

434

EXPRESSÃO DA QUITINASE CODIFICADA PELO GENE CHI2 DE METARHIZIUM ANISOPLIAE EM ESCHERICHIA COLI. *Ângela Junges, Juliano Tomazzoni Boldo, Irene Silveira Schrank, Augusto Schrank, Marilene Henning Vainstein (orient.) (UFRGS).*

M. anisopliae é um fungo entomopatogênico utilizado no biocontrole de pragas da agricultura e da pecuária. A infecção de *M. anisopliae* envolve pressão mecânica sobre a cutícula dos hospedeiros, exercida por apressório, e secreção de enzimas hidrolíticas, como proteases e quitinases. A descrição em nível molecular deste processo mostra a sua complexidade e a possibilidade de aplicação destes conhecimentos no desenvolvimento de biocontroladores mais eficientes. Dentre as quitinases, estamos caracterizando o gene *chi2*, que apresenta duas espécies de transcritos, uma completamente processada e outra que retém o segundo íntron. Para verificar se as duas espécies de transcrito são traduzidas, estamos procedendo a clonagem, expressão em *E. coli* e purificação das proteínas potencias para a produção de anticorpos. Estes permitirão a identificação de possíveis isoformas, sua localização celular e o acompanhamento da sua produção durante a infecção de *Metarhizium* em seus hospedeiros. A região codante do gene *chi2* foi amplificada por PCR, tendo como molde cDNA sintetizado a partir mRNA extraído de *M. anisopliae* cultivado em meio contendo quitina 1% por 72h, resultando em um amplicon de 1,3 Kb. Este amplicon foi clonado em pUC18 e seqüenciado sendo sub-clonado em vetores de expressão do sistema pET. As células transformadas foram induzidas por 3 horas (1 mM IPTG) e alíquotas coletadas a cada 0, 5h para verificar-se o tempo mais adequado para a indução. As células foram rompidas e o extrato celular avaliado em SDS-PAGE observando-se a presença da proteína de interesse na forma de corpos de inclusão. Testes para a solubilização dos corpos de inclusão foram realizados com SDS ou sarcosil, uréia e 2-mercaptoetanol. As etapas de purificação da proteína serão realizadas por cromatografia de afinidade em resina com Ni e a proteína purificada será utilizada para produzir antisoro em coelhos. (BIC).