

Clonagem, Expressão e Purificação de uma Cisteíno Endopeptidase Antimicrobiana de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Nascimento, J.R.¹; Da Silva Vaz Jr, I.²



UFRGS
PROPESQ

XXV SIC
Salão Iniciação Científica

CB - Ciências Biológicas

1. Juliana Rodrigues do Nascimento, Biomedicina, UFRGS
2. Itabajara da Silva Vaz Jr, Faculdade de Veterinária e Centro de Biotecnologia, UFRGS

Introdução

Durante o desenvolvimento embrionário, o carrapato utiliza como fonte de energia e aminoácidos uma lipoglicofosfoproteína de origem materna, a Vitelina (VT). A vitelina é hidrolisada por diferentes enzimas incluindo: VTDCE (Vitellin-degrading Cysteine endopeptidase), BYC (Boophilus Yolk Pró-Cathepsin) e THAP (Tick Heme Binding Aspartic Proteinase). Estudos anteriores mostraram que a VTDCE recombinante (r-VTDCE-TRX) apresentou também atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis*. Porém essa proteína recombinante apresenta uma grande proteína de fusão (Thioredoxin) que diminuiu a atividade enzimática e antimicrobiana da VTDCE. O Objetivo deste trabalho é a produção da proteína recombinante sem a proteína de fusão (r-VTDCE) para análises futuras.

Materiais e Métodos

Clonagem: DNA plasmideal foi purificado e a sequência clonada foi confirmada por sequenciamento.

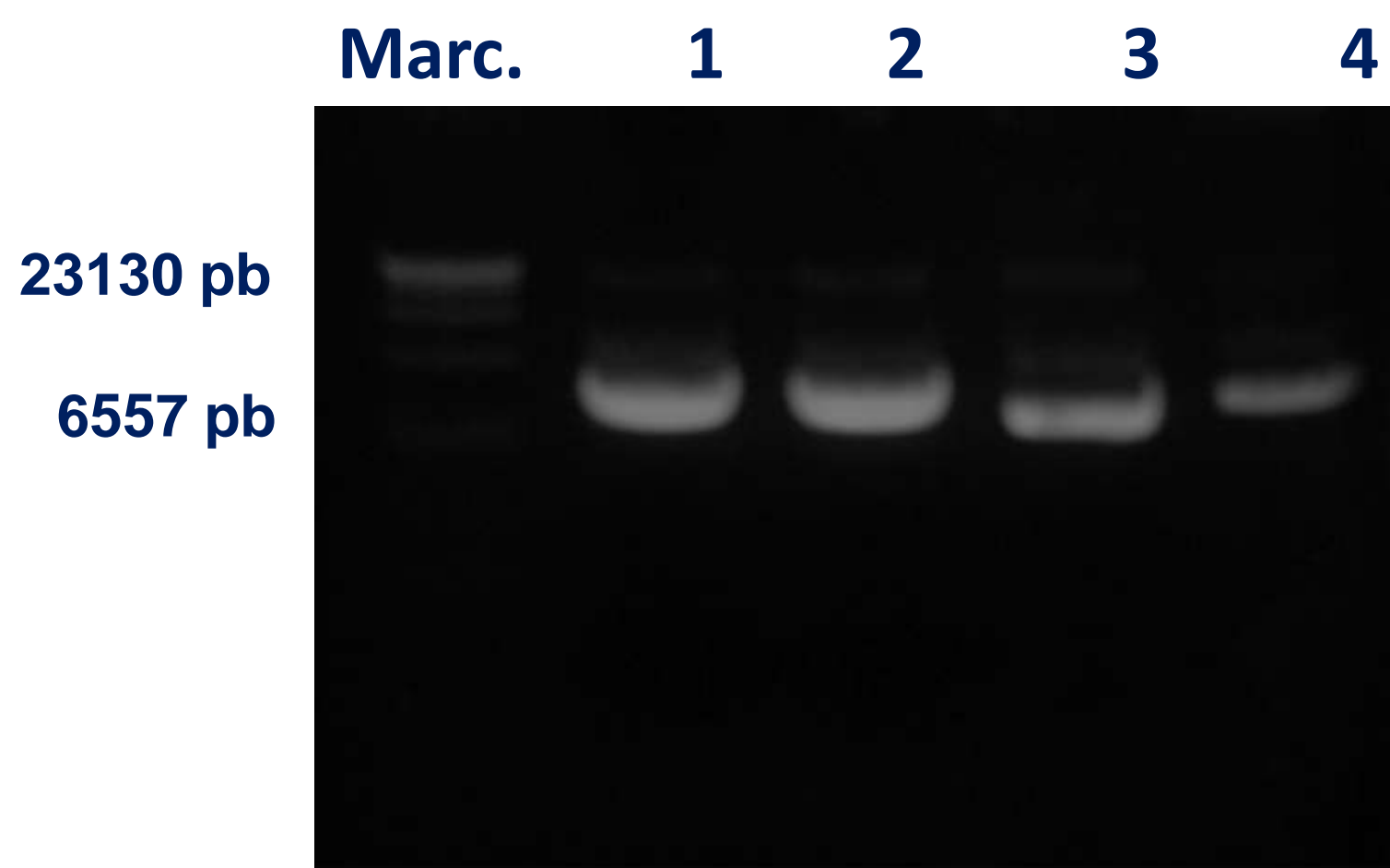


Figura 1. Purificação de DNA plasmideal de 4 colônias diferentes de *E. coli* XL1-Blue transformadas com pET 43a + r-VTDCE. Marc.: Marcador de peso molecular, Coluna 1: colônia 1, Coluna 2: colônia 2, Coluna 3: colônia 3, Coluna 4: Colônia 4.

Expressão:

Tabela 1.: Dez cepas de *E. coli* foram testadas com indução de 1 mM de IPTG. Em **vermelho** condições em que houve expressão da r-VTDCE.

Cepas	Temperatura de Incubação	Horas de Incubação
BL21(DE3)RP	37 °C e 25 °C	0h, 2h, 4h, 16h
BL21(DE3)PLysE	37 °C	0h, 2h, 4h, 16h

0h-s | 2h-s | 4h-s | 16h-s | 0h-p | 2h-p | 4h-p | 16h-p | C+

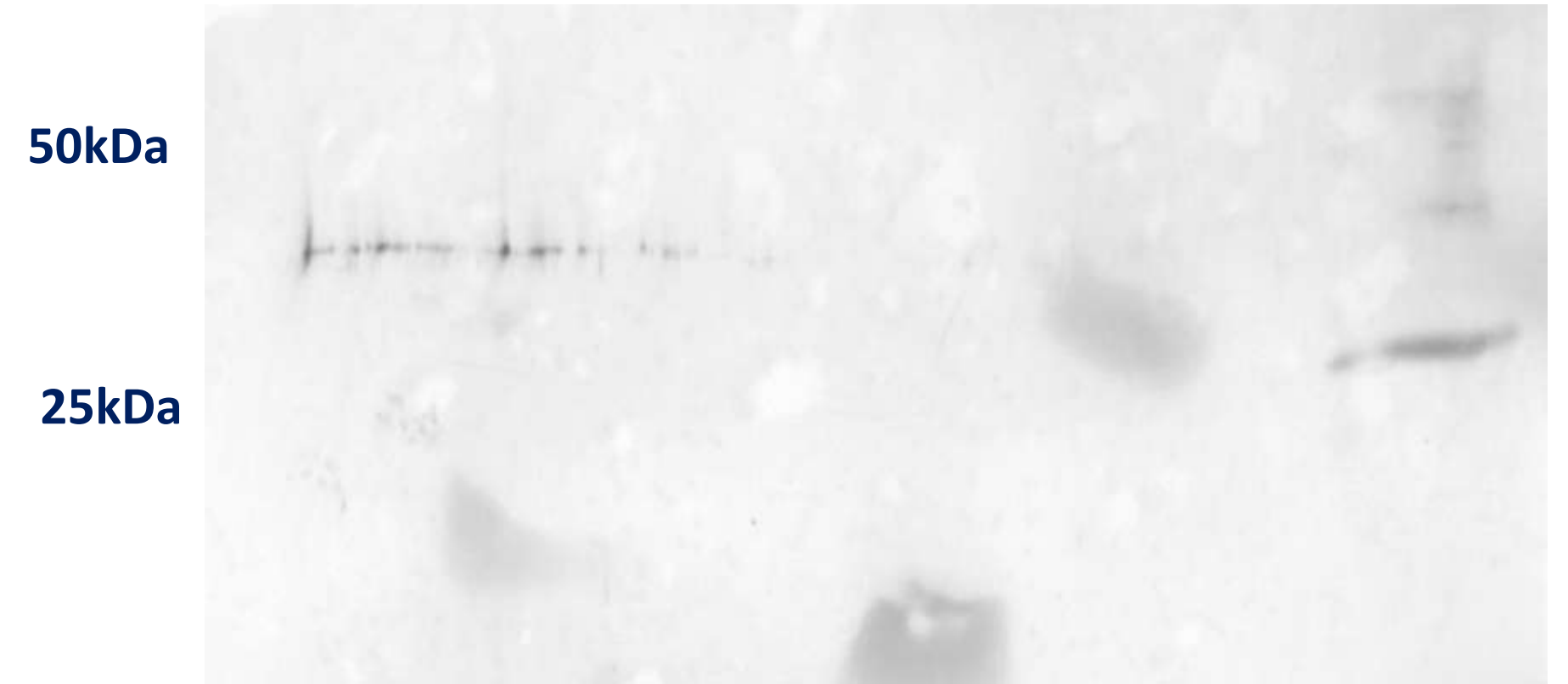


Figura 2. Expressão da r-VTDCE em *E. coli* BL21 (DE3) RP, reconhecida pelo anticorpo monoclonal anti-Histidina no sobrenadante das amostras incubadas 2h e 4h com 1mM de IPTG e em amostras sem a indução de IPTG (0h-s) a 37 °C. Como controle foi utilizada a r-VTDCE-TRX. (s= sobrenadante, p= pellet)

Purificação: A r-VTDCE foi purificada através de cromatografia de afinidade ao Níquel.

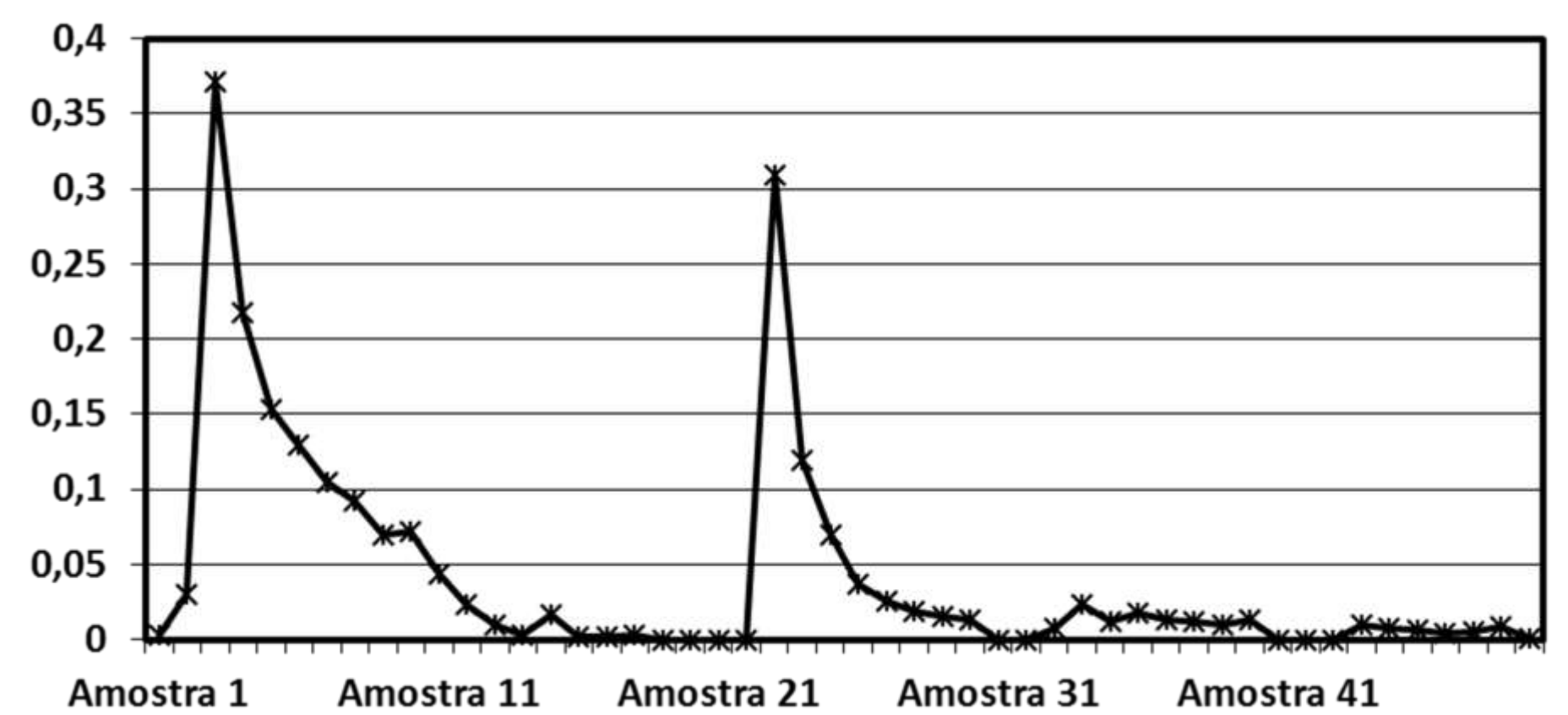


Figura 3. Purificação da r-VTDCE feita através de cromatografia de afinidade. Absorbância das amostras eluídas com 50 mM (1-10), 100 mM (11-20), 200 mM (21-30), 300 mM (31-40) e 500 mM (41-50) de Imidazol.

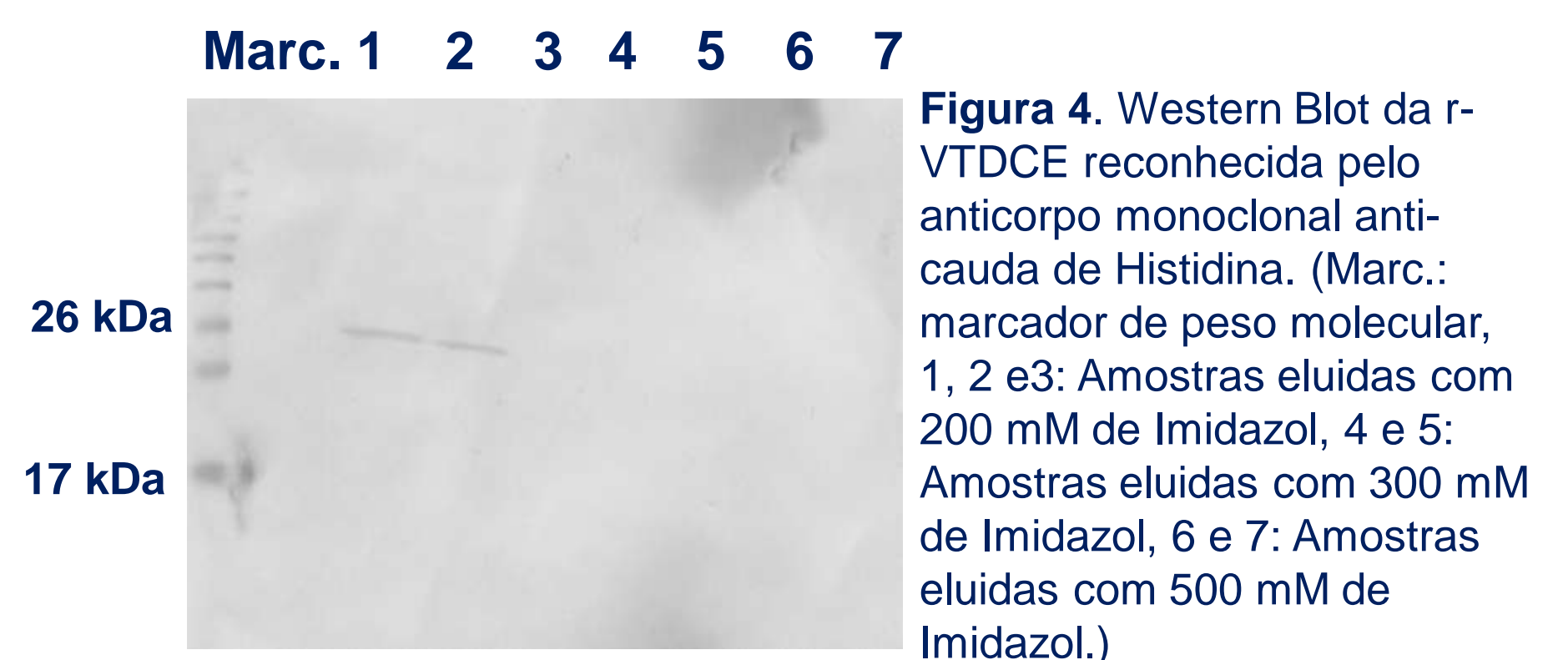


Figura 4. Western Blot da r-VTDCE reconhecida pelo anticorpo monoclonal anti-cauda de Histidina. (Marc.: marcador de peso molecular, 1, 2 e 3: Amostras eluídas com 200 mM de Imidazol, 4 e 5: Amostras eluídas com 300 mM de Imidazol, 6 e 7: Amostras eluídas com 500 mM de Imidazol.)

Conclusões e Perspectivas

A sequência que codifica a VTDCE foi clonada em Pet 43a. As cepas BL21 (DE3) RP e BL21 (DE3) PLys E foram capazes de expressar a proteína recombinante. A r-VTDCE purificada foi reconhecida pelo anticorpo monoclonal anti-cauda de Histidina e pelo anticorpo policlonal anti-VTDCE. A expressão e purificação da VTDCE sem a proteína de fusão representa um passo importante para analisar a atividade enzimática e antimicrobiana dessa molécula.

SUPORTE FINANCEIRO: CAPES, FAPERGS e INCT-EM



MODALIDADE
DE BOLSA

Pibic - CNPq