

# CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DA SUPERFÍCIE DA MEMBRANA DE *Leptospira* EM *Escherichia coli*.

**SCHUCH, Rodrigo<sup>1</sup>; BACELO, Kátia<sup>1</sup>; LESTON<sup>1</sup>; HARTWIG, Daiane Drawanz<sup>1</sup>  
FORSTER, Karine Maciel<sup>1</sup>; DELLAGOSTIN, Odir Antonio<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Celular e Molecular – Centro de Biotecnologia – CDTec – UFPA  
Campus Sítio – Caixa Postal 31354 – CEP 96010-900  
[schuch.biotec@gmail.com](mailto:schuch.biotec@gmail.com)

## 1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, causada por bactérias do gênero *Leptospira* spp., cuja transmissão se dá através do contato direto ou indireto com a urina de animais infectados (LEVETT, 2001). Considerada um problema de saúde pública, afeta cerca de 500 milhões de pessoas anualmente, dos quais mais de 10% na sua forma grave (Síndrome de Weil), a leptospirose pode ser classificada como uma zoonose que acomete principalmente populações pobres de países em desenvolvimento (McBRIDE et al., 2005) causando icterícia, febre e hemorragia pulmonar (Ko et al., 2009).

As vacinas atualmente utilizadas são compostas pela bactéria inteira (McBRIDE et al., 2005) e induzem uma resposta imunológica específica, ou seja, não conferindo proteção contra sorovares que não compõem a vacina. Devido à alta diversidade genética e a priorização de vacinas recombinantes de subunidade, compostas por proteínas superficiais de membrana da bactéria (OMP), vem sendo estudada como alternativa as atuais vacinas (BRANGER et al., 2005; SEIXAS et al., 2007). Dentre essas proteínas, podem-se destacar as adesinas LigA e LigB, pertencentes a superfamília *Leptospiral Immunoglobulin-Like* (Lig), que se caracterizam por apresentarem repetições de aminoácidos com afinidade por imunoglobulina. Essas proteínas são abundantes nas regiões distais conservadas, localizadas na porção N-terminal (LigBep) e com distinção nas regiões C-terminais (LigAni e LigBni), além de um fragmento único de LigB, presente em sua porção C-terminal (LigBct) (MATSUNAGA et al., 2003).

Devido a esses aspectos, o presente trabalho visa a produção de vacinas recombinantes LigAni, LigBni, LigBct1 e LigBct2 a partir de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, cuja prevalência em cães é colossal (ANDRE-FONTAINE, 2006), para posterior avaliação de vacinas e no desenvolvimento de testes diagnósticos para leptospirose.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Amplificação e clonagem das sequências gênicas

As sequências dos genes foram obtidas a partir do DNA genômico extraído de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola cepa Honda Utrecht (HU). Os primers utilizados na amplificação foram desenhados com o auxílio do programa

Vector NTI 10 (Invitrogen) (Tab. 1). As seqüências foram amplificadas através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e os produtos da reação foram purificados com o kit *GFX™ PCR and Gel Band Purification* (GE Healthcare).

Os fragmentos obtidos foram submetidos à clonagem no vetor (RAMOS et al., 2004) e os plasmídeos recombinantes utilizados para transformar *Escherichia coli* TOP10. As células recombinantes originadas foram submetidas a uma triagem rápida com o método de triagem, seguida de cultivo em meio Luria Bertani (LB) para expansão dos plasmídeos. Os clones considerados recombinantes foram então cultivados em meio Luria Bertani (LB) para expansão dos plasmídeos. Os clones considerados recombinantes foram então cultivados em meio Luria Bertani (LB) para expansão dos plasmídeos. Os clones considerados recombinantes foram então cultivados em meio Luria Bertani (LB) para expansão dos plasmídeos.

**Tabela 1 - Primers utilizados para a amplificação das seqüências.**

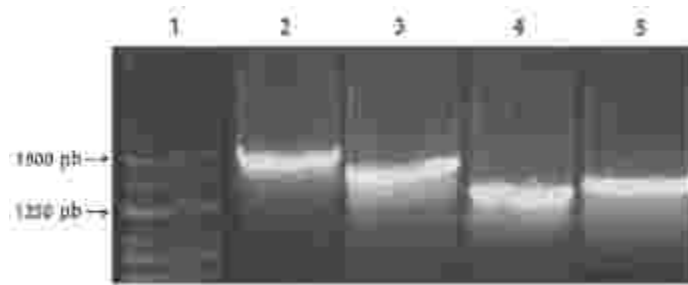
Fragmento	Primer	Enzima de restrição
LigAni	F 5' C <u>CTCGAGG</u> GATATTCTTAC GT TTC 3'	<i>XhoI</i>
	R 5' CGGGAATTCTGGCTCCGT TTA 3'	<i>EcoRI</i>
LigBni	F 5' CCG <u>CTCGAGG</u> GATATTGCTCAAT3	<i>XhoI</i>
	R 5' CGGGAATTCTCCAGATACTTAC3	<i>EcoRI</i>
LigBct1	F 5' CCGCTCGAGAATACAATCCCA3	<i>XhoI</i>
	R 5' GGGAAGCTTTATAAAAATACA3	<i>HindIII</i>
LigBct2	F 5' CCGCTCGAGGCA GGT TACA3	<i>XhoI</i>
	R 5' GGGAAGCTTTATTGATCGT3	<i>HindIII</i>

## 2.2. Produção e purificação das proteínas

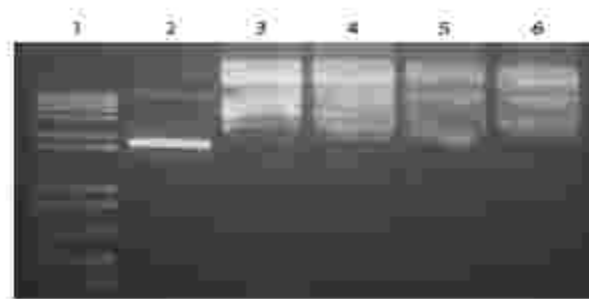
Os vetores plasmidiais produzidos foram utilizados para transformar *E. coli* BL21 (DE3) Star para a expressão da proteína recombinante. As células transformadas foram cultivadas sob agitação (200 rpm) em 500 mL de Yeast Tryptone Medium (2YT), contendo ampicilina, até atingirem a fase log de crescimento ( $DO_{600} = 0.6 - 0.8$ ). O cultivo foi induzido com 1 mM de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e mantido sob agitação com o indutor durante mais 4 horas. As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose (HiTrap™). A expressão dos quatro fragmentos foi avaliada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% e por Western Blot utilizando-se anticorpo anti-histidina. A quantificação das proteínas foi utilizando o kit Pierce® BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fragmentos foram amplificados (Fig. 1) e ligados de forma eficiente ao vetor de clonagem, resultando nos plasmídeos recombinantes denominados pAE/*ligAni*, pAE/*ligBni*, pAE/*ligBct1* e pAE/*ligBct2* (Fig. 2).

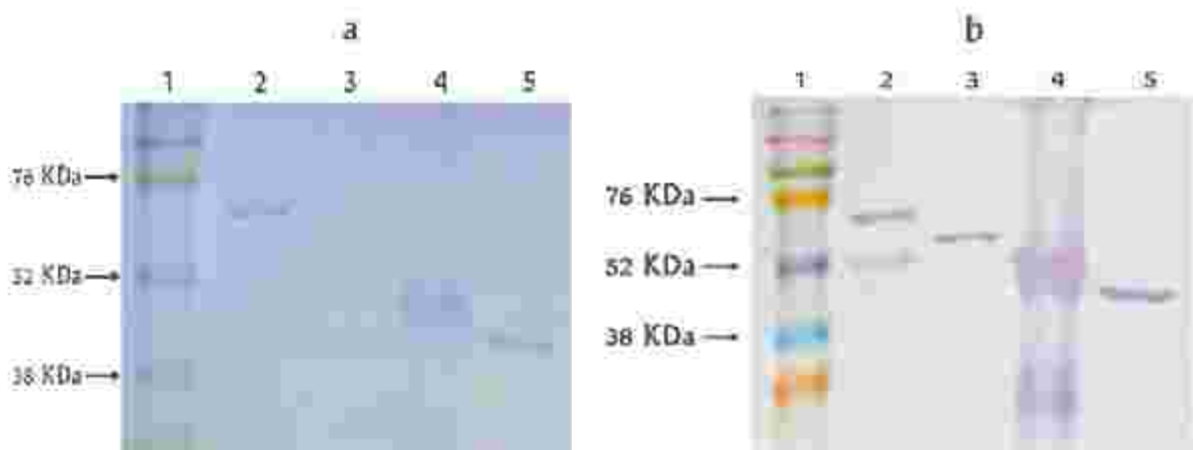


**Figura 1:** Gel de agarose 1% com os fragmentos gêni cosamplif i e a d e s . Padrão de P e s o R molecular de 100 pb (1); *ligAni*, 1776 pb (2); *ligBni*, 1452 pb (3); *ligBct1*, 1167 pb (4); e *ligBct2*, 1170 pb (5).



**Figura 2:** Gel de agarose 1% com os vetores recombinantes obtidos. Padrão de pes o 1 Kbp e u plus (1), pAE (2), pAE/*ligAni* (3), pAE/*ligBni* (4), pAE/*ligBct1* (5) e pAE/*ligBct2* (6).

As prot eéxpressas foram purificadas por cromatografia de afinidade e visualizadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% e Western Blot com anti-histidina (Fig.3). Com rel açõ a Bct 1, o West ern Blo t r eve l ou um co m p o s s í v e l d e g r a d e a ã o d a A p u r i f i c a ç ã o d a s p r o t e í n a s r e o m demonstrou rendimento de 1,88 mg.L<sup>-1</sup>, 2,58 mg.L<sup>-1</sup>, 5,42 mg.L<sup>-1</sup> e 1,52 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente para LigAni, LigBni, LigBct1 e LigBct2.



**Figura 3:** Gel de poliacrilamida 12% (a) e Western Blot (b), de mostrand a purifi ca ç ã o d a s recombinantes. Marcador Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Maker (1); LigAni, 64 KDa (2); LigBni, 52 KDa (3); LigBct1, 45 KDa (4); LigBct2, 45 KDa (5).

#### 4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a estratégia adotada para a construção de vetores de expressão é eficaz. Todos os genes alvos foram amplificados e clonados com sucesso em *E. coli*, possibilitando a expressão e purificação das proteínas de interesse. As proteínas SLiG e LigBct2 foram obtidas em quantidades suficientes para os estudos posteriores de avaliação da resposta imune e potencial imunoprotetor, esperando-se dessa forma contribuir para o desenvolvimento de uma vacina vetorial para a leptospirose.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ANDRE-FONTAINE, G., Canine leptospirosis - Do we have a problem?. **Vet Microbiol.**, v. 117, nº. 1, p. 19-24, 2006.
- BRANGER, C., B. Chatrenet, A. Gauvrit, F. Aviat, A. Aubert, J. M. Bach, and G. Andre-Fontaine. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infect. Immun.**, v. 73, nº. 7, p. 4062-4069, 2005.
- Ko, A. I., C. Goarant, and M. Picardeau, *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, nº. 10, p. 736-747, 2009.
- LEVETT, P.N. Leptospirosis, **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, nº 2 p. 320-329, 2001.
- MATSUNAGA, J. Barocchi M. A., Croda, J., Young T. A., Sanchez Y., Siqueira, I., Bolin, C. A., Reis, M. G., Riley, L. W., Haake, D. A., Ko, A. I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Mol. Microbiol.**, v. 49, nº. 4, p. 929-945, 2003.
- McBRIDE, A. J., D. A. Athanzio, M. G. Reis, and A. I. Ko. Leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 18, nº. 5, p. 376-386, 2005.
- RAMOS, C. R., P. A. Abreu, A. L. Nascimento, and P. L. Ho. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide: **Braz. J Med.Biol. Res.**, v. 37, nº. 8, p. 1103-1109, 2004.
- SEIXAS, F. K., C. H. Fernandes, D. D. Hartwig, F. R. Conceicao, J. A. Aleixo, and O. A. Dellagostin. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis: **Can. J. Microbiol.**, v. 53, nº. 4, p. 472-479, 2007.