

*Mycoplasma hyopneumoniae* (MH) é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína, uma doença crônica não fatal que causa importantes perdas econômicas ao redor do mundo. Assim como em outros *Mycoplasmas*, muito estudados por serem os menores organismos de vida livre encontradas na natureza, pouco se sabe sobre as regiões que regulam a transcrição do genoma de MH. A caracterização *in silico* das regiões promotoras nesse organismo faz-se difícil devido ao fato de seu genoma ser rico em conteúdo AT, uma vez que a predição destas tem sido predominantemente baseada em dados disponíveis para *Escherichia coli* (exemplo: TATA box). Dessa forma, é necessária a construção de ferramentas para a análise *in vivo* de promotores em *M. hyopneumoniae*. Neste trabalho foi desenvolvido um plasmídeo baseado em pOSTM, anteriormente produzido em nosso laboratório, do qual foi retirado o gene da tetraciclina através de clivagem com as enzimas de restrição BamHI e Sall (plasmídeo renomeado para pOSM) e este foi substituído pelo gene de fluorescência EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*), desprovido de seu promotor. O gene da EYFP foi obtido através da clivagem do plasmídeo comercial pEYFP (Clontech) com as enzimas PvuII e EcoRI, sendo posteriormente tratado com T4 polimerase para preenchimento das extremidades e subseqüentemente clonado no vetor pUC18 clivado com XbaI e desfosforilado. Após sequenciamento dos clones, aqueles com orientação correta foram clivados com as enzimas BamHI e Sall, para posterior clonagem direcionada em pOSM. Com essa nova construção objetiva-se a análise de promotores a partir da clonagem de possíveis regiões promotoras de MH na região 5' do gene EYFP, vindo estas a promoverem a expressão do gene, desenvolvendo a sua fluorescência e confirmando-se como região promotora.