

Núcleo de Avaliação: Núcleo I

Área temática: Ciências Biológicas

Área do Conhecimento: Biotecnologia

Clonagem molecular de potencial alvo vacinal de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para o desenvolvimento de vacina recombinante contra a linfadenite caseosa

José Gabriel Faustino Silva, Thiago Vinicius Santos e Alves, Fabíola Santos Silva, Lenise Maria Parente Mota, Francisco Silvestre Brilhante Bezerra.

A vacinologia reversa utiliza dados genômicos para projetar e prever proteínas imunogênicas a serem utilizadas em novas formulações vacinais, acelerando a produção de vacinas significativamente. Estudos de vacinologia reversa, aplicados a *Corynebacterium pseudotuberculosis*, demonstraram que o gene *ndh*, codificante de uma NADH desidrogenase do tipo II, apresentou antigenicidade moderada (0,48), sendo apontado como potencial candidato vacinal contra a linfadenite caseosa (LC) (Araújo et al., Gene, 702:36-45, 2019). Portanto, este trabalho teve como objetivo clonar o gene *ndh* de *C. pseudotuberculosis* em vetor pAE, com a finalidade futura de obtenção de imunobiológicos. Foram utilizadas as cepas *C. pseudotuberculosis* 1002 e *Escherichia coli* TOP10, cultivadas, respectivamente, em meio BHI-ágar (1,5%) com 0,5% de Tween 80, a 37 °C por 48 h sob agitação, e em meio Luria-Bertani (LB) com antibiótico, quando necessário, em shaker orbital a 140 rpm, por cerca de 16 h a 37 °C. O DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* foi extraído com o PureLink® Genomic DNA Mini Kit (ThermoFisher®), conforme as recomendações do fabricante, e mantido a -20 °C até o uso. A sequência do gene *ndh* (Gene ID: 12300072) foi obtida do GenBank e os primers específicos (*forward* 5'TTGGATCCCGCCATCACG3' e *reverse* 5'TTGAATTCCTAGTTTTTTGTTTCTAGG3') e o plasmídeo recombinante foram desenhados com o auxílio do software Vector NTI Advance 11 (Invitrogen®). Realizou-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando Master Mix 2x (ThermoFisher®) sob as seguintes condições: 95 °C por 5 min; 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 52°-62°C (gradiente de temperatura) por 1 min, 72 °C por 1 min; e extensão final a 72 °C por 1 min. Analisou-se os produtos em gel de agarose a 0,8%, corado com Blue Green, sob luz UV. O plasmídeo pAE e os produtos de PCR foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição FastDigest® *Bam*HI e *Eco*RI, purificados e ligados com a T4 DNA polimerase (ThermoFisher®). O produto obtido foi usado na transformação de células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10 por eletroporação, feita em BioRad Micropulser® (BioRad®). As colônias obtidas foram submetidas à triagem por

extração rápida de DNA com Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1) (Êxodo Científica®) para avaliar a presença possíveis recombinantes. Tais colônias foram selecionadas, cultivadas, submetidas à extração de plasmídeo e digestão enzimática para caracterização dos recombinantes. A PCR com melhor eficiência de amplificação foi a realizada com temperatura de anelamento de 52,7 °C, onde se pôde observar uma banda intensa com tamanho de 1.342 pb. Após os procedimentos de digestão, ligação e transfecção, observou-se o crescimento de colônias. Porém, os plasmídeos extraídos das células transformadas não foram caracterizados como recombinantes. Esse resultado pode indicar religação do plasmídeo sem a presença do inserto ou ineficiência das reações enzimáticas. Conclui-se deste modo, que apesar do sucesso na amplificação do gene *ndh*, a construção do vetor pAE/*ndh* não foi exitosa. Estudos de otimização dos protocolos de construção deverão ser realizados visando a obtenção da molécula recombinante.

Palavras-chave: vetor pAE; imunobiológicos; gene *ndh*.

Agência financiadora: PIBITI-VOL (IT).

Campus: Mossoró.

