



Clonagem e expressão de uma proteína salivar rica em glicinas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* na levedura *Pichia pastoris*

Alexandra Santos¹, Bruna Ferreira Leal¹, Carlos Alexandre Sanchez Ferreira ¹(orientador)

¹Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Faculdade de Biociências, PUCRS

Resumo

O Brasil é caracterizado por uma grande produção de pecuária extensiva, visto que a carne bovina é a fonte de proteínas mais consumida no país. Porém, rebanhos bovinos são hospedeiros de ectoparasitas que podem prejudicar a produtividade desses animais. O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o exemplo de ectoparasita mais importante, responsável pela queda na produção de leite e carne, além de transmitir agentes causadores de doenças e ocasionar danos ao couro dos bovinos. Para conseguir reduzir as infestações de *R. microplus* são utilizados acaricidas, mas já foi detectado o aparecimento de isolados resistentes a todos os princípios ativos comerciais. Neste contexto, antígenos protetores têm sido caracterizados para o desenvolvimento de vacinas como possível forma alternativa de controle. As proteínas salivares estão entre os alvos estudados e algumas proteínas ricas em glicinas, de diferentes espécies de carrapatos, mostraram proteger o hospedeiro quando usadas como imunógeno. Este trabalho tem como objetivos a clonagem e expressão da porção codificante de uma proteína rica em glicinas de *R. microplus* (RmPRG) em *Pichia pastoris*, além da purificação da proteína recombinante e análise do grau de reconhecimento da proteína por soros de bovinos infestados. A fim de alcançar os objetivos propostos, a sequência codificante de RmPRG foi clonada no vetor pGEM-T Easy (Promega), o qual foi eletroporado em *Escherichia coli* TOP 10. O DNA plasmidial foi extraído e inserido em um novo vetor, o pPICZαC (Life Technologies), que foi novamente transformado em *E. coli*. O plasmídeo recombinante foi linearizado com a enzima de restrição *PmeI* e inserido por eletroporação nas cepas de *P. pastoris* X-33 e GS115. A clonagem no vetor pPICZαC foi confirmada por sequenciamento e as transformações nas duas cepas foram confirmadas por

PCR, usando tanto oligonucleotídeos iniciadores específicos para o vetor como para a sequência correspondente à RmPRG. A expressão da RmPRG será realizada utilizando metanol como indutor. A proteína secretada pela levedura no meio de cultura será purificada por cromatografia de afinidade e o seu grau de pureza monitorado por SDS-PAGE. Após a obtenção da proteína recombinante purificada, ELISA e western-blot serão realizados a fim de detectar o seu reconhecimento por soros de bovinos infestados. Os resultados obtidos serão importantes para a avaliação do potencial da RmPRG como imunógeno protetor.

Palavras-chave

Palavras chaves: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; proteína rica em glicinas; clonagem.