

013

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE UMA QUITINASE DE METARHIZIUM ANISOPLIAE E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS. *Lucelia Santi, Augusto Schrank, Márcia Vanusa da Silva, Marilene Henning Vainstein (orient.)* (Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS).

Metarhizium anisopliae é um fungo filamentosos com grande potencial como agente biocontrolador de insetos e carrapatos. O seu processo de infecção combina pressão mecânica através do apressório e secreção de enzimas hidrolíticas como proteases e quitinases, que atuam de forma sinérgica, sendo as quitinases imprescindíveis para a patogenicidade. O presente trabalho tem por objetivos otimizar o processo de purificação da quitinase CHIT30 e a produção de anticorpos policlonais contra esta enzima. Durante a purificação, as atividades enzimáticas de quitinase foram medidas utilizando substratos específicos N, N'-diacetilquitobiose e N, N', N'', N'''- tetracetilquitotetraose e as proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford. Foram feitos géis SDS-PAGE para análise do padrão protéico. Para a produção de quitinases, o fungo foi cultivado em 50 litros de meio mínimo acrescido de quitina como única fonte de carbono durante 5 dias. Após o cultivo, o micélio foi filtrado e o sobrenadante foi concentrado com sulfato de amônio 85%. Este material foi aplicado em resina de troca iônica DEAE-Sepharose. As frações que continham a quitinase CHIT30, analisadas por gel SDS-PAGE e ensaios enzimáticos, foram agrupadas, concentradas por liofilização e aplicadas em resina de troca iônica Q-Sepharose. A quitinase CHIT30 encontrava-se pura na fração 51 desta cromatografia. A proteína purificada foi analisada em gel bi-dimensional para determinação do pI e massa molecular. Para a produção de anticorpos policlonais, a proteína purificada foi aplicada em coelho e, após seis aplicações, o soro foi extraído e analisado pela técnica de western blot. Foram realizados testes de reconhecimento e especificidade do anticorpo contra a proteína purificada. Pelos resultados obtidos, pode-se comprovar a purificação da quitinase CHIT30 que apresenta massa molecular de 30kDa e pI de 5, 4. O anticorpo produzido contra esta proteína apresentou alta especificidade. (PADCT III, CNPq, FAPERGS, UFRGS).