

ISSN 0104-6187



Ministério da Agricultura e do Abastecimento  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA  
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SOROS POLICLONAIS PARA A  
DETECÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

**CNPAB  
Seropédica, RJ  
Maio/1997**

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à  
EMBRAPA-CNPAB

Antiga Rodovia Rio/São Paulo

Telefone: (021)682-1086; (021)682-1500

Telex: (21) 32723 EBPA

Fax: (021)682-1230

Caixa Postal 74505

23851-970 Seropédica, RJ

E-mail: sac@cnpab.embrapa.br

**Comitê de Publicações**

Johanna Döbereiner(Presidente)

Helvécio De-Polli(Substituto do Presidente)

José Ivo Baldani

Eliane Maria Ribeiro da Silva

Dejair Lopes de Almeida

Robert Michael Boddey

Dorimar dos Santos Felix(Bibliotecária)

REIS, V.M.; CRUZ, G.B.; FERREIRA, A.; FERNANDES, M.F.; FERREIRA, A.C.; REIS, F.B.; RIBEIRO, J.R.A.; SALLES, J.F.; WEBER, O.B. **Produção e caracterização de soros policlonais para a detecção de bactérias diazotróficas.** Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1997. 11p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 30).

1. Bactéria. I. Cruz, G.B., colab. II. Ferreira, A., colab. III. Fernandes, M.F., colab. IV. Ferreira, A.C., colab. V. Reis, F.B., colab. VI. Ribeiro, J.R.A., colab. VII. Salles, J.F., colab. VIII. Weber, O.B., colab. IX. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). X. Título. XI. Série.

CDD 589.9

© EMBRAPA

## PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SOROS POLICLONAIS PARA A DETECÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

V.M. Reis<sup>1</sup>, G.B. Cruz<sup>2</sup>, A. de S. Ferreira<sup>3</sup>, M.F. Fernandes<sup>4</sup>, A.C. Ferreira<sup>5</sup>, F.B. Reis<sup>5</sup>, J.R. A. Ribeiro<sup>5</sup>, J.F. Salles<sup>5</sup>, O.B. Weber<sup>5</sup>

### 1. INTRODUÇÃO

Métodos sorológicos utilizando anticorpos mono e policlonais podem ser usados na identificação, quantificação e enriquecimento de bactérias específicas em extratos, bem como na visualização de células *in situ* (Schloter et al., 1994; 1995). Em anos recentes essas técnicas têm sido refinadas com objetivo de aumentar a especificidade e melhorar a sensibilidade dos soros a exemplo da técnica de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbant Assay) (Levanony et al., 1987; Lochner et al., 1988). Essa técnica utiliza enzimas ligadas covalentemente, sem alterar a especificidade do anticorpo e as propriedades catalíticas da enzima. Dentre as enzimas encontram-se as peroxidases, as fosfatases alcalinas e as  $\beta$ -galactosidases. Os produtos das reações apresentam cor e podem ser medidos em quantidades muito baixas.

Convém salientar que para a aplicação das técnicas imunológicas, os anticorpos precisam atender uma série de requisitos relacionados aos critérios de qualidade, tais como: a determinação de reações cruzadas, a localização de determinantes antigênicos nas células de interesse, as características de afinidade e a expressão dos determinantes antigênicos em condições ambientais.

Visando o desenvolvimento destas técnicas, serão descritos as técnicas de produção e caracterização de anticorpos policlonais. Tais soros, após estas etapas, podem ser usados para a detecção, quantificação e localização de bactérias diazotróficas em amostras de plantas.

---

<sup>1</sup> Eng. Agr., PhD., EMBRAPA-CNPAB, km 47, Caixa postal 74505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ.

<sup>2</sup> Assistente de Pesquisa, EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia.

<sup>3</sup> Universidade Federal Santa Maria, 97119-900 Santa Maria, RS

<sup>4</sup> EMBRAPA-CPACT, Avenida Beira Mar 3250, Caixa postal 44, 49025-040 Aracaju, SE

<sup>5</sup> EMBRAPA-CNPAB

## 2. PRODUÇÃO DE ANTISOROS POLICLONAIS DE CÉLULAS INTACTAS

A escolha do animal para a imunização depende do tipo de anticorpo e quantidade do antígeno. Para anticorpos policlonais usam-se coelhos na maioria dos casos, mesmo quando a quantidade do antígeno é limitada. Estes animais podem produzir um volume máximo de 100 ml do soro e são de fácil manuseio. Hamsters também podem ser usados especialmente se a quantidade de antígeno é pequena, obtendo-se ao final cerca de 20 ml de soro. Os anticorpos monoclonais podem ser produzidos em ratos ou camundongos. Para ambos os casos, devem ser escolhidos animais jovens e no caso de coelhos estes são considerados maduros para a aplicação do antígeno após 12 semanas. Também se deve escolher mais de um animal para a imunização com o mesmo antígeno pois os indivíduos não são idênticos. No mínimo, dois animais devem ser utilizados, sendo ideal de 3 a 4.

As células das bactérias de interesse devem ser cultivadas no meio de melhor crescimento, podendo ser meio rico ou meio mínimo. As células crescidas devem ser lavadas 3 vezes em tampão fosfato salino (PBS - pg. 6) e aquecidas a 90°C por 30 min para eliminar as proteínas do flagelo como também denaturar as proteínas da parede celular, permanecendo a maioria de lipopolissacarídeos (LPS). Outra forma é a morte usando luz ultra-violeta (UV) por 2 horas, que mantém a estrutura das proteínas e dos LPS. Após este tratamento as células devem ser ressuspensas em 4ml de água destilada estéril (100 mg de ptn). A dose do antígeno usada na imunização pode variar de 50-1000 µg já que parte do antígeno será destruído pelo catabolismo antes que chegue a alcançar a célula apropriada, responsável pela fabricação dos anticorpos. No caso de células intactas de microrganismos, por serem imunogênicas, permitem que as doses usadas na imunização possam variar.

O uso de adjuvantes permite que menores quantidades de antígeno sejam usadas e a resposta a produção do anticorpo seja mais persistente. Normalmente usa-se adjuvante de Freund's que é uma emulsão oleosa preparada com óleos não metabolizáveis formando um depósito que protege o antígeno de ser rapidamente catabolizado. Quando a mistura contém células mortas de *Mycobacterium tuberculosis* é dito Adjuvante Completo de Freund, se não contém é dito incompleto. Na primeira injeção usa-se uma mistura do adjuvante completo com o incompleto (1:1). Em seguida acrescenta-se as células formando uma emulsão, com a ajuda de duas seringas de vidro conectadas. A imunização deve ser feita injetando-se a emulsão subcutaneamente em diversas partes do coelho (200 µl por sítio, 8-10 sítios/coelho). A emulsão com o adjuvante nunca deve ser injetado pela via intravenosa. Nas injeções seguintes utiliza-se somente a suspensão de bactérias por via intramuscular (1 ml). Devem ser

feitas diversas imunizações durante um período de 2 meses, num intervalo de no máximo uma semana. A hiperimunização resulta em algumas vantagens como a mudança de classe de anticorpo de IgM para IgG; aumento da afinidade e dominância clonal. Visando checar a qualidade dos soros, alíquotas devem ser retiradas antes da imunização ( soro pré-imune ) para verificar a reação do coelho antes da imunização. Também devem ser retiradas amostras de sangue aos 10 dias depois da terceira inoculação utilizando a veia da orelha (10-20 ml), para verificação do aumento do título (diluição máxima onde ocorre reação da bactéria com o anticorpo). Nesta ocasião, suspende-se a imunização, realizando-se apenas a coleta da amostra.

Após o período de imunização dos animais, o sangue pode ser colhido diretamente do coração resultando um volume máximo de 20-30 ml sem provocar a morte do animal. Também pode ser feita a sangria total, o que resulta num volume maior (100 a 150 ml). Após a coagulação a 37°C, separa-se o soro e centrifuga-se (10.000 rpm por 10 min. a 4°C) para retirada dos glóbulos vermelhos. A seguir o soro é aquecido a 56°C por 1 h para diminuir a concentração dos componentes que possam causar reações inespecíficas. Ao final, estoca-se o soro em alíquotas de 1 ml no freezer (-20°C) onde podem ser mantidos por vários anos. Os soros em uso devem ser mantidos sob refrigeração com 50% glicerol. Vários protocolos utilizam azida de sódio (0,02%) para impedir o crescimento de microorganismos, mas este composto pode interferir com alguns ensaios biológicos e acoplagem de anticorpos. O soro deve ser descongelado uma única vez. Uma vez descongelado, mantenha-o na geladeira com pH 7,0, NaCl (0,9%) e azida de sódio (0,02%). Recipientes plásticos não devem ser utilizados em qualquer fase do uso de anticorpos pois estes aderem as imunoglobulinas.

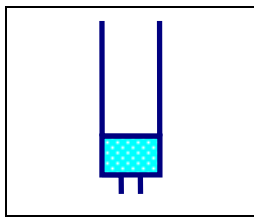
### **3. PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS**

Embora uma única estratégia de purificação não satisfaça a todos os usos, a maioria dos usuários prefere a purificação usando colunas preenchidas com proteína A isolada de *Staphylococcus aureus*. Este procedimento tem sido utilizado no CNPAB e será descrito a seguir. A única desvantagem é o custo elevado das colunas e que pode ser minimizado pela reutilização das mesmas.

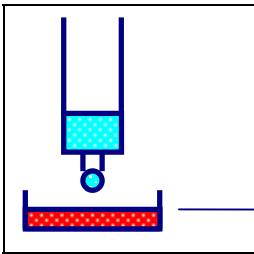
Este método é utilizado para purificação do soro e eliminação das imunoglobulinas inespecíficas, tais como as das subclasses IgM, IgA, IgD e IgE. Para tal, utiliza-se uma coluna contendo agarose e proteína A, que tem afinidade pela fração IgGs do antisoro, que é responsável pela resposta específica ao antígeno. A classe das IgG se subdivide em IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, sendo que cada uma apresenta uma resposta específica diferenciada ao antígeno.

A estrutura do anticorpo divide-se em duas partes principais: uma cadeia dita pesada (Fc) que é um componente constante e uma cadeia leve (Fab) que é variável e se liga a parte da estrutura do antígeno a partir do qual foi produzido. A proteína-A se liga a fração Fc do anticorpo. Estas colunas são vendidas comercialmente e variam de preço de acordo com o conteúdo de proteína-A que vem preenchendo a coluna.

FIGURA 1: Esquema de purificação de soros policlonais utilizando colunas preenchidas com proteína-A.



1. Lavar a coluna 2 x com 1 ml de tampão Tris (100 mM, pH 8,0)
2. Diluir o anticorpo 1:100 (9,9 ml tampão Tris + 100 µl anticorpo)
3. Lavar a coluna 2 X com 1 ml de tampão Tris.



Na coluna ficam retidas as imunoglobulinas da classe IgG  
 ptnA - IgG2a, IgG2b, IgG1 e IgG3.

IgM + IgE + IgD + IgA (anticorpos inespecíficos)

Para deslocar as imunoglobulinas da classe G, serão usados dois pHs diferentes.

4. Lavar a coluna 2X com 1 ml de tampão glicina 100 mM, **pH 4,0**.

Desloca as imunoglobulinas das subclasses IgG2a e IgG 2b

5. Lavar a coluna 2X com 1ml de tampão glicina 100 mM, **pH 3,0**.

Desloca as imunoglobulinas das subclasses IgG 1 e IgG 3

**OBS.:** Não utilizar plástico em nenhuma das fases do ensaio. O plástico permite a aderência das imunoglobulinas.

6. Lavar a coluna 2 X com 1 ml de tampão glicina (100 mM, pH 3,0) - descartar

7. Adicionar 1 ml de tampão Tris (100 mM, pH 8,0) e fechar a coluna. Manter na posição vertical dentro do refrigerador.

8. Ajustar o pH do anticorpo purificado para pH 7,0, utilizando solução de NaOH 0,5M.

Acrescentar 15 µl para a fração de IgG 2a e IgG 2b (pH 4,0) e 50 µl para a fração de IgG 1 e IgG3 (pH 3,0).

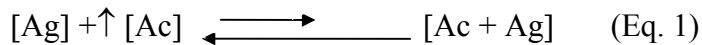
9. Quantificar a concentração de proteína do anticorpo através da leitura da densidade ótica a 280 nm. A concentração de proteína deve ser > 0,1 mg isto é, a DO. (280) =1 corresponde a 0,8 mg / ml de ptn.

10. Adicionar azida sódica (0,02%) para evitar possíveis contaminações. Manter no refrigerador.

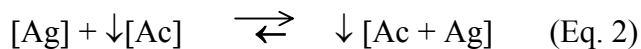
Para se verificar a eficiência do processo de purificação faz-se um gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 10%. Compara-se o soro antes e depois da purificação. No caso do soro puro ocorre o aparecimento de apenas uma banda no gel.

#### 4. DETERMINAÇÃO DA DILUIÇÃO IDEAL DO ANTICORPO

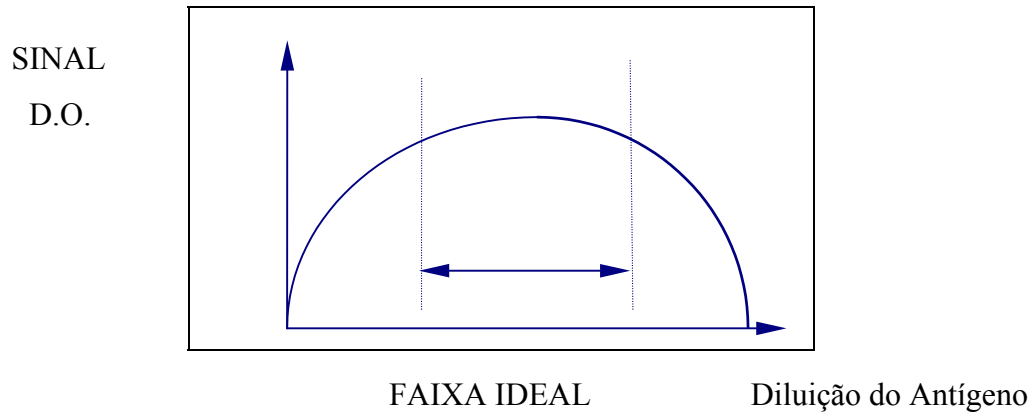
Caso a concentração do anticorpo seja elevada, estes irão competir pelos mesmos determinantes antigênicos (sítios de reconhecimento) e a reação se deslocará para a esquerda diminuindo o sinal do teste. (Eq.1).



Quando a concentração do anticorpo for baixa, não haverá reação suficiente para um sinal significativo. (Eq. 2).



Para solucionar este tipo de problema deve-se determinar a curva de diluição do anticorpo, visando determinar a diluição ideal a ser utilizada nos testes posteriores. Seguindo-se o método de ELISA, obtem-se uma curva como a apresentada abaixo (curva de Heidelberger). Na etapa nº 6 serão utilizadas diferentes diluições do anticorpo primário, variando de 1:1000 até 1:20.000 no caso de anticorpos não purificados e no caso dos purificados através da coluna de proteína-A usar diluições menores, de 1:10 até 1:1000.



### ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY):

1. Adicionar 50 $\mu$ l por poço de poli-L-lisina para fixação das bactérias na placa. Incubar por 20 min. a 37° C
2. Lavar 1 vez com 200 $\mu$ l de PBS por poço.
3. Adicionar 50 $\mu$ l do antígeno com  $DO_{436} = 1$  por poço. Incubar por 30 min. a 37° C
4. Lavar 1 vez com 200 $\mu$ l de PBS por poço.
5. Adicionar 200 $\mu$ l de solução de albumina (3%) por poço para bloquear os espaços não ocupados pelo antígeno, impedindo a adsorção dos anticorpos à poli-L-lisina. Incubar por 30 min. a 37° C.
6. Adicionar 50 $\mu$ l do anticorpo primário por poço e incuba por 30 min. a 37° C.
7. Lavar 3 vezes com 200 $\mu$ l de solução de lavagem por poço.
8. Adicionar 50 $\mu$ l do anticorpo secundário por poço, (Anti-rabbit IgG horseradish peroxidase linked whole antibody - from donkey - diluído 1:300). Incubar por 45 min. a 37° C.
9. Lavar 5 vezes com 200 $\mu$ l de solução de lavagem por poço.
10. Adicionar 100 $\mu$ l do substrato (ABTS - 1mg/ml em tampão ABTS)
11. Medir a densidade ótica a 405nm

### Soluções utilizadas:

⇒PBS: tampão fosfato salino:

NaCl - 8,0g.; KCl - 0,2g.;  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  - 1,4g.;  $KH_2PO_4$  - 0,2g.

Completar para 1litro.

⇒Solução de lavagem (SL):



Adicionar ao tampão PBS 0,05% Tween 20 e 0,5% BSA (soro de albumina bovina - fração V). Completar para 1 litro.

⇒ Tampão para ABTS (solução estoque):

1,67g de tampão para ABTS em 10ml de H<sub>2</sub>O destilada (manter congelado).

⇒ Solução para o substrato:

Por ocasião da adição do substrato, dissolver a solução estoque do tampão ABTS, diluir na proporção de 1:10 em H<sub>2</sub>O destilada e acrescentar para cada ml do tampão, 1 mg do substrato ABTS (pó verde). Manter no escuro. Usar imediatamente.

## 5. TESTES DE REAÇÃO CRUZADA

As bactérias tem diversos epitopos, uns são específicos e outros podem estar presentes em vários outros indivíduos. Os testes de reação cruzada são feitos para se determinar com quais outras bactérias o anticorpo irá reagir. Estes testes são feitos colocando na mesma placa (passo nº 3) diferentes bactérias (estirpes e espécies), todos com a mesma densidade ótica ( $DO_{436} = 1$ ).

## 6. PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS POR AFINIDADE COM BACTÉRIAS

De acordo com os resultados do teste de reação cruzada, escolhe-se a estirpe ou espécie onde houve o maior resultado de leitura para a reação de afinidade. Cresce o organismo em 500 ml de meio líquido por 24 horas. As culturas são centrifugadas, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspendido em volume de PBS para resultar numa  $D.O_{436} = 20$  (concentrar as células). Desta suspensão de bactérias serão usados 5 ml para a incubação com o soro. Para matar as bactérias adiciona-se azida sódica (0,002%) por 5min. A seguir adiciona-se o soro purificado (500 µl) e incuba-se sob agitação por 2 horas a temperatura ambiente. Centrifuga-se a suspensão a 4000 rpm durante 5 minutos, descarta-se o pellet e o sobrenadante é recolhido para nova centrifugação até completa eliminação do pellet. Em seguida faz-se novo teste de reação cruzada com o soro purificado. Esta etapa serve para eliminar todos os determinantes antigênicos comuns a ambos os microrganismos, ficando apenas os específicos.

## 7. TESTE DE SENSIBILIDADE

Este teste permite a determinação do nível mínimo de detecção do antígeno. Para tal, o teste de ELISA deve ser realizado com diluições do antígeno variando de  $10^8$  a  $10^3$  células por ml. Neste teste utiliza-se o anticorpo secundário biotilado onde há um aumento dos sítios de ligação (4 em vez de 1) com a enzima peroxidase e conseqüentemente ampliando o sinal colorimétrico (Método descrito por

Levanony & Bashan , 1990). As modificações são a partir da etapa 7 do teste de ELISA descrito acima.

8. Adicionar 50µl por poço do anticorpo secundário biotilado diluído 1:300 em PBS + BSA (0,5%). Incubar por 45min a 37° C.
9. Lavar 3 X com a solução de lavagem usando 200µl por poço.
10. Adicionar 50µl por poço de estreptavidina acoplado a peroxidase (horseradisch peroxidase) diluído 1:50 em PBS. Incubar por 20 min. a 37° C.
11. Lavar 5 vezes com solução de lavagem utilizando 200 µl por poço a cada lavagem.
12. Adicionar 100 µl por poço do substrato (preparado conforme citado acima).
13. Ler a 405nm.

## **8. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE EPITOPOS**

Esta fase é de vital importância para se verificar a localização do agente antigênico bem como a sua expressão. Para tal, as células serão marcadas com anticorpo acoplado a partículas de ouro e visualizado ao microscópio eletrônico de transmissão.

A suspensão de células da bactéria usada na imunização é lavada 2 vezes em PBS, ressuspendida em PBS contendo BSA (1%) e diluída para  $10^8$  células por ml. Incuba-se por 1 h com 100 µl do soro, lava 3 vezes com PBS contendo 0,02 % de BSA e incuba por 2 h com 100 µl do conjugado acoplado a partículas de ouro (5 nm - goat-anti-rabbit gold conjugate) diluído 1/10 em PBS. Finalmente, lava-se 3 vezes com PBS contendo BSA (0,02%).

A seguir, prepara-se as células para microscopia eletrônica. Células são fixadas por 10 min. em glutaraldeído (concentração pode variar de 3% a 5%) dissolvido em tampão fosfato (50 mM; pH 7,0). Lava-se com o mesmo tampão, e embebe em resina LR White (London Resin Company, UK) por 48 hs a 60°C. Secções (70 nm) são cortadas em micrótomo, coletadas em grades de níquel (200 mesh) cobertos com piroxilina. Os grades são contrastados com acetato de uranil (solução aquosa 5%) por 2 min. antes da visualização ao microscópio eletrônico de transmissão.

Após a visualização das partículas de ouro, deve-se considerar anticorpos de boa qualidade aqueles que obtiverem o número de epitopos (pontos negros) em torno de 1000 por célula. Este teste pode ser feito com outras estirpes no caso de soros desenvolvidos para quantificação. Se o número for mantido para outros isolados significa que o soro está apto para detectar o nível taxonômico de

interesse (gênero, espécie, etc). Também deve ser aplicado em amostras de plantas inoculadas com a bactéria alvo. Serve para verificar a estabilidade do epitopo.

## 9. AGRADECIMENTOS

A autora gostaria de agradecer a colaboração da Dr<sup>a</sup> Norma G. Rumjanek pela correção do texto e a Sr<sup>a</sup>. Dorimar dos Santos Félix pela normalização das referências.

## 10. REFERÊNCIAS

- LEVANOY, H.; BASHAN, Y. Avidin-biotin complex incorporation into enzyme-linked immunosorbent assay (ABELISA) for improving the detection of *Azospirillum brasilense* Cd. Current Microbiology, New York, v.20, p.91-94, 1990.
- LEVANOY, H.; BASHAN, Y.; KAHANA, Z. E. Enzyme-linked immunosorbent assay for specific identification and enumeration of *Azospirillum brasilense* Cd in cereal roots. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.53, p.358-364, 1987.
- LOCHNER, H. H.; SRIJDO, B.; KISHINEVSKY, B. STEIN, P.L. Limitations of the ELISA assay for routine determinations of legume inoculant quality. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, v.64, p.209-218, 1988.
- SCHLOTER, M.; ASSMUS, B.; HARTMANN, A. The use of immunological methods to detect and identify bacteria in the environment. Biotechnology Advances, Elmsford, v.13, p.75-90, 1995.
- SCHLOTER, M.; MOENS, S.; CROES, C.; REIDEL, R.; ESQUENET, M.; DEMOT, R.; HARTMANN, A.; MICHIELS, K. Characterization of cell surface components of *Azospirillum brasilense* Sp7 as antigenic determinants for strain specific monoclonal antibodies. Microbiology, Washington, v.140. p.823-828, 1994.