

EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA N DO VÍRUS DA SÍNDROME REPRODUTIVA E RESPIRATÓRIA DOS SUÍNOS (PRRSV)

PAULA DE ALMEIDA RODRIGUES¹; LIVIA SILVEIRA MUNHOZ;
MARCELO DE LIMA³

¹Universidade Federal de Pelotas – paularodrigues201@gmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande – livinhamunhoz@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – mdelima.ufpel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRS) é uma enfermidade viral descrita inicialmente no final da década de 80 nos Estados Unidos e Europa causando problemas respiratórios, perdas reprodutivas e mortalidade em granjas de suínos. O agente etiológico (vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos – PRRSV) está classificado na ordem *Nidovirales*, família *Arteriviridae*, gênero *Arterivirus*. Atualmente, a infecção pelo PRRSV está associada com perdas econômicas significativas para a suinocultura comercial nos principais países onde a suinocultura é expressiva. Somente nos EUA, estima-se que a infecção pelo PRRSV resulte em prejuízos anuais de 560 milhões de dólares à indústria suinícola. No Brasil, alguns estudos sorológicos e virológicos não demonstraram a presença da infecção pelo PRRSV em granjas de suínos. Entretanto, a situação é considerada desconhecida perante os órgãos sanitários internacionais devido à ausência de estudos oficiais com uma amostragem estatisticamente significativa do rebanho nacional. Recentemente, o vírus foi identificado em suínos no Uruguai sendo notificado a OIE em julho de 2017.

Considerando importância da suinocultura brasileira no para o mercado nacional e internacional além da identificação da enfermidade em um país vizinho, é indispensável um monitoramento constante dos rebanhos, assim como de animais e material genético introduzidos no país.

O presente estudo teve como objetivo a expressão e caracterização preliminar da proteína do nucleocapsídeo viral (proteína N) do PRRSV visando a produção de um antígeno recombinante para a elaboração de reagentes específicos e o desenvolvimento de um teste sorológico.

2. METODOLOGIA

Em virtude da impossibilidade de se manipular o agente infeccioso (vírus da PRRSV) no Brasil, foram obtidos plasmídeos contendo o DNA complementar (cDNA) de regiões do genoma de uma cepa norte-americana do PRRSV. A

aquisição destes vetores evita a manipulação do agente na sua forma infecciosa bem como os riscos inerentes.

Para a amplificação do gene codificante da proteína N do PRRSV, foram desenhados *primers* com base na sequência de nucleotídeos da cepa NVSL 97-7895 (GenBank: AY545985). As sequências dos primers foram: PRRSV N For CGGGATCCATGCCAAATAACAACG onde a região sublinhada representa o sítio de restrição para a enzima BamHI e PRRSV N Rev CGGAATTCTTACGCTGATGATGGC onde a região em destaque consiste no sítio de restrição pra a enzima EcoRI. Esta estratégia permitiu a clonagem direcional do fragmento no vetor de expressão (pAE).

O gene da proteína N do PRRSV foi amplificado a partir do plasmídeo EPpBR (que contém o cDNA dos genes que codificam as proteínas estruturais do PRRSV). Foi realizada a reação de PCR e o seu produto foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% e visualizado sob luz UV. Um fragmento de aproximadamente 385 pares de bases (pb) foi visualizado, confirmando a amplificação do gene de interesse. O produto de PCR foi então purificado usando o kit comercial (*Charge Switch PCR Clean-up – Invitrogen*) e digerido com as enzimas BamHI e EcoRI). Após a digestão com as respectivas enzimas de restrição, o amplicon foi clonado direcionalmente no vetor pAE (previamente digerido com as mesmas enzimas e desfosforilado pelo uso da enzima *Antarctic Phosphatase (New England Biolabs)*). O produto da ligação com a enzima T4 DNA ligase foi transformado em células competentes (*E. coli TOP10*) pela técnica de choque térmico, mantido sob agitação em meio de cultura LB líquido por uma hora à 37C e plaqueado em meio de cultura LB sólido contendo ampicilina *overnight* à 37C.

A seleção dos clones recombinantes foi realizada a partir da técnica de extração de DNA plasmidial das colônias obtidas e análise em gel de agarose. Os clones recombinantes apresentavam massa molecular de aproximadamente 3,1Kbp quando comparados ao vetor vazio com massa molecular de aproximadamente 2,8Kbp. A seleção dos clones recombinantes foi ainda confirmada por sequenciamento genômico bidirecional de dois clones recombinantes selecionados. O desenho dos *primers*, mapas de plasmídeos e todos os experimentos referentes a clonagem do gene de interesse foram previamente analisados com auxílio do programa *Vector NTI*.

Após a confirmação, o clone recombinante (pAE-N 2.1) foi transformado em células *E.coli* BL21 (cepa de expressão) e mantidos sob agitação a 37°C. A indução da expressão foi realizada com *isopropyl-B-D-thiogalactopyranoside* (IPTG). Visando uma otimização dos resultados e uma maior concentração de proteína recombinante, diferentes concentrações do indutor bem como diferentes tempos de expressão pós-indução foram analisados. O *pellet* e sobrenadante das culturas analisadas foram tratados com tampão de lise e analisados por

eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). Após o gel foi corado com o reagente *Comassie Blue* e os resultados analisados.

Após eletroforese das amostras em gel de poliacrilamida 12%, foi realizada sua transferência para uma membrana de nitrocelulose (Whatman Protran BA 85) por 1h a 100 V. Após a transferência, foi utilizado uma solução de bloqueio (PBST-20 0,05% em leite em pó desnatado 5%) e a membrana foi incubada em estufa à 37 °C por 1 hora, sob agitação. Posteriormente, foram realizadas 5 lavagens (solução de lavagem PBST-20 0,05%) para a remoção do excesso de proteínas da solução de bloqueio. Após as lavagens, foi adicionado uma solução de 1:50 de anticorpo monoclonal primário (SDOW17 – específico para a proteína N do PRRSV) diluído em solução de bloqueio sobre a membrana, seguida de nova incubação (37 °C por 1 hora, sob agitação). Após incubação, foi adicionada a solução do conjugado (anti-mouse IgG HRPO) na diluição de 1:4.000 seguido de nova incubação por 1h à 37°C.

Na etapa seguinte, foi adicionado o substrato cromógeno (3,3',5,5' - tetrametilbenzidina), seguido de incubação sob temperatura ambiente por 15 min e os resultados analisados

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após realização de todos os procedimentos de amplificação, clonagem e sequenciamento dos clones selecionados, a análise de expressão da proteína recombinante foi realizada em duas cepas de *E. coli* (BL21 *Star* e BL21 DE3). Os resultados obtidos foram muito similares. Entretanto, foi observada a presença da maior concentração de proteína no *pellet* bacteriano. Os resultados indicam uma expressão consistente da proteína recombinante que pode ser observada com uma peso molecular de aproximadamente 14 kDa quando comparados com as cepas bacterianas não transformadas. Além disso, a identidade da proteína recombinante foi confirmada por *western immunoblot* utilizando um anticorpo monoclonal (SDOW 17) específico contra a proteína N do PRRSV.

4. CONCLUSÕES

Os resultados observados indicam que a proteína N do vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos foi eficientemente produzida em um sistema heterólogo de expressão. Além disso, a caracterização preliminar demonstrou a identidade da proteína recombinante que poderá ser utilizada para a produção de reagentes e testes sorológicos que permitam o monitoramento da infecção causada pelo PRRSV em suínos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FLORES, E. F. Virologia Veterinária, Santa Maria, ufsm, 2012. 2v.

CIACCI-ZANELLA, J.R. et al. Lack of evidence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in domestic swine in Brazil. **Ciência Rural**, v.34, p.449-445, 2004.

HANADA, K. et al. The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. **Molecular Biology and Evolution**, v.22, p.1024-1031, 2005.

NEUMANN, E.J. et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.227, p.385-392, 2005.

CHU, J.Q et al., Development and validation of a recombinant nucleocapsid protein-based ELISA for detection of the antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Journal of Microbiology**, v. 47, n.5, p.582-588, 2009.