

045

CONSTRUÇÃO DE UM VETOR ESPÉCIE-ESPECÍFICO PARA TRANSFORMAÇÃO DE MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE. *Fernanda Rodrigues Galves, Shana de Souto Weber, Irene Silveira Schrank, Sergio Ceroni da Silva (orient.)* (UFRGS).

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica, considerada uma das mais importantes causas de perdas econômicas na suinocultura mundial. Diferentemente de algumas poucas espécies de micoplasma, esta bactéria não possui um vetor replicativo que possibilite a sua transformação, uma vez que estudos indicam que vetores desenvolvidos para este gênero devem possuir uma origem de replicação espécie-específica. Este trabalho tem como objetivo construir um vetor replicativo para transformação de *M. hyopneumoniae*. Estudos anteriores do nosso laboratório desenvolveram o plasmídeo pOSTM, o qual possui a origem de replicação (ori) deste microrganismo. O plasmídeo pOSTM (6631pb) foi previamente construído a partir do vetor pUC18, através da clonagem da região genômica contendo a ori e o gene *dnaA* de *M. hyopneumoniae*, além do cassete de expressão do gene de resistência à tetraciclina controlado pelo promotor do gene da espiralina de *Spiroplasma citri*. No entanto experimentos de transformação utilizando o pOSTM não apresentaram resultados conclusivos. Este trabalho tem como objetivo a redução da região composta pela ori / *dnaA* para conter somente a região da ori (DnaA-box). O fragmento de 1700pb (*dnaA* e DnaA-box), responsável pela replicação do vetor, foi removido por clivagem. Para substituí-lo, amplificou-se por PCR a região da DnaA-box (210pb) utilizando primers específicos. O produto da amplificação foi ligado no vetor de clonagem e transformado em *Escherichia coli* XL1 Blue para a seleção de clones. Após a confirmação da clonagem por seqüenciamento, o inserto será subclonado no plasmídeo pOSTM. Este, então, será utilizado na padronização da transformação em *M. hyopneumoniae*. Posteriormente tem-se como outro objetivo alterar a marca de seleção utilizando o gene de resistência à gentamicina, usualmente empregado para seleção de transformantes de *Mycoplasma* spp. (PIBIC).