

339

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

No Brasil, a criação de bovinos constitui uma das atividades mais expressivas economicamente. Este fato tem direcionado a pesquisa para solucionar os problemas de produção e sanitários. Isto inclui o controle à disseminação do carrapato *Boophilus microplus*, responsável por um significativo prejuízo na produção da carne e couro. A enzima TIM é a responsável pela conversão de gliceraldeído 3-fosfato em dihidroxiacetona fosfato e vice-versa, das rotas gliconeogênica e glicolítica 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 caracterização dessa enzima no *B. microplus* poderá contribuir para o desenvolvimento de uma vacina, composta por uma mistura de antígenos já identificados e em caracterização, que impediria o desenvolvimento e a disseminação do parasita bovino. 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 transformado em *Escherichia coli* AD494 (DE3) pLysS. A clonagem foi confirmada por clivagens com enzimas de restrição, por PCR e seqüenciamento. Para a expressão da proteína rTIM-Bm (27kDa com cauda de histidina) estabeleceu-se uma indução de 1mM de IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside), mantida sob agitação a 37 °C por 20 horas. A expressão foi analisada por SDS-PAGE 15% e a presença da TIM foi confirmada por Western blot, usando anticorpo monoclonal anti-histidina. A purificação da proteína está sendo realizada por cromatografia de afinidade por níquel. Após, serão realizadas imunizações em camundongos e bovinos para caracterizarão da resposta imunológica para o antígeno. (Fapergs).