

FUSÃO DE ANTÍGENO RECOMBINANTE DE *Clostridium chauvoei* À PROTEÍNA LIGADORA DE MALTOSE (MBP)

WELINGTON MATEUS PINTO DE MORAES¹; CRISTIAN HENRIQUE SOTT²; PEDRO HENRIQUE DALA NORA QUATRIN³; CLEIDEANNY CANCELA GALVÃO⁴; RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES⁵; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – welington.moraes@ufpel.edu.br

²Universidade Federal de Pelotas – cristian.sott@ufpel.edu.br

³Universidade Federal de Pelotas – quatrinp@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – annymedvet@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – rafaelr458@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Clostridium chauvoei, um bacilo anaeróbico Gram-positivo, é o agente etiológico do carbúnculo sintomático, uma doença de alta letalidade em bovinos e ovinos que pode levar à morte em 12 a 48 horas (USEH, NOK e ESIEVO, 2006). A rápida evolução da doença causa grandes prejuízos econômicos, tornando a profilaxia indispensável (SOUSA et al., 2024; NAMPANYA et al., 2019). Embora o método de prevenção mais eficaz seja a imunização com vacinas baseadas em bacterinas-toxoides, surtos ainda podem ocorrer em animais vacinados, e a doença persiste como causa significativa de mortalidade em bovinos (GREGORY et al., 2006; SPINELLI, 2024). Somado a variação da resposta imune individual no gado (ROSSI et al., 2018; ROSSI et al., 2025), e ao desconhecimento dos antígenos efetivamente protetores (NICHOLSON et al., 2019), este cenário questiona a eficácia das vacinas atuais e limita o desenvolvimento de vacinas de nova geração (ZARAGOZA et al., 2019).

Vacinas de subunidade, baseadas na expressão heteróloga de antígenos, são uma alternativa promissora por aliar maior segurança, facilidade de padronização e capacidade de gerar respostas imunes eficazes (FREY et al., 2012; PRAJAPATI et al., 2024). *Escherichia coli* representa uma excelente plataforma de expressão heteróloga para produção de antígenos em vacinas de subunidade devido à sua relação custo-benefício, escalabilidade, ciclo de produção rápido e altos rendimentos (TANG; ZHAO; ZHU, 2024). Contudo, um dos principais entraves dessa abordagem é a formação de corpos de inclusão (agregados proteicos insolúveis e pouco funcionais). O processo de solubilização e renaturação (*refolding*) dessas proteínas é complexo, de difícil escalonamento e eleva o custo final do produto, representando um desafio para a viabilidade econômica de vacinas veterinárias (UPADHYAY et al., 2015; ZARAGOZA et al., 2019).

Para contornar essa barreira, a biotecnologia utiliza etiquetas de solubilidade, como a *Maltose Binding Protein* (MBP). A MBP (~45 kDa) é uma proteína periplasmática de *E. coli* que, ao ser fusionada a uma proteína-alvo, atua de forma análoga a uma chaperona, prevenindo a agregação e facilitando a purificação (MISHRA, 2020). O sucesso da MBP em solubilizar proteínas recombinantes é amplamente reportado na literatura (PARK et al., 2021; PEDERSEN et al., 2022).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da etiqueta de solubilidade MBP na expressão de um antígeno recombinante de *C. chauvoei* em *E. coli*, buscando identificar estratégias que possibilitem sua produção de forma solúvel, um passo essencial para o desenvolvimento de vacinas recombinantes mais eficazes contra o carbúnculo sintomático.

2. METODOLOGIA

2.1 Propagação, extração e purificação dos plasmídeos

As sequências gênicas do antígeno alvo, identificado neste trabalho como *Cc1* e *MBP*, foram previamente clonadas no vetor pET-28a (pET-28a-*Cc1* e pET-28a-*MBP*). Os plasmídeos foram propagados em *E. coli* DH5 α , transformada por choque térmico. As células transformadas foram cultivadas em 10 mL de caldo LB (Luria-Bertani) suplementado com canamicina (0,1 mg/mL), sob agitação orbital (180 rpm, 37 °C), até atingirem DO_{600nm} = 2,0, quando as células foram submetidas ao protocolo de extração plasmidial por lise alcalina (*Midipreparation*), conforme descrito por Sambrook e Russell (2000). O DNA obtido foi purificado com o kit GFX™ *PCR DNA and Gel Band Purification* (Cytiva®), quantificado em espectrofotômetro NanoDrop™ *Lite* (Thermo Scientific®) e avaliado quanto à integridade por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

2.2 Digestão, ligação e triagem dos clones

Os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição *NheI*-HF e *HindIII*-HF (New England Biolabs®), de acordo com as recomendações do fabricante, gerando a linearização do vetor pET-28a-*MBP* (~6,4 kb) e o fragmento correspondente ao gene *Cc1* (~1,2 kb), ambos com extremidades coesivas. Os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, e o DNA de interesse recuperado com o kit GFX™ *PCR DNA and Gel Band Purification*.

A ligação foi realizada com T4 DNA Ligase (New England Biolabs®) e o produto utilizado para transformar *E. coli* DH5 α por choque térmico. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido suplementado com canamicina e incubadas a 37 °C por 24 h. Três colônias foram selecionadas aleatoriamente e submetidas à extração plasmidial por lise alcalina (*Midipreparation*). A confirmação da presença do inserto foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

2.3 Expressão e recuperação das porções proteicas

O plasmídeo recombinante pET-28a-*MBP*-*Cc1* foi expresso na cepa *E. coli* BL21 (DE3) em 50 mL de caldo LB contendo canamicina (0,1 mg/mL), sob agitação orbital (180 rpm, 37°C). A expressão foi induzida com 1 mM de IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida) quando a cultura atingiu DO_{600nm} entre 0,6 e 0,8, sendo coletadas amostras de antes e após 4 h de indução.

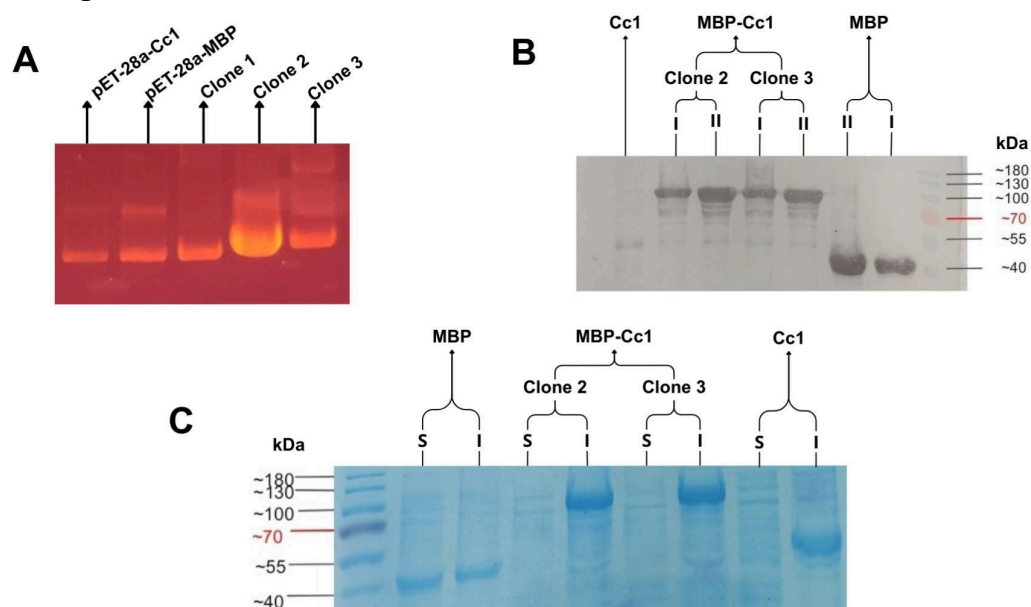
As células foram centrifugadas (7.000 rpm, 10 min, 4°C), suspendidas em 25 mL de tampão de lavagem pH 8,0 (10 mM de imidazol, 500 mM de NaCl e 20 mM de NaH₂PO₄), incubadas com lisozima (0,2 mg/mL) por 1h a 37°C, seguida de sete ciclos de sonicação (20 kHz, 15 s de pulso/30 s de intervalo). Após a centrifugação do lisado

celular (10.000 rpm, 20 min, 4°C), o sobrenadante, que contém a fração proteica solúvel, foi separado e armazenado à 4°C, e o *pellet* suspenso com tampão de lavagem contendo 8 M de ureia e mantido sob homogeneização por inversão por 17 h a 4°C para recuperação da fração proteica insolúvel. As amostras do cultivo (extrato celular), bem como as duas frações proteicas, foram analisadas por eletroforese em gel de poliácridamida a 12% (SDS-PAGE) e *Western Blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-poli-histidina (Sigma-Aldrich®).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A clonagem do gene *Cc1* no vetor pET-28a-MBP foi confirmada por eletroforese em gel de agarose, que revelou aumento na massa molecular em relação ao vetor original, com tamanho esperado de 7,6 kb, (Figura 1-A). A expressão do constructo em *E. coli* BL21 (DE3) resultou na produção de níveis satisfatórios da proteína MBP-Cc1, confirmada por *Western Blot* com banda específica de ~95 kDa, compatível com o tamanho esperado da fusão (Figura 1-B). No entanto, a análise de solubilidade mostrou que a maior parte da proteína permaneceu na fração insolúvel, sugerindo formação de corpos de inclusão (Figura 1-C). Esses resultados indicam que a fusão com MBP não foi suficiente para aumentar a solubilidade do antígeno Cc1, o que representa um entrave à sua aplicação como produto vacinal. Achados semelhantes quanto a solubilidade e expressão foram descritos para proteínas de *C. chauvoei*, como a CctA expressa em *E. coli* (FREY et al., 2012; NICHOLSON et al., 2019), apontando para a necessidade de explorar condições de cultivo otimizadas, cepas hospedeiras alternativas ou outras etiquetas de solubilidade como estratégias futuras.

Figura 1 - Resultado Dos Géis De Eletroforese e Western Blot



Legenda: **A)** Gel de agarose a 1% dos vetores utilizados na clonagem e dos respectivos clones MBP-Cc1. Apenas os clones 2 e 3 sugerem inserção do gene *Cc1* no vetor pET-28a-MBP. **B)** Western blot das amostras de antes e depois das 4h de expressão representadas por "I" e "II" respectivamente. **C)** Gel de poliácridamida a 12% após eletroforese de amostras das frações solúvel (S) e insolúvel (I).

4. CONCLUSÕES

A fusão do antígeno Cc1 de *Clostridium chauvoei* à proteína MBP permitiu a obtenção da proteína recombinante em níveis expressivos, porém com baixa solubilidade. Assim, a MBP não se mostrou eficaz em prevenir a formação de corpos de inclusão nas condições testadas. A otimização das condições e cepas de cultivo, e a avaliação de outras etiquetas de solubilidade, deverão ser consideradas em estudos futuros visando a otimização da solubilidade do antígeno recombinante.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- USEH, N. M.; NOK, A. J.; ESIEVO, K. A. N. Cancro da perna preta em ruminantes. CABI Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, **Nutrition and Natural Resources**, v. 2006, n. 1040, 8 p., 2006.
- SOUSA, A. I. DE J. et al. Blackleg: A review of the agent and management of the disease in Brazil. **Animals: An Open Access Journal from MDPI**, v. 14, n. 4, p. 638, 2024.
- NAMPANYA, S. ET AL. Financial impact of an outbreak of clinically diagnosed blackleg – a case study from Lao PDR, **Veterinary Medicine and Science**, 5(2), pp. 118–128, 2019.
- GREGORY, L. dos et al. Carbúnculo Sintomático: Ocorrência, Evolução Clínica E Acompanhamento Da Recuperação De Bovino Acometido De “Manqueira”. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p. 243–246, 2006.
- BEZERRA SPINELLI, Eron. Carbúnculo sintomático em bovinos: Uma revisão. **Revista VIDA: Exatas e Ciências da Terra (VIECIT)**, v. 2, n. 1, p. 62–74, 2024.
- ROSSI, A. et al. Temporal evolution of anti-*Clostridium* antibody responses in sheep after vaccination with polyvalent clostridial vaccines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 202, p. 46–51, 2018.
- ROSSI, A. et al. Humoral and cellular immune responses in cattle upon *Clostridium chauvoei* vaccination and challenge. **Frontiers in Immunology**, v. 16, p. 1584168, 2025.
- NICHOLSON, P. et al. Production of neutralizing antibodies against the secreted *Clostridium chauvoei* toxin A (CctA) upon blackleg vaccination. **Anaerobe**, v. 56, p. 78–87, 2019.
- ZARAGOZA, N. E. et al. Vaccine production to protect animals against pathogenic Clostridia. **Toxins**, v. 11, n. 9, p. 525, 2019.
- FREY, J. et al. Cytotoxin CctA, a major virulence factor of *Clostridium chauvoei* conferring protective immunity against myonecrosis. **Vaccine**, v. 30, n. 37, p. 5500–5505, 2012.
- PRAJAPATI, A. et al. Production of highly soluble and immuno-reactive recombinant flagellin protein of *Clostridium chauvoei*. **Anaerobe**, v. 89, n. 102899, p. 102899, 2024.
- TANG, Shubing; ZHAO, Chen; ZHU, Xianchao. Engineering *Escherichia coli*-derived nanoparticles for vaccine development. **Vaccines**, v. 12, n. 11, p. 1287, 2024.
- UPADHYAY, V. et al. Solubilization and refolding of inclusion body proteins. **Methods in Molecular Biology**, v. 1258, p. 283–291, 2015.
- MISHRA, Vibhor. Affinity tags for protein purification. **Current protein & peptide science**, v. 21, n. 8, p. 821–830, 2020.
- PARK, Sangsu et al. Soluble cytoplasmic expression and purification of immunotoxin HER2(scFv)-PE24B as a maltose binding protein fusion. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 12, p. 6483, 2021.
- PEDERSEN, Jannie et al. An adaptable platform for in-house hepatitis C serology. **Journal of virological methods**, v. 308, n. 114586, p. 114586, 2022.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. Nova Iorque, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.