XXXI Seminário de INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFERSA

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

# Clonagem de novo gene como estratégia imunoprofilática no combate à Linfadenite Caseosa

Augusto César Silva Ribeiro, Lenise Maria Parente Mota, Ana Karolina Melo Oliveira Barros, Bárbara Monique de Freitas Vasconcelos, Francisco Silvestre Brilhante Bezerra.

O gene *mtrB* codifica uma cinase sensora de histidina pertencente ao sistema regulatório de dois componentes, o MtrAB. A inativação do gene *mtrB* em *Mycobacterium pseudotuberculosis* resultou em redução da sua sobrevivência em macrófagos e aumentou sua associação com autofagossomas e autolisossomas, demonstrando que este é um fator de virulência essencial à sobrevivência no hospedeiro (Banerjee *et al*., J Biol Chem., 294(52):19862-19876, 2019). Em *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o gene *mtrB* se destacou como um dos antígenos mais promissores a partir de um workslow integrado *in silico* para prospecção de novos alvos vacinais através da análise de genes compartilhados no genoma core de 65 cepas de *C*. *pseudotuberculosis* (Araújo *et al*., Gene, 702:36-45, 2019). Assim, o presente trabalho objetivou clonar o gene *mtrB* em vetor pAE, visando a expressão *a posteriori* deste antígeno vacinal. O DNA genômico da cepa 1002 de *C. pseudotuberculosis* foi extraído utilizando kit comercial. O Programa Vector NTI Advance 11 foi utilizado para realizar a montagem da molécula recombinante pAE/*mtrB*, desenho dos primers e seleção de enzimas de restrição. A amplificação do gene *mtrB* (Gene ID: 69458734) foi realizada através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em gradiente de temperatura entre 51 e 61ºC (Tm média = 56ºC), visando o teste da temperatura ideal de anelamento. Os produtos de PCR foram visualizados por meio de Blue Green em gel de agarose a 0,8%. Os amplicons e o pAE foram submetidos à digestão enzimática utilizando as enzimas de restrição *Eco*RI e *Hind*III, seguidos pela ligação com T4 DNA ligase. O produto da ligação foi utilizado na eletroporação em *Escherichia coli* TOP 10. Um *screening* das possíveis colônias recombinantes foi realizado por extração rápida de DNA com fenol-clorofórmio (v/v). A caracterização dos clones recombinantes foi realizada através digestão com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Hind*III. A PCR em gradiente de temperatura demonstrou que a temperatura de 51 °C apresentou a melhor eficiência de amplificação, através da visualização de banda mais intensa com tamanho de 1543 pb. Após a transformação, houve o crescimento de colônias resistentes à ampicilina, demonstrando o sucesso do método de transformação. Entretanto, durante a triagem, não foi possível constatar a presença do vetor recombinante pAE/*mtrB.* Tais resultados indicam a presença do vetor pAE, porém sem a presença do inserto, o que pode estar relacionado a uma religação do vetor ou a falhas nas reações enzimáticas durante a montagem da molécula. Estudos futuros visando otimizar as etapas de digestão e ligação serão desenvolvidos para viabilizar a construção do vetor pAE/*mtrB*.

**Palavras-chave:** clonagem molecular, vacina recombinante, *mtrB*.

**Agência financiadora:** PIVIC/UFERSA, CNPq e CAPES.

**Campus:** Mossoró