

EXPRESSÃO DE UMA REGIÃO CONSERVADA DA PROTEÍNA N DO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA UTILIZANDO UM GENE SINTÉTICO

**MAUREEN HOCH VIEIRA FERNANDES¹; PAULA FONSECA FINGER²
RODRIGO CASQUERO CUNHA²; DÉBORA SCOPEL E SILVA²; MARCELO DE
LIMA²; SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER³**

¹Laboratório de Virologia e Imunologia Animal; Universidade Federal de Pelotas –
maureenhvfernandes@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas

³ Laboratório de Virologia e Imunologia Animal; Universidade Federal de Pelotas –
sohubner@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O vírus da cinomose canina (canine distemper virus - CDV) causa uma enfermidade conhecida como cinomose, caracterizada por infecção aguda sistêmica ou crônica persistente localizada no sistema nervoso central (DORSEY, 2005). A cinomose é altamente contagiosa, possui distribuição mundial, alta incidência e níveis elevados de letalidade (AN et al., 2008). No Brasil, alguns estudos têm mostrado essa enfermidade como a principal causa de morte precoce e eutanásia em cães (BENTUBO et al., 2007; FIGHERA et al., 2008).

Uma variedade de parâmetros clínicos e técnicas de imunodiagnóstico podem ser realizadas para se chegar a um diagnóstico definitivo *antemortem* (ELIA et al., 2015). No entanto, por ser uma doença com caráter imprevisível e curso variável, muitas vezes o diagnóstico final é inconclusivo (FRISK et al., 1999) ou apenas realizado através da observação das manifestações clínicas (LATHA et al., 2007). Nesse contexto, surge o advento da tecnologia de DNA recombinante e sua aplicação e contribuição nos testes de investigação de doenças (BALAMURUGAN et al., 2010). Estas técnicas moleculares estão se mostrando de importante aplicação em diagnósticos virais de rotina, visto que podem ser eficazes no sentido de facilitar o diagnóstico (KAPIL et al., 2008).

Alguns estudos sugerem que a proteína do nucleocapsídeo (NP) do CDV possui alto potencial para ser usada para o diagnóstico da cinomose canina (YI & CHENG, 2014; LATHA et al., 2007), uma vez que é altamente conservada, expressa logo no início do ciclo de replicação viral e produzida em grande quantidade nas células do hospedeiro (LATHA et al., 2007). Além disso, a NP é utilizada como referência na pesquisa do *status* sorológico (ELIA et al., 2015) por ser a proteína que induz maior título de anticorpos em infecções por Morbillivírus (VON MESSLING et al., 1999).

Este trabalho teve por objetivo a expressão de uma região altamente conservada da NP do CDV para posterior caracterização e utilização em testes de imunodiagnóstico.

2. METODOLOGIA

Construção de plasmídeo recombinante contendo um gene sintético de uma região conservada da NP do CDV: Após análise de sequências da NP do CDV depositadas no *GenBank*, foi escolhida uma região da proteína altamente conservada. A sequência de nucleotídeos foi obtida sinteticamente e otimizada para expressão em *E. coli* pela empresa GENONE®. O gene resultante foi

clonado no vetor pAE utilizando as enzimas de restrição BamHI e HindIII, resultando no plasmídeo recombinante pAE-NP.

Clonagem e expressão do pAE-NP: O vetor pAE-NP foi utilizado para transformar, mediante choque térmico, cepas de *TOP10F* de *E. coli*. Foi realizado um *screening* das colônias para verificar se continham o pAE-NP (eletroforese em gel de agarose 1%). As colônias foram então selecionadas e repicadas em meio líquido Luria Bertani (LB) suplementado com 100 mg/ml de ampicilina para amplificação. Foi realizada a extração de DNA plasmidial por lise alcalina com SDS (Miniprep) das colônias contendo o plasmídeo recombinante. Posteriormente, *E. coli* cepa *Star* foram transformadas com o pAE-NP também mediante choque térmico. As bactérias transformadas foram incubadas a 37 °C durante 30 minutos sob agitação constante. Em seguida, essa cultura foi colocada em um novo tubo com meio LB em maior quantidade, sendo incubada *overnight* a 37 °C sob agitação. Após esse período, a cultura obtida foi transferida para um novo meio LB contendo ampicilina e incubada a 37°C sob agitação, até atingir a densidade óptica ideal (DO600 = 0,6-0,8). A expressão da proteína recombinante foi induzida com 0,5 mM de Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), durante 3 h a 37 °C sob agitação constante.

Purificação da NP recombinante: A cultura induzida com IPTG foi centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi dissolvido em tampão *Akta Wash* com lisozima (50 mg/ml) e sonicada sete vezes durante 20 segundos a 60 Hz. O lisado foi centrifugado e, em seguida, o precipitado foi lavado três vezes com PBS. O precipitado foi dissolvido em tampão acrescido com 0,2% de N-Lauroylsarcosine e mantido durante 48 h sob agitação a 4 °C. Essa solução foi novamente centrifugada e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. A proteína recombinante foi purificada com uma coluna de cromatografia de afinidade com Ni²⁺. A concentração final da proteína purificada foi estimada por fluorometria utilizando *Qubit™ fluorometric quantitation*.

Confirmação da NP recombinante: As frações obtidas em cada etapa da expressão e purificação da NP recombinante foram analisadas por SDS-PAGE e *Western blotting*. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado *overnight*. Após lavagens sucessivas com PBS-T, a membrana foi incubada com um anticorpo monoclonal (MAb anti-His) durante 1 h. Após remoção dos anticorpos não ligados, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário *anti-mouse IgG* conjugado com peroxidase por mais 1 h. Após nova etapa de lavagem, o resultado foi revelado com 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A região do gene escolhida para síntese foi a porção central da NP que apresentou 100% de homologia com as proteínas NP do CDV depositadas no *GenBank*. O que corrobora com Yoshida et al. (1998), que relataram que as poucas diferenças encontradas no gene da NP ocorrem nas regiões N' e C' terminais, sendo a região central altamente conservada. O gene sintetizado apresentou 294 pares de bases e após inserido no vetor pAE foi clonado em *E. coli TOP10F*, resultando em muitas colônias transformantes (Figura 1). A produção do gene sintético otimiza a expressão de proteínas, visto que reduz tempo e custos quando comparado a proteínas expressas com gene nativo (ALDRICH et al., 2007). Além disso, a utilização de gene sintético permite otimizar a sequência de aminoácidos para expressão em um sistema heterólogo, aumentando assim o nível de expressão (DAS; SURESH, 2006).

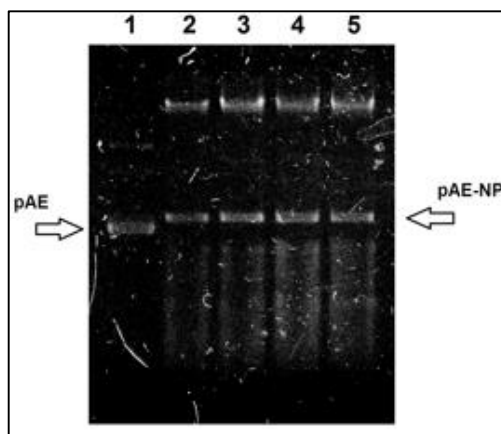


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose a 1% de colônias de *E. coli* TOP10F após transformação com o vetor pAE-NP. **1:** plasmídeo pAE; **2-5:** colônias de *E. coli* TOP10F transformadas com o vetor pAE-NP.

A expressão do gene sintético resultou em uma proteína de aproximadamente 12 kDa, peso molecular de acordo com o esperado. Junto a proteína, foi expressa uma cauda de histidina, que permite a purificação pela utilização de uma coluna de afinidade (CROWE et al., 1994). Na quantificação final, após purificação, a concentração da proteína foi de aproximadamente 300 µg/mL. A expressão da região central da NP foi analisada por SDS-PAGE e confirmada por *Western blotting* (Figura 2).

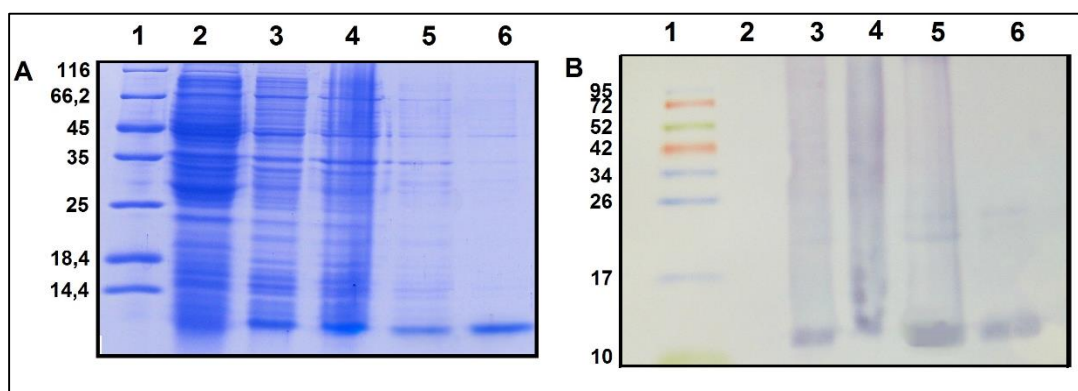


Figura 2: A – Análise da expressão da proteína NP por SDS-PAGE a 20%
B – Análise da expressão da proteína NP por *Western blotting*. **1.** Marcador; **2.** *E. coli* cepa *star* controle negativo; **3.** *E. coli* *star* transformada com pAE-NP não-induzida; **4.** *E. coli* *star* transformada com pAE-N induzida; **5.** NP solúvel em 0,2% N-lauroylsarcosine; **6.** NP purificada.

4. CONCLUSÕES

O gene sintético codificador de uma região conservada da NP do CDV foi clonado com sucesso utilizando o vetor pAE e expresso em *E. coli* resultando na proteína recombinante NP. Estudos posteriores estão sendo realizados a fim de avaliar seu possível uso em testes de imunodiagnóstico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRICH, S. C.; NEWCOMB, J.; CARLSON, R. **Genome sinthesis and design futures: implications for the US economy**. Report bio-era, 2007. Acessado em 30 jun. 2015. Online. Disponível em: <http://www.bio-era.net/reports/genome.html>
- AN, D. J.; KIM, T. Y.; SONG, D. S.; KANG, B. K.; PARK, B. K. An immunochromatography assay for rapid antemortem diagnosis of dogs suspected to have canine distemper. **Journal of Virological Methods**, v. 147, p. 244-249, 2008.
- BALAMURUGAN, V.; VENKATESAN, G.; SEM, A.; ANNAMALAI, L.; BHANUPRAKASH, V.; SINGH, R. K. Recombinant protein-based viral disease diagnostics in veterinary medicine. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 6, p. 731-753, 2010.
- BENTUBO, H. D. L.; TOMAZ, M. A.; BONDAN, E. F.; LALLO, M. A. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). **Ciência Rural**, v. 37, p. 1021- 1026, 2007.
- CROWE, J.; DOBELI, H.; GENTZ, R.; HOCHULI, E.; STUBER, D.; HENCO, K. 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. **Methods in Enzymology**, v. 31, p. 271-387, 1994.
- DAS, D.; SURESH, M. R. Copious production of SARS-CoV nucleocapsid protein employing codon optimized synthetic gene. **Journal of Virological Methods**, v. 137, n. 2, p. 343-346, 2006.
- DORSEY, W. A. Comments on canine distemper outbreak. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 1, p 32, 2005.
- ELIA, G.; CAMERO, M.; LOSURDO, M.; LUCENTE, M. S.; LAROCCA, V.; MARTELLA, V.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Virological and serological findings in dogs with naturally occurring distemper. **Journal of Virological Methods**, v. 213, p. 127-130, 2015.
- FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; SILVA, M. C.; BRUM, J. C.; GRAÇA, D. G.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 223-230, 2008.
- FRISK, A. L.; KÖNIG, M.; MORITZ, A.; BAUMGÄRTNER, W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3634-3643, 1999.
- KAPIL, S.; YEARY, T.; JOHNSON, B. **Veterinary Clinics Small Animal Practices**, v. 38, p. 755-774, 2008.
- LATHA, D.; GEETHA, M.; RADAMASS, P.; NARAYANAN, R. B. Evalution of ELISA based on the conserved and functional middle region of nucleocapsid protein to detect distemper infection in dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 120, p. 251-260, 2007.
- VON MESSLING, V.; HARDER, T. C.; MOENNING, V.; RAUTENBERG, P.; NOLTE, I.; HASS, L. Rapid and sensitive detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 1049-1056, 1999.
- YI, L.; CHENG, S. A Monoclonal antibody against truncated N protein (aa 277–471) of canine distemper virus. **Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy**, v. 33, n. 1, 2014.
- YOSHIDA, E.; IWATSUKI, K.; MIYASHITA, N.; GEMMA, T.; KAI, C.; MIKAMI, T. Molecular analysis of the nucleocapsid protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. **Veterinary Microbiology**, v. 59, p. 237-244, 1998.