

CLONAGEM DO GENE *invH* DE *Salmonella* Enteritidis EM VETOR DE EXPRESSÃO EM EUCARIOTO PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS POR IMUNIZAÇÃO GENÉTICA

BAMPI, Suely Ribeiro^{1,3,4}; LOPES, Caroline de Paula^{2,3}; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo³; SILVA, Wladimir Padilha²; MOREIRA, Ângela Nunes^{3,4}

¹ Bolsista CNPq, Faculdade de Nutrição, UFPel; ² DCTA, UFPel; ³ CDTEC/ Biotecnologia, UFPel

⁴ Faculdade de Nutrição, UFPel. suely_rbampi@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

O impacto social e econômico das doenças transmitidas por alimentos é evidente e, nesse contexto, a contaminação de alimentos por *Salmonella* merece destaque. *Salmonella ssp.* é uma bactéria entérica responsável por graves surtos de infecções alimentares registrados em vários países (KRÜGER et al., 2008). No Brasil, o Ministério da Saúde (2008) aponta que, no período de 1999 a 2008, bactérias do gênero *Salmonella spp.* foram responsáveis por mais de 40% das enfermidades de origem alimentar em todo o país, revelando a importância desse patógeno alimentar na saúde pública.

O método convencional para detecção de *Salmonella* em alimentos, baseado no isolamento, identificação bioquímica e sorológica do patógeno, apresenta limitações, como por exemplo, o longo período de tempo exigido para a detecção (até 7 dias para se obter um resultado negativo) (BAM, 1998). Por isso, métodos rápidos, reprodutíveis e baratos para a detecção desse patógeno tem sido alvo de pesquisas e, dentre esses métodos, destacam-se os baseados na reação antígeno-anticorpo (OLSVIK et al., 1994; KLEINER, 2000; MOREIRA et al., 2009).

A utilização de anticorpos monoclonais (MAbs) contra antígenos de superfície específicos de salmonelas aumenta a especificidade de métodos imunológicos de detecção e facilita sua padronização. Além disso, em geral, MAbs apresentam alta afinidade pelo antígeno selecionado e não promovem reações inespecíficas com outros antígenos (BOENISCH, 2001).

MAbs podem ser produzidos utilizando-se a imunização clássica com proteínas recombinantes ou através da imunização genética. Na produção de MAbs a partir da imunização genética, o gene que codifica o antígeno de interesse é clonado em um plasmídeo de expressão em eucariotos, o plasmídeo recombinante é inoculado em animais e a proteína é expressa *in vivo* (TANG et al., 1992). Essa técnica é vantajosa por gerar forte resposta imune humoral, altamente específica e os MAbs reconhecem a forma nativa e recombinante da proteína (LEINONEN et al., 2004; PUTTIKHUNT et al., 2003). O gene *invH* de *Salmonella* Enteritidis, utilizado para a clonagem no plasmídeo de expressão, foi obtido após uma extensa revisão bibliográfica e análises em bancos de dados de DNA (SIGRIST et al., 2011; YU et al., 2011). InvH é uma proteína de membrana externa, presente na maioria dos sorovares de *Salmonella* e apresenta características antigênicas (DAEFLER & RUSSEL, 1998). Desse modo, o presente trabalho teve por objetivo clonar o gene *invH*, de *Salmonella* Enteritidis em plasmídeo de expressão em eucariotos (pcDNA3), para imunização genética e posterior utilização no *screening* de MAbs.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O DNA genômico de *Salmonella* Typhimurium foi extraído conforme as instruções do *Kit Mini Prep Spin Kit* (GE-Healthcare) para amplificação por PCR do gene *invH* (número de acesso no NCBI [207858162](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/207858162)) de *Salmonella*. O fragmento amplificado foi visualizado em gel de agarose 0,8%, e purificado pelo *Kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE-Healthcare). Tanto o vetor pcDNA3 quanto o fragmento *invH* foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI, por uma hora a 37°C, e posteriormente submetidos a reação de ligação mediada pela enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen), por 30 minutos a 16°C.

O produto da ligação pcDNA3/*invH* foi utilizado para transformar por choque térmico cepas de *E. coli* BL21(DE3) TOP10. Posteriormente as células transformadas foram cultivadas em agar Luria Bertani (LB) acrescido de 100 µg.ml⁻¹ de ampicilina e as placas incubadas a 37°C *overnight*. A triagem dos clones recombinantes foi realizada através da extração rápida de DNA utilizando a técnica de *microprep* (Jouglard et al., 2002). O DNA plasmídeo foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 0,8% e as possíveis colônias recombinantes foram cultivadas em caldo LB suplementado com 100 µg.ml⁻¹ de ampicilina a 37°C, sob agitação, por 16 à 18h. Estas culturas foram submetidas à extração do DNA plasmídeo utilizando o kit *Plasmid Prep Mini Spin* (GE-Healthcare).

Para confirmar a presença do inserto, o DNA plasmídeo extraído dos possíveis clones recombinantes foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI para liberação do inserto e foi utilizado como DNA molde em uma PCR com os mesmos *primers* utilizados na clonagem. Os clones recombinantes foram expandidos e o plasmídeo pcDNA3/*invH* foi purificado em larga escala, de acordo com metodologia descrita por Sambrook e Russel (2001).

A concentração do plasmídeo purificado foi estimada através da comparação com o marcador de DNA λDNA/*Hind*III, após eletroforese em gel de agarose 0,8% e por fluorescência utilizando o equipamento Qubit (Invitrogen, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das possíveis colônias de *E. coli* TOP10 que cresceram após transformação com o produto da ligação pcDNA3/*invH*, três foram selecionadas para extração rápida, das quais duas das colônias selecionadas confirmaram-se clones recombinantes através da caracterização com as enzimas de restrição previamente citadas (Figura 1). Além disso, um produto de aproximadamente 441 pb, correspondente ao gene *invH* de *Salmonella* Typhimurium, foi obtido após a PCR utilizando o plasmídeo pcDNA/*invH* como DNA molde (dados não apresentados).

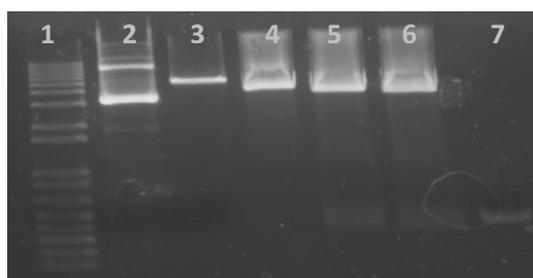


Figura 1. Caracterização do pcDNA3/*invH* através de digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI. 1 – Marcador de DNA de 1 kb; 2 – plasmídeo pcDNA3 circular; 3 – plasmídeo pcDNA3 digerido; 4 a 6 – plasmídeos pcDNA3/*invH* digeridos; 7 – PCR do fragmento *invH*.

O plasmídeo recombinante (pcDNA3/*invH*) foi expandido em larga escala e purificado com sucesso, o qual obteve-se uma concentração de aproximadamente 1 µg.µL⁻¹ (Figura 2).”

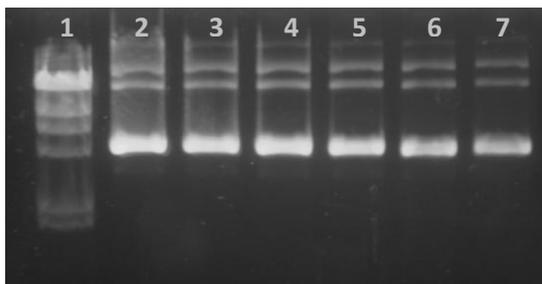


Figura 2. Quantificação do DNA plasmideal em gel de agarose 0,8% após expansão em larga escala e purificação. 1 - Marcador de DNA λDNA/HindIII; 2 e 3– pcDNA3/*invH* diluído 1:5; 4 e 5 – pcDNA3/*invH* diluído 1:10; 6 e 7 - pcDNA3/*invH* diluído 1:20.

4 CONCLUSÃO

A clonagem do gene *invH* de *Salmonella* Typhimurium no vetor de expressão em eucariotos pcDNA3 foi realizada com sucesso. O plasmídeo recombinante pcDNA3/*invH* está sendo utilizado na imunização genética de camundongos visando a produção de MAb's específicos contra *Salmonella*.

5 REFERÊNCIAS

BAM/FDA. **Bacteriological Analytical Manual/ Food and Drug Administration**, 8th, Arlington: Association of Official Analytical Chemists. 1998.

BOENISCH, T. (Ed.) **Immunochemical Staining Methods**, 3ª ed., Califórnia: Dako, 2001.

DAEFLER, S.; RUSSEL, M. The *Salmonella* Typhimurium InvH protein is an outer membrane lipoprotein required for the proper localization of InvG. **Molecular Microbiology** v.28(6), 1367–1380, 1998.

JOUGLARD, S.D.; MEDEIROS, M.A.; VAZ, E.K.; BASTOS, R.G.; CUNHA, C.W.; ARMOA, G.R.G.; DELLAGOSTIN, O.A. An Ultra-Rapid and Inexpensive Plasmid Preparation Method for Screening Recombinant Colonies. **Abstracts American Society for Microbiology**, H 71, p.234, 2002.

KLEINER, U. Investigations on use of the EiaFoss system for rapid detection of salmonellae in meat. **Archiv Fur Lebensmittelhygiene**, v. 51, n. 2, p. 46-49, 2000.

KRÜGER, A.; REDMANN, T.; KRAJEWSKI, V. Field investigations on the efficacy of a live vaccine of *Salmonella* Enteritidis in meat turkeys. In: INTERNATIONAL

SYMPOSIUM ON TURKEY DISEASES, 7., 2008, Berlim, **Anais Berlim**: German Branch of World Veterinary Poultry Association, p.60, 2008.

LEINONEN, J.; NIEMELÄ, P.; LÖVGREN, J.; BOCCHI, L.; PETTERSSON, K.; NEVANLINNA, H.; STENMAN, U-H. Characterization of monoclonal antibodies against prostate specific antigen produced by genetic immunization. **Journal of Immunological Methods**, v. 289, p. 157– 167, 2004.

MOREIRA A.N., CONCEIÇÃO F.R., CONCEIÇÃO R.C.S., DIAS C.N., CARVALHAL J.B., DELLAGOSTIN O.A.; ALEIXO J.A.G. IMS using in-house monoclonal antibody-coated magnetic beads associated to PCR assay for detection os *Salmonella* Typhimurium in raw meats, **Journal of Food Safety** v.29,p. 59–72, 2009.

NAGATA, S.; SALVATORE, G; PASTAN, I. DNA immunization followed by a single boost with cells: a protein-free immunization protocol for production of monoclonal antibodies against the native form of membrane proteins. **Journal of Immunological Methods**, v. 280, p. 59– 72, 2003.

OLSVIK, O.; POPOVIC, T.; SKJERVE, E.; CUDJOE, K.S.; HOMES, E.; UGELSTAD, J.; UHLEN, M. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, p. 43-54, 1994.

PUTTIKHUNT, C.; KASINRERK, W.; SRISA-AD, S.; DUANGCHINDA, T.; SILAKATE, W.; MOONSOM, S.; SITTISOMBUT, N.; MALASIT, P. Production of anti-dengue NS1 monoclonal antibodies by DNA immunization. **Journal of Virological Methods**, v. 109, p. 55-61, 2003.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, **Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**; Ministério da Saúde disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf Acesso em: 05 de julho 2012.

SIGRIST C.J.A., CERUTTI L, CASTRO E, LANGENDIJK-GENEVAUX PS, BULLIARD V, BAIROCH A, HULO N. PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. **Nucleic Acids Res.** 38(Database issue)161-6 (2010).

TANG, D.; DeVIT, M.; and JOHNSTON, S. A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. **Nature**, v. 356, p. 152-154, 1992.

ULIVIERI, C.; BURRONI, D.; TELFORD, J.L.; BALDARI, C.T. Generation of a monoclonal antibody to a defined portion of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by DNA immunization. **Journal of Biotechnology**, v. 51, p. 191-194, 1996.

YU, N.Y., LAIRD, M.R., SPENCER, C, and BRINKMAN, F.S.L. (2011) PSORTdb--an expanded, auto-updated, user-friendly protein subcellular localization database for Bacteria and Archaea. **Nucleic Acids Research.** 39:D241-244.