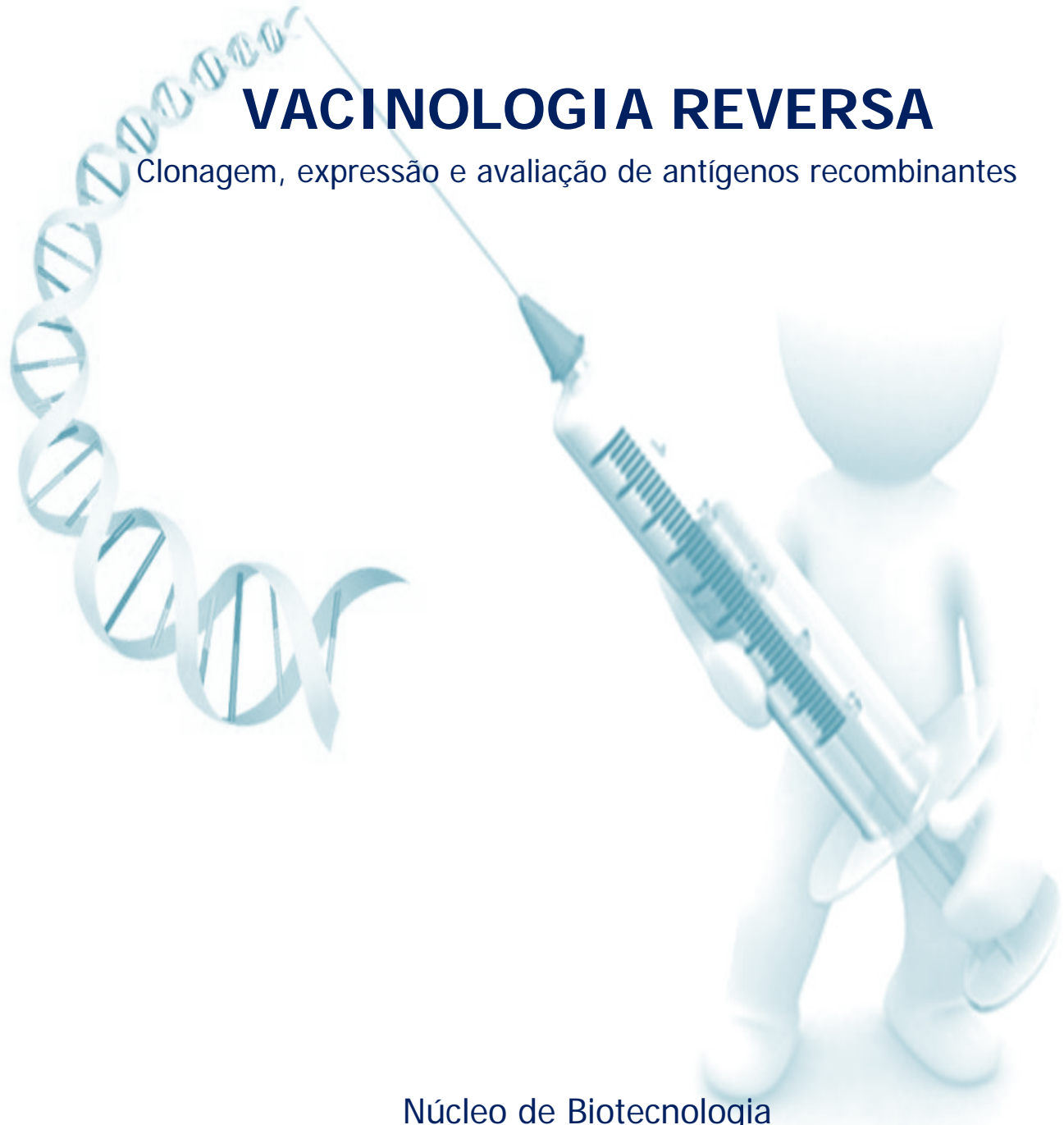


# VACINOLOGIA REVERSA

Clonagem, expressão e avaliação de antígenos recombinantes



Núcleo de Biotecnologia  
Centro de Desenvolvimento Tecnológico  
Universidade Federal de Pelotas  
Pelotas, RS  
Brasil



Centro Brasileiro -Argentino de Biotecnologia

## **Curso**

Vacinologia reversa: clonagem, expressão e  
avaliação de antígenos recombinantes

Núcleo de Biotecnologia  
Centro de Desenvolvimento Tecnológico  
Universidade Federal de Pelotas  
Pelotas, RS  
Brasil

## 1. Apresentação

A maneira mais eficaz de se prevenir doenças infecciosas é a vacinação. Nas últimas duas décadas, o rápido progresso das pesquisas, em particular nas áreas da imunologia e da biologia molecular, lançou as bases de um avanço sem precedentes para o desenvolvimento de novas vacinas e estratégias de vacinação em todo mundo. A vacinologia reversa é uma abordagem inovadora, pois parte do conhecimento gerado pela genômica para a produção e avaliação de antígenos recombinantes. Na abordagem tradicional o ponto de partida é a busca de genes que codificam para antígenos que tiveram desenvolvido uma forte resposta imune. Esta abordagem tem sido aplicada para a identificação de antígenos protetores de diferentes patógenos. O trabalho envolve a análise do genoma com o uso de ferramentas de Bioinformática para a identificação de proteínas com probabilidade de constituírem antígenos imunoprotetores. Também são analisadas as características de hidrofobicidade e antigenicidade da proteína, buscando identificar regiões que potencialmente contêm domínios imunodominantes e que sejam passíveis de serem expressos em sistemas heterólogos. Finalmente os genes são clonados e expressos através do uso da tecnologia do DNA recombinante. Após purificação, as proteínas são avaliadas em modelos animais para comprovar suas propriedades imunoprotetoras. Essa tecnologia tende a substituir os métodos tradicionais de desenvolvimento de vacinas. Nesse curso iremos abordar a expressão de antígenos de *Mycoplasmahyopneumoniae* e de *Leptospirainterrogans* em *Escherichia coli*, buscando desenvolver vacinas recombinantes para a pneumonia enzoótica suína e leptospirose. Além disso utilizaremos um gene modelo de eucarioto que codifica uma proteína verde fluorescente (GFP), isolada de uma espécie de água-viva (*Aequoreavictoria*). A GFP é uma proteína pequena de 238 aminoácidos (aprox. 28 kDa) e que sob luz ultravioleta emite luz fluorescente verde sem a necessidade de cofatores para essa reação. Desse modo, poderemos verificar facilmente a sua expressão e atividade quando purificada.

## **2. Corpo Docente**

### **Coordenador**

**Dr. Odir Antônio Dellagostin**

### **Professores envolvidos**

**Dr. Odir Antônio Dellagostin**, coordenador, Centro de Biotecnologia, UPPel, Brasil.

**Dr. Alan McBride**, pesquisador visitante da Fundação Oswaldo Cruz, BA, Brasil.

**Dr. Éverton Fagundes da Silva**, professor da Faculdade de Veterinária, UFPel, Brasil.

**Dra. Fabiana K. Seixas**, professora do curso de Biotecnologia, CDTec-UFPel, Brasil.

**Dra. Fabiana Nora**, bolsista PNPB do Programa da Fisiologia Vegetal, UPPel, Brasil.

**Dr. Fabricio R. Conceição**, professor do curso de Biotecnologia, CDTec-UFPel, Brasil.

**Dr. Luciano da Silva Pinto**, professor do curso de Biotecnologia, CDTec- UFPel, Brasil

**Dra. Marisa Farber**, Pesquisadora do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Argentina.

**Dra. Sibeles Borsuk**, professora do curso de Biotecnologia, CDTec-UFPel, Brasil

**Dra. Simone Simionatto**, professora do curso de Biotecnologia, UFGD, Brasil

### **Equipe de Apoio**

**Amilton Seixas Neto**- Mestrando PPGV

**AndreGrassman** -Mestrando PPGB

**Clarisse Brum**- Mestranda PPGB

**Caroline Rizze**, Doutoranda PPGB

**Daniela Fernandes Ramos**- Doutoranda PPGB

**SilvanaBeutingerMachioro**- Doutoranda PPGB

### **Local**

Núcleo de Biotecnologia

Centro de Desenvolvimento Tecnológico

Universidade Federal de Pelotas

Campus Universitário – Prédio 19

CEP 96010-900

Pelotas RS

Fone: (53) 3275-7350

### **3. Informações Técnicas**

#### **Curso**

- Vacinologia reversa: clonagem, expressão e avaliação de antígenos recombinantes

#### **Objetivos**

- Aprofundar os princípios das técnicas de biologia molecular e das suas aplicações na área de vacinologia reversa.

#### **Metodologia**

- O curso será teórico-prático para um total de 10 alunos. Os conteúdos serão abordados com uma linguagem detalhada e na maioria dos casos, através de atividades práticas, avaliação dos resultados experimentais, leitura e discussão de conceitos e conhecimentos relacionados clonagem, expressão e avaliação de proteínas recombinantes. Os alunos receberão uma apostila com protocolos de experimentais, brochuras com informações relevantes, informações de livro texto e artigos científicos relacionados ao tema do curso. No decorrer do curso serão apresentadas projetos de pesquisa na área de vacinologia reversa executados no Centro de Biotecnologia/UFPEL.

#### **Frequência/participação**

- Será computada a frequência dos alunos no curso, através de uma lista de presença, e a participação nas atividades experimentais e discussões.

#### **Avaliação**

A avaliação dos alunos será realizada da seguinte forma:

- Participação nas atividades teórico-práticas, bem como nas seções técnicas de discussão de artigos científicos (50%)
- Prova teórica realizada no final do curso (50%)

## **4. Programa**

### **4.1 Bioinformática**

### **4.2 Amplificação e clonagem de genes**

- 4.2.1 Geração de amplicons de genes de *Mycoplasma hyopneumoniae*, de *Leptospira interrogans* do gene da proteína verde fluorescente (EGFP),
- 4.2.2 Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose
- 4.2.3 Preparo do gel de agarose
- 4.2.4 Eletroforese das amostras de PCR
- 4.2.5 Visualização e documentação das amostras
- 4.2.6 Preparo dos genes e vetor (digestão com enzimas de restrição)
- 4.2.7 Purificação dos genes e vetor
- 4.2.8 Ligaçãõ dos amplicons no vetor pAE
- 4.2.9 Transformação do produto de ligaçãõ por eletroporaçãõ em *E.coli* Top10

### **4.3 Seleção e caracterização dos clones recombinantes**

- 4.3.1 Técnica de Lise rápida com fenol-clorofórmio
- 4.3.2 Pre-inóculo dos clones selecionados por lise rápida em meio LB
- 4.3.3 Extração de DNA plasmidial
- 4.3.4 Sequenciamento de DNA

### **4.4 Expressão das proteínas recombinantes em sistemas heterólogos**

- 4.4.1 Transformação de cepas de expressão de *E. coli* BL21 com os plasmídeos recombinantes
- 4.4.2 Avaliação da expressão das proteínas recombinantes em pequena escala
- 4.4.3 Teste de solubilidade das proteínas recombinantes
- 4.4.4 SDS-PAGE e Western blot para confirmar a expressão
- 4.4.5 Expressão e indução em larga escala

### **4.5 Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade**

- 4.5.1 Preparo das amostras para purificação
- 4.5.2 Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade ao níquel
- 4.5.3 SDS-PAGE
- 4.5.4 Quantificação das proteínas recombinantes purificadas
- 4.5.5 Preparo das vacinas recombinantes de subunidade

### **4.6 Experimentação animal**

- 4.6.1 Inoculação de camundongos BalB/c com as vacinas recombinantes
- 4.6.2 Coleta de sangue do plexo retro-orbital

### **4.7 Avaliação da resposta imune**

- 4.7.1 Titulação de anticorpos por ELISA
- 4.7.2 Western Blot

### **4.8 Sessão Técnica**

- 4.8.1 Apresentação dos resultados obtidos pelo grupo Cenbiot em Vacinas recombinantes
- 4.8.2 Discussão de artigos científicos sobre vacinologia reversa



## 5. Cronograma do Curso

Duração do curso: 2 semanas (27/09 a 08/10/2010). Carga horária total:80 horas/aula  
Carga horária teórica: 32 horas/aula (40%). Carga horária prática: 48 horas /aula (60%)

### Semana 1 (27/09 a 01/10/2010)

Horário	Segunda 27/09	Terça 28/09	Quarta 29/09	Quinta 30/09	Sexta 01/10
8:00-10:00	Recepção aos alunos  Abertura do curso  (Coordenação)	PCR e aplicações  (Dr. Fabrício Rochedo Conceição)	Seqüenciamento de DNA  (Dra. Luciano da Silva Pinto)	Sistemas de expressão em procaríotos ( <i>E. coli</i> )  (Dr. Alan McBride)	Extração de DNA plasmidial, eletroforese em gel de agarose
10:00-12:00	Utilização de ferramentas de Bioinformática em vacinologia reversa.  (Dr. Alan McBride)	PCR	Ligação dos genes em vetores e preparo de células competentes	Triagem das colônias transformadas por lise rápida e PCR	
12:00-13:30	Almoço	Almoço	Almoço	Almoço	Almoço
14:00-16:00	Utilização de ferramentas de Bioinformática em vacinologia reversa.  (Dr. Alan McBride)	Tecnologia do DNA recombinante  (Dra. Sibeles Borsuk)	Transformação de <i>E. coli</i> por choque térmico e eletroporação	Sistemas de expressão em procaríotos ( <i>E. coli</i> )  (Dr. Alan McBride)	Sistemas de expressão em eucariotos ( <i>Picchia pastoris</i> )  (Dr. Luciano Pinto)
16:00-18:00	Desenho de primers e construção de moléculas recombinantes utilizando programas de bioinformática.  (Dr. Odir A. Dellagostin)	Eletroforese em gel de agarose	Vacinas recombinantes para Leptospirose.  (Daiane Hartwig)	Expansão das colônias em meio líquido e avaliação da PCR das colônias.	Digestão enzimática e transformação dos clones recombinantes em cepas de expressão em <i>E. coli</i> .



**Semana 2 (04/10 a 08/10/2010)**

Horário	Segunda 04/10	Terça 05/10	Quarta 06/10	Quinta 07/10	Sexta 08/10
8:00-10:00	Sistemas de expressão em eucariotos (plantas).  (Dra. Fabiana Nora)	Indução da expressão  Metodologias de purificação de proteínas recombinantes.  (Dra. Marisa Farber)	Purificação das proteínas recombinantes	Quantificação das proteínas purificadas	Avaliação da resposta imune por ELISA e Western blot
10:00-12:00	Testes de expressão protéica	Indução e teste de solubilidade protéica		Experimentação animal  (Dr. Everton F. da Silva)	
12:00-13:30	Almoço	Almoço	Almoço	Almoço	Almoço
14:00-16:00	Sistemas de expressão em eucariotos (animais).  (Dr. Vinicius Farias Campos)	Dra. Marisa Farber	Eletroforese em SDS-PAGE	BCG Recombinante: Novos sistemas de Expressão (Dra. Sibebe Borsuk)	Avaliação da resposta imune por ELISA e Western blot
16:00-18:00	Seqüenciamento de DNA		Eletroforese em SDS-PAGE	Vacinas recombinantes para <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>  (Dra. Simone Simionatto)	
					Prova de avaliação, discussão final e encerramento do curso

Legenda das Tabelas:      Conteúdo teórico      Conteúdo prático      Sessão técnica

# CONTEÚDO TEÓRICO-PRÁCTICO

## 1. Bioinformática

Noções sobre a utilização de ferramentas de Bioinformática em vacinologia reversa, bem como desenho de primers e construção de moléculas recombinantes utilizando programas de bioinformática. Para tanto será utilizado o software Vector NTI 10 (Invitrogen). Este é um pacote de softwares que foi desenvolvido para ajudar os biólogos moleculares, engenheiros genéticos, no estudo, manipulação e criação de moléculas biológicas.

Abaixo podemos observar o mapa do vetor de expressão em sistema procarioto, pAE, o qual será utilizado para a clonagem e expressão de genes durante este curso.

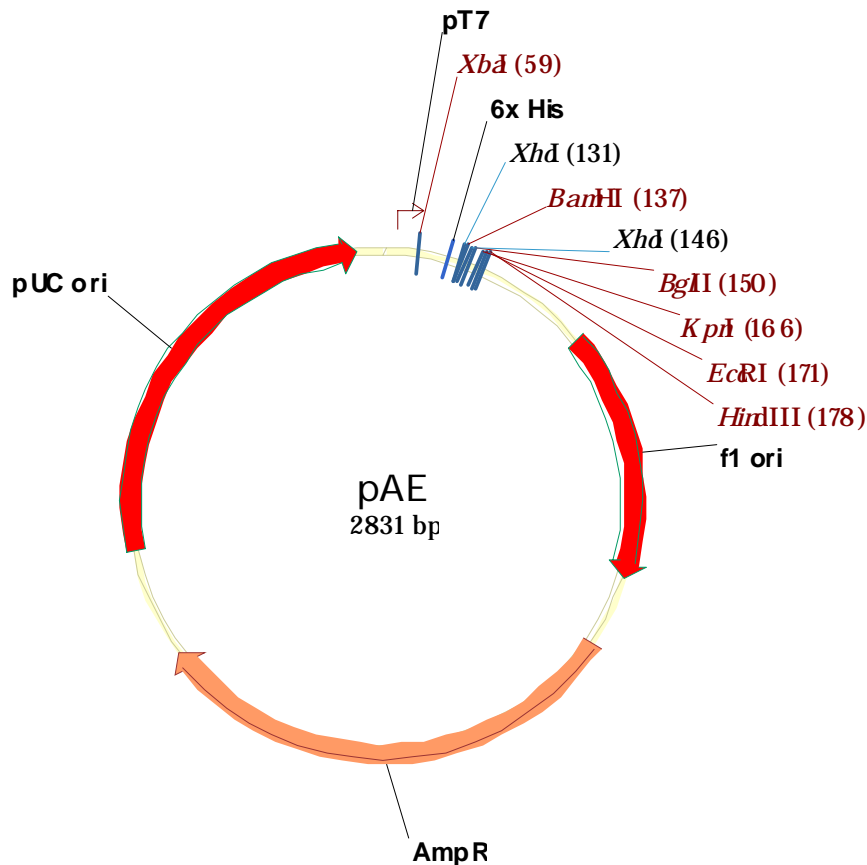


Figura1: Mapa de restrição do vetor pAE

## 2. Amplificação e clonagem de genes

### 2.1. PCR

Esta tecnologia foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80 e, desde então tem revolucionado a pesquisa na área biológica. A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade, tornam a técnica poderosa para estudos genéticos.

A PCR (reação em cadeia da polimerase) é uma técnica de amplificação de segmentos de DNA *in vitro*, sendo para tanto utilizado primers (oligonucleotídeos iniciadores) que se anelam com as fitas opostas do DNA, ladeando uma região específica que é então amplificada. O processo consiste de três etapas:

- **desnaturaçãodo DNA:** ocorre separação das fitas da DNA devido a quebra das pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, a uma faixa de temperatura variável de 94-95°C;
- **anelamento:**anelamento dos primers com o DNA molde (template), a temperatura é variável de 50-65 °C, sendo que quanto maior for o tamanho do primer e maior o conteúdo G+C (entre estas bases ocorre a formação de três pontes de hidrogênio), maior será a temperatura de anelamento;
- **polimerização:** síntese da nova fita (polimerização) devido ao acréscimo de nucleotídeos (dNTPs) pela enzima DNA polimerase na extremidade 3' do primer, sendo que esta enzima só atua em fita dupla (por isso há necessidade do anelamento inicial de um primer) e a temperatura ideal é de 72 °C. Sendo que quanto maior for o fragmento, maior será o tempo de polimerização. Para cada kb de tamanho do DNA utilizamos 1 minuto no tempo de polimerização.

O número de ciclos é variável, assim como o tamanho dos primers (varia de 10 até cerca de 30 nucleotídeos) e as temperaturas de desnaturaçã, anelamento e polimerização, sendo o primer o responsável pela especificidade da técnica de PCR. A enzima Taq DNA polimerase (Taq de *Thermusaquaticus*, bactéria termófila (75 °C) - da qual a enzima foi isolada, sendo de extrema importância para a estabilidade na reação de PCR) é a responsável pelas ligações fosfodiéster entre os nucleotídeos que serão incorporados na nova fita formada. A água milli-Q estéril é utilizada para diluir a solução e completar o volume final da reação, o tampão fornece as condições ótimas de pH e concentração salina, e o íon magnésio funciona como co-fator para a reação, facilitando o anelamento dos primers e estabilizando a reação.

As aplicações da técnica de PCR são as mais variadas possíveis, sequenciamento de DNA, medicina forense, diagnóstico de doenças infecciosas e genéticas, teste de paternidade. As variações da técnica recebem o nome de RT-PCR, Nested-PCR, RAPD, DRE-PCR, multiplex-PCR, entre outros.

**Reagentes:**

- DNA molde
- Primers F e R
- Enzima Taq DNA polimerase, MgCl<sub>2</sub>, e Buffer 10X
- dNTPs
- Agua milli-Q estéril

**Protocolo Reação de PCR**

Componentes	Quantidade (µl)	Controle Neg.
Água milli-Q estéril	17,75	18,75
Tampão 10 X	2,5	2,5
Primer forward 400 nM	1	1
Primer reverse 400 nM	1	1
dNTPs 10 mM	0,5	0,5
DNA molde	1	-
Taq DNA pol. 5 U/µl	0,5	0,5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75	0,75
<b>Volume final</b>	<b>25</b>	<b>25</b>

O gene da proteína verde fluorescente (EGFP), genes de *Mycoplasmahyopneumoniae* (*gi820* e *gi924*) e de *Leptospirainterrogans* (*lipL32*, *ligA*) serão amplificados com os primers descritos na tabela abaixo.

Gene	Primers	Tamanho (pb)	Tm(°C)
<i>lipL32</i>	F 5' CCG <b>CTC GAG</b> GTG GTC TGC CAA GCC T 3' ( <i>XhoI</i> ) R 5' <b>GGA ATT CTT</b> ACT TAG TCG CGT CAG AAG C 3' ( <i>EcoRI</i> )	706	55
<i>LigA</i>	F5' CGG <b>GAT CCA</b> ATT CCT TCT AAT A 3' ( <i>BamHI</i> ) R5' <b>GGA ATT CTT</b> ATG GCT CCG TT 3' ( <i>EcoRI</i> )	1900	55
<i>gi924</i>	F5' CAC CGG <b>ATC CCT</b> TAG CCA AAA TCC ATC AC 3' ( <i>BamHI</i> ) R5' CCC <b>AAG CTT</b> TCA ATT TTC GTT TTT ATC 3' ( <i>HindIII</i> )	807	55
<i>gi820</i>	F5' CAC CGG <b>ATC CCA</b> GCA AAC TTA TAA TTC TC 3' ( <i>BamHI</i> ) R5' CCC <b>AAG CTT</b> TCA GGA ATA ATC AAG AAC GA3' ( <i>HindIII</i> )	504	55
P42	F5' CGG <b>GAT CCA</b> TGG CGC TTA CAA GA3' ( <i>BamHI</i> ) R5' CCC <b>AAG CTT</b> TTA ATC CTG CTT GAT3' ( <i>HindIII</i> )	1116	55
<i>Gfp</i>	F5' R5'		

## 2.2. Eletroforese em gel de agarose

Para que possamos realizar a visualização do DNA, é necessário submetê-lo à eletroforese em gel de agarose. A agarose é um polímero, em forma de pó, extraído de algas marinhas. Após ser fundida na presença de um tampão (TBE) que otimiza o pH e a concentração iônica do gel, a agarose é colocada sobre um suporte que contém pentes para a formação dos pocinhos e, a temperatura ambiente, ocorre polimerização, ou seja, formação de uma matriz que serve como peneira para a separação de fragmentos de DNA. O tampão TBE contém TRIS, ácido bórico e EDTA. O ácido bórico é um sal que permite a condutividade, o EDTA é um quelante de íons que impede a degradação do DNA e o TRIS estabiliza o pH.

A mobilidade eletroforética de um fragmento de DNA é inversamente proporcional ao número de pares de bases. Ocorre migração do DNA no gel submetido a uma corrente elétrica porque o DNA apresenta carga negativa devido à presença do grupo fosfato em sua molécula; portanto o DNA migra do pólo negativo para o positivo.

Para corar o gel utiliza-se brometo de etídeo (**☞ CUIDADO!!! Mutagênico!!! Cancerígeno!!!**), composto que liga-se às moléculas de DNA e quando submetido à luz UV (**☞ CUIDADO!!! Mutagênico!!!**), fluoresce em uma cor róseo/alaranjada. Atualmente novos corantes estão sendo utilizados, como o GelRed que após testes de mutagenicidade não forneceu nenhuma indicação de mutagenicidade em doses variando de 0 a 50 ug/placa (podem ser encontrados na página [www.biotium.com](http://www.biotium.com)).

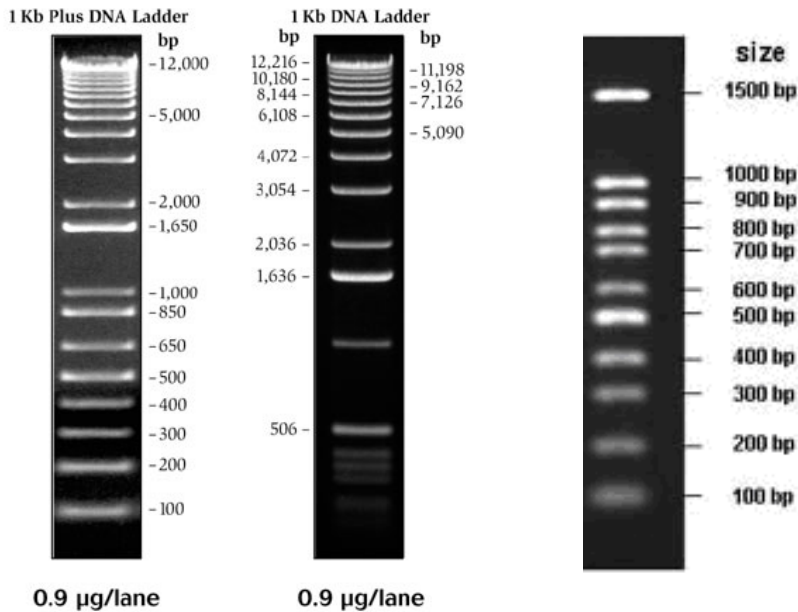
A concentração do gel de agarose determina a firmeza do gel. Quanto maior for a concentração do gel, menor serão os fragmentos separados, assim:

- 0,7%: separar fragmentos grandes (de 1 a 20 Kb);
- 1,5 %: separar fragmentos de 0,2 a 2 Kb;
- 3%: separar fragmentos pequenos de 50 a 500 pb.

Para que a amostra contendo o DNA desça no pocinho do gel, torna-se necessário adicionar um tampão de amostra ou tampão de corrida que contém glicerol e azul de bromofenol. O glicerol é o responsável por dar peso a amostra, permitindo que esta desça e o azul de bromofenol é um corante que permite a visualização da amostra, facilitando, portanto, a aplicação da amostra no gel.

Para podermos saber qual o tamanho da banda, em termos de pares de bases, aplicamos um marcador de peso molecular, o qual contém uma mistura de fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos. Existem diversos marcadores moleculares:  $\lambda$ HindIII, DNA ladder de 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 e 5000 pares de bases,  $\phi$ X 174, HaeIII, entre outros.

- **Marcadores de DNA utilizados**  
Fornecidos pela Invitrogen®.



### Reagentes

- Agarose
- Tampão TBE 0,5X

### Preparo do gel de agarose

Gel de agarose a 1%

1. Colocarem um erlenmeyer de 250 ml, 1 g de agarose e 100 ml de tampão TBE 1X (Tris-base 89mM; Ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM).
2. Levar ao forno micro-ondas até a completa fusão da agarose. Deixar a agarose dissolvida esfriar. Quando a temperatura da agarose dissolvida atingir cerca de 45 °C, despejá-lo num suporte de acrílico apropriada, conforme instrução do monitor (caso a temperatura da agarose dissolvida esteja acima de 45 °C, o suporte de acrílico pode ser danificada).

### Preparo das amostras

Tampão da amostra para gel de agarose 6X (Sambrook, 2001, Pagina A1-19, Tabela A1-6)

	Reagentes	
1	0,25% (w/v) azul de bromofenol	2,5mg
2	0,25% (w/v) xileno cianol FF	2,5mg
3	40% (w/v) sacarose	400mg
4	Água milli-Q (ultrapura) autoclavada	Qsp 1000µL

- Misturarem um parafilm cada amostra de DNA (produto de PCR) (10µL) e tampão da amostra 6X (2µL)
- Aplicar as amostras no gel de agarose.

- Utilizar 250ng (geralmente 5 $\mu$ L de uma solução estoque a 50ng/ $\mu$ L) um marcador de peso molecular de DNA

### **Eletroforese**

- Submeter o gel a 100V por aproximadamente 40 min.
- Visualizar o gel em transiluminador de UV
- Obter imagem do gel usando um fotodocumentador

## **2.3. Preparo dos genes e vetor (purificação e digestão com enzimas de restrição)**

### **2.3.1. Purificação de DNA da PCR (kit "GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification")**

A purificação do produto dos produtos da PCR será realizada com o uso do kit "GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification" seguindo o protocolo a seguir.

1. São adicionados 500 $\mu$ L de tampão de captura (contendo acetato) no tubo de microcentrífuga de 1,5mL contendo o DNA e a seguir este foi transferido para uma coluna contendo o tubo coletor e centrifugou-se por 1 min a 14000 rpm.
2. O líquido do tubo coletor é descartado e adicionado,
3. Adicionar 500 $\mu$ L de tampão de lavagem (10mM Tris-HCl pH 8.0; 0,1mM EDTA, etanol em uma concentração final de 80%).
4. Centrifugar por 1 min a 14000 rpm e em seguida descartar o tubo coletor descartado,
5. Transferir a coluna para um tubo de microcentrífuga de 1,5mL sem tampa
6. Adicionar 50  $\mu$ L de tampão de eluição (10mM Tris-HCl pH 8,0) e incubado por 1 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugar por 1 min a 14000 rpm e o DNA transferido para um outro tubo de microcentrífuga de 1,5mL limpo e armazenado a - 20 °C.

- Proceder ao preparo dos genes com a digestão dos mesmos com enzimas de restrição.

### **2.3.2. Digestão com enzimas de restrição**

As enzimas de restrição, também chamadas de endonucleases de restrição, são proteínas que reconhecem uma seqüência específica de bases nucleotídicas presentes no DNA, cortando a fita dupla em locais determinados. Elas foram isoladas inicialmente em 1970 e reconhecem e clivam somente uma determinada seqüência nucleotídica que varia de quatro a oito nucleotídeos, podendo gerar extremidades coesivas ("sticky ends") ou abruptas/cegas ("blunt ends"). Estas enzimas são encontradas em diversas bactérias, sendo que a função destas nestes organismos é proteger o DNA bacteriano do DNA exógeno, sendo que o DNA de um determinado microrganismo ("DNA self") não é degradado pela sua enzima de restrição porque ele está "protegido" (metilado) naqueles sítios específicos reconhecidos pela enzima de restrição por ele codificada. A ligação hidrolisada é a ligação fosfodiéster (ligação formada entre o grupamento hidroxila da



extremidade 3' de um nucleotídeo com o grupamento fosfato da extremidade 5' de outro nucleotídeo). Estas enzimas de restrição reconhecem uma sequênciapalindrômica, ou seja, os sítios de clivagem são simetricamente posicionados e a digestão se dá em ambas as fitas, mas em sentidos opostos.

A nomenclatura da enzima consiste de três letras, proveniente do nome da espécie do microrganismo da qual a enzima foi isolada, a primeira letra é do gênero e as duas outras da espécie, a seguir vem a designação da linhagem (cepa) e um número romano indicando se mais de uma enzima é produzida; por exemplo: *EcoRI*: *E. coli*, cepa R, primeira enzima isolada; *HindIII*: *Haemophilus influenzae*, cepa "d", terceira enzima isolada.

Com a descoberta destas enzimas, foi possível tratar diferentes DNA com a mesma enzima e após ligá-los em uma molécula única, agora denominada molécula recombinante.

Uma unidade de enzima é definida como a quantidade de enzima necessária para clivar 1µg de DNA em 1 hora na temperatura ideal para a enzima (geralmente 37 °C).

Em uma técnica de digestão, sempre utilizamos o DNA de interesse, a enzima de restrição, o tampão próprio para cada enzima e água milli-Q a fim de completar o volume da reação. O tampão de reação é fornecido sempre na concentração de 10X, isto é, utiliza-se 1:10 do volume final da reação.

#### Reagentes:

- Enzimas de restrição e seus tampões
- Água milli-Q estéril

#### Protocolo Reação de Digestão:

Reagentes	Vetor pAE	Genes
DNA	10 µL	10 µL
Tampão 10X	2 µL	2 µL
Enzima 10U/µL	1 µL	1 µL
Enzima 10U/µL	1 µL	1 µL
Água	7 µL	7 µL
Total	20 µL	20 µL

O vetor pAE e os insertos(lipL32, ligA, gi820, gi924, p42 e egfp)serão digeridos com as enzimas descritas tabela do item 2.1. Ambas as digestões devem ser mantidas a 37 °C por 24 h.

- Em seguida os fragmentos correspondentes ao vetor pAE e aos genes devem ser purificados com o kit GFX conforme descrito acima.
- Proceder a uma eletroforese em gel de agarose para verificar a concentração do DNA dos genes e vetor.

## 2.4.Ligação dos amplicons no vetor pAE

Atualmente, na moderna tecnologia do DNA recombinante, a realização de clonagens torna-se um processo rotineiro em laboratórios de Biologia Molecular, sendo que esta técnica envolve desde o isolamento do DNA de interesse, passando pela clivagem com enzimas de restrição, ligação a um vetor próprio utilizando a enzima DNA ligase, até a transformação de células competentes dos mais diversos microrganismos.

A DNA ligase é responsável pela ligação de fragmentos de DNA, ou seja, na presença de ATP como fonte de energia, esta enzima é capaz de restabelecer as ligações fosfodiéster entre a extremidade 3' OH e 5' P de extremidades coesivas de DNA.

### Reagentes:

- DNA ligase e tampão
- DNA vetor digerido
- DNA inserto digerido
- Água Milli-Q estéril

### Protocolo

Ligar os genes digeridos no vetor pAE digerido com as mesmas enzimas de restrição.

Em uma reação de ligação torna-se necessária a presença da enzima de ligação – T4 DNA ligase -, do tampão 5X próprio para que a enzima possa atuar, do DNA de interesse e de água milli-Q para completar o volume final da reação. Geralmente utilizam-se dois controles, além da ligação de interesse. O controle utilizando o **vetor “desfosforilado”** e religado é de fundamental importância a fim de sabermos se a atuação da enzima fosfatase alcalina (CIP) na extremidade 5' do vetor foi eficiente. O outro controle é só como inserto, sem vetor.

	Ligação 1 a 6 pAE+ inserto	Ligação 2 Controle Vetor	Ligação3 Controle Inserto
Vetor pAE/digerido- CIP	..µl	..µl	-
Inserto .....	.. µl	-	.. µl
Tampão 5X	4 µl	4 µl	4 µl
T4 DNA ligase	1 µl	1 µl	1 µl
H <sub>2</sub> O	..µl	..µl	..µl
TOTAL	20 µl	20 µl	20 µl

- Incubar a reação por 30 min a 16°C, ou overnight a 4°C.

## 2.5.Preparo de células eletrocompetentes de *E.coli* Top10

A preparação de células competentes de diversos microrganismos é um procedimento relativamente rápido e corriqueiro em laboratórios de Biologia Molecular e visa estimular as células bacterianas a captarem DNA solúvel no meio, já que elas normalmente não fazem isso por si só. O processo de transformação de bactérias permite a propagação, expressão e isolamento de moléculas de DNA recombinante que tem sido construídas *in vitro*, à imagem das moléculas naturais de DNA. As células bacterianas costumam apresentar um estado fisiológico particular antes de serem transformadas, estado este denominado de competência. Para o processo de eletroporação são requeridas células eletrocompetentes, no entanto, estes microrganismos não costumam entrar em estado de competência sozinhos, mas podem ser induzidos artificialmente através da aplicação de um protocolo de preparação de células competentes, cujos procedimentos variam de acordo com cada bactéria. Assim, existem diversos protocolos para preparação de células competentes para **choque térmico** e **eletroporação**, que promovem a abertura de poros na membrana da célula bacteriana permitindo a entrada de DNA exógeno.

### Reagentes

- LB líquido
- Água Milli-Q estéril gelada
- Glicerol 10% estéril gelado

### Protocolo (Células competentes para eletroporação)

1. Inocular 5 mL de LB líquido (sem antibiótico) com uma colônia de *E. Coli* TOP10. Incubar *overnight* a 37 °C;
2. Inocular 500 mL de LB líquido (sem antibiótico) com o pré-inóculo cultivado *overnight*. Cultivar a 37 °C sob agitação de 225-250 rpm até obter uma densidade de  $5 \times 10^7$  células por ml ( $OD_{600} = 0,4-0,5$ );
3. Colocar o cultivo em banho de gelo por cerca de 20 min;
4. Fracionar o cultivo em tubos de centrífuga estéreis de 250 ml resfriados. Centrifugar a 4000 rpm por 10 min a 4 °C;
5. Eliminar o sobrenadante e ressuspender cada péllet em 250 mL de água milli-q estéril. Centrifugar a 4000 rpm por 10 min a 4 °C;
6. Eliminar o sobrenadante e ressuspender cada péllet em 125 mL de glicerol 10% estéril. Centrifugar a 4000 rpm por 10 min a 4 °C;
7. Ressuspender o pellet em 1,5 a 2 mL de glicerol 10%. Fazer alíquotas de 60µL. As células competentes podem ser utilizadas imediatamente ou congeladas a -70°C.

- Utilizar 1µl de cada produto de ligação para transformação das células de *E. coli* eletrocompetentes.

## 2.6. Transformação de células competentes - eletroporação

A eletroporação é um método físico de transfecção de genes baseado em características físico-químicas comuns a todas as membranas biológicas. A eletroporação possibilita a introdução de DNA, RNA ou proteínas em células expostas a um campo elétrico. Este polariza as regiões hidrofílicas dos fosfolípidos presentes nas membranas celulares, causando repulsões e, conseqüentemente, poros transitórios na membrana, os quais são comumente chamados de eletroporos. Moléculas como os ácidos nucleicos não têm a capacidade de penetrarem sozinhas na célula, devido às barreiras físicas que ela possui. Portanto, para que isso ocorra necessitam de um fator que os possibilite alcançar o meio intracelular, onde tem maiores condições de se replicarem e de serem expressos. Uma das principais barreiras que a célula impõe à entrada de substâncias é a membrana celular, que apresenta alta seletividade. A quantidade de DNA utilizada na eletroporação é muito variável (normalmente é de 1 a 80µg/ml) e ainda não se conhece o grau de interferência da forma do plasmídeo na sua integração. A quantidade de células transformadas por cada µg de DNA determina a eficiência do método.

### Reagentes:

- Alíquotas de células de *E. coli* eletrocompetentes
- Meio LB líquido
- Placas com meio LB sólido com antibiótico

### Protocolo eletroporação

1. Colocar 2µL da reação de ligação de 50µL de suspensão de bactérias eletrocompetentes;
2. Transferir a suspensão de bactérias para uma cubeta de eletroporação (0,1 - 0,2 cm de largura) previamente resfriada em gelo e enxugar bem a parte externa da cubeta para remover a água de condensação. Cuidar para não deixar resíduos de papel;
3. Colocar a cubeta no eletrodo do eletroporador e verificar;
  - Acertar a capacitância para 25µFD;
  - Acertar a resistência para 200 OHMs;
  - Acertar a voltagem para 2,5 kV;
  - Apertar simultaneamente as duas teclas "pulse", até ocorrer a descarga elétrica;
4. Adicionar imediatamente 450µL de meio LB líquido e transferir para um tubo de microcentrífuga;
5. Incubar em shaker a 37 °C por 1h;

6. Plaquear em LB sólido contendo 100µg/mL de ampicilina e incubar 37 °C de 18-24h.

Transformação 1	pAE/lipL32
Transformação 2	pAE/ligA
Transformação 3	pAE/gi820
Transformação 4	pAE/gi924
Transformação 5	pAE/p42
Transformação 6	pAE/gfp

### **3. Seleção e caracterização dos clones recombinantes**

#### **3.1. Microprep de colônia**

Mesmo tratando as células bacterianas a fim de torná-las competentes, apenas uma pequena porção da população receptora adquire o novo plasmídio. Para selecionar essas bactérias utiliza-se um marcador de seleção. Os marcadores mais utilizados são genes de resistência a antibióticos. Quando uma mistura de bactérias contendo ou não o plasmídio é semeada em um meio seletivo contendo o antibiótico de escolha, apenas as bactérias que apresentam o plasmídio serão capazes de formar colônias. Dentre estas colônias, as quais agora podem ser chamadas de CLONES, teremos clones recombinantes (inserto ligado ao vetor) e não recombinantes, ou seja, clones contendo apenas o vetor, sem a presença de inserto.

A triagem dos clones recombinantes (ou “screening”) será feita através de microprep das colônias e consequente extração de plasmídio das colônias selecionadas e eletroforese em gel de agarose. O clone recombinante vai apresentar um plasmídio maior do que o vetor sem inserto, migrando menos no gel de agarose em relação a um clone não recombinante. Estes clones recombinantes são então selecionados, concluindo com isso o processo de clonagem gênica.

#### **Reagentes:**

- Solução fenol-clorofórmio 1:1
- Tampão de amostra (100 µL de tampão de amostra 6x + 900 µL de água milli Q + RNase)

#### **Protocolo:**

1. Identificar na placa as colônias selecionadas.

2. Em tubos eppendorf, adicionar 15µL de fenol clorofórmio (fase inferior) e 15µL de tampão (100µL de tampão de amostra 6x + 900µL de água milli Q + RNase).

3. Inocular a colônia selecionada, dar um vortex e centrifugar a 14.000 rpm durante 4 min.

4. Aplicar diretamente a fase superior (aproximadamente 15µL) em gel de agarose 0,8%.

- Diferenciar os clones recombinantes de não recombinantes, selecionar alguns dos clones recombinantes, fazer pré-inóculo destes em LB com ampicilina (37 °C/overnight).
- Será feita a extração de plasmídio utilizando-se os pré-inóculos dos clones selecionados extração de DNA plasmidial.

#### **3.2.Extração de DNA plasmidial**

Plasmídeos são elementos extracromossômicos com capacidade de replicação autônoma, sendo constituídos por uma molécula de DNA fita dupla circular e considerados replicons, pois se replicam independentemente do cromossomo bacteriano. Seu tamanho varia de 3 a 10 kb, sendo que seu DNA codifica para proteínas que, geralmente, conferem vantagens adaptativas às bactérias no meio no qual se encontram, pois codificam enzimas, toxinas, pilinas e adesinas, importantes na

interação entre bactérias e parasitos; fatores de resistência a diversos antibióticos, entre outros. Os plasmídeos podem ser utilizados como vetores para clonagem de genes bacterianos. Para isso são modificados em laboratório para que atendam à algumas características, tais como: origem de replicação, sítio “polylinker” (sítio para várias enzimas de restrição), gene que codifica para resistência a determinado antibiótico e outros. Estes vetores encontram-se em número de cópias variável por célula, podendo ainda estar “livres” (extracromossômicos) ou integrados ao genoma bacteriano como cópia única (vetores integrativos).

### Reagentes:

- Solução de lise I
- Solução de lise II
- Solução de lise III
- Etanol 70%
- TE 1X
- OBS: também pode ser utilizado o kit de Extração de DNA plasmidial GFX (GE).

### Protocolo

1. Transferir 1,5mL de um cultivo “overnight” para um tubo de microcentrifuga de 1,5mL (“eppendorf”) e centrifugar por 2 min a 14000 rpm;
2. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 200µL de solução I (50mM glicose, 25mM Tris-HCl, 10mM de EDTA, pH 7.4), homogeneizar em vortex;
3. Adicionar 200µL de solução II (1% SDS, 0,2M NaOH), homogeneizar lentamente invertendo os tubos por 10 a 15 vezes;
4. Adicionar 200 µL de solução III (3 M acetato de sódio pH 5,2), homogeneizar lentamente invertendo os tubos por 10 a 15 vezes e centrifugar por 5 min a 14000 rpm;
5. Transferir o sobrenadante para outro “eppendorf” limpo e adicionar 420µL de isopropanol;
6. Homogeneizar o tubo por 10 a 15 vezes e centrifugar por 5 min a 14000 rpm;
7. Remover completamente o sobrenadante e adicionar 500µL de etanol 70%;
8. Centrifugar 14000 rpm por 2 min, remover completamente o sobrenadante;
9. Secar o pellet completamente e ressuspender o pellet em 50µL de água ou tampão TE;
10. Checar 3-5µL em gel de agarose 0,8%.

**OBS:** A solução I auxilia na lise celular, permitindo que o material intracelular seja liberado para o meio. A solução II por sua vez, solubiliza os lipídeos, por conter SDS – detergente – e determina um pH alcalino, devido à presença de hidróxido de sódio, provocando a desnaturação do DNA. O acetato de sódio presente na solução III neutraliza o pH promovendo a precipitação do DNA cromossomal, das proteínas e de outras estruturas celulares, ficando o DNA plasmidial no sobrenadante. Ao adicionarmos isopropanol, ocorre a precipitação do DNA plasmidial.

### 3.3. Seqüenciamento de DNA (Megabace 500)

O seqüenciamento de DNA nada mais é que a determinação precisa da seqüência de nucleotídeos de um determinado fragmento de DNA que pode ter origem de um produto de PCR ou de um gene clonado em um vetor. Os seqüenciadores em funcionamento atualmente têm uma capacidade limitada de leitura conseguindo seqüenciar fragmentos de no máximo 900 pares de base. Em média, os fragmentos não passam de 600 pb, já que as extremidades são normalmente de baixa qualidade e por isso são retiradas da análise final. Os fragmentos para o seqüenciamento devem estar em fita simples e, portanto o DNA molde é submetido à reação de seqüenciamento usando-se apenas um dos primers (Forward ou Reverse) de cada vez. Também é importante que o DNA seja de alta qualidade devido à sensibilidade do seqüenciador. A separação dos fragmentos é feita dentro de capilares de vidro extremamente finos que são preenchidos com uma matriz (LPA long-readmatrix) e contaminantes como sais, restos celulares ou mesmo etanol atrapalham os resultados.

Reagentes:

- Kit Seqüenciamento
- Matriz

#### Procedimento

1. Verificação da qualidade e concentração do DNA (50-100 µg) de DNA plasmídial ou produto de PCR (preferencialmente purificados com kit);
2. Em uma placa de seqüenciamento de 96 cavidades distribua 2 µL de Pré-mix (ddNTPs marcados, dNTPs, ThermoSequenase II, Cofator enzimático Mg<sup>++</sup>, tampão...) em cada cavidade;
3. Distribua 1 µL de primer Forward ou Reverse na concentração de 5 µM;
4. Distribua o DNA num volume máximo de 2 µL por cavidade, conforme a concentração de DNA a ser utilizada;
5. Complete o volume da reação para 5 µL em função do volume de DNA adicionado a reação;
6. Centrifugue rapidamente, vortex rápido e novo spin;
7. Coloque a placa em um termociclador nas seguintes condições de amplificação:

- 1- 95 °C-----20 s
- 2- 50 °C -----15 s
- 3- 65 °C ----- 1 min
- 4- Repete 1 p/ 25 ciclos
- 5- 4 °C

#### Precipitação



1. Após a reação de amplificação, adicione a cada cavidade 0,5  $\mu\text{L}$  de Acetato de amônia e 13,7  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto gelado;
2. Centrifugue rapidamente, vortex rápido e centrifugue novamente;
3. Deixe descansando por 20 min no escuro;
4. Centrifugue por 30 min a 3700 rpm;
5. Descarte o sobrenadante e adicione 100  $\mu\text{L}$  de etanol 70% a cada poço;
6. Centrifugue por 10 min a 3700 rpm;
7. Descarte o sobrenadante, deixe secando 10 min em estufa a 37 °C até sair todo etanol.
8. Ressuspenda a reação com 5  $\mu\text{L}$  de *loadingsolution* (formamida 70%, 1 mM EDTA), e aplique no sequenciador.

#### **4. Expressão das proteínas recombinantes em *E. coli***

Existem diferentes cepas de *E. coli* utilizadas para a expressão de proteína recombinantes sob o controle do promotor T7, presente no vetor pAE, como *E. coli* BL21(DE3): SI, codon Plus, pLysS e DE3. O método de transformação por choque térmico promove a formação de poros na membrana celular bacteriana possibilitando a entrada do plasmídeo para o interior da mesma. Para efetuar a transformação por choque térmico pode-se preparar as células competentes após crescimento em meio líquido com

lavagens com  $\text{CaCl}_2$ . No entanto, pode-se utilizar uma cultura fresca de *E. coli* para efetuar a transformação.

#### 4.1. Transformação de colônia de *E. coli* por choque térmico

##### Reagentes

- 2YT ou LB
- DNA plasmidial
- Uma placa de células frescas
- $\text{CaCl}_2$  100mM

##### Protocolo

1. Adicionar 100 $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  100mM em um tubo *ependorf*;
2. Adicionar 1 $\mu\text{L}$  de DNA;
3. Com uma ponteira pegar uma colônia de células e misturar com o  $\text{CaCl}_2$  100mM e o DNA;
4. Incubar no gelo por 15 min;
5. Colocar em banho maria 42 °C por 1 min;
6. Incubar no gelo por 2 min;
7. Acrescentar 500 $\mu\text{L}$  de 2YT ou LB;
8. Incubar no shaker por 1h a 37 °C;
9. Usar 10  $\mu\text{L}$  da cultura para plaquear.
10. Transferir o restante da cultura para um tubo contendo 5mL de LB com antibiótico e crescer overnight a 37 °C sob agitação.

##### Recomendações à cerca do procedimento

- Para este procedimento é imprescindível que a placa contendo as colônias seja fresca, do dia anterior a transformação.
- A cultura pode ser transferida para 15mL de LB com antibiótico e crescer overnight a 37 °C sob agitação. Este cultivo pode ser usado como pré-inóculo de 500mL de LB para indução protéica. Neste caso é recomendado que a transformação não seja feita no final do dia, aumentando com isso o tempo do cultivo do pré-inóculo.

#### 4.2. Pré-inóculo, inóculo e indução

##### Reagentes

- LB líquido com antibiótico
- IPTG 0,3 M
- TE
- Tampão de amostra SDS-PAGE 5X

- Solução de AktaWash
- PBS 1X

#### **4.2.1. Indução em Pequena Escala**

1. Adicionar 1 mL do pré- inóculo em 10 mL de LB líquido com antibiótico;
2. Crescer no shaker a 37°C até atingir a DO<sub>600</sub> 0,8 (aproximadamente 3 h);
3. Retirar uma alíquota de 500 µL antes da indução;
4. Acrescentar 1µL/mL de IPTG 0,3 M e deixar no shaker por mais 3 h, juntamente com as alíquotas não induzidas;
5. Retirar 500 µL da amostra induzida e centrifugar juntamente com a não induzida;
6. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o pellet de ambas com 80 µL de TE e 20 µL de tampão de amostra SDS-PAGE 5 X;
7. Submeter à eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, juntamente com a cepa de expressão não transformada;

#### **4.2.2. Teste de solubilidade das proteínas recombinantes**

1. Retirar 2 mL da amostra induzida;
2. Centrifugar por 5 min a 11000 rpm;
3. Separar o pellet do sobrenadante e preparar as amostras para correr em gel de poliacrilamida 15%;
4. Sobrenadante: 500 µL da amostra + 50 µL de tampão de amostra SDS-PAGE 5 X;
5. pellet: 500 µL de TE + 50 µL de tampão de amostra SDS-PAGE 5 X.

#### **4.2.3. Indução em Grande Escala**

1. Adicionar 100 µL do inóculo da indução em pequena escala em 25 mL de LB com antibiótico;
2. Crescer no shaker a 37°C overnight;
3. No dia seguinte adicionar 20 mL desse pré-inóculo em 500 mL de LB com antibiótico;
4. Crescer no shaker a 37°C até atingir a DO<sub>600</sub> 0,8 e proceder à indução com 0,3 M de IPTG (1µL de IPTG 0,3 M para cada mL de cultivo);
5. Retirar alíquotas induzidas e não induzidas como realizado na etapa de induções em pequena escala;
6. Induzir por 3 horas e centrifugação essa cultura a 7.000 rpm por 15 minutos;
7. Descartar o sobrenadante e lavar o pellet com 50 mL de PBS 1 X;
8. Centrifugar a 7.000 rpm por 15 min a 4 °C; Nesta etapa o pellet pode ser guardado a -20 °C por até 3 meses sem haver perda protéica.

#### **Recomendações à cerca do procedimento**

- Para diminuir a formação de corpúsculos de inclusão e reduzir o efeito de precipitação das proteínas durante a diálise, realizar a indução em DO<sub>600</sub> 0,5 ou

0,6, crescer a 28 °C ou 30 °C durante o período de indução. Além disso, é recomendado diminuir o tempo de indução para 2 h.

- Ligar a centrífuga 30 min antes do horário a ser utilizada para a temperatura baixar a 4 °C.

#### 4.4. Gel SDS-PAGE

Para verificar os níveis de expressão e a solubilidade das proteínas submeter-se-á amostras à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para preparo do gel de empilhamento 5% e do gel de corrida 15%, o protocolo está descrito na tabela abaixo.

#### Reagentes

- Solução de bis-acrilamida 34%
- Solução de SDS 10%
- Solução de Tris-HCl 2,5 MpH 8,5
- Solução de Tris-HCl 1 MpH 6,5
- Solução de Persulfato de amônio 10% (APS)
- Solução de Coomassie Blue (0.1% Azul de coomassie; 45% metanol; 10% Ácido Acético, água q.s.p.)
- Solução de descoloração (4% metanol; 7.5% ácido acético)
- TEMED
- Água Milli-Q

#### Preparo do gel

Gel de corrida 15%:

Volumefinal	10 mL
Água bidestilada	4,6 mL
Acrilamida 34%	3,8 mL
Tris-HCl 2,5 MpH 8,5	1,6 mL
SDS 10%	100 µL
Persulfato de amônio 10% (APS)	70 µL
TEMED	7 µL

(TEMED – N,N,N',N'-tetrametilenodiamina)

Gel de empilhamento (stackinggel) 5%:

Volumefinal	5 mL
Água bidestilada	3,7 ml
Acrilamida 34%	0.7 ml

Tris-HCl 1 M pH 6,5	0.6 ml
SDS 10%	50 µL
Persulfato de amônio 10% (APS)	35 µL
TEMED	7 µL

- Proceder a eletroforese em gel SDS a uma voltagem de 140 V e 30 mA por aproximadamente 1 hora em fonte BioRad.
- Após a corrida corar o gel com Coomassie Blue a 65°C com solução de coloração (0.1% Azul de coomassie; 45% metanol; 10% Ácido Acético, água.s.p.) em banho 56-65 °C por 15 min. Obs: A solução pode ser reutilizada.
- Incubar com solução de descoloração (4% metanol; 7.5% ácido acético) a 56-65 °C por aproximadamente 15 min ou a temperatura ambiente durante a noite. Repetir este procedimento três vezes. O gel pode ser descorado em água destilada no micro-ondas.
- Depois de descorado, guardar o gel em água.

## 5. Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade

### Reagentes

- Solução PBS 1X
- AktaWash 8M uréia (Uréia 8 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200 mM, NaCl 0,5 M, Imidazole 0,34 g/L)
- AktaElution 8M uréia (Uréia 8M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazole 34g/L)
- Colunas HiTrap
- Seringas e filtros

- Sulfato de níquel 0,1M ( $\text{NiSO}_4$  0,1 M)

### 5.1.Preparo das amostras para purificação com uréia

1. Ressuspender o pellet do cultivo em grande escala em 50 mL de PBS 1 X ;
2. Sonicar 4 pulsos de ultrassom por 15 segundos, deixando um intervalo de 5 seg entre cada pulso, repetindo-se por 3 vezes, mantendo-as em gelo;
3. Centrifugar a 7.000 rpm por 15 min, a 4 °C;
4. Descartar o sobrenadante e solubilizar o pellet em 30 mL de solução AktaWash com uréia;
5. Agitar por 2 h ou overnight na câmara fria;
6. Centrifugar a 10.000 rpm por 1 h a 4 °C e filtrar o sobrenadante em filtro 0,8 micra;
7. Purificar o filtrado em cromatografia de afinidade;
8. Verificar a pureza das proteínas purificadas em SDS-PAGE 15%;

### 5.2.Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade ao níquel

Pode ser realizada pelo sistema automatizado ÄKTAprime(GE) ou de forma manual em colunas HiTrap.

#### Método Manual

1. Passar 5 mL de tampão ÄKTAWash 8M uréia pela coluna HiTrap previamente carregada com  $\text{NiSO}_4$  0,1 M
2. Passar um volume de 30 mL de amostra solubilizada em tampão ÄKTAWash 8M uréia pela coluna HiTrap
3. Após passar 5mL de tampão ÄKTAWash 8M uréia pela coluna
4. Fazer a eluição das proteínas recombinantes através de um gradiente de tampão ÄKTAElution 8M uréia (10, 20, 30, 40 e 50% de Elution Buffer diluído em ÄKTAWash Buffer). Utilizar 3mL de cada concentração de ÄKTAElution.
5. Submeter as amostras à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% para confirmar a purificação das proteínas recombinantes.

#### Método Automatizado

1. Acoplar a coluna HiTrap ao ÄKTAprime(GE) no local indicado
2. Colocar a amostra de proteína a ser purificada, e os tampões (ÄKTAWash 8M uréia e ÄKTAElution 8M uréia) nos locais indicados.
3. Ligar o aparelho e seguir as orientações do visor e observação da curva de purificação no computador que esta acoplado ao ÄKTAprime.
4. Ao final da purificação a amostra da proteína recombinante será eluída em frações de 1 mL
5. Submeter as amostras à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% para confirmar a purificação.

### 5.3.Quantificação das proteínas recombinantes purificadas

As proteínas recombinantes serão quantificadas pelo método de Bradford ou por SDS-PAGE com a curva de BSA.

**Reagentes:**

- Reagente de Bradford
- BSA

**Protocolo:**

1. Preparar o reagente de Bradford;
2. Preparar BSA;
3. Medir a absorbância no espectrofotômetro a 280nm, no caso de proteína;
4. Caso o valor de Coeficiente de Extinção BSA seja diferente de 0,66 (1mg/mL), determiná-lo por regra de três.

$$\begin{array}{l} \text{Ex: ABS } 0,576 \text{ ----- } x \\ \quad \quad \quad 0,66 \text{ ----- } 1\text{mg/mL} \end{array} \quad \longrightarrow \quad 0,66x = 0,276 \cdot 1\text{mg/mL}$$

$x = 0,872 \text{ mg/mL}$
---------------------------

5. Preparar Mix 1 para Curva Padrão de BSA, em triplicata, conforme segue:

<b>Mix 1 – Curva Padrão de BSA</b>			
<b>BSA (ug)</b>	<b>BSA 1X (5ul)</b>	<b>BSA 4X (uL)</b>	<b>H<sub>2</sub>O 4X (20ul)</b>
0,5	0,5725	2,29	17,71
1,0	1,1475	4,59	15,41
2,0	2,2925	9,17	10,83
3,0	3,44	13,76	6,24
4,0	4,5875	18,35	1,65

6. Preparar Mix 2, conforme segue:

<b>Mix 2 – Base</b>
Reag. Brradford :H <sub>2</sub> O Milli-Q estéril (v/v) 1:4

7. Ligar o Leitor de Elisa;
8. Adicione em placa de ELISA, 200 µL do mix base + 5 µL das proteínas;
9. Fazer a leitura;
10. Fazer o gráfico correspondente em Excel.

**Recomendações à cerca do procedimento**

- Lembrar de homogeneizar o mix e trocar a ponteira a cada pipetagem;
- Paralelamente ao Bradford pode-se fazer a quantificação por gel SDS-PAGE utilizando a cursa de BSA.

#### **5.4.Preparo das vacinas recombinantes de subunidade**

O uso de adjuvantes em vacinas é particularmente importante quando o antígeno possui baixa imunogenicidade. Isto se aplica para antígenos constituídos por subunidades de peptídeos e peptídeos recombinantes. A utilidade de um adjuvante é dependente de sua segurança e capacidade em estimular a imunidade por longos períodos. Adjuvantes são substâncias imunopotencializadoras que aumentam ou ocasionam resposta imune a um antígeno podendo ser compostos naturais ou sintéticos. O Hidróxido de Alumínio é o único adjuvante aprovado para uso em humanos e é também utilizado em vacinas veterinárias. Esta substância tem sido largamente utilizada na prática de vacinas há algum tempo.

##### **Material:**

- Solução de Hidróxido de alumínio
- Vacinas recombinantes
- Seringas de insulina

##### **Protocolo:**

1. Misturar a quantidade necessária de proteína recombinante (geralmente 50ug por animal) a Solução de Hidróxido de alumínio numa concentração final de 15%. O volume de vacina não deve exceder 100uL por animal, no caso de camundongos como modelo biológico.
2. Deixar a emulsão vacinal por algumas horas a 4 °C.

##### **Recomendações à cerca do procedimento:**

- Preparar as vacinas no volume necessário para todos os animais do grupo, de modo que todos sejam vacinados com a mesma solução vacinal.

## **6.Experimentação animal**

### **6.1.Inoculação de camundongos BALB/c com as vacinas recombinantes**

##### **Reagentes:**

- Seringas de insulina de 1 mL
- Agulhas para seringas
- Algodão
- Vacinas recombinantes



**Protocolo:**

3. Vacinar os animais por via intramuscular (geralmente a pata posterior)
4. Uma pessoa imobiliza o animal posicionando-o lateralmente com pata que será vacinada esticada.
5. A outra pessoa faz a imunização na região interna da pata posterior
6. Logo em seguida, estancar o local da vacinação com o auxílio de gaze ou algodão embebido com água;
7. Colocar o animal na caixa

**6.2.Coleta de sangue do plexo retro-orbital**

**Reagentes:**

- Álcool a 70%
- Hipoclorito a 2%
- Ácido Pícrico diluído

**Protocolo:**

- 1- Separar e identificar os animais em grupos;
- 2- Conter o animal de forma que o mesmo não possa mexer-se livremente;
- 3- Posicionar o animal lateralmente e pressionar levemente a cabeça do animal em uma superfície firme;
- 4- Abrir as pálpebras do animal levemente e introduzir a pipeta Pasteur em posição central no espaço entre o olho e a pálpebra, localizando o plexo ocular e rompendo-o;
- 5- Fazer movimentos leves, nos sentidos lateral e de cima para baixo até o sangue verter dentro da pipeta;
- 6- Colocar o sangue imediatamente no *ependorf* com auxílio de uma pêra para evitar a coagulação;
- 7- Estancar o sangue imediatamente com o auxílio de gaze ou algodão embebido com água;
- 8- Pintar o animal com ácido pícrico
- 9- Colocá-lo na caixa;
- 10- Colocar o sangue em estufa a 37 °C por 1 h;
- 11- Colocar o sangue na geladeira a 4 °C por pelo menos 1 h, podendo ser armazenado a 4 °C até o dia seguinte;
- 12- Armazenar os soros em refrigeração até o momento do processamento final;
- 13- Centrifugar a 3.000 rpm durante 10 min a 4 °C;
- 14- Separar o soro do coágulo colocando em um *ependorf* estéril corretamente identificado;
- 15- Armazenar em caixas para congelamento, fazer o mapa da caixa e congelar em freezer a -20 °C;

### **Recomendações à cerca do procedimento:**

- Eliminar a pipeta dentro de uma caixa para instrumentos pérfuro-cortantes.
- Retirar o algodão das pipetas antes do procedimento;
- Fazer uma inspeção rigorosa nas pipetas antes de usá-las, pois qualquer ponta quebrada poderá ferir em demasia o olho do animal.

### **Identificação de animais**

<b>Animais</b>	<b>Pintura com ácido pícrico</b>
1 – CP	Cabeça pintada
2 – RP	Rabo pintado
3 – PDD	Pata dianteira direita pintada
4 – PTD	Pata traseira direita pintada
5 – N	Nenhuma pintura

## **7.Avaliação da resposta imune**

### **7.1.Titulação de anticorpos por ELISA**

#### **Reagentes:**

- Tampão Carbonato Bicarbonato 50 mM pH 9,8;
- PBS-T 1x;
- BSA 0,5%;
- Conjugado antiIgG mouse;

- OPD;
- Citrato fosfato pH 4,0;
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Protocolo:**

**1) Sensibilização da Placa**

- em uma placa de ELISA reservar a posição A1 para o branco;
- verificar a concentração da proteína (NRDF 0,12 µg/µL = 120 µg/mL);
- calcular para as concentrações de padronização: 5 µg/mL e 10 µg/mL ( $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ );

**Ex.: 5 µg/mL**

$$120 \mu\text{g/mL} \cdot V_1 = 5 \mu\text{g/mL} \cdot 5000 \mu\text{L}$$

$$V_1 = 25.000 \mu\text{L} / 120$$

$$V_1 = 208,33 \mu\text{L} \text{ proteína} + 4791,66 \mu\text{L} \text{ Tampão Carbonato Bicarbonato}$$

**Ex.: 10 µg/mL**

$$120 \mu\text{g/mL} \cdot V_1 = 10 \mu\text{g/mL} \cdot 5000 \mu\text{L}$$

$$V_1 = 50.000 \mu\text{L} / 120$$

$$V_1 = 416,66 \mu\text{L} \text{ proteína} + 4583,33 \mu\text{L} \text{ Tampão Carbonato Bicarbonato}$$

- Diluir a proteína em Tampão Carbonato Bicarbonato 50 mM pH 9,8;
- Adicionar 100 µL da proteína para sensibilizar a placa;
- Incubar a 37 °C por 2 h ou overnight a 4 °C (geladeira);
- Lavar 3 X a placa adicionando 200 µL PBS-T 1X por cavidade durante 1 min.

**2) Bloqueio**

- Adicionar 150 µL por cavidade de BSA 0,5%;
- Incubar a 37 °C por 1h;
- Lavar 3 X a placa adicionando 200 µL PBS-T 1X por cavidade durante 1 min.

**3) Adição do soro**

- Diluição dos soros 1/20 e 1/50;
- Adicionar 50 µL por cavidade;
- Incubar a 37 °C por 1 h.

**Ex.: Diluição do soro 1/20**

1/20 → 4 cavidades (fazer para 5)

1 - 20 µL

X - 250 µL

X = 12,5 µL pool soro cada coleta

237,5 µL PBS-T 1X

---

Total = 250 µL

**Diluição do soro 1/50**

1/50 → 4 cavidades (fazer para 5)

1 - 50 µL

X - 250 µL

X = 5 µL pool soro cada coleta

245 µL PBS-T 1X

---

Total = 250 µL

Usar 1 µL de soro cada animal  
Vortex antes de aplicar na placa.

Usar 2,5 µl de soro cada animal  
Vortex antes de aplicar na placa.

#### **4) Conjugado**

- Conjugado antiIgG mouse (1/2000);
- Incubar a 37 °C por 1 h;
- Lavar 3 X a placa adicionando 200 µL PBS-T 1X por cavidade durante 1 min.

**Ex.:** Preparar na hora:

Para 96 cavidades - 5500 µL

5500 µL de PBS-T 1X + 2,75 µL de conjugado IgG.

#### **5) Substrato**

- 2 mg de OPD (0,002g na balança);
- 5 mL de citrato fosfato pH 4,0.
- 5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Aplicar 50 µL cada orifício.
- Incubar a TA por 10 min no escuro.

#### **6) Leitura**

- Calibração do leitor de ELISA;
- Ligar o estabilizador e o leitor;
- Esperar 15 min de autocalibração;
- Recall (para ver o programa que esta);
- Meansparamets (para ver quais os parâmetros do programa);
- Ajustar o programa 1 – 450nm;
- Ajustar a cavidade branca A1;
- Limpar o fundo da placa com algodão embebido em álcool.

#### **Recomendações à cerca do procedimento**

- Preparar o conjugado e o substrato no momento do uso.
- Ligar o leitor do ELISA 15 min antes de fazer a leitura, ou seja, depois de adicionar o substrato na placa.
- Diluir os soros sempre no gelo e de preferência nos mesmos horários para todos os ELISAS.

#### **7.2. Western blot**

##### **Reagentes**

- Tampão de transferência
- Ponceau
- PBS-T

- Leite em pó 5% ou BSA 2%
- Conjugado marcado com peroxidase
- Cromógeno

### **Protocolo**

1. Eletroforese em gel de SDS-PAGE;
2. Montar o sanduíche de transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose nessa ordem: - aparato da cuba de eletroforese (parte preta para baixo);
  - espuma;
  - 3 papéis filtro 3 MM;
  - gel;
  - membrana de nitrocelulose;
  - 3 papéis filtro 3 MM;
  - espuma;
4. Fechar o sanduíche e colocar o aparato de transferência para dentro da cuba de eletroforese;
5. Transferir por eletro transferência a 100 V por 1h e 30 min, em tampão de transferência;
6. Corar a membrana com Ponceau e fotografar, para visualizar a transferência das proteínas;
7. Descorar com PBS-T 1x, por 3 vezes durante 5 min cada lavagem;
8. Bloquear a membrana com leite em pó 5% ou BSA 2% *overnight* a 4°C ou 1h a 37°C;
9. Lavar a membrana com PBS-T 1x, por 3 vezes durante 5 min cada lavagem;
10. Adicionar o anticorpo anti-hisTag, diluído 1:10.000. Agitar 1 h a temperatura ambiente;
11. Lavar a membrana com PBS-T 1x, por 3 vezes durante 5 min cada lavagem;
12. Adicionar o conjugado anti-IgG camundongo marcado com peroxidase, incubar 1 h a temperatura ambiente;
13. Lavar a membrana com PBS-T 1x, por 3 vezes durante 5 min cada lavagem;
14. Revelar com solução cromógena: - 10 mL de TRIS-HCL 50 mM pH 7,5
  - 100 µL de cloronaftol
  - 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 Volumes
15. Incubar 15 min no escuro;
16. Parar a reação com água;

### **Recomendações à cerca do procedimento**

- Preparar a solução no momento do uso.
- Cortar uma ponta da membrana para marcar a ordem das amostras na membrana.

## **8.Sessão Técnica**

### **8.2.Resultados obtidos pelo grupo Cenbiot em vacinas recombinantes**

**Vacinas recombinantes para *Mycoplasma hyopneumoniae***  
(Dra. Simone Simionatto)

*M. hyopneumoniae* é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína (PES), uma doença respiratória responsável por significativas perdas econômicas. Vacinas comerciais são mundialmente utilizadas no controle desta doença, porém proporcionam apenas proteção parcial. Além disso, são caras devido ao crescimento fastidioso do *M. hyopneumoniae* *in vitro*. Desta forma, o desenvolvimento de alternativas para a profilaxia da PES é fundamental para a melhoria da sanidade dos suínos. A tecnologia do DNA recombinante pode ser usada para superar problemas com as vacinas convencionais. No entanto, pela utilização de códons TGA e não TGG para codificar o amino ácido triptofano, a tradução de genes de micoplasmas termina prematuramente quando clonados e expressos em outras bactérias, como *E. coli*. Devido a isso, o número de proteínas antigênicas de *M. hyopneumoniae* caracterizadas e testadas como vacinas ou em testes de imunodiagnóstico ainda é restrito. Nosso grupo vem trabalhando no desenvolvimento de vacinas recombinantes para *M. hyopneumoniae*, em um trabalho foram selecionados 63 fragmentos gênicos, os quais correspondem a 48 seqüências codificadoras (CDS) de *M. hyopneumoniae*. Num primeiro momento, foi padronizado um método de PCR de sobreposição para mutagênese sítio-dirigida de genes de *M. hyopneumoniae*, objetivando a substituição do códon TGA por TGG, na seqüência do DNA. Com esse método, a mutagênese sítio-dirigida foi realizada com sucesso em 14 genes de *M. hyopneumoniae*. Os demais genes selecionados foram amplificados por PCR e clonados no vetor Champion™ pET200D/TOPO® (Invitrogen). No total, 59 fragmentos gênicos foram clonados eficientemente. Destes, 49 tiveram suas proteínas expressas em *E. coli* e 35 foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose (HisTrap™). As propriedades antigênicas e imunogênicas destas proteínas foram analisadas. Para isso, as proteínas foram testadas contra soro de suínos convalescentes e soro hiperimune através de ELISA e *Western blot*. Algumas proteínas recombinantes foram reconhecidas especificamente por soro de suínos convalescentes indicando que elas são expressas durante a infecção. Resposta imune humoral contra as proteínas recombinantes foi avaliada em camundongos BALB/c através de ELISA. Os resultados demonstraram que os antígenos induzem um nível variável de anticorpos, o que nos permite inferir quanto à capacidade imunogênica de cada antígeno. O soro dos camundongos inoculados foi capaz de reconhecer as proteínas nativas através de ELISA. Este estudo permitiu identificar e caracterizar novas proteínas imunogênicas de acordo com o seu potencial para uso em testes de diagnóstico e/ou vacina. Estes dados representam uma importante contribuição para o desenvolvimento de testes sorológicos mais eficientes e vacinas de subunidade para o controle da infecção causada por *M. hyopneumoniae* em suínos.

### **BCG Recombinante: Novos sistemas de Expressão**

(Dra. Sibeles Borsuk)

*Mycobacterium bovis* BCG tem o potencial para ser um vetor efetivo para vacinas recombinantes multivalentes. No entanto, existem dois problemas quanto a sua utilização como vetor vacinal. O primeiro é a presença de genes que conferem resistência a antibióticos nos vetores utilizados para transformação genética. O segundo é a limitação de uso de BCG em animais, principalmente por comprometer o teste de tuberculina, utilizado como diagnóstico de tuberculose, o qual é baseado na reação de hipersensibilidade ao PPD (Derivado Protéico Purificado). Nosso grupo vem trabalhando para desenvolver estratégias que possam ser alternativas ao uso de BCG como vetor de vacina. Resultados promissores foram encontrados no desenvolvimento de complementação auxotrófica como novo marcador de seleção. Para o uso de complementação auxotrófica como marcador de seleção, uma cepa de BCG auxotrófica para o aminoácido leucina foi construída por *knockout* do gene *leuD* por recombinação homóloga. A expressão do gene *leuD* em um plasmídeo atuou como marcador de seleção nas cepas auxotróficas de *M. bovis* BCG  $\Delta leuD$  e *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>144. A seleção por complementação de BCG auxotrófica se mostrou equivalente à seleção por resistência a antibiótico, com a vantagem adicional de proporcionar maior estabilidade do vetor plasmidial, já que a pressão seletiva é mantida mesmo durante multiplicação da bactéria *in vivo*. Para possibilitar o uso de BCG sem comprometer o diagnóstico de TB foi feita a identificação das proteínas que compõem o PPD por espectrometria de massa utilizando-se LC-MS/MS (cromatografia líquida associada à espectrometria de massa em tandem). Foram identificadas 147 proteínas entre 5 amostras de PPD (2 PPD bovino e 3 PPD aviário). O PPD bovino teve um número maior de proteínas comparado ao PPD aviário. Foi identificado um grupo de 28 proteínas presentes em PPD bovino, mas ausentes em PPD aviário. Além disso, 5 proteínas encontradas no PPD estão ausentes em *M. bovis* BCG. Estes são de especial interesse, pois poderão vir a contribuir para o desenvolvimento de um teste de diagnóstico mais específico, e possivelmente capaz de diferenciar indivíduo vacinado com BCG e infectado com o bacilo da tuberculose. Os resultados obtidos apresentam alternativas para os problemas envolvidos quanto à utilização de *M. bovis* BCG como vacina recombinante. O sistema de seleção por complementação auxotrófica foi estável, e pode ser empregado na expressão de antígenos heterólogos em BCG. A identificação dos principais componentes protéicos do PPD possibilita o desenvolvimento de testes diagnósticos diferenciais, permitindo a utilização de BCG como vacina também em animais.

### **Vacinas recombinantes para Leptospirose**

(Dra. Fabiana K. Seixas)

A leptospirose é uma doença infecciosa causada por espiroquetas que pertencem ao gênero *Leptospira*, classificada como uma zoonose direta de ampla distribuição geográfica, que ocorre de forma endêmica no mundo inteiro. Os prejuízos na saúde pública e as perdas econômicas causadas por esta zoonose justificam o uso de vacinas em



humanos e em populações de animais com risco. A proteína de membrana externa LipL32 é conservada e encontrada somente em sorovares patogênicos de leptospira, apresentando grande potencial imunogênico. O gene lipL32 foi clonado no vetor de expressão em eucariotos pTarget (vacina de DNA); nos vetores pUS973, pUS974, pUS977 e pUS2000 para expressão em *M.bovis* BCG; e no vetor pAE para obtenção da proteína recombinante em *E. coli* (vacina de subunidade). Após a construção das vacinas, camundongos foram imunizados e a resposta imune foi avaliada por ELISA, western blotting e imunofluorescência. Dentre as vacinas estudadas a resposta imune teve níveis mais elevados que induziu a maior resposta imune foi a vacina de subunidade, porém com BCG recombinante (rBCG) o título de anticorpos ainda continuava em ascensão no final de 12 semanas de experimento. Os anticorpos presentes no soro dos animais vacinados foram capazes de reconhecer a proteína na membrana da leptospira através da técnica de imunofluorescência indireta. Um anticorpo monoclonal anti-LipL32 foi capaz de inibir o crescimento de Leptospiras in vitro, indicando o potencial imunoprotetor do antígeno LipL32. Hamsters imunizados com rBCG expressando LipL32 mostraram níveis significativos de proteção ( $P \leq 0,05$ ) em desafio com um inóculo letal de *L. interrogans* serovar Copenhageni. Exames de autópsia não revelaram evidências macroscópicas ou histológicas da doença em hamsters imunizados com rBCG que sobreviveram ao desafio letal. Os resultados obtidos reforçam o potencial do antígeno LipL32 como um candidato promissor no desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose, principalmente quando apresentado ao sistema imune de maneira adequada. Além disso, a estabilidade do BCG recombinante conferida pelo sistema de complementação auxotrófica pode melhorar a resposta imune induzida por este vetor vacinal, o qual pode ser utilizado para expressar antígenos de Leptospira e de outros patógenos.

Nome do Aluno \_\_\_\_\_ Livro de Registro 2010\_\_\_\_1

---

---

---

---

---

---

---























