

336

EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ASPÁRTICO PROTEASE RECOMBINANTE DO BOOPHILUS MICROPLUS. Paula Cristiane Pohl, Alexandre Trindade Leal, Marcos Sorgine, Itabajara da Silva Vaz Junior, Aoi Masuda (orient.) (UFRGS).

O controle do carrapato *B. microplus* é de substancial importância para reduzir as perdas econômicas da bovinocultura. Como alternativa ao uso de acaricidas, o desenvolvimento de uma vacina é um método promissor que depende da identificação e caracterização de moléculas fisiologicamente importantes. A THAP (tick heme-binding aspartic proteinase) é uma aspártico protease isolada dos ovos de *B. microplus* envolvida na hidrólise das hemoproteínas de acordo com as necessidades do embrião durante o seu desenvolvimento. Para melhor caracterizar sua função na embriogênese, nós realizamos a subclonagem da sequência codificante completa da THAP após a recuperação dos doze nucleotídeos iniciais que estavam ausentes no cDNA inicialmente clonado. Através de PCR, obtivemos um amplicon de 1065 pb que foi clonado no vetor de expressão pET43a. O plasmídeo resultante (pET43a-THAPr) foi eletroporado em nove linhagens de *E. coli* BL21(DE3). As melhores condições estabelecidas para a produção da proteína recombinante (THAPr associada a proteína de fusão Nus-Tag) na forma solúvel foi a expressão em *E. coli* BL21(DE3) RIL a 23°C por 4 horas com 1 mM de IPTG. A análise da expressão foi realizada por SDS-PAGE e Western-blot com soro policlonal anti-THAP nativa. A THAP recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade com resina Sepharose-Ni²⁺. Uma fração parcialmente purificada e hidrolisada para remoção da proteína de fusão foi utilizada na realização de ensaios enzimáticos com substrato sintético fluorogênico. A atividade específica obtida sobre substrato sintético foi de 2, 267 RFU/min/mg de proteína. Essa atividade foi inibida por pepstatina, mas não por E-64, leupeptina ou antipaina. Os resultados confirmam a atividade enzimática da THAPr, etapa importante para a definição da sua importância na fisiologia desse carrapato. (PIBIC).