

# Expressão da rVTDCe, uma cisteíno endopeptidase do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Corssac, G. <sup>1</sup>; Oldiges D. P. <sup>1,2</sup>; Seixas, A. <sup>1,2</sup>;  
Da Silva Vaz Jr, I. <sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup> Centro de Biotecnologia – UFRGS; <sup>2</sup> Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA;  
<sup>3</sup> Faculdade de Veterinária – UFRGS.

## INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasita hematófago cujo principal hospedeiro é o bovino, sendo causador de perdas econômicas na pecuária, como queda na produção de carne e leite, danos ao couro e transmissão da bactéria e dos protozoários causadores da tristeza parasitária bovina.

Durante seu desenvolvimento embrionário, o carrapato obtém energia e aminoácidos através da degradação de uma lipoglicofosfoproteína de origem materna, denominada vitelina (VT). Atualmente já foram descritas cinco enzimas responsáveis pela degradação de VT: VTDCe, BYC, THAP, BmCL1 e RmLCE (Seixas et al., 2003), sendo a VTDCe o foco desse projeto.

A Cisteíno Endopeptidase Degradora de Vitelina (VTDCe) apresenta tamanho de 17 kDa (Seixas et al., 2003) e, além de possuir função na nutrição do embrião, possui atividade antimicrobiana (Oldiges et al., 2012). Para aprofundar a caracterização da VTDCe, é necessária a produção de uma proteína recombinante sem proteína de fusão, uma vez que a construção utilizada em estudos anteriores adicionava a proteína de fusão tioredoxina, que interfere na atividade enzimática e dificulta a realização de ensaios que visem a caracterização antimicrobiana e, futuramente, a elucidação estrutural da molécula. A partir disso, o presente trabalho tem como objetivo realizar duas clonagens da região codificante da VTDCe com e sem o pró-peptídeo, em um vetor de expressão sem proteína de fusão.

## METODOLOGIA E RESULTADOS

Para a realização da clonagem, foi utilizado o vetor de clonagem pGEM-T contendo a região codificante da VTDCe e, para realizar a amplificação das sequências através de PCR, *primers* foram projetados:

**Forward:** 5'-CATGGTAGATGATCCAGATATCTGCGCT-3'  
**Reverse:** 5'-CTCGAGCGGCCACGTCGTC-3'

O *primer reverse* adiciona uma sequência responsável por codificar uma cauda de seis histidinas, que vai facilitar posterior identificação (através de anticorpo anti-histidina) e purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade.

As sequências codificantes da VTDCe com e sem pró-peptídeo foram novamente clonadas no vetor de expressão pET5a e a presença do inserto correto foi confirmada via PCR, hidrólise com as enzimas de restrição NdeI e BamHI e sequenciamento.

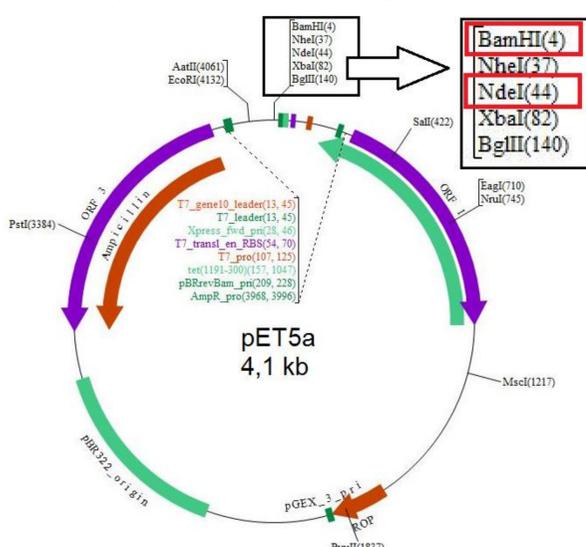


Figura 1: Mapa do plasmídeo pET5a, com destaque para os sítios das enzimas de restrição NdeI e BamHI.

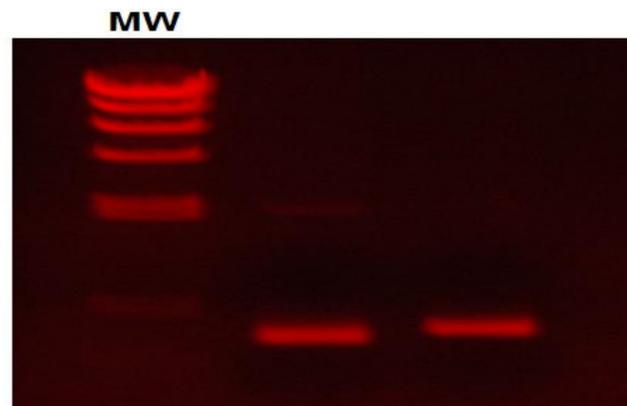


Figura 2: PCR das sequências codificantes da VTDCe full e short (com e sem o pró-peptídeo, respectivamente).

Após a confirmação da clonagem, a bactéria *Escherichia coli* de diferentes cepas (tabela 1) foi transformada com os plasmídeos resultantes para serem testadas, através de testes de expressão, com relação a sua capacidade de produção da proteína recombinante.

Bactéria	Temperatura utilizada
BL21 (DE3)	37°C
BL21 (DE3) pLys S	25°C e 37°C
BL21 (DE3) pLys E	25°C e 37°C
BL21 (DE3) SI	37°C
BL21 (DE3) RIL	37°C
BL21 (DE3) STAR	37°C
BL21 (DE3) RP	37°C
BL21 (DE3) C41	37°C
BL21 (DE3) C43	37°C
BL21 (DE3) C41 pLys S	25°C e 37°C
BL21 (DE3) Rosetta	37°C
BL21 (DE3) Rosetta Gami B	37°C
AD 494	37°C

Tabela 1: Cepas de *E. coli* utilizadas. Os testes foram realizados a uma temperatura de 37°C, tendo algumas exceções que também foram testadas a 25°C.

Para análise da expressão, as amostras foram submetidas a testes de western blot, sondados com anticorpo monoclonal anti-histidina.

Como não foi verificada a produção da proteína recombinante em nenhuma das condições testadas, foi realizado um teste de expressão em presença do antibiótico ampicilina para verificar se a ausência de expressão ocorria em função de instabilidade do plasmídeo. Porém, mesmo com essa abordagem, não houve sucesso na expressão. Como alternativa, foi realizada uma nova clonagem da sequência codificante da VTDCe, utilizando os mesmos *primers* e enzimas de restrição, mas em outro vetor de expressão, o pET43a.

## PERSPECTIVA

A partir da confirmação da nova clonagem da sequência codificante da VTDCe, no vetor pET43a, novos testes de expressão serão realizados, a fim de possibilitar um conhecimento mais aprofundado sobre a proteína e sua atividade enzimática e antimicrobiana.

## APOIO