



<b>Evento</b>	Salão UFRGS 2018: FEIRA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DA UFRGS - FINOVA
<b>Ano</b>	2018
<b>Local</b>	Campus do Vale - UFRGS
<b>Título</b>	Clonagem da ORF e expressão de uma proteína de ligação à histamina do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>
<b>Autores</b>	MICHELE BARRETO DE FREITAS GABRIELA ALVES SABADIN
<b>Orientador</b>	ITABAJARA DA SILVA VAZ JUNIOR

# RESUMO

[máximo duas páginas]

**TÍTULO DO PROJETO:** Clonagem da ORF e expressão de uma proteína de ligação à histamina do carrapato *Rhipicephalus microplus*

Aluno: Michele Barreto de Freitas

Orientador: Itabajara da Silva Vaz Jr.

## RESUMO DAS ATIVIDADES

---

### 1. Introdução:

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasita hematófago que parasita principalmente os bovinos e é importante vetor de patógenos, afetando a população de gado de diversas regiões do mundo. Atualmente, o principal tratamento contra os carrapatos é por método químico. Porém, este método possui desvantagens como a seleção de populações resistentes e a contaminação do ambiente e dos produtos derivados de bovinos. Por isso são necessários estudos a respeito dos mecanismos de modulação do sistema imune do hospedeiro pelo carrapato, para aumentar o entendimento da relação parasito-hospedeiro e desenvolver métodos de controle menos danosos ao meio ambiente. As HBPs (histamine binding proteins) são proteínas secretadas na saliva do carrapato durante a alimentação e, através da capacidade de se ligarem à histamina, reduzem seu efeito pró-inflamatório, que só seria desencadeado a partir da ligação da histamina ao receptor. Dessa forma, com esse projeto tem-se o objetivo de elucidar a possível função biológica das HBPs de carrapato na modulação do sistema imune bovino através da clonagem da região codificante (em pGEM e posteriormente em pET 43-a), expressão e purificação da proteína recombinante e caracterização da sua capacidade de ligação à histamina. No primeiro ano do projeto a clonagem da sequência em vetor pGEM já foi realizada.

### 2. Atividades realizadas:

- PCR para obtenção de produto para clonagem;
- Purificação do produto de PCR em gel de agarose;
- Preparo do vetor (clivagem e purificação) para ligação com inserto;
- Clonagem em pET-43 a – ligação vetor e inserto;
- Transformação por eletroporação;
- Cultivo bacteriano e extração de DNA plasmidial;
- Sequenciamento das amostras clonadas (serviço disponibilizado pela unidade de genética medica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre);
- Projeto de novos primers – com adição de sequência codificadora de cauda de histidina no primer reverse;
- Testes de expressão de proteína recombinante com diferentes cepas e tempos de expressão;

### 3. Objetivos atingidos:

A sequência codificadora da HBP foi clonada em vetor de expressão (pET 43-a) e um protocolo de expressão da proteína foi estabelecido.

#### **4. Resultados obtidos:**

Clonagem da sequência codificadora da proteína HBP em vetor de expressão: A partir do clone da HBP em pGEM foi realizada a obtenção do inserto através de PCR, seguido de clivagem com enzimas de restrição e purificação para ligação com vetor pET 43-a. Após a ligação, foi realizada a eletroporação com células eletrocompetentes (XL 1 -BLUE) que resultaram em colônias de clones HBP-pET 43-a que foram confirmados por clivagem, PCR e sequenciamento.

Sequenciamento: A análise do sequenciamento confirmou que a sequência clonada em pET-43-a se tratava da sequência de HBP já anteriormente clonada em pGEM e identificada no transcriptoma do carrapato *R. microplus*. A análise do sequenciamento também permitiu que um erro na projeção dos primers fosse identificado. Esse erro impediu a posterior expressão da cauda de histidina na proteína recombinante.

Expressão da proteína recombinante: Através de choque-térmico, a bactéria *Escherichia coli* foi transformada com o plasmídeo contendo a sequência codificante para a HBP, e testada quanto à produção da proteína recombinante. A análise de expressão foi feita por SDS-PAGE onde os extratos solúveis e insolúveis foram submetidos à eletroforese juntamente com um padrão de massa molecular para identificação da proteína através de sua massa molecular. Essa análise indicou possível expressão da proteína recombinante, sendo em maior quantidade na cepa STAR com período de 24 horas de expressão

Correção do primer reverse: após a identificação do erro no primer reverse, um novo primer da região foi projetado. Com essa correção, será possível a posterior expressão da cauda de histidina junto à proteína recombinante para possibilitar a identificação da mesma através de western blot e facilitar sua purificação através de cromatografia de afinidade em coluna imobilizada com Níquel.

#### **5. Conclusão:**

Diante dos resultados obtidos, é possível afirmar que o protocolo de clonagem em vetor de expressão ficou bem estabelecido, de modo que está sendo repetido, neste momento, com uso do primer corrigido. Além disso, conseguiu-se obter um protocolo inicial de expressão para ser aplicado posteriormente à clonagem, para então iniciar-se a purificação e ensaios de caracterização da proteína.