



# VII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA

## INTEGRAÇÃO ENTRE GRADUAÇÃO E PÓS-GRADUAÇÃO

### III MOSTRA ACADÊMICA



## CLONAGEM E EXPRESSÃO DA TOXINA TETÂNICA DE *Clostridium tetani*.

POLETTI, IGOR<sup>1\*</sup>; DONASSOLO, RAFAEL A.<sup>1</sup>; CARNEIRO, FERNANDA S.<sup>1</sup>;  
FERREIRA, MARCOS R. A.<sup>1</sup>; MOREIRA-JR, CLOVIS<sup>1</sup>; CONCEIÇÃO, FABRICIO R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Imunologia Aplicada; Biotecnologia – CDTec; UFPEL

<sup>1\*</sup> E-mail do apresentador: igor.poletti@hotmail.com.br

Área de submissão: microbiologia

### RESUMO

*Clostridium tetani* é um bacilo Gram-positivo, anaeróbio estrito, encontrado no solo na forma de esporos e no trato gastrointestinal de animais e humanos. A principal toxina produzida por estes microrganismos é a tetanospasmina (TeNT). A ação dessa toxina é por meio do impedimento da liberação de neurotransmissores inibitórios, como o GABA e a glicina, provocando a inibição de reflexos motores. As vacinas disponíveis no mercado são toxóides eficientes na imunização dos animais, mas apresentam algumas desvantagens. As vacinas recombinantes surgem oferecendo maiores vantagens como, processo de produção simplificado, segurança para os manipuladores e maior imunogenicidade. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi a clonagem e expressão de um pequeno fragmento desta toxina, responsável pela ligação na célula hospedeira. A sequência codificadora (CDS) foi sintetizada e clonado em vetor pET28a (Epoch, Life Science). A CDS e o vetor pET28a foram digeridos com enzimas NheI e HindIII, e posteriormente ligados com enzima T4 DNA ligase. O produto da ligação foi utilizado para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , plaqueadas em meio LB sólido suplementado com 100  $\mu$ g/mL de canamicina e cultivadas à 37 °C por 16 h. As colônias obtidas foram inoculadas em 5 mL de meio LB com canamicina e cultivadas à 37 °C, por 16 h. Os cultivos foram utilizados para extração de DNA plasmidial, e os possíveis clones recombinantes foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Para expressão, a cepa utilizada foi *E. coli* BL21 (DE3) Star® (Invitrogen), transformadas através de choque térmico. Após, foi cultivado um pré-inóculo em 10 mL de LB suplementado com 100  $\mu$ g/mL de canamicina. No dia seguinte, 9 mL de LB com a mesma concentração de canamicina foi inoculado com 1 mL de pré-inóculo. No final da fase logarítmica de crescimento (D.O.<sub>600nm</sub> = 0,6 a 0,8), a expressão das proteínas foi induzida pela adição de 0,5 mM de IPTG. A cultura foi incubada por 3 h a 37 °C sob agitação. A confirmação da expressão foi realizada por SDS-PAGE 12% e *Western blot*. A clonagem foi bem-sucedida, assim como a expressão de TeNT em *E. coli* BL21 (DE3) Star®. Através da técnica de eletroforese em SDS-PAGE e de *Western Blot*, confirmou-se a expressão do fragmento da toxina tetânica. Foi possível clonar e expressar a porção C-terminal do domínio de ligação de TeNT. Novos estudos serão conduzidos buscando otimizar a expressão das proteínas avaliadas, bem como avaliar o potencial imunoprotetor das proteínas como antígenos em experimento de vacinação em animais contra o tétano, conforme preconizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

**PALAVRAS-CHAVE:** proteína recombinante; clostridioses; vacinas; tétano.