

Núcleo de Avaliação: Núcleo I

Área temática: Ciências Biológicas

Área do Conhecimento: Imunologia

Construção de vetor de clonagem de gene de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para a imunoprofilaxia contra a linfadenite caseosa

Lúcia Larissa de Lima Andrade, Pablo Leandro Filgueira Feitosa, Thiago Vinícius Santos e Alves, Bárbara Monique de Freitas Vasconcelos, Francisco Silvestre Brilhante Bezerra

Corynebacterium pseudotuberculosis é o agente etiológico da linfadenite caseosa (LC), enfermidade crônica que afeta principalmente pequenos ruminantes e gera perdas econômicas na ovinocaprino cultura em escala global. As abordagens terapêuticas convencionais para a LC apresentam eficiência limitada, enquanto as vacinas disponíveis no mercado possuem eficácia variável, podendo não conferir total proteção. Assim, o desenvolvimento de vacinas recombinantes tornou-se uma alternativa na profilaxia da LC e o gene *copC* de *C. pseudotuberculosis* apresentou-se como alvo vacinal promissor em estudos *in silico* (Araújo et al., Gene, 702:36-45, 2019) porém ainda não foi expresso e testado com objetivo vacinal. Assim, objetivou-se clonar o gene *copC* de *C. pseudotuberculosis* no vetor pAE visando expressão heteróloga futura e ensaios vacinais *in vivo*. O DNA genômico da cepa 1002 de *C. pseudotuberculosis* foi extraído utilizando o PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Thermo Scientific). A amplificação do gene *copC* (Gene ID: 69459341) foi realizada através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com o uso de 50 ng do DNA genômico, 10 µM de cada primer (*forward* 5'TTACCATGGGGCTATTGTCTGG3' e *reverse* 5'TCTAAGCTTTTAACCTTTCTGTTTACGAG3') e PCR Master Mix (2x) (ThermoFisher Scientific®) em um volume final de 50 µL. Para a definição da melhor temperatura de anelamento, utilizou-se um gradiente da temperatura entre 51 e 61 °C ($T_m = 56^\circ\text{C}$). Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1%, utilizando o corante Blue Green (LCG Biotecnologia®), sob luz UV. O vetor pAE e os amplicons foram digeridos com as enzimas FastDigest® *HindIII* e *NcoI* (ThermoFisher Scientific®) e ligados com a enzima T4 DNA ligase (ThermoFisher Scientific®). Células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10 foram transfectadas com o produto da ligação por meio de eletroporação. Os transformantes foram selecionados em ágar Luria-Bertani (LB) suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e incubados a 37 °C por 16 horas. O *screening* de colônias foi realizado por lise rápida de colônia com fenol-clorofórmio (v/v) seguida de eletroforese em gel de agarose (0,8 %). Os possíveis clones recombinantes foram cultivados em caldo LB contendo ampicilina (100 µg/mL) a 37 °C sob agitação (140 rpm) por 16 horas, e o DNA plasmidial foi subsequentemente isolado com o PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific®). A identidade da construção recombinante (pAE/*copC*) foi validada por PCR. Como resultados, a temperatura de anelamento de 52.7°C resultou em amplificação mais eficiente, gerando uma banda de 556 pb. No *screening* foi possível observar bandas referentes ao DNA plasmidial em posições mais altas (acima de 2800 pb) que as bandas do pAE não recombinante, sugestivas de

colônias recombinantes. Em tais colônias, confirmou-se a clonagem do gene *copC* no vetor pAE através de PCR dos plasmídeos extraídos, pela visualização das bandas do gene *copC* com tamanho de 556 pb em gel de agarose. Em conclusão, os resultados comprovaram o sucesso da clonagem molecular do gene *copC* em vetor pAE, estabelecendo a base para a expressão heteróloga da proteína recombinante e testes pré-clínicos visando o desenvolvimento de formulações vacinais contra a linfadenite caseosa.

Palavras-chave: Clonagem molecular; *copC*; pAE; Antígeno recombinante; vacina

Agência financiadora: PIBIC/CNPq

Campus:

Mossoró

