

EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA N DO VÍRUS DA SINDROME RESPIRATÓRIA E REPRODUTIVA DOS SUÍNOS (PRRSV) PARA USO COMO ANTÍGENO EM TESTE DE ELISA

LÍVIA SILVEIRA MUNHOZ¹; PAULA FONSECA FINGER²; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO³; RUDI WEIBLEN⁴; MARCELO DE LIMA⁵; SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER⁶

¹Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária – Laboratório de Virologia e Imunologia Animal – UFPel - livinhamunhoz@hotmail.com

²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária – Centro de Biotecnologia – UFPel

³Centro de Biotecnologia - CDTec - UFPel

⁴Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - UFSM

⁵Laboratório de Virologia e Imunologia Animal - Faculdade de Veterinária - UFPel

⁶Laboratório de Virologia e Imunologia Animal - Faculdade de Veterinária - UFPel
sohubner@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV) tem sido associada a perdas econômicas significativas em países com suinocultura expressiva (NEUMANN et al., 2005). Infecções subclínicas e ocorrência de altas taxas de mortalidade têm sido frequentemente observadas em rebanhos afetados (ZIMMERMAN, 1997). O PRRSV está classificado na ordem *Nidovirales*, família *Arteriviridae*, gênero *Arterivirus*. É um vírus pequeno (50-65nm de diâmetro); possui um nucleocapsídeo icosaédrico envolto por um envelope lipoprotéico. O genoma é composto por uma molécula linear de RNA, fita simples e sentido positivo, com aproximadamente 15.1Kb. Dentre as proteínas estruturais, a proteína do nucleocapsídeo (N) é a mais abundante no vírion e tem sido utilizada como antígeno em testes de diagnóstico (MEULENBERG et al., 2000).

Apesar da infecção pelo PRRSV ser endêmica na grande maioria dos países produtores de suínos, a circulação viral não foi detectada no Brasil (CIACCI-ZANELLA et al., 2004, 2012). Entretanto, devido a importância da suinocultura brasileira no agronegócio nacional e internacional, é de fundamental importância o monitoramento constante dos rebanhos bem como de animais e material genético introduzidos no país (DE LIMA; OSÓRIO, 2007).

Neste sentido, é essencial a adoção de medidas que evitem a introdução do agente em áreas ou países livres bem como o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico da infecção. Testes comerciais do tipo ELISA têm sido amplamente utilizados para o diagnóstico sorológico da infecção pelo PRRSV em diversos países. No entanto, o alto custo e os trâmites de importação, muitas vezes, impossibilitam a sua ampla utilização no monitoramento sorológico dos rebanhos (DE LIMA; OSÓRIO, 2007).

Este trabalho teve como objetivo a expressão e caracterização da proteína N do PRRSV e sua utilização como antígeno recombinante em teste de ELISA indireto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Clonagem e seleção dos clones recombinantes

Para a amplificação do gene codificante da proteína N do PRRSV, foram desenhados *primers* com base na sequência de nucleotídeos da cepa NVSL 97-7895 (*GenBank*: AY545985). O gene da proteína N do PRRSV foi amplificado a partir do plasmídeo EPpBR que contém o cDNA dos genes que codificam as proteínas estruturais do PRRSV. O produto da PCR foi então purificado através do kit comercial (*Charge Switch PCR Clean-up* – Invitrogen) e digerido com as enzimas BamHI e EcoRI. Posteriormente, o amplicon foi clonado direcionalmente no vetor de expressão pAE, e o plasmídeo recombinante (pAE-N) foi então transformado em células competentes (*E. coli* TOP10) pela técnica de choque térmico.

A seleção dos clones recombinantes foi realizada pela extração de DNA plasmidial a partir das colônias obtidas, seguido de análise em gel de agarose. Adicionalmente, a presença dos clones recombinantes foi confirmada por sequenciamento genômico bidirecional.

Expressão, caracterização e purificação da proteína N recombinante

O clone recombinante selecionado foi transformado em células *E. coli* BL21(DE3) e as células foram mantidas sob agitação a 37°C. A indução da expressão foi realizada com 2mM de isopropyl-B-D-thiogalactopyranoside (IPTG), por 3 horas. O *pellet* e sobrenadante das culturas obtidas foram tratados com tampão de lise e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% após coloração com *Comassie Blue*. A identidade da proteína recombinante produzida foi confirmada por *western blot* utilizando o anticorpo monoclonal (SDOW17) e soro policlonal de animais experimentalmente infectados.

Para a purificação, o extrato celular foi inicialmente produzido em larga escala e submetido à lise celular com N-Lauroylsarcosine 0,2%, após prévios ciclos de centrifugações e sonicação, e mantido sob agitação a 4°C durante 48 horas. Após análise por SDS-PAGE, as frações contendo a proteína recombinante foram purificadas no equipamento *AKTA Prime* (*GE Healthcare*) utilizando a coluna cromatográfica de afinidade *HisTrap FF* (*GE Healthcare*), conforme recomendações do fabricante. As alíquotas purificadas e dialisadas foram quantificadas através da curva padrão de BSA (*Bovine Serum Albumin*).

ELISA indireto

A proteína recombinante purificada (rUSprotN) foi avaliada como antígeno na padronização de um teste de ELISA indireto para detecção de anticorpos específicos contra o PRRSV. Resumidamente, placas de poliestireno (*Corning Costar*[®]) foram previamente sensibilizadas com o antígeno recombinante seguidas de bloqueio por 2 horas com leite desnatado a 10%. Após incubação por 1 hora com soros controle positivo e negativo as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T20 e incubadas por mais 45 minutos com o conjugado (Anti-Pig IgG HRPO). Após nova etapa de lavagem o substrato TMB (*tetramethylbenzidine*) foi adicionado por 10 minutos e a leitura realizada a 450nm.

As concentrações ótimas do antígeno recombinante e dos soros teste foram determinadas pelo método *checkerboard*. Como controle positivo foi usado soros de animais experimentalmente infectados pelo PRRSV (gentilmente cedidos pelo prof. Fernando Osorio – UNL, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seleção do plasmídeo recombinante (pAE-N) foi inicialmente realizada pela observação da diferença de massa molecular em relação ao vetor sem o inserto (pAE) após eletroforese em gel de agarose. O sequenciamento bidirecional do clone recombinante confirmou a orientação do gene de interesse bem como a ausência de mutações.

Os resultados demonstraram ainda uma expressão consistente da proteína recombinante com peso molecular de aproximadamente 14 KDa que foi confirmada por *western blot* pelo uso de um anticorpo monoclonal específico (SDOW17) contra a proteína N e também pelo soro policlonal de suínos experimentalmente infectados com o PRRSV. Cabe ainda ressaltar que a estratégia da expressão da proteína N recombinante fusionada com uma cauda de histidina (6XHis-tag) foi adequada e permitiu a purificação no sistema proposto.

Após a determinação de concentrações ótimas do antígeno (5ug/mL) e dos soros teste (1:80), resultados preliminares demonstram que a proteína N do PRRSV produzida em *E. coli* é adequada para uso como antígeno recombinante em teste de ELISA indireto conforme demonstrado pela diferença entre os valores de densidade óptica obtidos com o uso de soros controles positivos e negativos. Atualmente, os esforços estão direcionados na otimização e validação do teste. A validação do teste sorológico, utilizando a proteína recombinante produzida, representa uma ferramenta importante para o diagnóstico e vigilância da infecção pelo PRRSV no Brasil.

4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que a proteína N de uma cepa norte-americana do PRRSV foi produzida em altos níveis em *E.coli* sendo adequada para utilização como antígeno recombinante em teste de ELISA indireto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CIACCI-ZANELLA, J., et al. Lack of evidence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in domestic swine in Brazil. **Ciência Rural**, v.32, n.4, p.449-455, 2004.
- CIACCI-ZANELLA, J., et al. Lack of evidence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection as cause of reproductive failure in Brazilian swine herds. **22nd International Pig Veterinary Society (IPVS)**, South Korea, 2012, Proceedings of the 22nd International Pig Veterinary Society, p.965.
- DE LIMA, M.; OSORIO, F.A.. *Arteriviridae*. In: FLORES, E. **Virologia Veterinária**, Santa Maria, Editora UFSM, 2007, Cap.25, p.639-655.
- MEULENBERG, J.J. PRRSV, the virus. **Veterinary Resesarch**, v.31, p.11-21, 2000.
- NEUMANN, E.J. et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. **Journal of the American veterinary medical association**, v.227, p.385-392, 2005.
- ZIMMERMAN JJ, YOON KJ, WILLS RW, SWENSON SL. General overview of PRRSV: a perspective from the United States. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.55, n.2, p.187-196, 1997.