

437

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS DE MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE POR RECOMBINAÇÃO IN VIVO EM E. COLI. Lucinara Dadda Dias, Desirée Cigaran Schuck, Henrique Bunselmeyer Ferreira, Arnaldo Zaha (orient.) (UNISINOS).

A suinocultura constitui uma importante fonte econômica para o Brasil. Entretanto, grandes perdas financeiras associadas à produção de carne suína são atribuídas a doenças respiratórias, como a pneumonia enzoótica suína causada pelo *Mycoplasma hyopneumoniae*. O seqüenciamento do genoma das cepas patogênicas e não patogênicas possibilitou a identificação de genes que codificam proteínas com potencial para utilização em imunodiagnóstico e vacinação. Os métodos tradicionais de clonagem utilizando enzimas de restrição e T4 DNA-ligase são trabalhosos e demorados para a clonagem simultânea de um número maior de seqüências. Visando agilizar esse processo foi testada uma técnica alternativa que utiliza a recombinação homóloga natural de *Escherichia coli* para produção dos clones recombinantes. Essa técnica consiste em transformar um vetor linearizado e um segmento de DNA contendo a seqüência codificante (SC), flanqueada por sítios homólogos ao vetor, em uma linhagem de bactérias para que ocorra a recombinação entre as regiões homólogas. Neste trabalho duas SCs de *M. hyopneumoniae* foram utilizadas para testar essa metodologia: Agmh4 com 594 pb e Agmh5 com 1200 pb. O vetor pGEX 4T-3 (Amersham) foi clivado com a enzima de restrição EcoRI. Os produtos de PCR foram gerados utilizando-se primers com 35 nt de homologia com o vetor (sítio de recombinação) e 20 nt específicos da SC. O vetor preparado e o produto de PCR foram introduzidos em *E. coli* cepa KC8 por transformação, utilizando-se células tratadas com CaCl₂ e choque térmico. A indução da expressão das proteínas em fusão com GST nos recombinantes foi realizada com adição de IPTG. Proteínas de massa molecular de 70 kDa e 50 kDa foram observadas para Agmh4 e Agmh5, respectivamente. A simplicidade e a rapidez do processo de clonagem por recombinação *in vivo* abrem perspectivas para a clonagem de um número muito maior de possíveis antígenos.