

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. Reis¹, G.B. Cruz², A. de S. Ferreira³, M.F. Fernandes⁴, A.C. Ferreira⁵, F.B. Reis⁵, J.R. A. Ribeiro⁵, J.F. Salles⁵, O.B. Weber⁵

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 β -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.

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

² Assistente de Pesquisa, EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia.

³ Universidade Federal Santa Maria, 97119-900 Santa Maria, RS

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

⁵ 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.

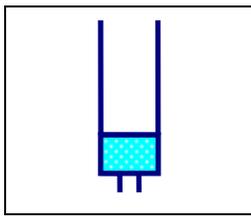
3. PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

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.

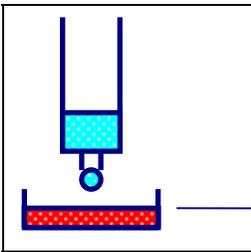
Este método é utilizado para purificação do soro e eliminação das imunoglobulinas inespecíficas, tais como as das subclasses IgM, IgA, IgD e IgE. Para tal, utiliza-se uma coluna contendo agarose e proteína A, que tem afinidade pela fração IgGs do antisoro, que é responsável pela resposta específica ao 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).

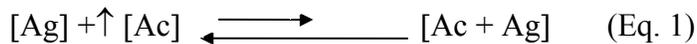
9. Quantificar a concentração de proteína do anticorpo através da leitura da densidade ótica a 280 nm. A concentração de proteína deve ser > 0,1 mg isto é, a DO. (280) =1 corresponde a 0,8 mg / ml de ptn.

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

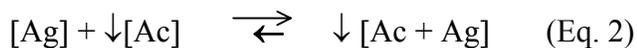
Para se verificar a eficiência do processo de purificação faz-se um gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 10%. Compara-se o soro antes e depois da purificação. No caso do soro puro ocorre o aparecimento de apenas uma banda no gel.

4. DETERMINAÇÃO DA DILUIÇÃO IDEAL DO ANTICORPO

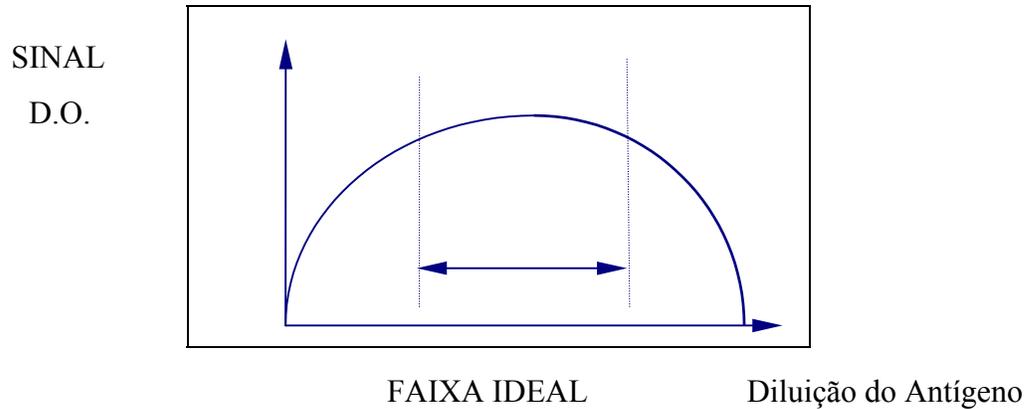
Caso a concentração do anticorpo seja elevada, estes irão competir pelos mesmos determinantes antigênicos (sítios de reconhecimento) e a reação se deslocará para a esquerda diminuindo o sinal do teste. (Eq.1).



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 μ 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 μ l de PBS por poço.
3. Adicionar 50 μ l do antígeno com $DO_{436} = 1$ por poço. Incubar por 30 min. a 37° C
4. Lavar 1 vez com 200 μ l de PBS por poço.
5. Adicionar 200 μ 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 μ l do anticorpo primário por poço e incuba por 30 min. a 37° C.
7. Lavar 3 vezes com 200 μ l de solução de lavagem por poço.
8. Adicionar 50 μ 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 μ l de solução de lavagem por poço.
10. Adicionar 100 μ 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 H₂O 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 H₂O 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 biotinizado 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^a Norma G. Rumjanek pela correção do texto e a Sr^a. 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.