

367

CLONAGEM E EXPRESSÃO DA THAP RECOMBINANTE DO CARRAPATO BOOPHILUS MICROPLUS PARA ESTUDOS ENZIMÁTICOS E DE IMUNOGENICIDADE. Paula Cristiane

Pohl, Alexandre Trindade Leal, Marcos Sorgine, Itabajara da Silva Vaz Júnior, Aoi Masuda (orient.)

(UFRGS).

O carrapato *Boophilus microplus* é ectoparasita dos bovinos e causa importantes perdas econômicas. O método de controle convencional está baseado no uso de acaricidas, no entanto, formas alternativas, como o controle imunológico, estão sendo investigadas. A THAP (tick heme-binding aspartic proteinase) é uma proteinase aspártica isolada dos ovos de *B. microplus* envolvida na hidrólise das heme proteínas de acordo com as necessidades do embrião durante o seu desenvolvimento. O presente trabalho tem como objetivos a caracterização enzimática e imunogênica dessa proteína. Para isto, foi realizada a recuperação da seqüência codante completa da THAP através de PCR, obtendo-se um amplicon de 1065 pb que foi clonado no vetor de expressão pET43a. O plasmídeo resultante (pET43a-THAPr) foi eletroporado em *E.coli* e a proteína recombinante (THAPr associada a proteína de fusão Nus-Tag) foi produzida na forma solúvel em *E.coli* BL21(DE) incubada a 23 °C por 16h com 0,5mM de IPTG. A análise da expressão foi realizada por SDS-PAGE e western-blot com soros anti-THAP nativa e anti-cauda de histidina. Uma fração parcialmente purificada por cromatografia de afinidade com resina sepharose-Ni²⁺ e hidrolisada para remoção da proteína de fusão foi utilizada na realização de ensaios enzimáticos com substrato fluorogênico Abz-AIAFFSRQ-EDDnp. A atividade específica obtida foi de 9,55 RFU/min/mg de proteína. Para caracterização da imunogenicidade realizou-se as clonagens dos cDNAs da THAP completa e dos fragmentos das porções 5' e 3' em vetor de expressão pET23d. Os plasmídios resultantes dessas clonagens foram eletroporados em *E.coli* BL21(DE). Através da imunização de camundongos e bovinos com as proteínas recombinantes pretendemos identificar regiões da THAP com diferentes perfis de imunogenicidade. (PIBIC).