



Evento	Salão UFRGS 2015: SIC - XXVII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2015
Local	Porto Alegre - RS
Título	Clonagem e expressão de proteína com possível função metabólica de Mycoplasma hyopneumoniae.
Autor	CAMILA VIEIRA PINHEIRO
Orientador	IRENE SILVEIRA SCHRANK

Clonagem e expressão de proteína com possível função metabólica de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Camila Vieira Pinheiro
Prof. Dr(a). Irene Silveira Schrank
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Mycoplasma hyopneumoniae é uma das menores bactérias existentes, tendo seu genoma reduzido e ausência de parede celular. Este micro-organismo é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína. Na anotação atual do genoma de *M. hyopneumoniae* o gene MHP7448_0476 tem seu produto funcional descrito como hipotético. No entanto, estudos *in silico* apontam a presença de motivos proteicos, neste peptídeo, relacionados à síntese de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD). Portanto, o objetivo do presente estudo é a clonagem e expressão do gene MHP7448_0476 de *M. hyopneumoniae* linhagem 7448 para futuros ensaios de caracterização funcional desta proteína. A metodologia empregada para a obtenção dos clones foi a clonagem sequencial em dois vetores, sendo um vetor de clonagem (pUC18) e outro de expressão (pGEX-4T3). Primeiramente, a sequência de MHP7448_0476, de 1.086 pares de bases (pb), foi amplificada com *primers* específicos contendo sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição EcoRI e XhoI. Posteriormente, as extremidades do fragmento amplificado foram tratadas com o fragmento de Klenow da DNA polimerase I, enquanto o vetor de clonagem pUC18, foi linearizado com a enzima SmaI. Vetor e fragmento foram ligados com T4 DNA Ligase e o recombinante denominado MHP7448_0476+pUC18, totalizando 3.772 pb, transformado em células quimiocompetentes de *Escherichia coli* K-12 por choque térmico. Duas colônias recombinantes foram repicadas e tiveram seu DNA plasmidial extraído, o qual foi analisado para a confirmação da clonagem. A confirmação foi realizada pelo padrão de bandeamento em gel de agarose (peso molecular) e pela técnica de PCR com os *primers* específicos do gene em estudo. Foi obtido 01 (um) clone confirmado pelas duas metodologias, sendo esse usado para as etapas seguintes. O plasmídeo selecionado, foi clivado com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI, e o resultado desta reação analisado em gel de agarose 0,8%. Os fragmentos liberados (1.086 pb) serão excisados do gel e purificados. Este fragmento purificado será clonado no vetor de expressão pGEX-4T3, cujas extremidades também foram tratadas com as mesmas enzimas de restrição. Após a clonagem no vetor de expressão, a proteína recombinante obtida e purificada será empregada em ensaios funcionais buscando a determinação da sua participação na síntese de NAD em *M. hyopneumoniae*.