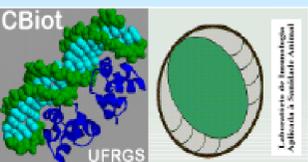


# Expressão de duas formas recombinantes de Triosefosfato isomerase do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*



Klein, A. S.<sup>1,2</sup>, Vaz, I.S.<sup>1,2</sup>



Centro de Biotecnologia, UFRGS<sup>1</sup>, Faculdade de Veterinária, UFRGS<sup>2</sup>; Porto Alegre, RS, Brasil.  
aneliseklein@cbiot.ufrgs.br.

## Introdução

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é considerado o principal ectoparasita de bovinos, sendo o principal vetor dos patógenos do complexo da tristeza parasitária bovina, causando prejuízos para a pecuária brasileira. O controle desse parasito atualmente é feito principalmente com o uso de acaricidas químicos, método o qual acarreta na seleção de populações resistentes, na contaminação dos produtos de origem animal e na poluição do meio ambiente. Diversos métodos alternativos de controle deste parasita vem sendo estudados. O controle imunológico possui uma boa relação custo-benefício, além de não gerar contaminação nos produtos de origem animal e no ambiente.

O estudo da fisiologia do carrapato é necessário para a pesquisa de possíveis alvos para o seu controle. Triosefosfato isomerase (TIM) é uma enzima atuante na glicólise e gliconeogênese, catalizando a interconversão entre gliceraldeído 3-fosfato e fosfato de dihidroxicetona. Esta enzima vem sendo utilizada como alvo para o desenvolvimento de drogas contra endoparasitas.

## Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi expressar a forma recombinante desta enzima e realizar a purificação para avaliar o seu uso como antígeno vacinal no controle imunológico do carrapato bovino.

## Materiais e Métodos

Em uma etapa anterior, através da sequência de DNA da TIM depositada no banco de dados TIGR foram projetados primers para a clonagem da sequência completa do cDNA da enzima a partir do RNA total extraído de ovos de 10 dias de idade. Um fragmento de 750 pb foi clonado diretamente no vetor de expressão pET-3a e pET-43a.

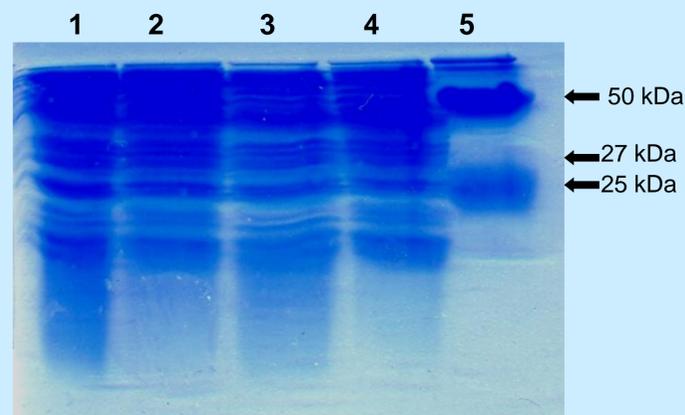
Posteriormente foram feitos testes de expressão das duas construções contendo a sequência da TIM, o plasmídeo pET-3a, contendo a sequência da proteína recombinante, e o plasmídeo pET-43a, adicionando uma cauda de histidina à proteína recombinante. Estes plasmídeos foram transformados para teste de expressão em *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Para o teste de expressão as células contendo o fragmento foram crescidas em meio LB com uma concentração de 1 mM de IPTG durante um período de aproximadamente 16 horas.

Foi selecionada a construção com cauda de histidina para realizar a purificação da proteína. Essa forma foi escolhida devido a praticidade da purificação que foi realizada através de cromatografia de afinidade para níquel.

## Resultados

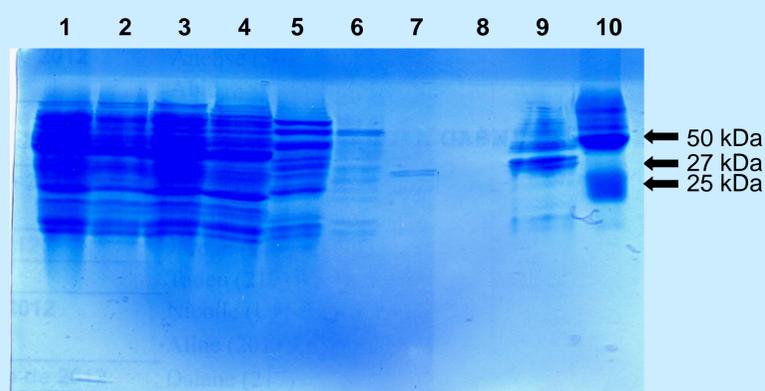
As duas formas recombinantes da enzima foram expressas nas condições testadas, resultando, conforme figura 1.

**Apoio:** CAPES, FAPERGS, CNPq PIBIC, BIC-UFRGS CNPq-UFRGS.



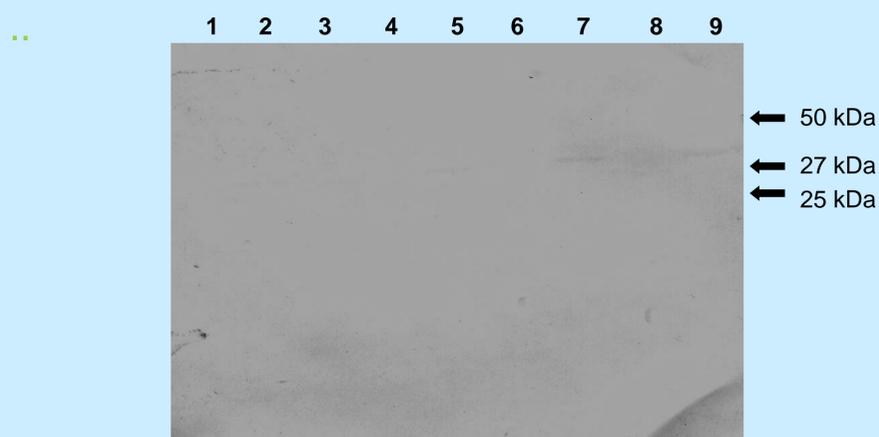
**FIGURA 1.** Expressão das duas formas da Tim recombinante analisadas em SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 16%. (1) não induzido Tim sem cauda, (2) Tim sem cauda, (3) não induzido Tim com cauda, (4) Tim com cauda, (5) marcador de massa molecular IgG bovino.

Foi realizada a purificação da forma recombinante contendo a cauda de histidina e obteve-se uma proteína purificada com tamanho compatível o esperado (27kDa).



**FIGURA 2.** Purificação da Tim com cauda com diferentes concentrações de Imizadol analisadas em SDS-PAGE em gel de acrilamida 16%. (1) extrato total, (2) fração não-ligada, (3) fração 1 10mM de imizadol, (4) fração 2 10mM de imizadol, (5) fração 3 50mM de imizadol, (6) fração 3 100mM de imizadol, (7) fração 4 200mM de imizadol, (8) fração 2 500mM, (9) proteína controle, (10) marcador de massa molecular

As purificação foi verificada por Western Blot com anticorpos anti-histidina e anti-TIM.



**FIGURA 3.** Western Blot da purificação da Tim. (1) extrato total, (2) fração não-ligada, (3) fração 1 10mM de imizadol, (4) fração 2 10mM de imizadol, (5) fração 3 50mM de imizadol, (6) fração 3 100mM de imizadol, (7) fração 4 200mM de imizadol, (8) fração 2 500mM, (9) proteína controle.

## Perspectivas

Novas condições de expressão e purificação serão testadas de forma a otimizar esses processos, após isso serão realizados testes de imunização em bovinos para que se possa verificar o potencial imunogênico dessa proteína.