

## CLONAGEM DA PROTEÍNA MPT64 DE *Mycobacterium tuberculosis*

EMILI GRIEP<sup>1</sup>; CAROLINA GEORG MAGALHÃES<sup>1</sup>; PAULA FONSECA FINGER<sup>1</sup>;  
RAFAEL AMARAL DONASSOLO<sup>1</sup>; MORGANA LÜDTKE AZEVEDO<sup>1</sup>; FABRICIO  
ROCHEDO CONCEIÇÃO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – Laboratório de Imunologia Aplicada, CDTec, Biotecnologia  
emiliigrip@gmail.com  
fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada por bactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) como *M. tuberculosis*, *M. Africanum*, *M. anettii*, entre outras (COSCOLLA, et al., 2013). *M. tuberculosis* é o principal agente causador de TB em humanos, entretanto, há cerca de 20 espécies diferentes de micobactérias, as micobactérias não tuberculosas (MNT), que também podem causar infecções (micobacterioses) em humanos. Casos de micobacterioses vêm aumentando no decorrer dos anos principalmente em virtude do aumento no número de pacientes imunocomprometidos por doenças como AIDS e câncer, logo é importante distinguir o grupo de micobactéria envolvida na infecção para que o tratamento seja específico e efetivo (AKYAR, et al., 2010), já que a sintomatologia das doenças causadas por cada grupo é muito similar e o diagnóstico pode ser muitas vezes confundido (Griffith, et al., 2006).

Já foram desenvolvidos ensaios diagnósticos imonocromatográficos que diferenciam as bactérias do CMT das MNT, baseados na identificação da proteína MPT64 por anticorpo monoclonal, como ensaio Capilia TB (Tauns, Numazu, Japão), ensaio rápido SD Bioline AgMPT64 (Standard Diagnostics, Yongin, Coréia do Sul) e teste BD MGIT TBc ID (Becton Dickinson, Sparks, EUA (Gaillard et al., 2011; Yin et al., 2013), são testes simples, fáceis, rápidos, porém é necessário sua importação para o Brasil, encarecendo o custo destes testes. A MPT64 é uma importante proteína, de massa molecular de 24 kDa, produzida e secretada somente pelas bactérias do CMT, sendo a detecção deste antígeno uma alternativa específica, sensível e rápida para confirmar isolados de CMT (Oettinger et al, 1995; Kumar et al, 2011).

O objetivo deste trabalho foi clonar o gene que codifica a proteína MPT64 e expressá-la de forma recombinante em *Escherichia coli* para posterior produção de anticorpos policlonais para um diagnóstico direto de TB capaz de identificar bactérias do CMT.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Extração de DNA

Foi extraído o DNA de *M. tuberculosis* H37Rv para amplificação do gene que codifica para a proteína MPT64 (*mpt64*). A extração foi realizada a partir de 1 a 2 colônias de *M. tuberculosis* H37Rv. As colônias foram eluídas em 400 µL de TE (10 mM TrisHCl pH 8; 50 mM EDTA), inativadas por 30 min a 80 °C e centrifugadas (10000 rpm; 3 min) para coleta do sobrenadante contendo o DNA.

#### 2.2 Amplificação do gene que codifica para MPT64

Com base na sequência do gene *mpt64* de *M. tuberculosis* H37Rv (GenBank: X75361.1), foram desenhados *primers* para completa amplificação do gene. Sítio de clivagem para a enzima *Bam*HI foi introduzido no *primer forward* (5'

TCAGGATCCGCGCCCAAGAC 3') e *Hind*III no *primer* reverse (5' CCCAAGCTTCTAGGCCAGCATCG 3').

O DNA extraído foi utilizado como fita molde na PCR (*Polymerase Chain Reaction*). O preparo da reação foi realizado com 16 µL de H<sub>2</sub>O; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; tampão 1x; 0,2 mM de dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatados), 1 pmol de cada *primer*, 20 ng de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv e 1 U de Taq DNA polimerase. A reação aconteceu em termociclador, com desnaturação inicial de 95 °C por 5 min, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 1 min e 72 °C por 1 min, e extensão final a 72 °C por 10 min. A verificação da amplificação por PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

### 2.3 Digestão do produto de PCR e do vetor de expressão

A reação de PCR foi purificada com GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). O produto da PCR e o vetor de expressão pET28a foram digeridos com enzimas de restrição *Hind*III e *Bam*HI.

A digestão com a enzima *Hind*III foi realizada por 3 h a 37 °C. Foram adicionados 10 µL de DNA (vetor pET28a e produto da PCR), 1 x de tampão 2.1 NEB, 20 U da enzima e 7 µL H<sub>2</sub>O. Após esse período a enzima foi inativada por calor a uma temperatura de 80 °C por 20 min. Com a primeira enzima inativada, foram adicionados à reação 1 x de tampão 2.1 NEB, 20 U de enzima *Bam*HI. A reação foi submetida por 16 h a 37 °C. A confirmação da digestão com as enzimas de restrição foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

### 2.4 Ligação do vetor de expressão com inserto

O vetor e inserto digeridos foram purificados com GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit e quantificados por Qubit.

A ligação do pET28a com *mpt64* foi realizada com 1x de tampão T4 DNA ligase; 3 U de T4 DNA ligase; 1 parte do vetor para 3 de inserto (2,5 µL de vetor; 5 µL de inserto) e 9,5 µL de H<sub>2</sub>O. 10 µL da ligação foram utilizados para transformar por choque térmico células *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes.

### 2.5 Caracterização dos clones

As células *E. coli* DH5α quimiocompetentes transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido (Luria-Bertani - 1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl, 1,5% Agar) suplementado com 100 µg mL<sup>-1</sup> de canamicina e cultivadas à 37 °C por 18 h. As colônias obtidas na placa foram inoculadas em 5 mL de meio LB com 100 µg mL<sup>-1</sup> de canamicina e cultivadas à 37 °C, 180 rpm, por 18 h.

Os cultivos foram utilizados para extração de DNA plasmideal seguindo o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001). O DNA plasmideal dos possíveis clones foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, e caracterizado utilizando a enzima de restrição *Sma*I que apresenta um sítio de clivagem no inserto e outro no vetor, gerando fragmentos de 4642 pb e 1325 pb.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação do gene *mpt64* por PCR pode ser comprovada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, confirmando o tamanho esperado de 618 pb (Figura 1A).

Foi possível observar a eficiência de clivagem das enzimas de restrição (dados não mostrados), onde o vetor pET28a digerido apresentava apenas uma banda, enquanto que o vetor pET28a circular apresentou duas bandas. A presença de apenas uma banda de plasmídeo pode caracterizar a sua linearização, já que quando o plasmídeo está na forma circular, pode adquirir

diferentes conformações podendo apresentar mais de uma banda em gel de agarose (Lima, 2008).

A partir da ligação do gene *mpt64* com pET28a, possíveis clones pET28a/*mpt64* foram selecionados e analisados em eletroforese em gel de agarose 0,8%. Pode-se observar que três plasmídeos apresentaram características diferentes do pET28a circular (controle negativo), com bandas um pouco acima do controle negativo (Figura 1B), sugerindo que sejam possíveis clones recombinantes.

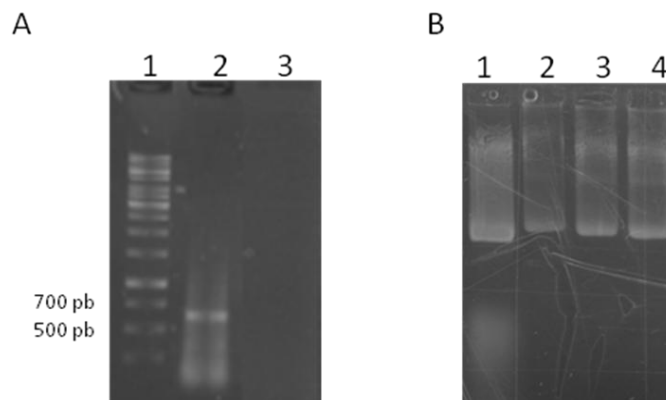


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 0,8%: (A) Resultado da amplificação de *mpt64* por PCR 1. Marcador molecular 1 kb; 2. Produto da PCR; 3. Controle negativo. (B) Seleção dos clones pET28a/*mpt64*: 1. PET28a circular; 2. Clone 10; 3. Clone 11; 4. Clone 13.

A caracterização dos possíveis clones foi feita com a enzima de restrição *Sma*I. A clivagem do clone com a enzima gera dois fragmentos e, no vetor sem o inserto, a enzima tem um único sítio de clivagem gerando apenas um fragmento do tamanho do vetor linear.

Esta caracterização por restrição com *Sma*I foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (Figura 2), verificando-se a presença de dois fragmentos nas amostras dos três possíveis clones, com tamanhos correspondentes aos citados anteriormente (4642 e 1325 pb), e apenas uma banda no pET28a clivado com a enzima (controle negativo).

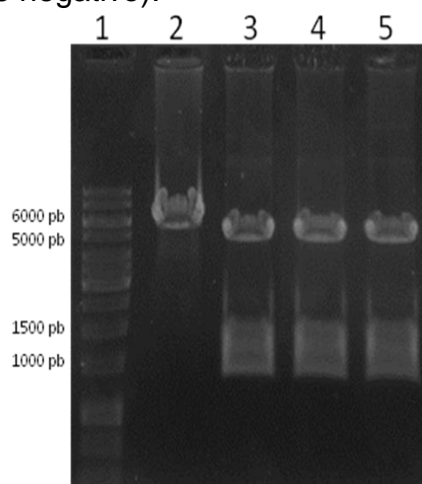


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da digestão dos clones com a enzima de restrição *Sma*I: 1. Marcador molecular 1 kb; 2. pET28a digerido com *Sma*I; 3. Clone 10 digerido com *Sma*I; 4. Clone 11 digerido com *Sma*I; 5. Clone 13 digerido com *Sma*I.

#### 4. CONCLUSÕES

Estes resultados demonstram que foi possível a clonagem do gene que codifica para a proteína MPT64 no vetor pET28a. Ainda neste projeto será realizada a expressão heteróloga da proteína MPT64 em *Escherichia coli* a partir dos clones recombinantes obtidos neste trabalho e, posteriormente a produção de anticorpos policlonais para a elaboração de um teste diagnóstico para TB.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKYAR, I.; KOCAGOZ, T.; SINIK, G., OKTEM, S., AYTEKIN, N., KOCAGOZ, S. Lateral flow assay for rapid differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex and 97 species of mycobacteria other than tuberculosis grown in Löwenstein-Jensen and TK-SLC medium. **Indian Journal of Medical Microbiology**. 28 (4), p. 308-312, 2010.

COSCOLLA, M., LEWIN, A., METZGER, S., MAETZ-RENNING, K., CALVIGNAC-SPENCER, S., NITSCHE, A., DABROWSKI, P., RADONIC, A., NIEMANN, S., PARKHILL, J., COUACY-HYMAN, E., FELDMAN, J., COMAS, I., BOESCH, C., GAGNEUX, S., LEENDERTZ, F. Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolate from a Wild Chimpanzee. **Emerging Infectious Diseases** (www.cdc.gov/eid). 19 (6), 969-976, 2013.

GAILLARD, T.; FABRE, M.; MARTINAUD, C.; VONG, R.; BRISOU, P.; SOLER, C.. Assessment of the SD Bioline Ag MPT64 Rapid™ and the MGIT™ TBc identification tests for the diagnosis of tuberculosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 70, p 154–156, 2011.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. 1v.

GRIFFITH, D. E., AKASAMIT, T., BROWN-ELLIOTT, B. A., CATANZARO, A.; DALEY, C.; GORDIN, F.; HOLLAND, S. M.; HORSBURGH, R.; HUITT, G.; IADEMARCO, M. F.; ISEMAN, M.; OLIVER, K.; RUOSS, S.; VON REYN, C. F.; WALLACE JR, R. J.; WINTHOP, K. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. **American Thoracic Society Documents**, p. 386-406, 2007.

KUMAR, V. G. S.; URS, T. A.; RANGANATH, R. R. MPT 64 Antigen detection for Rapid confirmation of *M.tuberculosis* isolates. **BioMed Central Research Notes**. 4, 79, 2011.

LIMA, J. B.M. **Efeito do grau de superenrolamento de plasmídeos da sua estabilidade estrutural e função biológica**. 2008. Dissertação (Mestrado em biologia molecular e genética) - Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia do Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa.

OETTINGER, T.; HOLM, A.; MTONI, I. M.; ANDERSEN, A. B.; HASLOV, A. K. Mapping of the Delayed-Type Hypersensitivity-Inducing Epitope of Secreted Protein MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**. 63(12), p. 4613–4618, 1995.

YIN, X.; ZHENG, L.; LIN, L.; HU, Y.; ZHENG, F.; HU, Y.; WANG, Q. Commercial MPT64-based tests for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex: A meta-analysis. **Journal of Infection**. 67, 369-377, 2013.