

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

Instituto de Biologia

Curso de Graduação em Ciências Biológicas



*Trabalho de Conclusão de Curso*

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA ANTIGENICIDADE DE  
PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Mycoplasma  
hyopneumoniae***

**Vanessa Galli**

Pelotas, 2008

**Vanessa Galli**

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA ANTIGENICIDADE DE  
PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Mycoplasma*  
*hyopneumoniae***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de Biologia  
da Universidade Federal de Pelotas,  
como requisito parcial à obtenção do  
título de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

Orientador: Odir Antônio Dellagostin

Co-Orientador: Simone Simionatto

Pelotas, 2008.

**Banca examinadora:**

Profa. Dra. Fabiana Seixas, Universidade Federal de Pelotas.

MSc. Silvana Marchioro, Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Fabrício Conceição, Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin, Universidade Federal de Pelotas.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Clareni e Antoninha e meus irmãos André e Fernanda que, mesmo estando longe, estiveram sempre muito presentes.

Aos demais familiares que sempre apoiaram meus objetivos.

Ao meu orientador, professor Odir pelas oportunidades que me proporcionou.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Simone, pela atenciosidade e disponibilidade prestada e pela simpatia e brincadeiras que tornavam cada dia de trabalho ainda mais agradável.

A alguém especial, cujo amor, carinho e atenção são incentivos para querer crescer sempre mais.

## RESUMO

GALLI, Vanessa. **Produção e avaliação da antigenicidade de proteínas recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae***. 2008. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso. Instituto de Biologia. Curso de Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A Pneumonia Enzoótica Suína (PES) é uma doença respiratória contagiosa, com ampla distribuição, causada pela bactéria fastidiosa *Mycoplasma hyopneumoniae*. As vacinas disponíveis oferecem apenas proteção parcial e apresentam elevado custo de produção. Alguns antígenos vêm sendo testados em diferentes sistemas de vacinação, no entanto, somente dois destes foram testados em ensaio de imunoproteção em suínos, porém nenhum deles foi mais eficiente que as bacterinas comerciais no controle da PES. O *M. hyopneumoniae* não utiliza o código genético universal e esta diferença tem dificultado a expressão de genes de *M. hyopneumoniae* contendo códons TGA em *Escherichia coli*, o sistema de expressão heteróloga mais utilizado em laboratório. Este trabalho teve como objetivo a produção e avaliação da antigenicidade de proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* em *E. coli*, visando o desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra a PES. Com esta finalidade, quatro genes foram amplificados por PCR, clonados e expressos em *E. coli*. Um dos genes foi submetido à mutação sítio-dirigida, onde um códon TGA foi substituído por TGG. Três proteínas recombinantes - uma proteína paróloga à P102, e duas proteínas hipotéticas - foram purificadas por cromatografia de afinidade. Em ensaio de *Western blot*, todas as proteínas recombinantes reagiram quando confrontadas com anticorpo anti-histidina. Estas proteínas também foram reconhecidas por anticorpos presentes no soro de suínos naturalmente e experimentalmente infectados com o *M. hyopneumoniae* indicando serem candidatas promissoras para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade.

**Palavras-chave:** *Mycoplasma hyopneumoniae*, clonagem, purificação de proteínas, vacina recombinante, *Western blot*.

## ABSTRACT

GALLI, Vanessa. **Production and antigenicity evaluation of *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins**. 2008. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso. Instituto de Biologia. Curso de Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The Porcine Enzootic Pneumonia (PEP) is a contagious respiratory illness, with large distribution, caused by the fastidious bacterium *Mycoplasma hyopneumoniae*. Available vaccines offer only partial protection and present high cost of production. A few antigens have been tested in different systems of vaccination, however, only two of these have been tested in immunoprotection assay in swine and none of them was more efficient than the commercial bacterin for the control of the PEP. The *M. hyopneumoniae* does not use the universal genetic code and this difference has hampered the expression of genes of *M. hyopneumoniae* containing TGA codons in *Escherichia coli*, the heterologous system normally used in laboratory. The objective of the present work was to produce and evaluate the antigenicity of recombinant proteins of *M. hyopneumoniae* in *E. coli*, aiming at the development of a subunit vaccine against the PEP. Four genes have been amplified by PCR, cloned and expressed in *E. coli*. One of these genes was submitted to the site-directed mutagenesis, where one TGA codon was replaced by TGG. Three recombinant proteins – a P102-paralogous and two hypothetical proteins – were purified by affinity chromatography. All of them reacted with anti-histidine antibody in a Western blot assay. Also, these proteins were recognized by antibodies present in the serum of swine naturally and experimentally infected with the *M. hyopneumoniae*, being promising candidates to develop a subunit vaccine.

**Keywords:** *Mycoplasma hyopneumoniae*, cloning, protein purification, recombinant vaccine, Western blot.

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose 1 % da mutação sítio-dirigida da CDS MHP0660.....**35**
- Figura 2.** SDS-PAGE 12 % da expressão de três proteínas de *M. hyopneumoniae* expressas em *E. coli* BL21(DE3)RIL.....**35**
- Figura 3. A.** 12% SDS-PAGE das três proteínas recombinantes purificadas por cromatografia de afinidade. **B.** *Western blot* das três proteínas recombinantes separadas em 12% SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e confrontadas contra anticorpo anti-histidina e anticorpo anti-mouse conjugado com peroxidase utilizando anticorpo anti-histidina.....**36**
- Figura 4.** *Western blot* das três proteínas recombinantes separadas em 12% SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e confrontadas com: **A.** soro de suíno convalescente e **B.** soro hiperimune de suíno. Anti-soro IgG de suíno conjugado com peroxidase foi utilizado como anticorpo secundário.....**38**

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Regiões Codificadoras de <i>M. hyopneumoniae</i> selecionados e os respectivos <i>primers</i> desenhados para amplificação.....	<b>31</b>
--	-----------

## Lista de Abreviaturas

**A:** adenina

**C:** citosina

**CDS:** região codificadora (códon sequence, em inglês)

**°C:** graus Celsius

**DNA:** ácido desoxirribonucléico

**dNTP:** dinucleotídeo tri-fosfato

**G:** guanina

**Kb:** quilobase

**kDa:** quilodalton

**M:** molar

**min:** minuto

**mL:** mililitro

**mM:** milimolar

**ng:** nanograma

**PCR:** Reação em Cadeia da Polimerase (Polimerase Chain Reaction, em inglês)

**pmol:** picomol

**µm:** micrômetro

**T:** timina

**%:** por cento

**µg:** micrograma

**µL:** microlitro

**× g:** vezes gravidade

## SUMÁRIO

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>1</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>2</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>4</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>5</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>6</b>
<b>Introdução Geral</b> .....	<b>8</b>
<b>Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>9</b>
1. Características gerais.....	9
2. Patogenia.....	11
3. Patologia.....	14
4. Prejuízos econômicos.....	15
5. Transmissão.....	16
6. Diagnóstico.....	17
7. Controle.....	20
7.1. Vacinas Comerciais.....	21
7.2. Desenvolvimento de novas vacinas.....	24
8. Conclusão.....	27
<b>Artigo 1- Clonagem, purificação e avaliação da antigenicidade de proteínas recombinantes de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i></b> .....	<b>28</b>
1. Introdução.....	29
2. Material e Métodos.....	30
2.1. Cepas e plasmídios.....	30
2.2. Análise das regiões codificadoras.....	30
2.3. Amplificação dos fragmentos gênicos.....	30
2.4. Mutação Sítio-Dirigida.....	31
2.5. Clonagem dos fragmentos gênicos.....	32
2.6. Expressão e teste de solubilidade das proteínas recombinantes.....	32
2.7. Purificação das proteínas recombinantes.....	33
2.8. <i>Western blot</i> .....	33
2.9. Avaliação da antigenicidade das proteínas recombinantes.....	33
3. Resultados e Discussão.....	34
4. Conclusão.....	38
5. Referências Bibliográficas.....	40
<b>Conclusões Finais</b> .....	<b>42</b>
<b>Referências</b> .....	<b>43</b>