

Campo Grande, MS
Novembro, 2002

Autores

Flávio Ribeiro de Araújo
Méd.-Vet., M.Sc., CRMV-MS Nº
1.895, Embrapa Gado de Corte,
Rodovia BR 262 Km 4, Caixa Postal
154, CEP 79002-970 Campo
Grande, MS. Endereço eletrônico:
flavio@cnpqc.embrapa.br

Lenita Ramires dos Santos
Bióloga, M.Sc., Estudante de Pós-
Graduação em Imunologia do
Instituto de Ciências Biológicas e
da Saúde, Universidade Federal da
Bahia. Endereço eletrônico:
lenitasantos@hotmail.com

Claudio Roberto Madruga
Méd.-Vet., Ph.D., CRMV-MS Nº
0587, Embrapa Gado de Corte.
Endereço eletrônico:
madruga@cnpqc.embrapa.br

Perdigão Fragoso
Instituto de Biologia
Iná. Rua Professor
Mader, 3.775-SIC,
Endereço eletrônico:
fragoso@tecpar.br

de Souza Umaki
Instituto de Biologia
Paraná. Endereço
maki@hotmail.com

ber Oliveira Soares
h.D., CRMV-RJ Nº
ipa Gado de Corte.
Endereço eletrônico:
cnpqc.embrapa.br



Clonagem e expressão do gene *msp5* de um isolado brasileiro de *Anaplasma marginale*

Introdução

A anaplasmosose é uma doença pertencente ao complexo tristeza parasitária bovina, que causa grandes prejuízos à pecuária da América Latina (Madruga et al., 1987). Essa enfermidade é causada por *Anaplasma marginale*, riquétsia intracelular do genogruppo II das erlíquias (Dumler et al., 2001). Nos últimos anos, os estudos sobre o diagnóstico imunológico e a vacinação contra *A. marginale* concentraram-se na obtenção de frações antigênicas.

Na membrana externa dessa riquétsia, foram caracterizadas seis proteínas principais de superfície (*major surface proteins*-MSPs: MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5) (Tebele et al., 1991; de la Fuente, 2001). Dentre estas, a MSP5 destaca-se como antígeno para diagnóstico, em função de sua conservação entre isolados e por estimular forte resposta humoral, com produção de anticorpos específicos em animais infectados, os quais podem ser detectados por meio de provas sorológicas.

Este trabalho teve como objetivo a clonagem e expressão do gene *msp5* de um isolado brasileiro de *A. marginale*, e a purificação da proteína recombinante para fins de imunodiagnóstico.

Metodologia

O isolado Pernambuco-Zona da Mata de *A. marginale* (riquetsemia 87%), preservado como estabilizado em nitrogênio líquido, foi utilizado para extração de DNA genômico, utilizando o *kit* Easy DNA (Invitrogen). A reação em cadeia da polimerase (PCR), com os oligonucleotídeos iniciadores *msp5*F: 5'-ATGAGAATTTTCAAGATTGTGTCTAACCTT-3' e *msp5*R: 5'-AGGAAAGCCCCCAAGCCCCATACTT-3', foi utilizada para amplificar o gene *msp5*. O produto da PCR foi utilizado para ligação ao plasmídeo pTrcHis-TOPO (Invitrogen).

Células TOP10 (Invitrogen) foram transformadas com o produto da ligação e, posteriormente, semeadas em meio Luria-Bertani (LB) ágar com 100 µg/mL de ampicilina, as quais foram incubadas por 12 horas a 37°C. As colônias com o inserto de interesse foram selecionadas após análise por palitagem em gel de agarose corado com brometo de etídeo. Os clones selecionados foram cultivados em 2 mL de caldo LB com ampicilina a 37°C, por 12 horas, sob agitação (180 rpm). Em seguida, 200 µL desse pré-inóculo foram cultivados em 2 mL de caldo LB com ampicilina por uma hora, a 37°C, sob agitação. Posteriormente, adicionou-se 1 mM de isopropil-tio-β-galactosídeo (IPTG) para indução da expressão.

A seleção dos clones com inserto na orientação correta foi realizada após eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 13%, seguida por *Western blot*, com anticorpo monoclonal (ANAF16C1), específico para MSP5 (Munodzana et al., 1998). A cinética de expressão foi avaliada após 2, 4 e 6 horas de indução com IPTG. Para purificação da proteína recombinante, 50 mL de cultura em caldo LB foram induzidos por 4 horas. Após centrifugação, realizou-se tratamento do sedimento bacteriano com tampão da amostra para eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. Após a separação eletroforética, o gel foi tratado com 100 mM de cloreto de potássio para visualização das bandas protéicas. A banda correspondente à MSP5 recombinante (rMSP5) foi cortada do gel e submetida à eletroeluição contra tampão Laemmli. O eluato foi analisado quanto à pureza por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 13%.

Resultados e Discussão

A amplificação do DNA de *A. marginale* com os oligonucleotídeos iniciadores *msp5F* e *msp5R* gerou um fragmento de 714 pares de bases, que compreende todo o gene *msp5*. A ligação do produto da PCR ao plasmídeo pTrcHis-TOPO e posterior transformação de células TOP10 permitiu a obtenção de clones contendo o gene *msp5*, os quais, após indução com IPTG, produziram uma proteína recombinante majoritária cerca de 22 kDa, a qual reagiu com o anticorpo monoclonal ANAF16C1, específico para MSP5 (Fig. 1).

Pela avaliação da cinética de expressão, demonstrou-se que os níveis de produção de rMSP5 atingiram um platô com 4 horas de indução. A purificação da rMSP5 por eletroeluição resultou na obtenção de uma banda protéica única, a qual foi reativa com o anticorpo ANAF16C1.

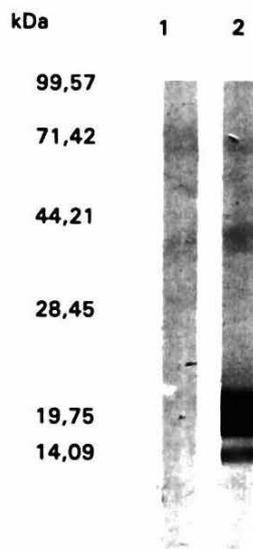


Fig. 1. Western blot de MSP5 recombinante com anticorpo monoclonal ANAF16C1. Linha 1: controle negativo (células TOP10 não transformadas); linha 2: células TOP10 transformadas com o plasmídeo pTrcHis-TOPO/*msp5* e induzidas com IPTG.

A MSP5 é uma proteína altamente conservada entre diferentes isolados de *A. marginale*, bem como em *Anaplasma centrale* e *Anaplasma ovis* (Visser et al., 1992). Ocorre nas formas monomérica, com pontes dissulfeto intramoleculares, e dimérica, com pontes dissulfeto intermoleculares, na membrana de *A. marginale* (Vidotto et al., 1994). A massa molecular da rMSP5, obtida neste estudo, foi ligeiramente superior àquela da proteína nativa (19 kDa) (Visser et al., 1992), por causa da fusão de uma cauda de 3 kDa, codificada pelo vetor.

Em decorrência das características de conservação da MSP5 e pelo fato de essa proteína induzir altos títulos de anticorpos em animais persistentemente infectados, ela foi utilizada para o desenvolvimento de um ELISA competitivo, capaz de detectar anticorpos contra *A. marginale* e *A. ovis* com alta sensibilidade e especificidade (Ndung'u et al., 1995; Knowles et al., 1996). A produção da rMSP5, originado de um isolado brasileiro, permite a obtenção do antígeno purificado, o qual pode ser empregado no desenvolvimento de métodos sorológicos para o diagnóstico de *A. marginale* no Brasil.

Agradecimentos

Este trabalho teve suporte financeiro da Embrapa, Projeto de Apoio ao Desenvolvimento de Tecnologia Agropecuária para o Brasil (Prodetab) e Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect).

Agradecemos o apoio da Genética Comércio, Importação e Exportação Ltda., que tornou possível a publicação deste trabalho.

Referências Bibliográficas

- DE LA FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; KOCAN, K. M. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 97, n. 1, p. 65-76, 2001.
- DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, California, v. 51, p. 2145-2165, 2001.
- KNOWLES, D.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C.; STILLER, D.; McELWAIN, T. F. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP-5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 34, n. 9, p. 2225-2230, 1996.

MADRUGA, C. R.; HONER, M. R.; SCHENK, M. A. M.; CURVO, J. B. E. Avaliação preliminar de parâmetros epidemiológicos da trieste parasitária bovina no Mato Grosso do Sul. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1987. 7 p. (EMBRAPA-CNPGC. Pesquisa em Andamento, 38).

MUNODZANA, D.; McELWAIN, T. F.; KNOWLES, D. P.; PALMER, G. H. Conformational dependence of *Anaplasma marginale* major surface protein 5 surface-exposed B-cell epitopes. *Infection and Immunity*, Washington, v. 66, n. 6, p. 2619-2624, 1998.

NDUNG'U, L. W.; AGUIRRE, C.; RURANGIRWA, F. R.; McELWAIN, T. F.; McGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P.; PALMER, G. H. Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 33, n. 3, p. 675-679, 1995.

TEBELE, N.; McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infection and Immunity*, Washington, v. 59, n. 9, p. 3199-3204, 1991.

VIDOTTO, M. C.; McGUIRE, T. C.; McELWAIN, T. F.; PALMER, G. H.; KNOWLES, D. P. J. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, Washington, v. 62, n. 7, p. 2940-2946, 1994.

VISSER, E. S.; McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; DAVIS, W. C.; SHKAP, V.; PIPANO, E.; KNOWLES, D. P. J. The *Anaplasma marginale* MSP-5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infection and Immunity*, Washington, v. 60, n. 12, p. 5139-5144, 1992.

Circular Técnica, 29

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Gado de Corte
Endereço: Rodovia BR 282, Km 4, Caixa Postal
154,
79002-070 Campo Grande, MS
Fone: (67) 368 2084
Fax: (67) 368 2180
E-mail: publicacoes@cnpdc.embrapa.br

1ª edição
1ª Impressão (2002): 600 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Cecília Borges de Vello
Secretário-Executivo: Liene Junk
Membros: Antonio do Nascimento Rosa, Amílido
Pott, Ecila Carolina N. Z. Lima, Esquival R. de
Vello, José Raul Valério, Maria Antonia M. de U.
Citra, Rosângela Maria S. Rosendo, Tânia W.
de Souza

Expediente

Supervisor editorial: Ecila Carolina N. Z. Lima
Revisão de texto: Lídia Helena Paula de Castro
Edição eletrônica: Ecila Carolina N. Z. Lima