

273

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA ENZIMA RECOMBINANTE TRIOSE FOSFATO ISOMERASE DO CARRAPATO BOOPHILUS MICROPLUS.** *Fernanda Êmeli Klein Silva, Jorge Luiz da Cunha Moraes, Carlos Jorge Logullo de Oliveira, Aoi Masuda, Itabajara da Silva Vaz Junior (orient.)* (PUCRS).

O carrapato *Boophilus microplus* é um parasita bovino que pode causar doenças ao seu hospedeiro e prejuízos aos seus criadores, os quais desempenham uma atividade economicamente representativa no país. Uma alternativa ao controle químico seria o controle imunológico através da formulação de uma vacina contra o parasito. A enzima Triose Fosfato Isomerase (TIM) é a responsável pela conversão de gliceraldeído 3-fosfato em dihidroxiacetona fosfato e vice-versa, das rotas do metabolismo dos carboidratos. O uso da TIM como antígeno vacinal tem sido estudado para o controle de vários parasitas, como por exemplo, *Schistosoma japonicum*. A clonagem da região codante da TIM foi obtida a partir do RNA extraído de ovos de 20 dias de *B. microplus*, por RT-PCR, utilizando primers específicos para região codificante e com sítios de restrição para endonucleases *NdeI* e *XhoI*, obtendo-se um amplicon de 750pb. Este fragmento foi clonado no vetor de expressão pET43a e a clonagem foi confirmada por análise de clivagem com as enzimas de restrição, PCR e sequenciamento. Células de *Escherichia coli* AD494 (DE3) pLysS foram transformadas com o plasmídeo TIM-Bm-pET43a e a expressão da proteína rTIM-Bm (27kDa com cauda de histidina) foi obtida com indução de 1mM de IPTG, mantida sob agitação a 37 °C por 20 horas. A expressão foi analisada por SDS-PAGE 12% e a presença da TIM foi confirmada por Western blot, usando anticorpo monoclonal anti-histidina. Para a purificação da proteína se utilizou cromatografia de afinidade por níquel, porém em diversos experimentos não se constatou a purificação da proteína recombinante. Como alternativa, outros clones contendo o gene da proteína TIM do carrapato *Boophilus microplus* estão sendo submetidos a expressão, para a realização de purificação por Sulfato de Amônio. A seguir serão realizadas imunizações em camundongos e coelhos para caracterizarão da resposta imunológica para o antígeno.