

Anticoagulantes da Saliva do Carrapato Bovino *Boophilus microplus*



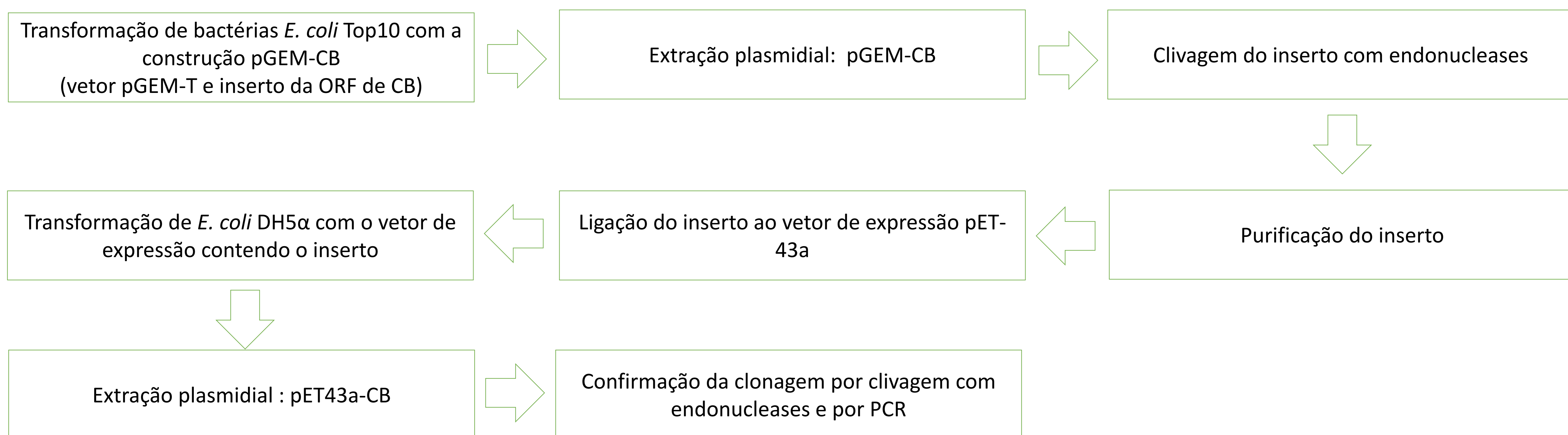
Kessler, F.G.C., Termignoni, C.

Centro de Biotecnologia e Departamento de Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, Porto Alegre, RS, Brasil

INTRODUÇÃO

Para contrapor a homeostase do hospedeiro, animais hematófagos, como o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, precisam de um amplo arcabouço de inibidores enzimáticos, enzimas, proteínas e outras moléculas anticoagulantes. O sucesso da alimentação depende de manter o sangue não coagulado no bolsão hemorrágico que o carrapato cria na derme do hospedeiro, no hipostômio e no tubo digestório do carrapato. Anteriormente, nosso grupo de pesquisa identificou proteínas de *R. microplus* que ligam em trombina. Dentre estas moléculas, uma catepsina B (CB) parece ser muito abundante no intestino, e a respectiva região codificante (ORF) foi clonada (construção pGEM-CB). Este trabalho apresenta resultados da clonagem de catepsina B em vetor de expressão pET-43a.

MATERIAIS E MÉTODOS



RESULTADOS

O inserto da região codificante da CB foi (i) transformado em células *E. coli* TOP10 por choque térmico; (ii) extraído destas células por extração plasmidial de média escala; (iii) analisado pela clivagem com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*; (iv) purificado do gel de agarose após clivagem com as endonucleases; e (v) ligado no vetor de expressão pET-43a. A construção pET43a-CB foi (i) transformada em *E. coli* DH5α por eletroporação; (ii) extraída destas células por extração plasmidial de pequena escala; e (iii) confirmada através da clivagem com as enzimas *NdeI* e *BamHI* (Figura 1) e por PCR (Figura 2).

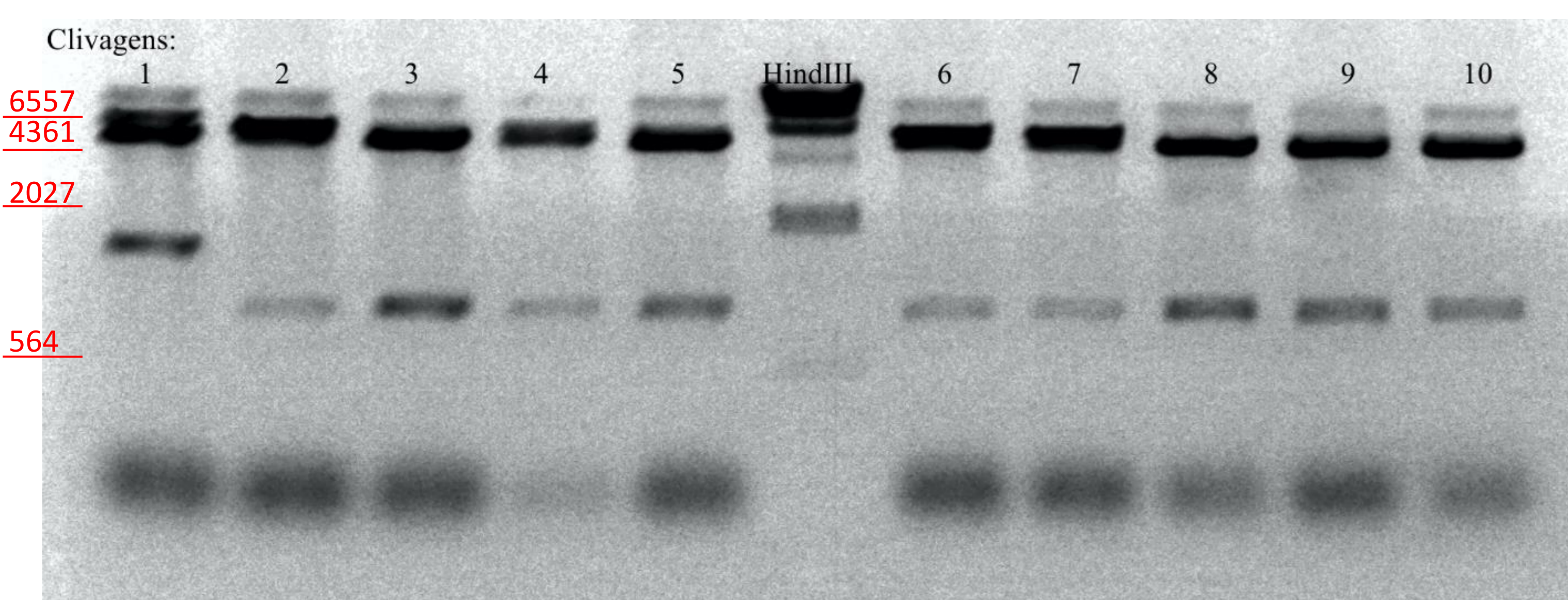


Figura 1: Vetor pET-43a e o inserto da fase aberta de leitura (ORF) da CB clivados com as endonucleases *NdeI* e *BamHI*. 1-10: Vetor pET-43a e inserto de CB (pET43a-CB), oriundos de *screening* de 10 colônias. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. *HindIII*: Marcador de peso molecular. Números em vermelho referem-se ao tamanho (pares de bases) aproximado dos fragmentos.

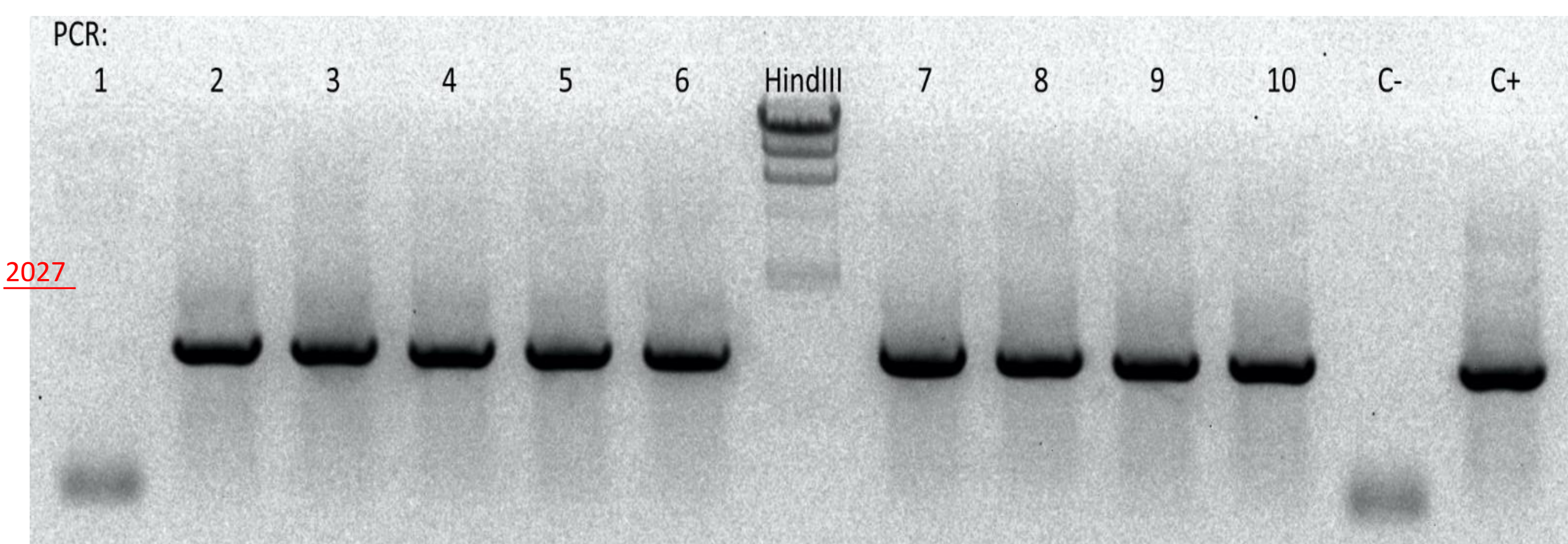


Figura 2: PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) dos plasmídeos recombinantes. 1-10: amplificação da fase aberta de leitura (ORF) de CB inserida em vetor pET-43a, oriundos de *screening* de 10 colônias. C-: Controle negativo. C+: Controle positivo, pGEM-CB. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. *HindIII*: Marcador de peso molecular. Número em vermelho refere-se ao tamanho (pares de bases) aproximado do fragmento.

CONCLUSÃO

A região codificante da CB possivelmente foi clonada no vetor de expressão pET-43a. A determinação da sequência de nucleotídeos do produto de clonagem obtido está em andamento para confirmar que a ORF da CB foi clonada. Dessa forma, se pode iniciar a expressão da proteína em sistema heterólogo.

Agradecimentos:

