XXXI Seminário de INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFERSA

Núcleo de Avaliação: Núcleo I
Área temática: Ciências Biológicas
Área do Conhecimento: Imunologia

Construção de plasmídeo recombinante para expressão de antígeno de *C. pseudotuberculosis* com finalidade vacinal

Gabriela Rebouças de Oliveira, Ana Karolina Melo Oliveira Barros, Augusto César Silva Ribeiro, Pablo Leandro Filgueira Feitosa, Francisco Silvestre Brilhante Bezerra

Na última década, o interesse pelo desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a linfadenite caseosa (LC) tem sido crescente dada a segurança e eficácia demonstradas em algumas formulações. Nesse contexto, a vacinologia reversa permite a identificação de alvos imunogênicos diretamente a partir do genoma de patógenos, aliando ferramentas de bioinformática e biologia molecular. Entre os genes preditos com potencial antigênico, o *ykuE* de *Corynebacterium pseudotuberculosis* codifica uma metalofosfoesterase dependente de manganês e zinco, envolvida em reações de hidrólise e participante da via de translocação Tat (*twin-arginine translocation*), responsável pelo transporte de proteínas enoveladas e essencial para a sobrevivência bacteriana. Estudos *in silico* apontaram o gene *ykuE* como um potencial alvo vacinal contra a LC. Assim, o objetivo foi construir o plasmídeo recombinante pAE/ykuE, etapa inicial para a expressão e posterior avaliação da proteína YkuE quanto ao seu potencial antigênico. Para isso, a cepa 1002 de *C. pseudotuberculosis* foi cultivada em meio *Brain Heart Infusion (BHI)* suplementado com 0,5% de Tween 80 a 37 °C sob agitação de 150 rpm por 24 h, e o DNA genômico foi extraído utilizando o kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit. A amplificação do gene *ykuE* foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando aproximadamente 50 ng de DNA genômico, 10 µM de cada primer (forward 5'-AATCCATGGAATGGTTGTTAAGCC-3' e reverse 5'-AATAAGCTTTTAACGCTCGGTGAC-3') e PCR Master Mix (2×) (Thermo Fisher Scientific®) em volume final de 50 µL. O fragmento amplificado e o vetor pAE foram digeridos com as enzimas de restrição *Nco*I e *Hind*III (Thermo Fisher Scientific®), purificados e ligados na presença da enzima T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific®). O produto da ligação foi utilizado para transfectar *Escherichia coli* TOP10 por eletroporação a 1,8 kV. Após incubação em meio Luria-Bertani (LB) suplementado com ampicilina (100 µg/mL) a 37 °C por 16 h, as colônias obtidas foram submetidas a triagem por extração rápida de DNA com Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1) (Êxodo Científica®) e eletroforese em gel de agarose. As colônias que apresentaram bandas com tamanho maior que o plasmídeo pAE foram selecionadas para extração de plasmídeo usando o GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich®). A presença do inserto de interesse foi confirmada por digestão enzimática e liberação do inserto nos plasmídeos recombinantes. A análise em gel de agarose 0,8% confirmou a amplificação de um fragmento de aproximadamente 958 pb, compatível com o tamanho dos amplicons esperados. Na triagem screening foi possível observar bandas com tamanhos superiores ao pAE (2822 pb), sugerindo a presença de colônias recombinantes. Em

tais plasmídeos, confirmou-se a clonagem do gene *ykuE* no vetor pAE através de digestão enzimática com liberação de inserto no tamanho de PCR dos plasmídeos extraídos, pela visualização das bandas do gene *ykuE* com tamanho de 958 pb em gel de agarose. Em conclusão, a construção do plasmídeo pAE/*ykuE* foi exitosa e representa um avanço significativo para as etapas subsequentes de expressão e purificação da proteína YkuE recombinante com vistas a obtenção de nova formulação vacinal contra *C. pseudotuberculosis*.

Palavras-chave: Proteína recombinante; Clonagem molecular; YkuE; Linfadenite caseosa.

Agência financiadora: PIVIC/UFERSA, CAPES, CNPq

Campus: Mossoró