

CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DO GENE *pgk* de *Brucella abortus*

Marrielen Aparecida Benites Caitano¹; Carina Calixto Jank²; Bruna Barbosa¹; Carina Elisei de Oliveira³; Lenita Ramires Santos³; Cleber de Oliveira Soares³; Grácia Maria Soares Rosinha

¹Curso de Ciências Biológicas, Universidade Anhanguera – Uniderp, Campo Grande/MS. marrielenabc@hotmail.com

²Curso de Biologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, Campo Grande/MS

³Embrapa Gado de Corte, Campo Grande/MS.

RESUMO

A brucelose é uma das doenças emergentes mais importantes mundialmente na atualidade, afetando diversas espécies animais e o homem. A situação brasileira no controle de doenças infecciosas de animais requer melhorias para atingir os padrões internacionais e aumentar a produção. Por estes motivos o MAPA vem incentivado o desenvolvimento de novas vacinas e formas de diagnósticos para a brucelose bovina. Enzimas metabólicas têm sido descritas no envolvimento da virulência de *Brucella abortus*. Uma delas é a fosfoglicerato cinase (PGK), codificada pelo gene *pgk*. Neste trabalho objetivou-se a produção da proteína recombinante PGK (PGKr) de *B. abortus* em sistema heterólogo de expressão, para caracterização da cepa vacinal geneticamente modificada, *B. abortus* 2308 Δ *pgk* por *western blot* e posterior utilização em testes sorológicos. Para isto, foi realizada a extração de DNA genômico da cepa S2308 de *B. abortus* e o gene *pgk* foi amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir de primers específicos. O produto da PCR foi ligado ao plasmídeo pMAL-c2E. O clone recombinante, foi submetido à indução da produção da proteína em *Escherichia coli*. A PGKr foi purificada por cromatografia de afinidade e duas frações purificadas foram dosadas por Bradford, obtendo-se 2,62 mg da PGKr. Camundongos BALB/c foram injetados com a proteína emulsionada em adjuvante Montanide, via subcutânea. Foram realizadas três inoculações com intervalos de três semanas. Quinze dias após as inoculações, os soros sanguíneos destes animais foram coletados e separados para avaliação pelo método de *Western Blot*. Os soros confirmaram a produção de anticorpos contra o antígeno e pode-se observar que no ensaio com a cepa selvagem o anticorpo reagiu mostrando que a produção da proteína PGK está intacta nesta cepa e com a cepa mutante S2308 Δ *pgk* o anticorpo não reagiu, mostrando que a produção da proteína PGK é nula, confirmando realmente a deleção do gene *pgk* nesta cepa.

Palavras-chave: brucelose bovina; fosfoglicerato cinase; proteína PGKr; testes sorológicos

ABSTRACT

Brucellosis is one of the major emerging diseases in the world today, affecting many animal species and man. The Brazilian situation in the control of infectious animal diseases requires improvements to reach international standards and increase production. For these reasons MAPA has promoted the development of new vaccines and diagnostics means for bovine brucellosis. Metabolic enzymes have been described in the involvement in *Brucella abortus* virulence. One of them is the phosphoglycerate kinase (PGK), encoded by the gene *pgk*. This work aimed the production of the PGK recombinant protein (PGKr) of *B. abortus* in a heterologous expression system to characterize the genetically modified vaccine strain, *B. abortus* 2308 Δ *pgk* by *western blotting* and subsequent use in serological tests. For this purpose, the extraction of the genomic DNA from *B. abortus* strain S2308 was extracted and the *pgk* gene was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using specific primers. The PCR product was linked to the vector pMal-C2E. Only one recombinant clone was obtained, which was submitted to the induction of protein production with IPTG in *Escherichia coli*. The PGKr was purified by chromatography affinity using an amylose column and two purified fractions were dosed by Bradford, obtaining 2.62 mg of PGKr. BALB / c mice were injected with 48 μ g of the protein emulsified in Montanide adjuvant, subcutaneously. Three inoculations were performed at intervals of three weeks. Fifteen days after inoculation, the sera of these animals were collected and the serum was separated for evaluation by the *Western blotting* method. The sera confirmed the production of antibodies against the antigen and can be observed in the experiment with the wild type strain reacted antibody showing that the production of PGK protein is intact in this strain and the mutant strain S2308 Δ PGK antibody did not react, showing that the PGK protein production is nil, confirming really deletion of PGK gene in this strain.

Keywords: brucellosis; phosphoglycerate kinase; protein rPGK; serological tests

INTRODUÇÃO

A brucelose bovina é uma doença endêmica no Brasil, tendo sido diagnosticada em todos os Estados da Federação, contudo existem marcantes diferenças na prevalência da infecção por *B. abortus* entre os Estados (ANSELMO E PAVEZ, 1977; POESTER *et al.*, 2002).

Esta é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Brucella* (bactéria intracelular facultativa que replica nas células fagocíticas e não fagocíticas do hospedeiro, podendo infectar o homem e os animais domésticos (NICOLETTI;

WINTER, 1990). A brucelose humana foi originalmente descrita como a “Febre de Malta”, uma enfermidade muito difícil de diferenciar de outras febres endêmicas que ocorriam na Ilha de Malta, no litoral Mediterrâneo (BRUCE, 1887).

Em humanos, a brucelose causa febre ondulante, endocardite, artrite, osteomielite e complicações neurológicas, enquanto nos animais domésticos os órgãos reprodutivos são principalmente afetados, causando aborto e infertilidade (YOUNG, 1983; YOUNG, 1988).

A disseminação dessa bactéria ocorre por contato direto ou indireto com animais infectados. A ingestão é a via mais comum de infecção, embora ocorra exposição por meio das mucosas genital e conjuntival, da pele e das vias respiratórias. As principais fontes de exposição de *B. abortus* para os bovinos são os fetos abortados, a placenta e líquidos uterinos após aborto (WALKER, 2003).

A distribuição geográfica da brucelose é ampla, apesar de alguns países já terem erradicado a doença como o Canadá, Japão, Austrália, Inglaterra e Dinamarca.

Desde a década de 1970, o controle da brucelose no Brasil era realizado de forma muito limitada e sem estratégia populacional, ou seja, com enfoque em rebanhos e nos indivíduos e não na população bovina. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) reconheceu a necessidade de definir uma estratégia de controle da brucelose e da tuberculose e, para tratar deste assunto, foi constituído um grupo de trabalho que elaborou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT). Os objetivos principais deste programa são o aumento da eficácia das medidas de combate à brucelose e tuberculose; promover a qualidade dos produtos de origem animal oferecidos ao consumidor (um objetivo eminentemente relacionado à saúde pública); modernizar as cadeias produtivas de leite e de carne para o aumento da produtividade e, em consequência, ofertar ao mercado internacional produtos de melhor qualidade, gerando divisas para os produtores e para o país (BRASIL, 2000).

Dois focos principais fundamentam o PNCEBT com relação à brucelose bovina: o diagnóstico, baseado até o momento em técnicas sorológicas, e a vacinação.

A vacina viva atenuada de *B. abortus* S19 é o elemento essencial nos programas de controle da brucelose bovina no mundo, sendo a mais amplamente utilizada, induzindo bons níveis de proteção. Porém, esta vacina induz anticorpos contra o antígeno O do lipopolissacarídeo (LPS), os quais interferem nos testes sorológicos de diagnóstico da brucelose entre animais vacinados e infectados a campo (NICOLETTI; WINTER, 1990). Este é um enorme problema em países como o Brasil, onde os programas de erradicação estão baseados nos testes sorológicos e descarte dos animais soropositivos.

A clonagem, caracterização e identificação de genes de *B. abortus* envolvidos em virulência, são muito importantes para o entendimento da patogênese molecular deste microorganismo e, principalmente para o desenvolvimento de novas vacinas, bem como na identificação de novos antígenos úteis para o desenvolvimento de testes de diagnósticos.

Grandes são os esforços na busca de uma nova vacina contra brucelose. Além da eficácia vacinal, visa-se a produção de uma vacina que seja segura aos manipuladores e, principalmente, que seu uso não interfira nos testes diagnósticos utilizados nos atuais programas de controle. Dentre as possibilidades de novas vacinas estão: o uso de vacinas de subunidades, vacinação com expressão de antígenos de *Brucella* em *Escherichia coli* (OÑATE *et al.*, 2003) e vacinas de DNA (OÑATE *et al.*, 1999).

Enzimas metabólicas têm sido descritas no envolvimento na virulência de *B. abortus* e a fosfoglicerato quinase (PGK), codificada pelo gene *pgk* é uma delas. Esta enzima é caracterizada por participar da via glicolítica, a qual cataliza reversivelmente a transferência de um grupo fosforila de 1,3 bisfosfoglicerato para ADP, formando 3-fosfoglicerato e ATP (BERNSTEIN *et al.*, 1997). Esta reação é essencial na maioria das células para a geração de ATP em aeróbios, para a fermentação de anaeróbios e de fixação de carbono em plantas. Esta enzima está organizada em um operon com outras enzimas glicolíticas, e presente em vários microorganismos como *Xantobacter flavus*, *Zimomonas mobilis* e *Lactobacillus bulgaricus*.

Já se tem estudos com maiores informações sobre o gene PGK de *Brucella abortus*, e uma cepa mutante foi construída, a qual já foi identificada e seqüenciada. A avaliação da cepa mutante foi feita em camundongos de várias linhagens, e foi verificada a atenuação da virulência. Para a bactéria *B. abortus* o gene PGK possui um papel no seu crescimento dentro do macrófago. (TRANT *et al.*, 2010).

Desta forma, neste trabalho objetivou-se a produção da proteína recombinante PGK (PGKr) de *B. abortus* em sistema heterólogo de expressão, para caracterização de uma cepa vacinal geneticamente modificada, *B. abortus* 2308 Δ *pgk* por *western blot* e posterior utilização desta proteína em testes sorológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE PGK

Para a realização deste trabalho foram utilizados: DNA extraído da cepa S2308 como molde e primers específicos para o gene *pgk*, que foram cedidos pelo Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Gado de Corte e que estão listados no quadro abaixo.

Primers para amplificação do gene *pgk*

Primers	Sequência
<i>pgk</i> Bam HIF	5'-CAAGGATCCATGTTCCGCACCATT-3'
<i>pgk</i> Sal IR	5'-CAAGTCGACTCACTTCTTCAATACATC-3'

A marcação em negrito refere-se à região de clivagem das enzimas.

O fragmento obtido através da amplificação por meio da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi purificado com o kit da QIAGEN – QIAquick PCR purification kit protocol e digerido com as enzimas de restrição Bam HI e Sal I (Invitrogen) e purificado novamente da mesma forma.

2.2 PREPARAÇÃO DO PLASMÍDEO PMAL-C2E

Para a preparação do plasmídeo, foi utilizado o estoque do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Gado de Corte, sendo 2 μ l transformados em células competentes TOP10 F' de *E. coli* e plaqueados em placa de *petri* contendo meio de cultura Luria Bertani (LB) ágar. Das colônias crescidas, uma colônia foi escolhida e deixada sob agitação a 200rpm a 37°C overnight em 10 ml de meio LB com 10 μ l de ampicilina a 100 μ g/ μ l concentração final. Foi realizada a mini-prep com o Kit MiniPrep da Promega, e a digestão com as mesmas enzimas utilizadas para o fragmento amplificado na PCR, após feita a purificação do plasmídeo para a reação de ligação.

2.3 LIGAÇÃO DO GENE PGK NO PLASMÍDEO PMAL-C2E

A ligação do fragmento de interesse ao plasmídeo foi realizada em 10 μ L de reação contendo a mistura do inserto e vetor. Na reação de ligação de vetor com inserto foi utilizada uma unidade de T4 DNA ligase para 100 ng de DNA, e 1 μ L de tampão de ligação (fornecido pelo fabricante). As reações foram incubadas por 16 horas a 16°C.

2.4 TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS DE *ESCHERICHIA COLI*

Para a realização da transformação, uma alíquota de 100 μ l de células quimicamente competentes de *E. coli* TOP 10 F' foi descongelada em gelo, e a ela adicionados 10 μ L da solução de reação de ligação. A mistura foi mantida em gelo por 30 minutos e então submetida a choque térmico a 42°C por 2 minutos, e incubada em gelo por mais 2 minutos. Em seguida foram adicionados 900 μ L de meio de cultura LB às suspensões de células e estas foram mantidas por 60 minutos a 37°C sob agitação. Após esse período, o material foi plaqueado em meio LB-ágar contendo o antibiótico ampicilina na concentração de 100 μ g/ μ l, X-Gal 25 μ g/ μ l e IPTG 1M na concentração estoque.

2.5 Confirmação do clone positivo

Para confirmação do clone positivo foi realizada a PCR de colônia onde utilizou-se como DNA molde a colônia escolhida. Em seguida após confirmação a colônia positiva foi colocada em meio líquido de crescimento e após foi realizada a mini-prep para a extração do DNA plasmidial. O DNA foi digerido com enzimas Bam HI e Sal I.

2.6 EXPRESSÃO DO GENE *PGK*

Para determinar a localização e a cinética da expressão da proteína de fusão, MBP(Maltose Binding Potein)-PGK, foi realizado primeiramente um experimento piloto com apenas 100 ml de cultura. Foi preparado um pré-inóculo saturado, do clone positivo, em meio LB suplementado com ampicilina e incubado durante 16 horas a 37°C sob agitação constante (200 rpm). Após o crescimento da cultura, 100 ml de meio LB contendo 0,2% de glicose e 100µg/ml de ampicilina foram inoculados com 1 ml do pré-inóculo saturado de células, contendo o plasmídeo recombinante. As células foram incubadas a 37°C sob agitação constante de 200 rpm até atingirem, aproximadamente 2×10^8 células/ml ($OD_{600} \sim 0,5$). Neste momento, foi retirada uma alíquota de 10 ml de cultura e em seguida foi adicionado IPTG (isopropil-tio- β -galactosídeo), para uma concentração final de 0,6 mM. Posteriormente, foram retiradas alíquotas de 10 ml de cultura nos intervalos de 1, 2, 3 e 4 horas após a indução da expressão com IPTG. Em seguida as células foram recuperadas por centrifugação a 10.000 rpm por 20 min. O sedimento contendo as células foi ressuspenso em 1 ml de PBS 0,15 M pH 8,4 contendo 25 mg de lisozima. As bactérias foram lisadas através de três ciclos de congelamento (gelo seco-metanol) e descongelamento (banho-maria a 37 °C) e depois sonicadas três vezes com pulsos de 30 segundos, utilizando-se a potência de 70% do sonicador. As frações das proteínas solúveis e insolúveis contidas no sobrenadante e no sedimento, respectivamente foram separadas após centrifugação a 9.000 rpm por 30 min a 4°C, e ambos foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% para confirmar a presença da proteína de fusão MBP-PGK. Após este experimento piloto, foi realizada a produção da proteína de fusão MBP-PGK em grande escala, utilizando-se 1000 mL de cultura, por meio dos mesmos procedimentos mencionados acima, obedecendo à relação de quantidades das soluções empregadas.

2.7 DIÁLISE

A diálise em um procedimento que separa substâncias, ou seja, soluto de solvente. Como são adicionadas substâncias a mais na proteína, como a lisozima que ira contribuir para o rompimento da camada protetora da bactéria, ela deve ser retirada antes da purificação, e é por meio da diálise que isto ocorre.

Os sobrenadantes provenientes da expressão foram reunidos e dialisados em 4 litros de tampão Tris-HCl 0,75 mM pH 8,8, em membrana de diálise Spectra/Por® com “cut off” de 6 a 8,000 Da, durante três dias em câmara fria. Foram feitas duas trocas do tampão de diálise por dia.

2.8 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA

A purificação foi realizada por meio de cromatografia de afinidade em coluna de amilose. Para a montagem da coluna, foi utilizado de 15 a 20 ml da resina em seringa de 60 mL com lâ de vidro e papel filtro na ponta da seringa. A coluna foi lavada com 1L de PBS 0,15M pH 7,2 gelado.

Com a coluna preparada, todo o material foi descongelado permanecendo no gelo. Após descongelar totalmente o material foi diluído em PBS 0,15M pH 7,2 em uma proporção de 1:5 e foi passado na coluna. Na sequência a coluna foi lavada com 500 mL de PBS 0,15M pH 7,2. Nesta lavagem tudo que não é de interesse é descartado, ou seja, substâncias que estão na proteína e que não serão utilizadas podendo dar interferência nos resultados e, a proteína de interesse fica retida na coluna. A proteína de fusão MBP-PGK foi eluída da coluna utilizando-se PBS com 10 mM de maltose. Foram coletadas aproximadamente 12 frações de 2 ml cada, num fluxo de 0,5 ml/min, sendo a eluição completa da proteína de fusão monitorada pela dosagem de proteínas pelo método de Bradford (descrita no abaixo).

Após a eluição, a coluna foi lavada com três volumes da coluna com água bi-destilada, três volumes de SDS 0,1%, novamente um volume de água, e três volumes de PBS. Todo o processo de cromatografia foi realizado a 4°C e a coluna estocada em PBS, contendo 0,05% de azida sódica, foi reutilizada por até três vezes.

2.9 DOSAGEM DA PROTEÍNA PURIFICADA

Foi utilizada a técnica de dosagem de proteínas descrita por Bradford (1976), modificada para o ensaio em placas de microtitulação de 96 poços.

Triplicatas de 5 μ l das amostras de proteínas foram diluídas em 15 μ l de água bi-destilada. Em cada poço contendo as amostras, foram adicionados 180 μ l do reagente de Bradford (0,01% de Coomassie Brilliant Blue G-250, 5% de etanol e 10% de ácido fosfórico). A reação foi finalizada em 5 min e a intensidade de cor resultante foi lida no

comprimento de onda de 595 nm no leitor de ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) BioRad 2550 EIA Reader (BioRad). Para a calibração do aparelho de ELISA foram utilizados 20 μ l de água bi-destilada e 180 μ l do reagente de Bradford como o branco, e incubados da mesma forma que as amostras que continham as proteínas. A estimativa da quantidade de proteína nas amostras foi feita com base em uma curva padrão de uma solução de Soro Albumina Bovina (BSA) (Sigma).

2.10 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS

Camundongos BALB/c foram inoculados com a proteína produzida PGKr. No total foram utilizados quatro animais. Um dia antes da primeira inoculação foi coletada uma amostra de sangue de cada animal, chamado de soro pré-imune. Foram realizadas três inoculações com intervalos de vinte um dias, e quatorze dias após cada inoculação o soro pós-mune era coletado. Após a última inoculação, foi coletado sangue total destes animais o qual foi analisado pela técnica de *Western Blot*.

2.11 WESTERN BLOT PARA AVALIAÇÃO DA ANTIGENICIDADE DA MBP-PGK

Os ensaios de *Western blot* foram realizados a partir de SDS-PAGE com géis nas concentrações de 12 %.

No primeiro ensaio as amostras da proteína purificada foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese para posterior transferência.

A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada durante 2 horas a 100 V, em sistema úmido, envolvendo a cuba em gelo. As membranas foram coradas com Ponceau S por cinco minutos e descoradas com água destilada para visualização e corte das tiras. O marcador de massa molecular (Brod Range Protein Molecular, Promega, V491) foi cortado e guardado ao abrigo de luz e umidade. Em seguida foi realizado o bloqueio da membrana com PBS 1x, tween 20 0,1%, leite em pó 5% overnight. Após o bloqueio as membranas foram lavadas por cinco minutos com PBS 1x e tween 20 0,1%. Em seguida, foram incubadas com anticorpo primário (soro dos camundongos imunizados com a proteína de fusão MBP-PGK, diluído com PBS 1x e tween 20 0,1% a 1:500). Esta incubação foi de 1 hora a temperatura ambiente com agitação e, então, lavou-se com PBS 1x e tween 20 0,1% por 5 minutos. Logo após, fez-se a incubação por 1 hora agitando com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase e diluído a 1:3000 com PBS 1x e tween 20 0,1%. A lavagem final das membranas foi feita com PBS 1x e tween 20 0,1% por cinco minutos. A revelação foi realizada com o substrato ácido diamino benzidínico (Sigma)/H₂O₂, parando-se a revelação com água destilada. As membranas foram guardadas em papel cartão, protegidas da luz e umidade.

2.11 WESTERN BLOT PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PGK NAS CEPAS S2308 SELVAGEM E MUTANTE S2308 Δ PGK DE *B. ABORTUS*

Para a análise de expressão da proteína PGK em *B. abortus* S2308 e Δ pgk mutante, estas cepas foram cedidas do estoque do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Gado de Corte.

As cepas foram cultivadas em 5 ml de meio Tryptic Soy Broth (TSB) por 72 horas a 37°C com agitação (200 rpm). Estas cepas foram. Então, 1 ml de cada cultura foi retirado para a leitura de OD600 de 1. Cada cultura foi centrifugada e ressuspendida em tampão de amostra SDS. As amostras foram fervidas por 5 minutos e 10 μ L das amostras foram aplicadas em gel 12% SDS-PAGE. Após a eletroforese do gel, as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por 2 horas a 100 V usando um sistema úmido de transferência (Bio-Rad) envolvendo a cuba em gelo. As membranas foram coradas com Ponceau S por cinco minutos e descoradas com água destilada para visualização e corte das tiras. O marcador de massa molecular (Brod Range Protein Molecular, Promega, V491) foi cortado e guardado ao abrigo de luz e umidade. As membranas foram bloqueadas durante a noite com leite em pó 5% em tampão PBST (PBS, tween 20 0,1%, pH 7,2). Após o bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes com PBST foram incubadas por 1 hora com anticorpo primário (soro dos camundongos imunizados com a proteína recombinante) diluído 1:100 em PBST à temperatura ambiente. Após a reação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas cinco vezes com PBST e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com anticamundongo conjugado com peroxidase, diluído 1:3000 em PBST. A lavagem final foi feita com PBST por cinco vezes. A revelação foi realizada com o substrato ácido diamino benzidínico (Sigma)/H₂O₂, parando-se a revelação com água destilada. As membranas foram guardadas em papel cartão, protegidas da luz e umidade.

RESULTADOS

AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA COMPLETA DO GENE *PGK* DE *B. ABORTUS*

A sequência completa do gene *pgk* de *B. abortus* foi amplificada pela PCR, a partir do DNA genômico de *B. abortus* S2308. O fragmento de 1191 pb, amplificado codifica a proteína PGK de *B. abortus*. O tamanho do fragmento foi confirmado por comparação com o padrão de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (invitrogen) conforme o esperado. (Figura 1).

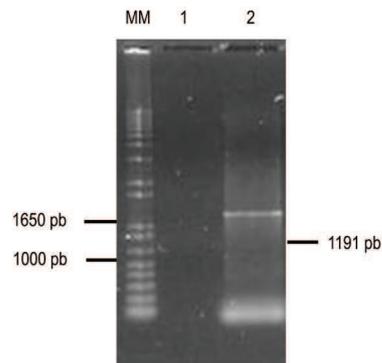


Figura 1. Amplificação do gene *pgk* (1191 pb) de *Brucella abortus* S2308 através de PCR. Linhas: MM, Marcador molecular 1kb plus Ladder (Invitrogen); 1, controle negativo da PCR e 2-6, gene *pgk*.

Após a amplificação do fragmento de interesse, este foi clivado com as enzimas de restrição Bam HI e Sal I. O vetor pMAL c2E também foi clivado com as mesmas enzimas para a obtenção das extremidades coesivas. O plasmídeo recombinante foi introduzido em uma cepa de *E.coli*, TOP 10 F' quimicamente competente. Esta cepa é importante porque possibilita a expressão de proteínas recombinantes quando transformadas.

A transformação de *E. coli* com o produto da ligação de pMAL c2E/*pgk* obteve sucesso.

Por meio da técnica de PCR de colônia pode-se observar a presença de uma banda na altura da banda referente ao gene, resultando em um clone positivo como observa-se na figura 2.

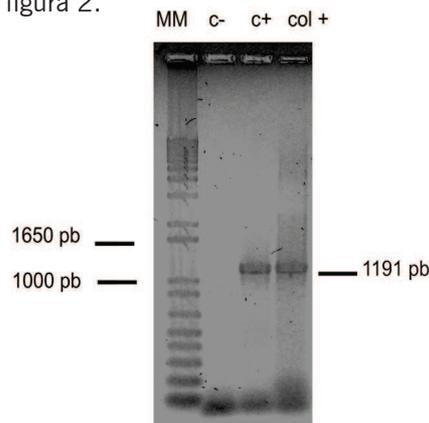


Figura 2. Eletrofore em gel de agarose da PCR de colônia do clone positivo para a clonagem do gene *pgk* no plasmídeo pMal-C2E. Linhas: MM, Marcador molecular 1kb plus Ladder (Invitrogen); C-, controle negativo da PCR; C+, controle positivo S2308; Col+, colônia positiva.

Após feita a PCR de colônia, para mais uma confirmação da clonagem, foi feita a mini-prep e esta foi digerida com as enzimas Bam HI e Sal I e a clonagem foi confirmada devido a visualização da separação dos fragmentos relacionados ao plasmídeo e ao gene, como observamos na figura 3.

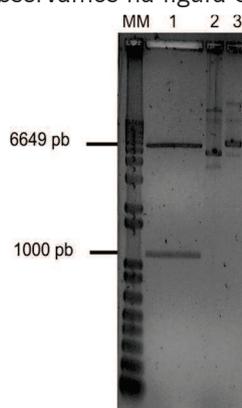


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose da digestão da mini-prep da colônia positiva com as enzimas Bam HI e Sal I para confirmação da clonagem. Linhas: MM, Marcador molecular 1kb plus Ladder (Invitrogen); 1, digestão pMAL+*pgk*; 2, vetor pMAL sem digerir; 3, mini-prep pMAL+*pgk* não digerida.

A expressão do gene *pgk* em *E. coli* foi feita através do método de indução, onde apresentou grande produção da proteína recombinante no período de uma, duas, três e quatro horas de indução a 37°C sob agitação de 200rpm, mostrando que o melhor tempo para a produção da proteína foi o tempo de 4h, como mostrado na figura 4.

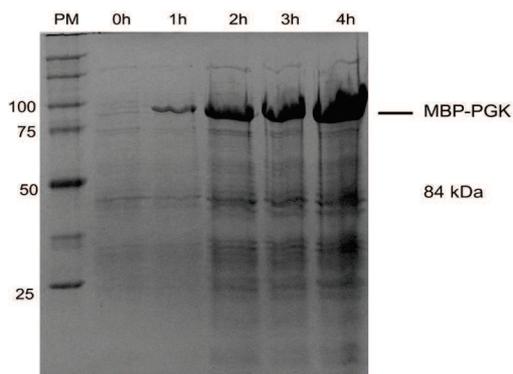


Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida da cinética de expressão da proteína MBP-PGK. Linhas: PM, Peso molecular (Broad Range Protein Molecular), Promega, V491; 0h, produto lisado de *E.coli* transformado com pMAL c2E/*pgk* não induzido, sem adição de isopropil-tio-β-galactosídeo (IPTG); 1h – 4h, produto lisado de *E.coli* transformado com pMAL c2E/*pgk* induzido por IPTG .

A produção da proteína recombinante foi confirmada na forma solúvel pela análise em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), presente portanto no sobrenadante do produto, apresentando 84kDa. A proteína nesta condição proporciona facilidade na execução do trabalho (Figura 5).

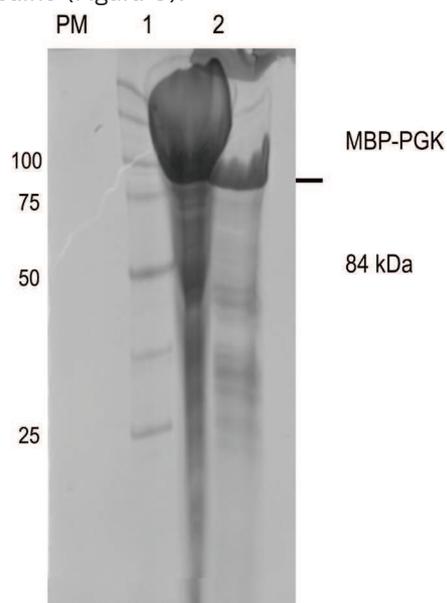


Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida para localização da proteína. Linhas: PM, Peso molecular(Broad Range Protein Molecular), Promega, V491; 1, Sobrenadante do produto lisado de *E.coli* transformado com pMAL c2E/pgk; 2, sedimento do produto lisado de *E.coli* transformado com pMAL c2E/pgk .

A expressão de PGKr produzida pelas bactérias transformadas com o vetor pMAL-c2E+PGK, produziu uma proteína fusionada a MBP (*Maltose Binding Protein*) que está presente no vetor com 42kDa e tem afinidade por amilose, o que possibilitou a utilização da técnica de cromatografia de afinidade. Contudo a proteína produzida apresentou 84kDa, pois a proteína PGKr sozinha apresenta 42kDa também.

Durante a purificação a proteína não sofreu degradação, apresentando no gel bandas definidas conforme o esperado como pode-se visualizar na figura 6.

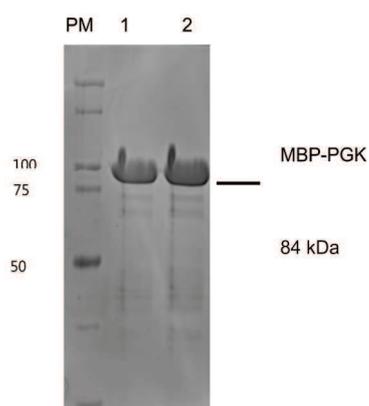


Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida da purificação. Linhas: PM, Peso molecular (Broad Range Protein Molecular), Promega, V491; 1 e 2, proteína purificada por cromatografia de afinidade em coluna de amilose, apresentando 84 kDa.

Para a quantificação da proteína foi utilizado o método de Bradford, onde foi possível quantificar as frações de proteína produzida, obtendo no final de todo processo 2,62mg de proteína. Com este resultado quatro camundongos BALB/c foram inoculados com a proteína emulsionada em adjuvante Montanide via subcutânea. Os soros destes foram coletados para a análise por *Western Blot*, onde apresentou resposta positiva a produção de anticorpos para PGKr como pode ser observado na Figura 7.

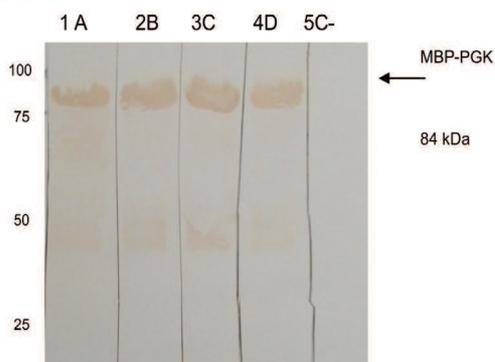


Figura 7. *Western Blot* com soros de camundongos inoculados com a proteína MBP-PGK. Linhas: 1A, Soro do Animal A; 2B, Soro do Animal B; 3C, Soro do Animal C; 4D, Soro do Animal D; 5C, Controle negativo com soro de animal não inoculado.

Para determinar se a cepa S2308 Δ pgk realmente não está expressando a proteína PGK, western blot foi realizado com a cepa mutante e com a cepa selvagem S2308 utilizando anticorpos policlonais anti-PGK. Pode-se observar na figura 7 que os anticorpos anti-PGK reagiram com a cepa selvagem, mostrando que anticorpos produzidos contra a proteína recombinante de fato reconhecem *pgk* em sua conformação nativa, visto que *pgk* está presente na cepa selvagem. Já na cepa S2308 Δ pgk não houve reação com os anticorpos anti-PGK, confirmando realmente a deleção do gene *pgk* nesta cepa (Figura 8).

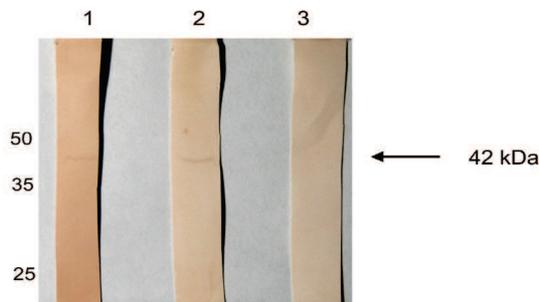


Figura 7. Análise por meio de *Western blot* da proteína recombinante PGK de *Brucella abortus* na cepa S2308. Observa-se o resultado do *Western Blot* mostrando o reconhecimento da proteína PGK na cepa S2308 apresentando 42 kDa. Linhas 1 e 2, soro de camundongos inoculados com a proteína PGK; 3, soro de camundongo livre de patógeno como controle negativo. Os números à esquerda correspondem ao padrão de peso molecular [Broad Range Protein Molecular], Promega, V491.

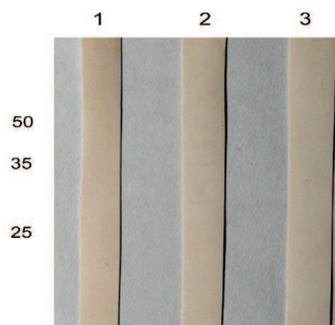


Figura 8. Análise por meio de *Western blot* da proteína recombinante PGK de *Brucella abortus* na cepa mutante S2308 Δ pgk. Observa-se o resultado do *Western Blot* mostrando o não reconhecimento da proteína PGK no mutante S2308 Δ pgk. Linhas 1 e 2, soro de camundongos inoculados com a proteína PGK; 3, soro de camundongo livre de patógeno como controle negativo. Os números à esquerda correspondem ao padrão de peso molecular [Broad Range Protein Molecular], Promega, V491.

DISCUSSÃO

A brucelose bovina é responsável por perdas econômicas à bovinocultura brasileira estimadas em 32 milhões de dólares anuais (POESTER, 2002), prejuízos estes que justificam esforços na busca de soluções efetivas de controle, o qual só é possível por meio de vacinas.

Além disso, as bactérias do gênero *Brucella* podem ser usadas como armas biológicas reforçando o interesse de se desenvolver meios de controle e prevenção eficientes contra essa bactéria.

Grandes são os esforços na busca de uma nova vacina contra brucelose. Além da eficácia vacinal, visa-se a produção de uma vacina que seja segura aos manipuladores e, principalmente, que seu uso não interfira nos testes diagnósticos utilizados nos atuais programas de controle.

Grupos de pesquisa vêm trabalhando no sentido de desenvolver testes que ajudem no diagnóstico preciso da doença, e a identificação de genes envolvidos na virulência da bactéria são de extrema importância para o entendimento da patogênese molecular deste microorganismo.

Enzimas metabólicas também têm sido descritas no envolvimento da virulência, como o gene *pgk* que codifica a enzima fosfoglicerato quinase importante na via glicolítica, esta enzima tem sido caracterizada, e está organizada em um operon com outras enzimas glicolíticas, em vários microorganismos como *X. flavus*, *Z. mobilis*, *Lactobacillus bulgaricus*, e *B. abortus* (MEIJER *et al.*, 1996; BURCHHARDT *et al.*, 1993; BRANNY *et al.*, 1998; ROSINHA, 2002).

Mutantes para esta enzima já foram obtidos para *Aspergillus nidulans* (STREATFIELD & ROBERTS, 1993), *X. flavus* (MEIJER *et al.*, 1996) e *B. abortus* (ROSINHA, 2002). O mutante para o gene *pgk* de *X. flavus*, não mostrou atividade fosfoglicerato cinase e teve seu crescimento afetado em meio com succinato, e o mutante *pgk* de *A. nidulans*, não cresceu em meio suplementado com hexoses. Em *B. abortus* a cepa mutante S2308 Δ *pgk* apresentou virulência reduzida na primeira e sexta semana após a infecção, quando comparada à cepa selvagem S2308. Além disso a cepa mutante S2308 Δ *pgk* mostrou eficiência de proteção mais significativa quando comparada às cepas vacinais S19 e RB51 após desafio com a cepa parental virulenta S2308 (ROSINHA, 2002).

A produção da proteína PGK tem como principal alvo, ser usada em teste de diagnóstico juntamente com o a cepa mutante construída S2308 Δ *pgk*.

Neste trabalho a produção da proteína recombinante permitiu a obtenção do antígeno purificado, o qual manteve suas propriedades imunogênicas e antigênicas, da mesma forma que o gene *virB9*, que também participa de um operon (operon *virB*) e esta envolvido na virulência da bactéria. A purificação da *VirB9* resultou na obtenção de uma banda proteica única, a qual foi analisada pela técnica de

Western blotting. Essa proteína reagiu com o anticorpo monoclonal anti-histidina e também com o anticorpo IgG específico contra VirB9 (Ac α -VirB9) de *B. abortus*, induzidos em camundongos injetados com VirB9, mostrando a capacidade imunogênica dessa proteína (ELISEI *et al.*, 2009).

A proteína recombinante PGK não reagiu com a cepa mutante confirmando a deleção do gene *pgk* nesta cepa, e confirmando também sua especificidade para ser usada em teste de diagnóstico para diferenciação de animais vacinados com a cepa mutante de animais infectados naturalmente.

CONCLUSÕES

Obteve-se a produção da proteína recombinante PGK (PGKr) por meio da clonagem e expressão heteróloga utilizando-se o plasmídeo pMAL-c2E como vetor.

A purificação da proteína recombinante possibilitou a inoculação desta em camundongos, para a produção de anticorpos anti-PGK.

Os soros obtidos de camundongos inoculados apresentaram-se reagentes a cepa selvagem 2308 e não reagentes a cepa mutante S2308 Δ *pgk*, estas foram utilizadas neste trabalho como padrão de confirmação da reação da proteína, que por meio da técnica de *Western blot* pôde caracterizar a cepa mutante S2308 Δ *pgk* como potencial vacina candidata contra a brucelose bovina.

A proteína recombinante produzida pode servir futuramente como teste sorológico para brucelose, para a diferenciação entre cepa de campo e cepa vacinal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Embrapa Gado de Corte, pela oportunidade de estágio e ao CNPq e Fundect, por financiarem o projeto.

Agradeço a todas as pessoas que colaboraram neste trabalho. As Dras. Grácia Maria Soares Rosinha, Dra. Carina Elisei de Oliveira e Lenita Ramires Santos, por todas as oportunidades, ensinamentos, orientações e compreensão. Muito obrigada pela paciência e ao aprendizado que obtive com a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Gado de Corte por toda a ajuda. Em especial a Carina Jank e Bruna Barbosa que desde o início acompanharam e colaboraram na realização deste trabalho. Sem a ajuda de todos com certeza não teria conseguido. Vocês foram fundamentais para a realização deste projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSELMO, FP, PAVEZ MM. Diagnóstico de saúde animal. Brasília: Ministério da Agricultura, 1977. 735p.

BERNSTEIN, B. E., MICHELS, P. A. M., HOL, W. G. J. Synergistic effects of substrate-induced conformational changes in phosphoglycerate kinase activation. *Nature*. v. 385, p. 275-278. 1997.

BRANNY, P., TORRE, F., GAREL, J.R. An operon encoding three glycolytic enzymes in *Lactobacillus delbrückii* subsp. *Bulgaricus*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase and triosephosphate isomerase. *Microbiology*. v. 144, p. 905-914. 1998.

BRASIL. Brucelose bovina. Boletim da Defesa Sanitária Animal, Brasília, v.29, n.1-4, p. 41-47, 1996. Edição 2000.

BRUCE, D. Note on the discovery of a microorganism in Malta Fever. *Practitioner*. ,39: 161-163. 1887.

BURCHHARDT, G., KESHAV, K.F., YOMANO, L., INGRAM, L.O. Mutational analysis of segmental satbilization of transcripts from the *Zymomonas mobilis* gap-pgk operon. *J. Bacteriol*. v. 175, p. 2327-2333. 1993.

MEIJER, W.G., ERWIN, R.E., SMITH, L.M. Induction of the gap-pgk operon encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase of *Xanthobacter flavus* requires the lysR-type transcriptional activator CbbR. *J. Bacteriol*. v. 178, p. 881-887. 1996.

NICOLETTI P.; WINTER, A. J. Response to *Brucella abortus*. In: Nielsen K, Duncan JR, editors. *Animal brucellosis*. Boca Raton, FL: CRC Press; p. 83-95.1990.

OÑATE, A. A.; VEMULAPALLI, R.; ANDREWS, E.; SCHURIG, G. G.; BOYLE, S.; FOLCH, H. Vaccination with live *Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent *B. abortus*. *Infect. Immun.*, v. 67, n. 2, p. 986-988. 1999.

OÑATE, A. A.; CÉSPEDES, S.; CABRERA, A.; RIVERS, R.; GONZÁLES, A.; MUÑOZ, C.; FOLCH, H.; ANDREWS, E. A DNA vaccine encoding Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect. Immun.* v.71, n.9, p.4857-4861. 2003.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. *Vet. Microbiol.*, v. 90, n. 1-4, p.55-62. 2002.

ROSINHA, G.M.S. Isolamento, identificação e avaliação do envolvimento dos genes *gap*, *pgk*, *tkt*, *vacB* e *exsA* da *Brucella abortus* na patogênese molecular e imunoproteção. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. P. 226. 2002.

STREATFIELD, S.J. & ROBERTS, C.F. Disruption of the 3' phosphoglycerate kinase (*pgk*) gene in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.*, v. 23, p.123-128.1993.

TRANT, C. G. M. C.; LACERDA, T. L. S.; AZEVEDO, V.; ROSINHA G. M. S.; SALCEDO, S. P.; GORVEL J. P.; OLIVEIRA, S. C. *Brucella abortus* phosphoglycerate kinase (*pgk*) mutant is highly attenuated and induces superior protection than vaccine strain 19 in IRF-1 knockout and 129/Sv mice. *Infect Immun.* V.78, n.5, p. 2283-2291. 2010.

WALKER, R. L. Brucella. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. *Microbiologia Veterinária*. Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro. 2003.p.185-191.

YOUNG, E.J. Human brucellosis. *Rev. Infect. Dis.* n.5 p.821-842. 1983.

YOUNG, E.J. Brucellosis: a model zoonosis in developing countries. *APMIS Suppl.* v. 3, p. 17-20. 1988.