

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



CONSTRUÇÃO DE UMA QUIMERA RECOMBINANTE FORMADA PELA FUSÃO DO GENE *fimA* DE *Salmonella* Enteritidis E A SUBUNIDADE B DA ENTEROTOXINA TERMOLÁBIL DE *Escherichia coli*

**DE CARLI, Eduardo¹; SENH, Carla Pohl²; CONRAD, Neida Lucia¹; BANDEIRA;
Rafaela Oliveira³; MENDONÇA, Marcelo²; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo²;
ALEIXO, José Antonio Guimarães²; MOREIRA, Ângela Nunes^{2,4}**

¹ Bolsista CNPq/UFPeI;

² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – UFPeI;

³ Bolsista BIC/FAPERGS;

⁴ Faculdade de Nutrição – UFPeI

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900

ecarli.fn@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Em função dos riscos que bactérias do gênero *Salmonella* representam para os consumidores, sua pesquisa em alimentos é de fundamental importância. Métodos imunológicos com anticorpos monoclonais (MAbs) têm sido propostos para a detecção rápida e específica de salmonelas em alimentos (BLACKBURN, 1993).

Para a produção de MAbs, a escolha do antígeno e a sua purificação são de extrema importância para que o mesmo seja capaz de induzir resposta imune após a imunização (PATA et al., 2009). Como alguns alvos antigênicos podem apresentar baixa imunogenicidade, a utilização de adjuvantes pode ser uma alternativa para o aumento da eficiência nas imunizações (DZIERZBICKA; KOLODZIEJCZYK, 2006). A subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) é um potente adjuvante, capaz de estimular uma resposta sistêmica e secretória de anticorpos contra antígenos co-administrados ou fusionados (CONCEIÇÃO et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi clonar e expressar a proteína rLTB-FimA, uma quimera recombinante composta pela fusão da LTB com a subunidade fimbrial principal de *Salmonella* Enteritidis (FimA), a qual será utilizada na imunização de camundongos para posterior produção de MAbs anti-FimA.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Clonagem do gene que codifica a subunidade fimbrial principal de *S. Enteritidis* (*fimA*) em plasmídeo de expressão em *E. coli* contendo o gene *ltb*

Primers específicos para o gene *fimA* de *S. Enteritidis* foram desenhados a partir da sequência depositada no GenBank (número de acesso S76043) com a utilização do programa VectorNTI 9.0. Na sequência dos *primers*, foram incluídos sítios de clivagem para as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI nas extremidades 5' e 3' do gene, respectivamente. O gene *fimA* foi amplificado por PCR a partir do DNA

cromossomal de *S. Enteritidis* e clonado no vetor de expressão em *E. coli* contendo o gene *ltb* (pAE/*ltb*). O produto da ligação (pAE/*ltb-fimA*) foi usado para transformar células competentes de *E. coli* TOP10F por eletroporação e as colônias recombinantes selecionadas em ágar Luria Bertani (LB) contendo ampicilina. Cepas de *E. coli* BL21 (DE3) Star, pLysS e Ril foram transformadas com pAE/*ltb-fimA* por choque térmico, visando a expressão da quimera recombinante (rLTB-FimA). As células recombinantes, selecionadas em ágar LB contendo ampicilina, foram cultivadas em caldo LB e incubadas em agitador orbital (37°C/200 rpm) até a fase log de crescimento, quando a cultura foi dividida em duas alíquotas. Uma foi suplementada com 0,5 mM de IPTG (isopropil β-D-tiogalactosídeo) por 3h (37°C/200 rpm) visando a indução da expressão da quimera recombinante e a outra não foi induzida para ser utilizada posteriormente como controle negativo. Após a indução, alíquotas de 1 mL das culturas foram coletadas e centrifugadas para avaliar a expressão da rLTB-FimA através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), usando extrato protéico total de cada clone como descrito por Sambrook (2001).

2.2 Avaliação da expressão da quimera recombinante através de *Western blot* e *Dot blot*

Para avaliar a expressão da quimera, *Western blot* (WB) e *Dot blot* foram realizados de acordo com Dummer et al. (2009) com modificações. Para o WB, proteínas de alíquotas de 1 mL das culturas foram separadas através de SDS-PAGE como descrito acima. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e a membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado em PBS por 1h. A membrana foi incubada com MAb anti-histidina (1:5000) e, após nova lavagem, incubada com anticorpo de cabra anti-imunoglobulina de camundongo conjugado a peroxidase (1:3000). Entre as incubações, foram realizadas três lavagens com PBS-T. A expressão da quimera também foi avaliada por *Dot blot*. Cerca de 10 µL das culturas foram aplicados diretamente em membranas de nitrocelulose. As membranas foram secas à temperatura ambiente por 10 min, bloqueadas com 5% de leite em pó em PBS por 1 h, lavadas 3 vezes com PBS-T e incubadas com soro policlonal anti-LTB (1: 1000) e MAb anti-histidina (Sigma) (1:5000). Após 1 h, nova lavagem foi realizada e a solução composta por anticorpo de cabra anti-imunoglobulina de camundongo conjugado a peroxidase (1:3000) foi adicionada. As reações de WB e *Dot blot* foram reveladas utilizando-se o cromógeno diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂. Como controles negativos foram utilizados uma proteína recombinante de 44 kDa (rOmpX) e alíquotas das culturas não induzidas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O par de *primers* contendo os sítios para as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI foram desenhados de forma a amplificar apenas um segmento que codifica um fragmento de 496 pb correspondente a *fimA*, o qual foi clonado com sucesso no plasmídeo pAE/*ltb*.

SDS-PAGE 12% foi utilizada para avaliar a expressão da quimera recombinante em cepas de *E. coli* BL21 (DE3) Star, pLysS e Ril que foram transformadas com pAE/*ltb-fimA*. As três cepas de *E. coli* avaliadas expressaram uma proteína heteróloga de aproximadamente 28,5 kDa, massa molecular predita para a rLTB-FimA (Figura 1).

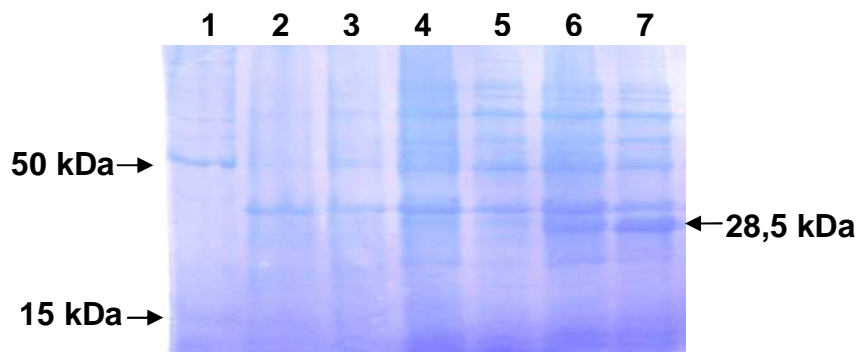


Figura 1. SDS-PAGE 12% da expressão da quimera recombinante LTB-FimA em *E. coli* Ril. 1 - Marcador BenchMark Protein Ladder; 2 – Ril não induzida; 3 - Ril induzida; 4 - Ril transformada com pAE/*ltb* não induzida; 5 - Ril transformada com pAE/*ltb* induzida; 6 - Ril transformada com pAE/*ltb-fimA* não induzida; 7 - Ril transformada com pAE/*ltb-fimA* induzida.

O vetor pAE possui em sua estrutura uma cauda de 6 histidinas, que possibilita a purificação da proteína de interesse por cromatografia de afinidade e a sua detecção em imuno-técnicas utilizando MAb anti-histidina. A confirmação da expressão da quimera foi realizada por WB utilizando MAb anti-histidina, no qual foi possível observar a expressão de uma proteína heteróloga de massa molecular predita para a rLTB-FimA (Figura 2).

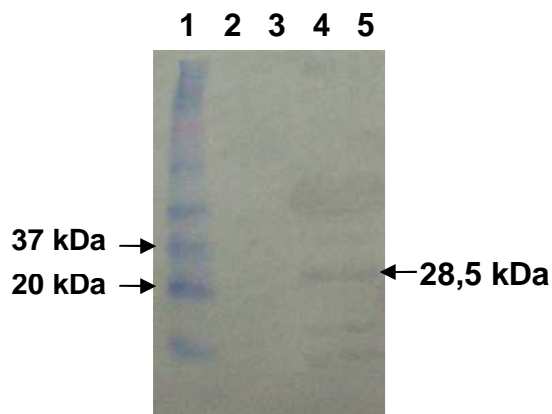


Figura 2. Western blot da expressão da rLTB-FimA em *E. coli* Star utilizando MAb anti-histidina. 1– Marcador pré-corado; 2–Ril não induzida; 3- Ril induzida; 4- Ril transformada com pAE/*ltb-fimA* não induzida; 5- Ril transformada com pAE/*ltb-fimA* induzida.

Através do *Dot blot* foi possível observar que as três cepas expressaram a rLTB-FimA e que, tanto o soro policlonal anti-LTB quanto o MAb anti-histidina, foram capazes de reconhecer a quimera LTB-FimA (Figura 3).

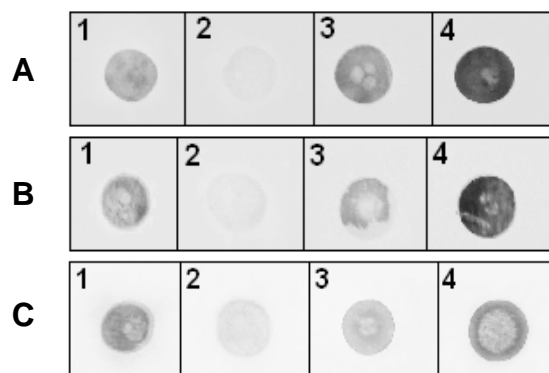


Figura 3. Dot blot da expressão da rLTB-FimA utilizando MAb anti-histidina. A) Ril; B) Star; C) pLysS. 1– rOmpX (44 kDa); 2– Extrato celular de *E. coli* sem indução; 3 – *E. coli* transformada com pAE/*ltb-fimA* não-induzido; 4 - *E. coli* transformada com pAE/*ltb-fimA* induzido.

4. CONCLUSÃO

O gene *fimA* foi clonado com sucesso no plasmídeo de expressão pAE/*ltb* e a quimera recombinante LTB-FimA foi expressa pelas cepas de *E. coli* BL21 (DE3) Star, pLysS e Ril. As três estratégias de expressão serão avaliadas quanto à solubilidade da proteína produzida. Cultivos e purificações em maior escala serão realizados e a quimera purificada será utilizada na imunização de camundongos BALB/c visando a posterior produção de MABs anti-FimA.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 022098320-80 pelo suporte financeiro.

6. REFERÊNCIAS

BLACKBURN, C. de W. Rapid and alternative methods for detection of salmonellas in foods. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 75,p. 199-214, 1993.

CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N.; DELLAGOSTIN, O. A. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, v. 24, p. 5734–5743, 2006.

DUMMER, L.A.; CONCEIÇÃO, F.R.; NIZOLI, L.Q.; DE MORAES, C.M.; ROCHA, A.R.; DE SOUZA, L.L.; ROOS, T.; VIDOR, T.; LEITE, F.P. Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in

methylophilic yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, v. 161, n. 1, p. 84-90, 2009.

DZIERZBICKA, K.; KOŁODZIEJCZYK, A. M. Adjuvants essential components of new generation vaccines. **Postepy Biochemistry**, v. 52, n. 2, p. 204-211, 2006.

PATA, S.; TAYAPIWATANA, C.; KASINRERK, W. Three different immunogen preparation strategies for production of CD4 monoclonal antibodies. **Hybridoma (Larchmt)**, v. 28, n. 3, p. 159-165, 2009.

SAMBROOK, J. & RUSSEL. D. W. **Molecular Cloning – A laboratory Manual**. *In* (Cold Spring Harbor, Ed.), 2001.