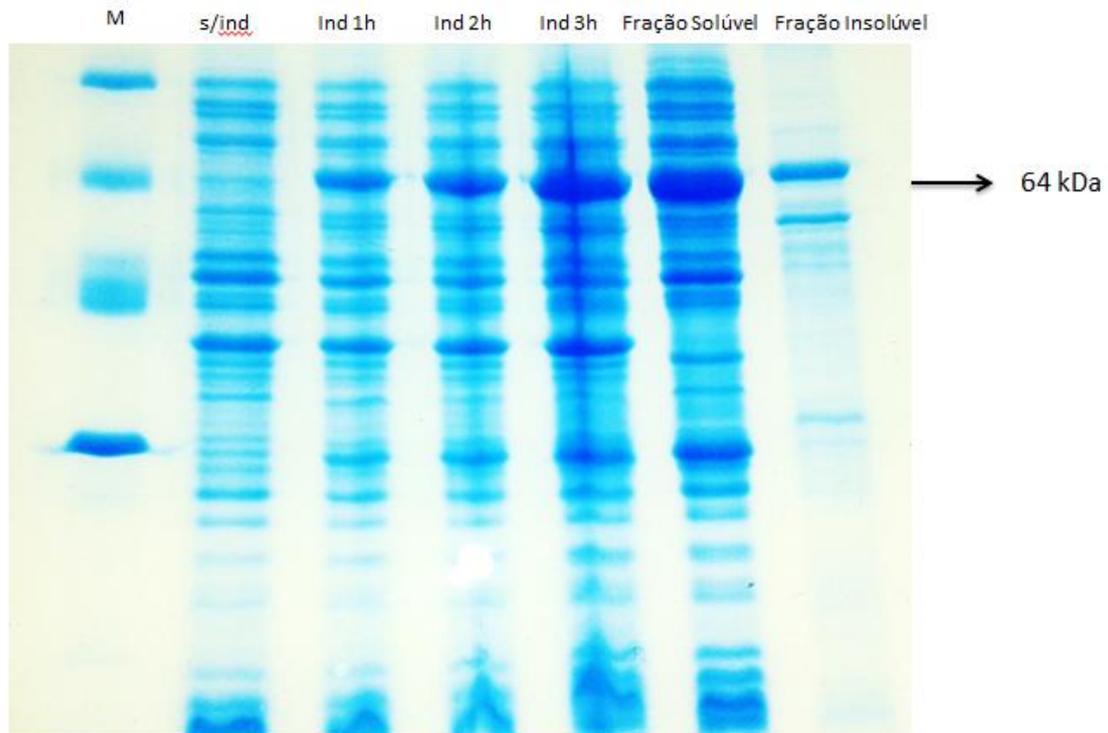
É possível perceber que a linhagem *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus Rill e *E. coli* BL21 (DE3) pLysE apresentam uma expressão relativamente maior que as demais células. Ind: indução da expressão. s/ind: células sem indução da expressão. Rill: *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus Rill. RP: *E. coli* BL21 (DE3) RP. Rosetta: *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta. Star: *E. coli* BL21 (DE3) Star. pLysE: *E. coli* BL21 (DE3) pLysE Proteína de interesse com peso molecular de 59 kDa. Visualização em gel SDS-PAGE 12%. M: marcado de peso molecular

#### 4.5 Teste de solubilidade

As duas melhores cepas que propiciaram a expressão da proteína MHP7448\_0394 (*E. coli* BL21 (DE3) pLysE e *E. coli* BL21 (DE3) Star) foram selecionadas para o teste de solubilidade. As células bacterianas foram induzidas em condições padrões de indução (0,1 mM de IPTG por 3 horas a 37°C). Após a indução, as células foram lisadas, por meio de sonicação e as frações solúvel e insolúvel analisadas. Diferentes tempos de indução (1h, 2h e 3h) foram também analisados.

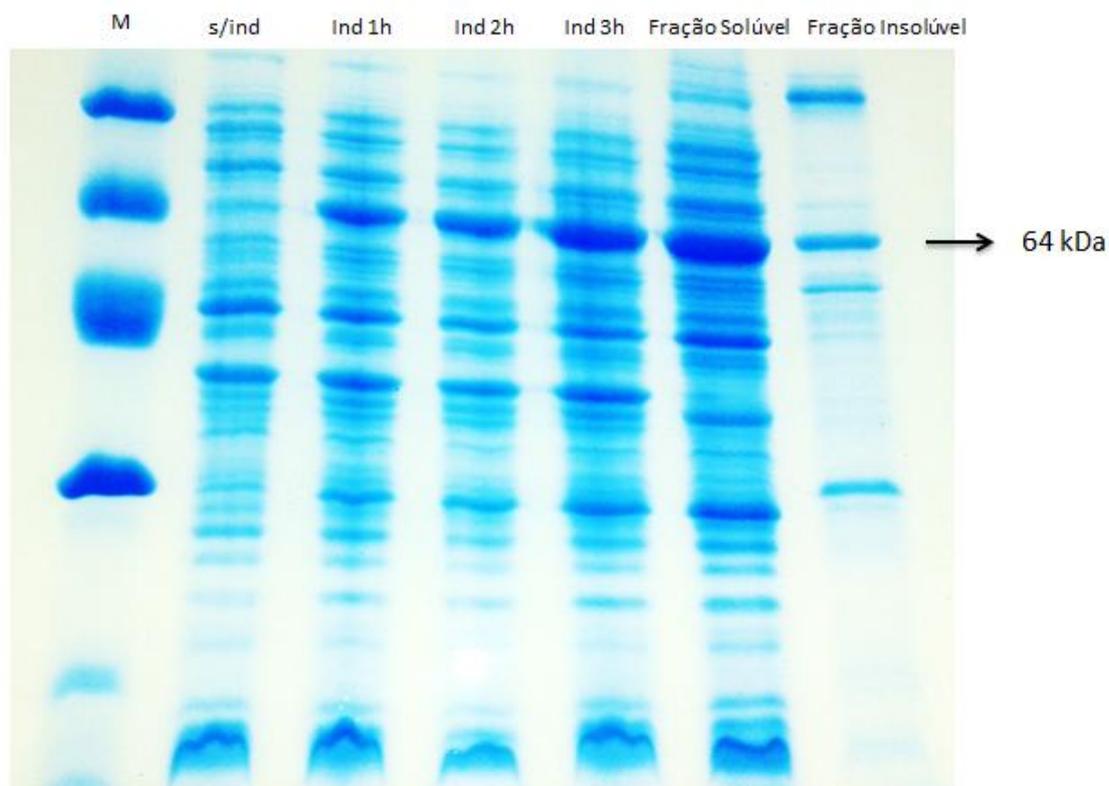
Ambas as linhagens mostraram a grande maioria da proteína na fração solúvel e em rendimento similar (Figura 12 e 13), porém a cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysE mostrou um leve rendimento superior, e por esse motivo, ela foi

selecionada para realizar a purificação da proteína. O melhor tempo de expressão foi de 3 horas para as duas linhagens testadas.



**Figura 12. Teste de solubilidade da proteína MHP7448\_0394 com a linhagem *E. coli* BL21 (DE3) pLysE.**

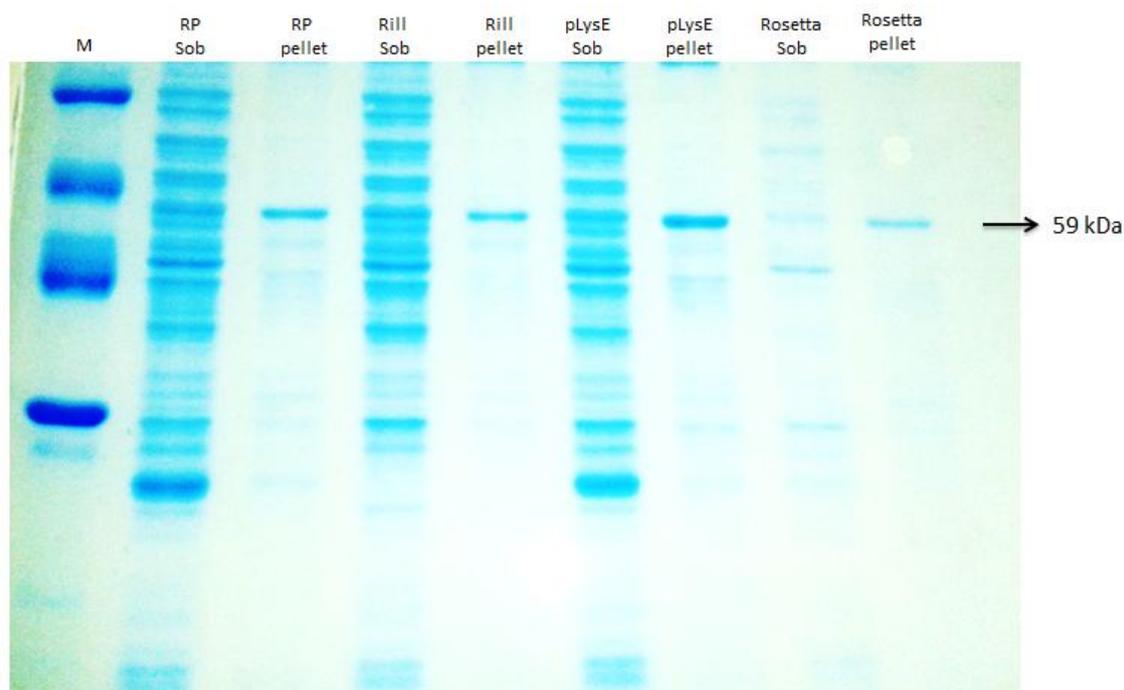
Pode-se perceber que o melhor tempo de indução da expressão acontece ao final de 3 horas e que a grande maioria da proteína encontra-se na sua forma solúvel. Ind: indução da expressão. s/ind: células sem indução da expressão. Proteína de interesse com peso molecular de 64 kDa. Visualização em gel SDS-PAGE 12%. M: marcado de peso molecular



**Figura 13. Teste de solubilidade da proteína MHP7448\_0394 com a linhagem *E. coli* BL21 (DE3) Star.**

Pode-se perceber que o melhor tempo de indução da expressão acontece ao final de 3 horas e que a grande maioria da proteína encontra-se na sua forma solúvel. Ind: indução da expressão. s/ind: células sem indução da expressão. Proteína de interesse com peso molecular de 64 kDa. Visualização em gel SDS-PAGE 12%. M: marcado de peso molecular

O mesmo teste de solubilidade foi realizado com a proteína hipotética MHP7448\_0278 com todas as linhagens de indução, mas apesar de algumas linhagens mostrarem expressão relativa maior, a diferença não foi tão significativa. O resultado do teste mostrou que em condições padrões de indução (0,1 mM de IPTG por 3 horas a 37°C) todas as linhagens mostraram a proteína na sua fração insolúvel (Figura 14)

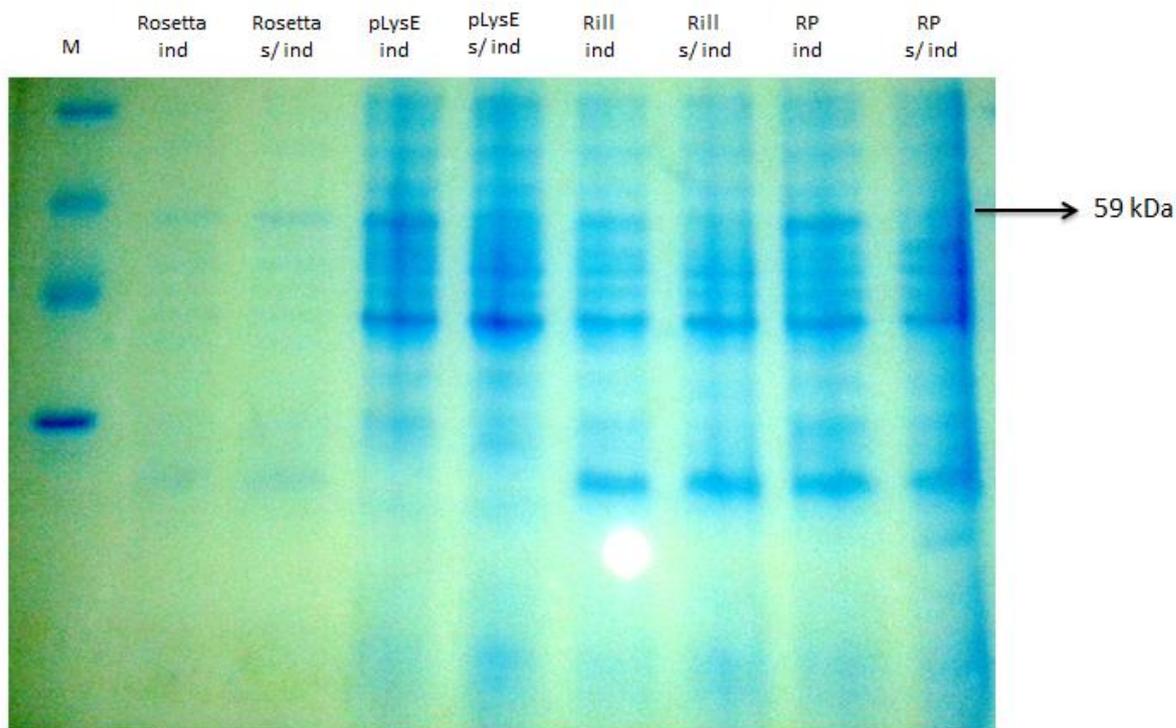


**Figura 14. Teste de solubilidade para a proteína hipotética MHP7448\_0278 em condições padrões de indução.**

Nota-se que em todas as linhagens testadas a proteína de interesse encontra-se na fração insolúvel (*pellet*) Ind: indução da expressão. s/ind: células sem indução da expressão. Sob: sobrenadante (fração solúvel). *Pellet* (fração insolúvel). Rill: *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus Rill. RP: *E. coli* BL21 (DE3) RP. Rosetta: *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta. Star: *E. coli* BL21 (DE3) Star. pLysE: *E. coli* BL21 (DE3) pLysE Proteína de interesse com peso molecular de 59 kDa. Visualização em gel SDS-PAGE 12%. M: marcado de peso molecular

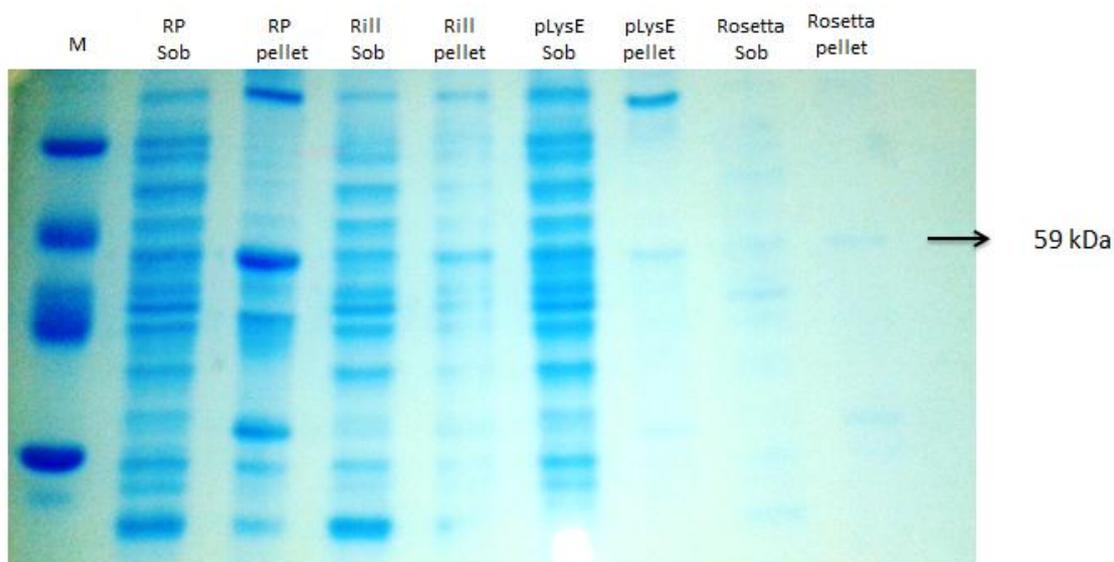
Tendo em vista que a proteína recombinante permaneceu no *pellet* (fração insolúvel) em condições padrões de indução, um novo teste de solubilidade foi realizado, alterando a temperatura de indução para 28°C e mantendo os demais parâmetros: 3 horas de indução e concentração de 0,1 mM de IPTG.

Utilizando a temperatura de 28°C, percebeu-se que a expressão da proteína MHP7448\_0278 diminuiu (Figura 15) e o teste de solubilidade não mostrou diferença (Figura 16), estando ainda a proteína na fração insolúvel.



**Figura 15. Ensaio da expressão da proteína do gene MHP7448\_0278 a 28°C.**

É possível perceber uma diminuição na expressão da proteína se comparada à temperatura de indução de 37°C. Ind: indução da expressão. s/ind: células sem indução da expressão. Rill: *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus Rill. RP: *E. coli* BL21 (DE3) RP. Rosetta: *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta. Star: *E. coli* BL21 (DE3) Star. pLysE: *E. coli* BL21 (DE3) pLysE. Proteína de interesse com peso molecular de 59 kDa. Visualização em gel SDS-PAGE 12%. M: marcado de peso molecular

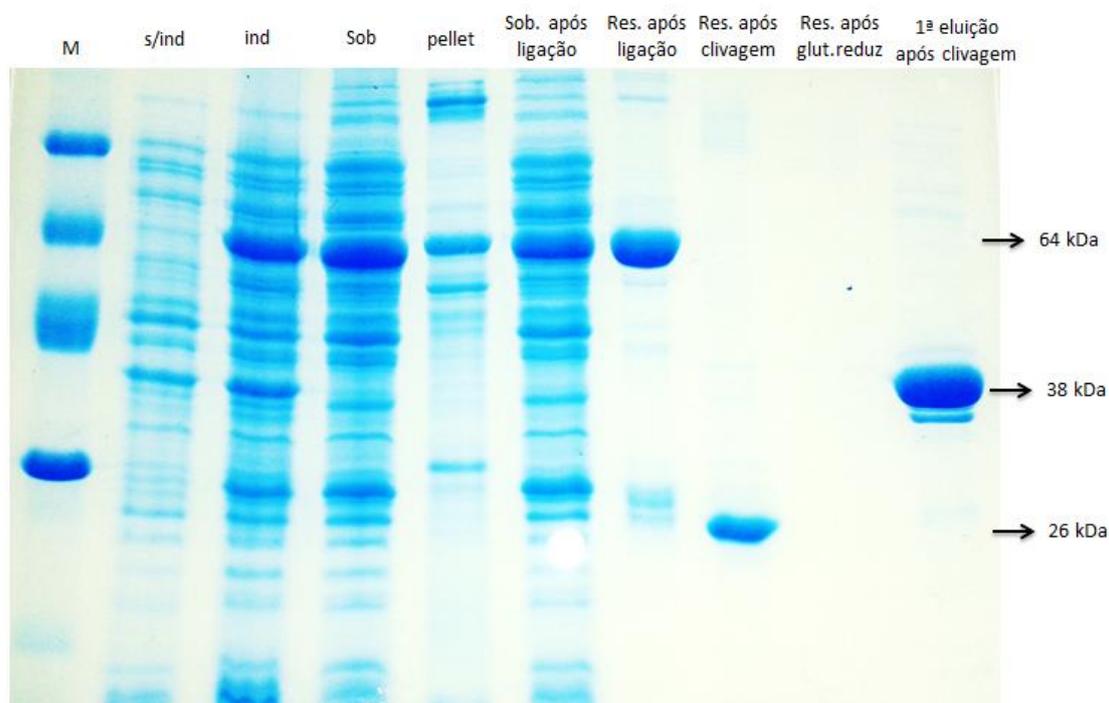


**Figura 16. Teste de solubilidade para a proteína hipotética MHP7448\_0278 a 28°C.**

Nota-se que em todas as linhagens testadas a proteína de interesse encontra-se ainda na fração insolúvel (*pellet*), sem alteração comparada à temperatura de 37°C. Sob: sobrenadante (fração solúvel). *Pellet* (fração insolúvel). Rill: *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus Rill. RP: *E. coli* BL21 (DE3) RP. Rosetta: *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta. Star: *E. coli* BL21 (DE3) Star. pLysE: *E. coli* BL21 (DE3) pLysE. Proteína de interesse com peso molecular de 59 kDa. Visualização em gel SDS-PAGE 12%. M: marcado de peso molecular.

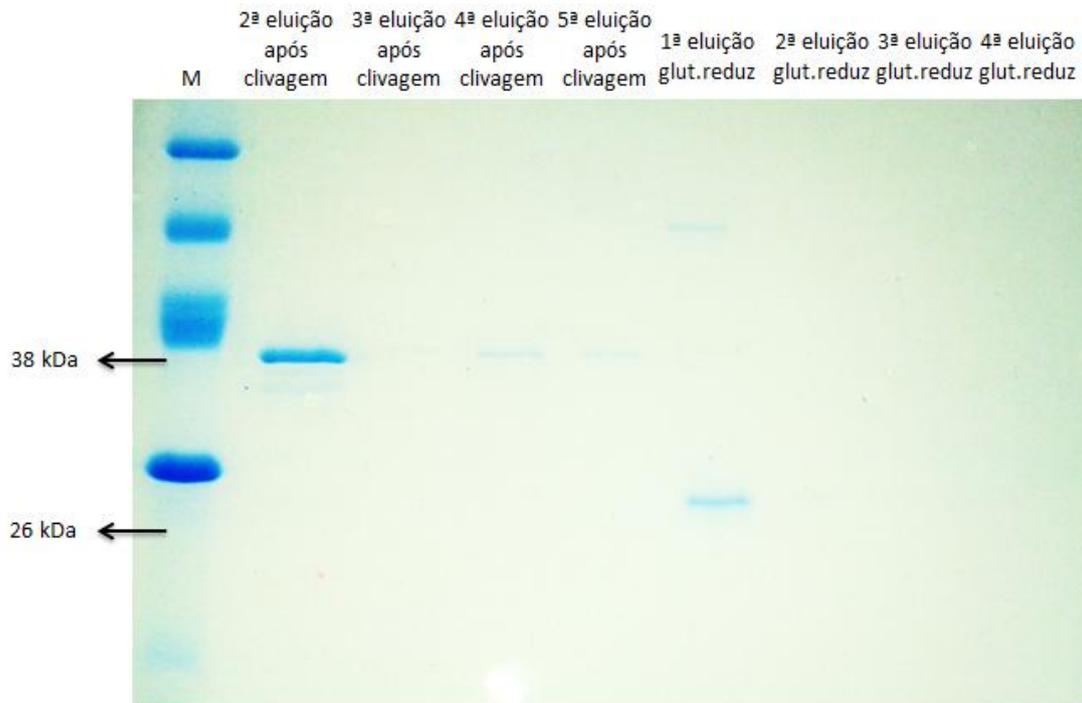
#### 4.6 Purificação da proteína recombinante

A purificação da proteína MHP7448\_0394 foi realizada por meio da sua fusão a GST (Glutathione S-Transferase), adquirida através da utilização do plasmídeo pGEX 4T3 como vetor da expressão. A GST possui alta afinidade pela resina sepharose 4B e por meio desta, realizou-se a purificação por cromatografia de afinidade. A resina foi incubada com a fração solúvel do extrato celular para que a proteína MHP7448\_0394, carregando a GST, se ligasse a ela. Após a ligação, a GST foi clivada com trombina e a proteína de interesse (MHP7448\_0394) foi liberada e recuperada em cinco frações de eluição com tampão PBS 1X (Figura 17). Para a remoção da GST ligada à resina, um tratamento com tampão de glutathione reduzida foi realizado e a GST foi recuperada também em cinco etapas de eluições com tampão PBS 1X (Figura 18). A proteína purificada foi quantificada através do fluorímetro *Qubit* que apresentou um ótimo rendimento de 5 $\mu$ g/ $\mu$ L em um total de 2 mL.



**Figura 17. Purificação da proteína MHP7448\_0394.**

Controle de todas as etapas da purificação da proteína. Ind: indução da expressão. s/ind: células sem indução da expressão. Sob: sobrenadante (fração solúvel). Res: Resina. Glut.reduz: glutathione reduzida. Proteína de interesse (sem GST) com peso molecular de 38 kDa, GST+MHP7448\_0394 com 64 kDa e GST (sozinha) com peso molecular de 26 kDa. Visualização em gel SDS-PAGE 12%. M: marcado de peso molecular.



**Figura 18. Purificação da proteína MHP7448\_0394 (eluições).**

Etapas das eluições após clivagem com trombina e tratamento com glutathione reduzida. Proteína de interesse (sem GST) com peso molecular de 38 kDa e a GST com tamanho de 26 kDa, glut.reduz: glutathione reduzida. Visualização em gel SDS-PAGE 12%. M: marcado de peso molecular

## 5. DISCUSSÃO

Desde o isolamento dos primeiros organismos identificados como micoplasmas vem se buscando elucidar os mecanismos pelos quais esse microrganismo se multiplica, realiza suas funções vitais de replicação, transcrição e tradução, bem como os processos metabólicos que o compreendem, além dos mecanismos de patogenicidade e infecção ao hospedeiro, quando patogênicos.

Esse trabalho normalmente não é fácil, uma vez que micoplasmas possuem um crescimento *in vitro* bastante fastidioso e dependendo da espécie nem se quer consegue-se cultivá-lo, o que dificulta bastante o processo, tornando-o lento e trabalhoso. A espécie *M. hyopneumoniae* pode ser cultivada *in vitro*, porém requer inúmeros suplementos e demanda certo tempo para sua multiplicação (Razin *et al*, 1998). Apesar de todas essas dificuldades, muitos avanços vêm ocorrendo na caracterização dessas bactérias, principalmente com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e ferramentas de bioinformática. Os métodos computacionais possibilitam através de comparações entre organismos, por exemplo, a predição de funcionalidade de proteínas, um trabalho antes somente realizado experimentalmente, que com a utilização de *softwares* reduz gastos e economiza tempo. Embora haja essa facilidade, é fundamental, a partir dos resultados obtidos por bioinformática, a análise com utilização de métodos tradicionais de biologia molecular para a caracterização completa do estudo realizado.

Sabe-se que são limitadas as vias metabólicas de organismos como micoplasmas, bem como as rotas de biossíntese de metabólitos, sendo um dos principais motivos da vida parasitária dessa bactéria. Embora limitadas, essas rotas não são inexistentes e um dos pontos chaves na compreensão das mesmas é realmente saber quais vias de metabolização realmente existem e como elas atuam no organismo.

Baseado nessa questão Fonsêca *et al.* (2012) realizou um estudo com o objetivo de caracterizar, a partir de modelagem comparativa, várias proteínas anotadas como hipotéticas, sem uma caracterização funcional definida, em *M. hyopneumoniae*. Ao final de várias etapas de modelagem cinco proteínas

hipotéticas foram caracterizadas, sendo três delas envolvendo processos metabólicos e duas envolvendo processos transcricionais.

Como já descrito, com a ausência de conhecimento em rotas metabólicas essenciais em *M. hyopneumoniae*, selecionaram-se as três proteínas envolvidas nesse processo (YP\_287866, YP\_287786, YP\_287675), para um exame experimental.

Fonsêca *et al.* (2012) obteve como resultado em sua análise por meio de ferramentas de bioinformática, que a proteína YP\_287866, codificada pelo gene MHP7448\_0476 de *M. hyopneumoniae*, mostrou similaridade com a enzima ácido nicotínico mononucleotídeo adeniltransferase - NadD de *Staphylococcus aureus*. A proteína YP\_287786, codificada pelo gene MHP7448\_0394 mostrou melhor similaridade com a enzima ácido nicotínico fosforribosiltransferase (NAPRTase) de *Thremoplasma acidophilum*. A terceira proteína analisada, YP\_287675, codificada pelo gene MHP7448\_0278, mostrou similaridade com a enzima FAD sintetase de *Thermotoga marítima*.

Entre espécies a rota de biossíntese de NAD pode variar, mas as enzimas envolvidas nessas vias são geralmente: ácido nicotínico fosforribosiltransferase (NAPRTase), ácido nicotínico mononucleotídeo adeniltransferase (NaMNAT ou NadD) e NAD sintetase (NadE). Essas enzimas são codificadas pelos genes conservados: *pncB*, *nadD* e *nadE*, respectivamente e somente *nadE* está anotada no genoma de *M. hyopneumoniae*. Enzimas envolvidas na biossíntese de NAD são consideradas alvos de drogas, pois são essenciais para a viabilidade da maioria das bactérias.

A biossíntese de FAD em procariotos envolve, em geral, proteínas bifuncionais, pertencentes à família de FAD sintetase que catalisa tanto a fosforilação de riboflavina quanto a adenilação do mononucleotídeo flavina.

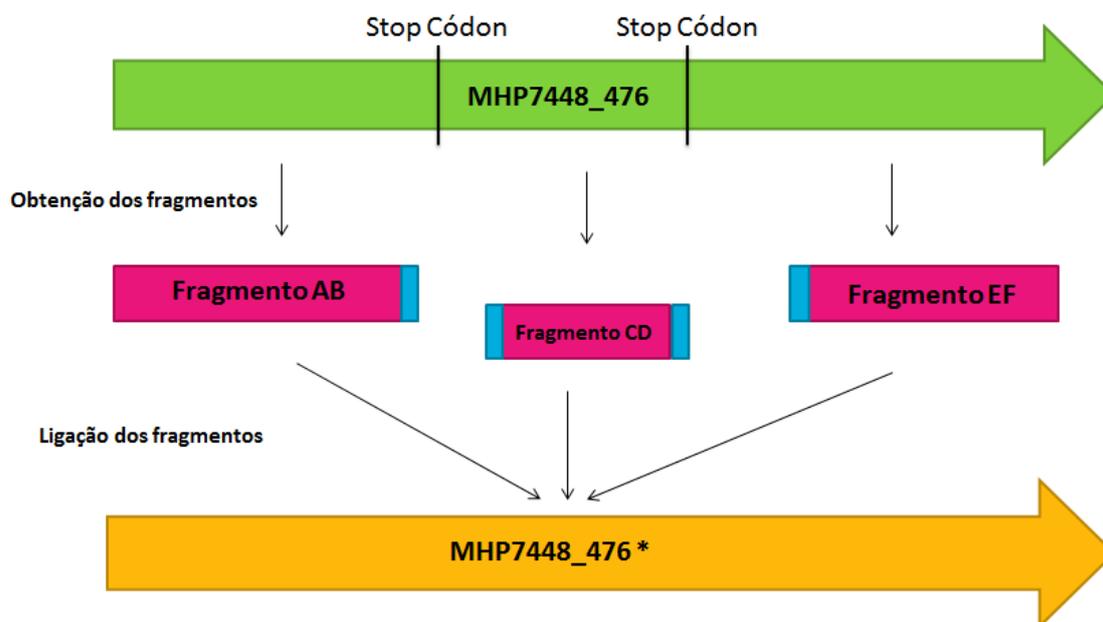
Embora em *M. hyopneumoniae* a enzima FAD sintetase não esteja anotada no genoma, em outras espécies de micoplasma, ela encontra-se presente no repertório de proteínas do organismo (Fonseca *et al.*, 2012)

O estudo de enzimas envolvidas nas rotas biossintéticas de NAD e FAD se faz de extrema importância, pois são potenciais alvos terapêuticos antimicrobianos, além de preencherem vazios na anotação do genoma de *M. hyopneumoniae*. Com isso, os genes codificantes para as proteínas

YP\_287866, YP\_287786, YP\_287675 foram selecionados para a análise experimental de suas características e posterior caracterização da funcionalidade das enzimas obtidas.

A análise de proteínas de *Mycoplasma* spp. é de certa forma prejudicada por uma peculiaridade do código genético da bactéria: elas usam o códon UGA para incorporar triptofano ao contrário do código genético universal, onde este é um códon de parada (Inamine *et al*, 1990). Clonado em *E. coli* ou outros hospedeiros, os genes de *M. hyopneumoniae* podem conter muitos códons de parada que impedem a expressão heteróloga (Hames *et al.*, 2005).

Esse problema foi solucionado com o emprego da metodologia de *overlap extension PCR* (*Overlapping PCR*). Essa técnica é um método poderoso para mutagênese sítio-dirigida já que é rápido, simples e eficiente na geração de produtos mutados (Simionatto *et al.*, 2009). Dos genes analisados neste estudo, todos possuíam pelo menos um códon TGA, que baseado nessa metodologia foi alterado com sucesso para o códon TGG, gerando os genes completos e mutados, aptos para a expressão correta das proteínas. Um exemplo da metodologia utilizada pode ser visualizado na Figura 19.



**Figura 19. Obtenção dos genes passíveis de serem clonados ao vetor de expressão.**

O processo de obtenção dos genes aptos a serem clonados segue duas etapas. A primeira com a obtenção dos fragmentos a partir de mutagênese sítio-dirigida e a segunda com a utilização desses fragmentos como moldes para a *Overlapping PCR*, em azul destacam-se os nucleotídeos similares entre os fragmentos, que possibilitarão a união dos mesmos. Esquema representativo mostrando os passos para a obtenção do gene MHP7448\_476.

O sistema de expressão utilizado foi o vetor de *E.coli*, pGEX 4T3. O sistema de pGEX permite a produção induzível de alto nível de proteínas e limita os problemas da formação de corpos de inclusões (Smith *et al*, 1988). Estes vetores foram construídos para produzir proteínas de interesse em *E. coli* como fusões da região C-terminal com a proteína Glutathione S-transferase (GST) de *Schistosoma japonicum* (26-kDa) sob o controle do promotor forte *tac* que é um híbrido derivado de promotores *trp* e *lac* (Borgi & Gargouri, 2008). Esse promotor é induzido com adição de isopropil-beta-D-tiogalactopiranosideo (IPTG).

A inserção dos genes no vetor de expressão foi realizada por recombinação homóloga *in vivo*, um método prático e eficiente, além de econômico. Esta técnica requer um fragmento de DNA de interesse, amplificado por PCR com mais de 20 bp de similaridade à região de ligação ao vetor, além do vetor que é digerido com enzimas de restrição dentro da região de ligação (Hua *et al*, 1997; Goto & Nagano, 2013). O pGEX 4T3 foi digerido com duas enzimas de restrição (XhoI e EcoRI), além de defosforilado com a enzima SAP para que as regiões geradas (distintas) não se religassem e um alto *background* não ocorresse na clonagem. A utilização de uma única enzima para a clivagem do vetor aumentaria a probabilidade de altos *background* no desenvolver da técnica.

Com uma região de homologia de 20 nucleotídeos, somente o gene MHP7448\_0394 teve sucesso na clonagem por recombinação homóloga, onde houve o crescimento de uma única colônia que foi confirmada possuir o gene MHP7448\_0394, possibilitando prosseguir para as próximas etapas. Inúmeras tentativas foram realizadas para os demais genes, todas sem sucesso. A partir desse momento decidiu-se alterar a metodologia incorporando mais nucleotídeos de similaridade ao vetor nos genes de interesse, aumentando essa região para 40 pb e possibilitando uma maior região de complementariedade, o que melhoraria as taxas de recombinação (Parrish *et al.*, 2004).

Modificando a metodologia, o gene MHP7448\_0278 obteve sucesso na clonagem, gerando três colônias, onde as três foram consideradas recombinantes. Entretanto, para o gene MHP7448\_0476, mesmo após

algumas tentativas ainda não se obteve sucesso na recombinação. Além dos nucleotídeos homólogos, uma possível explicação para essa dificuldade na obtenção de clones recombinantes percebida durante o trabalho foi que as concentrações tanto de vetor quanto de produto de PCR precisam ser semelhantes, mesmo que se obedeça a proporção 3:1. O gene MHP7448\_0476 teve de ser purificado a partir do gel de agarose, pela presença de bandas inespecíficas, não recuperando-se uma quantidade eficiente de produto, gerando uma baixa concentração de DNA, pois muito dele se perde na coluna por esse processo. Os demais genes possuíam concentrações semelhantes ao vetor e foram clonados eficientemente, entretanto com o gene MHP7448\_0476, mesmo com o aumento de nucleotídeos homólogos, não conseguiu-se clones recombinantes. Essa teoria é baseada em observações realizadas durante a realização da técnica e não é totalmente clara, necessitando de maiores estudos para a verificação do motivo pelo qual ainda não se obteve clones recombinantes para esse gene.

Com as construções do vetor mais o gene [anexo 7.1], a indução da expressão foi realizada em cinco linhagens bacterianas distintas para cada proteína uma vez que cada uma se comporta de maneira distinta no sistema de expressão.

Para o gene MHP7448\_0394 as melhores induções aconteceram em *E. coli* BL21 (DE3) pLysE e *E. coli* BL21 (DE3) Star com um rendimento similar em ambas. Para o gene MHP7448\_0278 as melhores linhagens foram *E. coli* BL21 (DE3) pLysE e *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus Rill. A linhagem Star é recomendada para a utilização em plasmídeos de baixo número de cópias, induzíveis com IPTG e para proteínas não tóxicas (Invitrogen), com baixa degradação de mRNA. A cepa pLysE é utilizada para uma proposta geral de expressão e a linhagem CodonPlus Rill permite a expressão de genes codificando tRNAs para os códons raros de arginina (AGA e AGG), isoleucina (AUA) e leucina (CUA) (Novagen, Stratagene).

Depois de confirmada a indução da proteína realizou-se o teste de solubilidade para verificar se após a indução ela permanecia na fração solúvel ou insolúvel do extrato celular. O desejado sempre na produção de proteínas recombinantes é que elas se encontrem na fração solúvel do extrato celular, uma vez que tornam simples o procedimento de purificação e evitam

tratamentos químicos para a sua solubilização, mantendo o estado conformacional natural da proteína.

A proteína MHP7448\_0394 se mostrou na fração solúvel do extrato celular nas condições padrões de indução e tornou possível a purificação da mesma direto do sobrenadante do lisado celular. Embora a condição ideal seja essa (solúvel), estima-se que em torno de 35% das proteínas recombinantes produzidas permaneçam na fração insolúvel do seu extrato celular (Leibly *et al.*, 2012). Proteínas no seu estado insolúvel representam um problema para estudos estruturais, funcionais e bioquímicos. Porém, o alto nível de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*, muitas vezes resulta em acumulando-os como agregados insolúveis, conhecidos como corpos de inclusão (Kane *et al.*, 1988). Corpos de inclusão de proteínas são desprovidos de atividade biológica sendo necessário elaborar procedimentos de solubilização, redobramento e purificação para recuperar funcionalmente o produto ativo (Vallejo *et al.*, 2004).

A proteína MHP7478\_0278 foi detectada na fração insolúvel nas condições padrões de indução. Com esse resultado, outro teste de temperatura de indução foi realizado a 28°C, antes da utilização de compostos químicos para sua solubilização, uma vez que temperaturas menores no momento de indução tem um efeito de diminuir problemas de dobramentos da proteína e obter conformação de corpos de inclusão (Bomholt *et al.*, 2013). Com a alteração da temperatura não houve modificação na solubilidade, além de ocorrer uma diminuição na expressão da proteína.

Modificações nas técnicas devem ser testadas para que a proteína se solubilize, iniciando com a diminuição ainda maior da temperatura de indução em período de tempo mais longo, ou partir, caso isso não resolva, para o uso de detergentes iônicos, como o sarcosil, onde seu uso é capaz de inibir as agregações de proteínas com componentes da membrana celular da bactéria (Frankel *et al.*, 1991).

A proteína solúvel (MHP7448\_0394) foi purificada baseando-se no princípio que está fusionada com a proteína de fusão GST podendo ser purificada, em uma única etapa, por cromatografia de afinidade em coluna de Glutathione Sepharose seguida por eluição através de glutathione reduzida (Borgi *et al.*, 2008). A região de GST pode ser clivada de proteínas de fusão por

digestão com proteases específicas tais como trombina ou fator de coagulação de sangue Xa (Borgi *et al*, 2008). A purificação foi realizada de maneira eficiente e um ótimo rendimento da proteína foi obtido de 5 µg/µL em um total de 2 mL

As três enzimas analisadas nesse trabalho após expressas e purificadas serão utilizadas em ensaios bioquímicos para a predição de sua funcionalidade. Até agora pouco se conhece sobre essas vias em micoplasmas e poucas técnicas experimentais são relatadas sobre ensaios desse tipo. Muitas vezes os *kits* comerciais disponíveis (BioVision, Sigma) relacionados a análises de FAD e NAD têm como objetivo a sua medição final, independente dos intermediários, foco principal desse trabalho. O estudo terá de ser feito a partir do precursor dessas rotas, nicotinamida ou ácido nicotínico – NAD e riboflavina – FAD e a eles será adicionado as enzimas estudadas além de suplementos e condições ideais para a reação, que ainda devem ser determinadas, para então a mensuração da formação ou não de NAD/FAD a partir de *kits* comerciais. O NAD/FAD gerado ainda pode ser empregado em outros ensaios para determinar se estão sendo formados de forma funcional.

A expressão de duas das três proteínas proposta por esse trabalho foi eficientemente realizada. O gene MHP7448\_0476 não obteve sucesso na clonagem e continuará tentando-se a expressão dessa proteína. A análise dessas três proteínas, que são possíveis enzimas relacionadas com rotas metabólicas em *M. hyopneumoniae* preenchem uma lacuna na ausência de conhecimento dessas vias vitais para o organismo e com certeza haverá a geração de novos debates sobre a sobrevivência dessa espécie, bem como a sua dependência com o hospedeiro e a utilização dos recursos do mesmo.

Esse conhecimento poderá gerar informações de grande valia a indústria de produção de vacinas e medicamentos que atuam no ramo de prevenção a esse tipo de infecção, uma vez que essas vias são potenciais alvos de drogas antimicrobianas, pois são essenciais para a sobrevivência desses microrganismos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bomholt, J., Helix-Nielsen, C., Scharff-Poulsen, P., and Pedersen, P.A. (2013). Recombinant production of human Aquaporin-1 to an exceptional high membrane density in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 8, e56431.
- Borgi, I., and Gargouri, A. (2008). A spontaneous direct repeat deletion in the pGEX fusion vector decreases the expression level of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 60, 15-19.
- Debey M.C., Ross R.F (1994). Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ-cultures *Infect. Immun.*, 62, pp. 5312–5318
- Fonseca, M.M., Zaha, A., Caffarena, E.R., and Vasconcelos, A.T. (2012). Structure-based functional inference of hypothetical proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Mol Model* 18, 1917-1925.
- Frankel, S.; Sohn, R. & Leinwand, L (1991). The use of sarkosyl in generating soluble protein after bacterial expression. *Proc.Natl. Acad.Sci.*, 88(4): 1192-1196.
- Friis, N.F. (1975). Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suipneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord Vet Med* 27, 337-339.
- Goto, K., and Nagano, Y. (2013). Ultra-low background DNA cloning system. *PLoS One* 8, e56530.
- Hames, C., Halbedel, S., Schilling, O., and Stulke, J. (2005). Multiple-mutation reaction: a method for simultaneous introduction of multiple mutations into the *glpK* gene of *Mycoplasma pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* 71, 4097-4100.
- Hilz, H. (1997). ADP-ribose. A historical overview. *Adv Exp Med Biol* 419, 15-24.
- Houtkooper, R.H., Canto, C., Wanders, R.J., and Auwerx, J. (2010). The secret life of NAD<sup>+</sup>: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr Rev* 31, 194-223.
- Hua SB, Qiu M, Chan E, Zhu L, Luo Y (1997) Minimum length of sequence homology required for in vivo cloning by homologous recombination in yeast. *Plasmid* 38: 91–96.
- Inamine, J. M., K.-C. Ho, S. Loechel, and P.-C. Hu. (1990). Evidence that UGA is read as a tryptophan codon rather than as a stop codon by *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, and *Mycoplasma gallisepticum*. *J. Bacteriol.* 172:504-506

Kurnasov, O., Goral, V., Colabroy, K., Gerdes, S., Anantha, S., Osterman, A., and Begley, T.P. (2003). NAD biosynthesis: identification of the tryptophan to quinolinate pathway in bacteria. *Chem Biol* 10, 1195-1204.

Lee, H.C. (2000). NAADP: An emerging calcium signaling molecule. *J Membr Biol* 173, 1-8.

Kahane, L., Muhlrad A., and Razin S.(1978). Possible role of acetate kinase in ATP generation in *Mycoplasma hominis* and *Acholeplasma laidlawii*. *FEMS Lett.* 3:143-145.

Kobisch, M., and Friis, N.F. (1996). Swine mycoplasmoses. *Rev Sci Tech* 15, 1569-1605.

Leibly, D.J., Nguyen, T.N., Kao, L.T., Hewitt, S.N., Barrett, L.K., and Van Voorhis, W.C. (2012). Stabilizing additives added during cell lysis aid in the solubilization of recombinant proteins. *PLoS One* 7, e52482.

Liu, W., Feng, Z., Fang, L., Zhou, Z., Li, Q., Li, S., Luo, R., Wang, L., Chen, H., Shao, G., *et al.* (2011). Complete genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168. In *J Bacteriol* (United States), pp. 1016-1017.

Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., and Haesebrouck, F. (2008). Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol* 126, 297-309.

Mashhadi Z (2010). Identification and Characterization of the Enzymes Involved in Biosynthesis of FAD and Tetrahydromethanopterin in *Methanocaldococcus jannaschii*. Dissertation submitted to the faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy In Biochemistry. Virginia – EUA

Minion, F.C., Lefkowitz, E.J., Madsen, M.L., Cleary, B.J., Swartzell, S.M., and Mahairas, G.G. (2004). The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. In *J Bacteriol* (United States), pp. 7123-7133.

Nathues, H., Doehring, S., Woeste, H., Fahrion, A.S., Doherr, M.G., and Grosse Beilage, E. (2013). Individual risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling pigs at the age of weaning. *Acta Vet Scand* 55, 44.

Parrish, J.R., Limjindaporn, T., Hines, J.A., Liu, J., Liu, G., and Finley, R.L., Jr. (2004). High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORfs by in vivo recombination in *Escherichia coli*. *J Proteome Res* 3, 582-586.

Pollack, J.D., Tryon, V.V., and Beaman, K.D. (1983). The metabolic pathways of *Acholeplasma* and *Mycoplasma*: an overview. *Yale J Biol Med* 56, 709-716.

Razin, S., and Hayflick, L. (2010). Highlights of mycoplasma research--an historical perspective. *Biologicals* 38, 183-190.

Razin, S. (1992). Peculiar properties of mycoplasmas: the smallest self-replicating prokaryotes. *FEMS Microbiol Lett* 79, 423-431.

Razin, S., Yogev, D., and Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1094-1156.

Sambrook and Russell (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual*, Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Simionatto, S., Marchioro, S.B., Galli, V., Luerce, T.D., Hartwig, D.D., Moreira, A.N., and Dellagostin, O.A. (2009). Efficient site-directed mutagenesis using an overlap extension-PCR method for expressing *Mycoplasma hyopneumoniae* genes in *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods* 79, 101-105.

Simionatto, S., Marchioro, S.B., Maes, D., and Dellagostin, O.A. (2013). *Mycoplasma hyopneumoniae*: From disease to vaccine development. *Vet Microbiol* 165, 234-242.

Singleton, M.R., Hakansson, K., Timson, D.J., and Wigley, D.B. (1999). Structure of the adenylation domain of an NAD<sup>+</sup>-dependent DNA ligase. *Structure* 7, 35-42.

Smith D.B., Johnson K.S (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase Gene, 67 (1), pp. 31–40

Stancek, M., Schnell, R., and Ryden-Aulin, M. (2005). Analysis of *Escherichia coli* nicotinate mononucleotide adenylyltransferase mutants in vivo and in vitro. *BMC Biochem* 6, 16.

Thacker E.L., Minion F.C (2010). *Mycoplasmosis* J. Zimmerman (Ed.), *Diseases of Swine*, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, pp. 779–797

Tourtellotte ME, Jacobs RE (1960). Physiological and serological comparisons of PPLO from various sources. *Ann NY AcadSci* 79:521-530.

Vallejo L.F., Rinas U (2004). Strategy for recovery of active protein through refolding of bacterial inclusion body proteins *Microb. Cell Fact.*, 3, pp. 2–12

Vasconcelos, A.T., Ferreira, H.B., Bizarro, C.V., Bonatto, S.L., Carvalho, M.O., Pinto, P.M., Almeida, D.F., Almeida, L.G., Almeida, R., Alves-Filho, L., *et al.* (2005). Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. In *J Bacteriol (United States)*, pp. 5568-5577.

Vicca J., Stakenborg T., Maes D., Butaye P., Peeters J., K.A. de, Haesebrouck F (2004). In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48 pp. 4470–4472

Villarreal I., Maes D., Vranckx K., Calus D., Pasmans F., Haesebrouck F (2011). Effect of vaccination of pigs against experimental infection with high and low virulence *Mycoplasma hyopneumoniae* strains Vaccine, 29, pp. 1731–1735

Wang, W., Kim, R., Yokota, H., and Kim, S.H. (2005). Crystal structure of flavin binding to FAD synthetase of *Thermotoga maritima*. Proteins 58, 246-248.



## 7.2 Protocolo de extração de DNA genômico de *M. hyopneumoniae*

1. Centrifugar 5 mL de cultura por 30 min a 3360 g;
2. Ressuspender as células em 1 mL de tampão TE;
3. Homogeneizar em vórtex;
4. Dividir em dois tubos grandes (1,7 ou 2,0 mL);
5. Adicionar para cada tubo:
  - 15 µL SDS 10%;
  - 1,5 µL proteinase K (20m/mL);
6. Misturar invertendo gentilmente o tubo;
7. Incubar por 1h a 37°C;
8. Adicionar:
  - 100 µL NaCl 5M;
  - 80 µL de CTAB 1%;
9. Incubar 10 min à 65°C;
10. Adicionar 1 volume de fenol:clorofórmio;
11. Inverter gentilmente o tubo;
12. Centrifugar 5 min a 13.000 rpm;
13. Transferir o sobrenadante para outro tubo;
14. Adicionar 800 µL de clorofórmio;
15. Inverter gentilmente o tubo;
16. Centrifugar 5 min a 13.000 rpm;
17. Transferir o sobrenadante para outro tubo;
18. Adicionar 600 µL de isopropanol gelado, misturar invertendo o tubo;
19. Deixar a -20°C overnight ou 1h à -80°C;
20. Centrifugar 13.000 rpm, 5 min;
21. Lavar com etanol 70% gelado (Adicionar 500 µL de etanol 70% sem agitar e centrifugar a 13.000 rpm por 2 min; depois descartar cuidadosamente o sobrenadante e adicionar mais 500 µL de etanol 70%) Repetir 2X;
22. Secar (pode ser em estufa até 37°C);
23. Ressuspender o pellet em 10-30 µL de água autoclavada e colocar na geladeira por 3 horas;
24. Adicionar 3 µL de RNase (10 mg/mL) e incubar a 37°C por 1 hora;
25. Checar 10% do volume em gel de agarose 0,8% - 60 V.