



<b>Evento</b>	Salão UFRGS 2013: SIC - XXV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
<b>Ano</b>	2013
<b>Local</b>	Porto Alegre - RS
<b>Título</b>	Clonagem, expressão e purificação de uma cisteíno endopeptidase antimicrobiana de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
<b>Autor</b>	JULIANA RODRIGUES DO NASCIMENTO
<b>Orientador</b>	ITABAJARA DA SILVA VAZ JUNIOR

**Introdução:** Durante o desenvolvimento embrionário, o carrapato *Rhipicephalus microplus* utiliza como fonte de nutrientes uma lipoglicofosfoproteína de origem materna, a vitelina (VT). A VT é hidrolisada por diferentes enzimas, incluindo VTDCE (Vitellin-degrading Cysteine endopeptidase), BYC (*Boophilus* Yolk Pró-Cathepsin) e THAP (Tick Heme Binding Aspartic Proteinase). A análise da sequência de aminoácidos da VTDCE mostrou que esta apresenta maior similaridade com peptídeos antimicrobianos do que com enzimas, sendo sua atividade antimicrobiana experimentalmente comprovada contra *Staphylococcus epidermidis*, utilizando a proteína recombinante. A construção plasmidial utilizada para a expressão da proteína adiciona à VTDCE recombinante (rVTDCE) a proteína de fusão tioredoxina, o que reduz a sua atividade enzimática e antimicrobiana. O objetivo do trabalho foi clonar a ORF, expressar e purificar a rVTDCE sem a proteína de fusão. A expressão da rVTDCE não fusionada permite a realização de novas análises para melhor definir função desta molécula. **Metodologia:** A sequência codificadora da VTDCE previamente clonada em pGEM-T foi utilizada como molde. Primers específicos foram utilizados para amplificar a sequência da VTDCE. O amplicom foi ligado ao vetor de expressão pET43a e *E. coli* XL1-Blue foi transformada com a construção. Foi realizada a extração do DNA plasmidial e os plasmídeos submetidos a PCR, hidrólise com enzimas de restrição e sequenciamento para confirmar a identidade da clonagem. Para determinar em quais cepas e condições ocorre a melhor expressão da proteína recombinante, testes de expressão foram realizados com dez cepas de *E. coli*. A análise da expressão foi realizada através de SDS-PAGE e western blot de amostras incubadas 2, 4 ou 16 horas após indução com 1mM de IPTG a 37 ou 25° C. Após selecionar a melhor condição, a proteína foi expressa em maior escala para purificação da proteína recombinante através de cromatografia de afinidade a metais imobilizados. **Resultados:** A sequência da VTDCE clonada em pET43a foi expressa em *E. coli* BL21(DE3) RP e BL21(DE3) PLYS E. A proteína recombinante foi reconhecida por anticorpo monoclonal anti-cauda de histidina e soro de coelho anti-VTDCE nativa. A *E. coli* BL21(DE3) RP foi escolhida para expressão em larga escala e purificação. A rVTDCE purificada foi eluída com 200 mM de imidazol. Novos testes de expressão estão sendo feitos com o intuito de otimizar a expressão da VTDCE para a realização de ensaios que elucidem o funcionamento desta molécula.

**Apoio:** CNPq, CAPES, FAPERGS e INCT-EM