

407

CISTEÍNA PROTEINASE: CLONAGEM E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DO CARRAPATO *Boophilus microplus*. Patrícia G. Weber; Itabajara Da Silva Vaz Jr e Aoi Massuda.
(Centro de Biotecnologia - UFRGS)

O carrapato *Boophilus microplus* é um dos principais ectoparasitas dos rebanhos bovinos, causando importantes perdas econômicas, pelas doenças que transmite e do alto custo necessário para o seu controle. Os métodos atuais de controle são baseados no uso de acaricidas, que além de selecionarem populações resistentes faz com que a carne e o leite apresentem resíduos químicos. As proteinases estão envolvidas em inúmeras funções em muitos organismos, conseqüentemente podem ser usadas como alvos em potencial para o controle do parasita. Em estudos prévios foi caracterizada uma cisteína proteinase (BmCL1) que pode estar envolvida na degradação de hemoglobina no intestino de *B. microplus*, sendo nosso objetivo caracterizar bioquímica e imunologicamente essa cisteína proteinase do carrapato *B. microplus*. Foram realizados PCRs com “primers” baseados na seqüência do gene da Bmcl1 para obter o fragmento do gene da pró-proteína que foi clonado no vetor de expressão pET-23d, que adiciona uma cauda de seis histidinas a porção C-terminal da proteína. A proteína recombinante foi expressa nas condições usuais e sua atividade enzimática caracterizada com um substrato sintético. O fragmento de 942pb do gene da Bmcl1 foi amplificado por PCR, purificado e ligado ao plasmídeo de expressão pET-23. O plasmídeo contendo o inserto, foi transformado em BL21 (DE) para a expressão do gene. Através da análise por SDS-PAGE e Western Blot usando soro policlonal de coelho anti BmCL1 foi possível identificar um fragmento de aproximadamente 32kDa correspondendo à pró-proteína BmCL1. A atividade enzimática da proteína recombinante foi determinada por um ensaio enzimático com o substrato fluorogênico (N-Cb2-Phe-Arg-MCA). A proteína recombinante BmCL1 está sendo expressa em bactéria *E. coli* e apresenta atividade enzimática compatível com uma cisteína endopeptidase. No momento estamos padronizando a purificação da enzima para sua melhor caracterização. (CAPES, PRONEX, Fapergs, PADCT e CNPq)