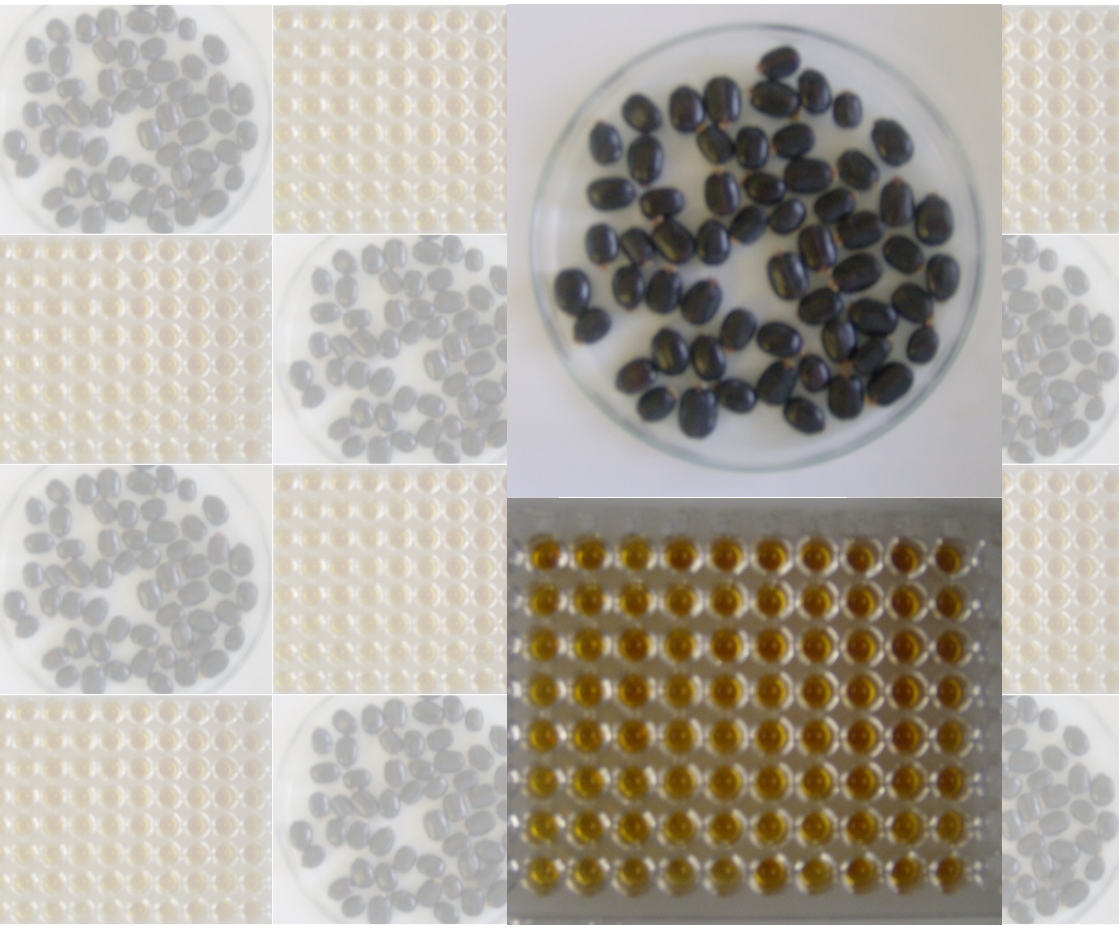
# Documentos

ISSN 1677-1915
Outubro, 2008
116

# Produção de Anticorpos Policlonais Anti-Ricina: Metodologia Científica



Embrapa

*ISSN 1677-1915*
*Outubro, 2008*

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária***
***Embrapa Agroindústria Tropical***
***Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

# *Documentos 116*

# Produção de Anticorpos Policlonais Anti-Ricina: Metodologia Científica

*Roselayne Ferro Furtado*
*Maria Izabel Florindo Guedes*
*Carlucio Roberto Alves*
*Rosa Amália Fireman Dutra*
*Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira*

Embrapa Agroindústria Tropical
Fortaleza, CE
2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Agroindústria Tropical**
Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici
CEP 60511-110 Fortaleza, CE
Caixa Postal 3761
Fone: (85) 3391-7100
Fax: (85) 3391-7109
Home page: www.cnpat.embrapa.br
E-mail: vendas@cnpat.embrapa.br

**Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical**

Presidente: *Antonio Teixeira Cavalcante Júnior*
Secretário-Executivo: *Marco Aurélio da Rocha Melo*
Membros: *João Paulo Saraiva Morais, Jorge Anderson Guimarães, Antonio Calixto Lima, José Américo Bordini do Amaral, Diva Correia, Ana Fátima Costa Pinto*

Supervisor editorial: *Marco Aurélio da Rocha Melo*
Revisora de texto: *Ana Fátima Costa Pinto*
Normalização bibliográfica: *Ana Fátima Costa Pinto*
Fotos da capa: *Roselayne Ferro Furtado*
Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

**1ª edição**
1ª impressão (2008)

**Todos os direitos reservados**
A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**
**Embrapa Agroindústria Tropical**

Produção de anticorpos policlonais anti-ricina: metodologia científica/ Roselayne Ferro Furtado... [et al.] – Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2008.

17 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 116).

ISSN 1677-1915

1. *Ricinus communis*. 2. Toxina. 3. Sorologia. I. Furtado, Roselayne Ferro. II. Guedes, Maria Izabel Florindo. III. Alves, Carlucio Roberto. IV. Dutra, Rosa Amália Fireman. V. Moreira, Ana Cristina de Oliveira Monteiro. VI. Série

CDD 633.85

© Embrapa 2008

# Autores

**Roselayne Ferro Furtado**
Bióloga, M. Sc. em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Pici, 60511-110, Fortaleza, CE, roselayne@cnpat.embrapa.br

**Maria Izabel Florindo Guedes**
Engenheira agrônoma, D. Sc., professora da UECE, Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, 60740-000, Fortaleza, CE, florinfg@terra.com.br

**Carlucio Roberto Alves**
Químico, D. Sc., professor da UECE, alvescr@yahoo.com.br

**Rosa Amália Fireman Dutra**
Engenheira elétrica, D. Sc., professora, UPE, Rua Arnóbio Marques, 310, Santo Amaro, Cidade Universitária, 50100-120, Recife, PE, rfiremandutra@yahoo.com.br

**Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira**
Farmacêutica, D. Sc., professora da UNIFOR, Av. Washington Soares, 1321, Edson Queiroz, 60810-431, Fortaleza, CE, acomoreira@unifor.br

# Apresentação

Constitui-se objetivo de inúmeros estudos no meio científico, o desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico de contaminantes químicos e biológicos em alimentos que tenham como características alta especificidade e sensibilidade.

Técnicas consagradas na detecção de substâncias e moléculas biológicas na área da Saúde e Ciências Exatas e da Terra, atualmente, são intensamente aplicadas também na área agrícola e têm demonstrado significativos resultados. Neste trabalho, os autores fazem uso de uma abordagem técnica e prática sobre a produção de anticorpos policlonais anti-ricina, visando subsidiar o desenvolvimento de futuros métodos de detecção dessa proteína, a partir de técnicas de imunologia em torta de mamona destinada à alimentação animal.

A Embrapa Agroindústria Tropical nesta publicação contribui com uma metodologia científica destinada a estudantes e pesquisadores envolvidos na valorização e agregação de valor da torta de mamona como ração, mais especificadamente, no desenvolvimento de métodos que atestem a qualidade desse co-produto do biodiesel.

*Vitor Hugo de Oliveira*
Chefe-Geral da Embrapa Agroindústria Tropical

# Sumário

Introdução ..... 9
Preparo de soluções..... 10
Preparo da amostra ..... 13
Imunização ..... 14
Purificação dos anticorpos anti-ricina ..... 15
Análise dos anticorpos produzidos ..... 15
Western blot..... 16
Referências ..... 17

# Produção de Anticorpos Policlonais Anti-Ricina: Metodologia Científica

*Roselayne Ferro Furtado*
*Maria Izabel Florindo Guedes*
*Carlucio Roberto Alves*
*Rosa Amália Fireman Dutra*
*Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira*

## Introdução

A torta da mamona tem elevado valor nutritivo, sendo rica em proteínas, fibras, minerais e gordura (BELTRÃO, 2003). Por apresentar essas características, ela tem potencial para ser utilizada como ração na pecuária. Porém, para ser empregada na alimentação animal precisa de um processo de destoxificação, para eliminar as substâncias contidas na semente com propriedades de toxicidade ou alergenicidade. Entre essas substâncias pode-se destacar a ricina, uma proteína inibidora de ribossomos (RIP) do tipo II, heterodimérica.

A ricina é constituída de enzima inibidora de ribossomo, com aproximadamente 32 kDa (cadeia A ou RTA), ligada por ponte dissulfeto a uma lecitina galactose específica, com aproximadamente 34 kDa (cadeia B ou RTB) (LORD et al., 1994). A toxicidade dessa proteína é amplamente conhecida. As doses letais mínimas de ricina injetadas em camundongos variam entre 5 a 10 $\mu$g/kg, em cães variam entre 1 a 1,75 $\mu$g/kg (FODSTAD et al., 1976). A ingestão em torno de cinco sementes de mamona pode ser letal para seres humanos (OLSNES, 2004). Embora o processo de destoxificação da torta de mamona seja considerado eficaz, recomenda-se uma análise rápida quanto à presença de ricina, que ateste a atoxicidade da torta a cada processamento, visto que o procedimento pode não ter sido satisfatoriamente realizado e quantidades mínimas da proteína são suficientes para conduzir animais a óbito.

Os métodos sorológicos ganham cada vez mais importância no meio científico por serem bastante sensíveis e específicos na detecção de contaminantes químicos e biológicos. Atualmente, sabe-se que os anticorpos são capazes de detectar uma molécula de um antígeno protéico dentre mais de 108 moléculas similares (JANEWAY et al., 2007). Anticorpos anti-ricina podem ser úteis no desenvolvimento de kit e em outros métodos sorológicos para detecção de ricina em torta de mamona submetida à destoxificação.

Nesta publicação são detalhadas informações para a produção dos anticorpos policlonais anti-ricina, obtidos a partir de imunização de coelho e análise de sensibilidade e especificidade por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e Western blot, respectivamente.

## Preparo de Soluções

### Solução de NaCl 0,15M

Pesar 8,77 g de NaCl em béquer de 50 mL e diluir em água destilada, lavando-se o béquer consecutivas vezes, transferindo-se a solução para balão volumétrico de 1.000 mL, até completar o volume. Armazenar à temperatura ambiente.

### Solução de glicina 0,1M e NaCl 0,15M pH 2,6

Pesar 7,51 g de glicina em béquer de 50 mL e diluir em água destilada, lavando-se o béquer consecutivas vezes, até o volume de cerca de 400 mL. Pesar 8,77 g de NaCl em béquer de 50 mL e diluir em água destilada lavando-se o béquer consecutivas vezes até o volume de cerca de 400 mL. Em um béquer com capacidade de 1.000 mL, adicionar as duas soluções de NaCl e glicina e colocar, lentamente, gotas de HCl 1M até que o pH de 2,6 seja alcançado. Transferir a solução para um balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume, se necessário. Armazenar à temperatura ambiente, por no máximo quatro dias.

### Solução de PBS (solução salina tamponada com fosfato)

Pesar em béquer de 100 mL, 8 g de NaCl, 0,2 g de $KH_2PO_4$, 1,1 g de $Na_2HPO_4.7H_2O$ e 0,2 g de KCl. Lavar o béquer consecutivas vezes com água destilada, transferindo-se o seu volume para um balão volumétrico de 1.000 mL. Armazenar sob refrigeração.

## Solução de PBS BSA 1%

Pesar 1 g de BSA em béquer de 50 mL e transferir a proteína diluída para balão volumétrico de 100 mL por meio de lavagens com PBS preparado conforme solução anterior. Distribuir alíquotas de 1mL e armazenar sob congelamento.

## Solução de peróxido de hidrogênio 30%

Em balão volumétrico de 100 mL, adicionar 30 mL de peróxido de hidrogênio P.A. e completar o volume para 100 mL com água destilada. Homogeneizar e transferir a solução para um frasco de vidro. Armazenar à temperatura ambiente.

## Solução de ácido sulfúrico 2,5N

Adicionar cuidadosamente 30 mL de ácido sulfúrico P.A. em 402 mL de água destilada. Acondicionar à temperatura ambiente, em frasco âmbar.

## Solução de PBS molico 5%

Pesar 5 g do leite molico em béquer de 50 mL e lavar o mesmo consecutivas vezes com PBS. Transferir e aferir o volume para balão volumétrico de 100 mL. A solução não deve ser estocada.

## Solução de PBS Tween 20 a 0,05%

Separar 1 L de PBS e adicionar 500 $\mu$L de Tween 20. Armazenar sobre refrigeração.

## Solução de Tris-HCl 0,1M

Pesar 1,21 g de Tris em béquer de 100 mL e diluir em 70 mL de água. Adicionar lentamente HCl 1M até que o pH 7,2 seja alcançado. Completar o volume do balão volumétrico com água destilada. Armazenar à temperatura ambiente.

## HCl 1M

Transferir 84 mL de ácido clorídrico, com o auxílio de uma proveta, para um balão volumétrico de 1.000 mL. O ácido clorídrico deve ser adicionado sobre a água, lentamente. Armazenar à temperatura ambiente.

## Tampão citrato fosfato com NaCl 0,5M

Pesar 4 g de ácido cítrico, 9,38 g de $Na_2HPO_4.7H_2O$ e 8,87 g de NaCl em béquer de 100 mL e transferir, com água destilada, o volume para balão volumétrico de 500 mL. Armazenar sob refrigeração.

## Tampão bicarbonato de sódio 0,1M com NaCl 0,5M

Pesar 8,401 g de bicarbonato de sódio e 17,75 g de NaCl, e diluir em 1 L de água. Ajustar o pH da solução para 8,3, com HCl 0,1M.

## Tampão acetato de sódio 0,1M com NaCl 0,5M

Pesar 8,203 g de acetato de sódio e diluir em 1 L de água. Ajustar o pH da solução para 4,0, com HCl 0,1M.

## Coluna de goma de guar (APPUKUTAN et al., 1977)

Pesar 2 g de goma de guar e dissolver em 6 mL de NaOH 3M e 0,6 mL de epicloridrina. Colocar em estufa a 40 ºC por 24 horas e, posteriormente, a 70 ºC por 12 horas. Fazer três lavagens da goma de guar com água destilada. Guardar a goma de guar sob refrigeração.

## Coluna de sepharose CL 4B

Pesar 1 g de sepharose CL 4B ativada com brometo de cianogênio e diluir em HCl 1mM. Esperar a decantação para descartar o sobrenadante da solução e adicionar 25 mg da ricina diluída em 5 mL do tampão bicarbonato de sódio contendo NaCl 0,5M a 4 ºC por 16 horas. Proceder o bloqueio com galactose 0,2M. Após esse procedimento, lavar a sepharose cinco vezes com tampão bicarbonato de sódio e descartá-lo. Adicionar 15 mL de solução de Tris-HCl 0,1M pH 8,0 e deixar descansar por 2 horas. Lavar o gel de sepharose três vezes, com tampão acetato pH 4,0 e três vezes com solução Tris-HCl 0,1M e NaCl 0,5M pH 8,0, alternando os tampões. Guardar a sepharose CL 4B sob refrigeração.

## Gel de poliacrilamida 12%

**Gel principal (main gel)**

Colocar 1,655 mL de água destilada em béquer de 10 mL. Adicionar 1,25 mL de Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 50 $\mu$L de lauril sulfato de sódio (SDS 10%), 2 mL de acrilamida bis (30%), 5 $\mu$L de temed e 43 $\mu$L de

persulfato de amônio (10%). Aguardar a polimerização do gel por 15 minutos.

**Gel de empacotamento (stacking gel)**
Colocar 1,84 mL de água destilada em béquer de 10 mL. Adicionar 0,315 mL de Tris-HCl 1,5M pH 6,8, 25 $\mu$L de lauril sulfato de sódio (SDS 10%), 0,325 mL de acrilamida bis (30%), 2,5 $\mu$L de temed e 12,5 $\mu$L de persulfato de amônio (10%). Aguardar a polimerização do gel por 15 minutos.

## Método de Bradford (BRADFORD, 1976)

Preparar diluições da proteína de interesse em água destilada nas proporções 1:2, 1:10, 1:100 e 1:1.000, em duplicata e no volume de 100 $\mu$L. A quantificação da proteína será realizada a partir de curva padrão de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL diluída nas proporções 1:2, 1:4, 1:10, 1:20 e 1:50, em água destilada, no volume de 100 $\mu$L. Adicionar 2,5 mL do reagente de Bradford em cada tubo e agitar. Fazer a leitura de cada tubo de ensaio em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 595 nm, dois minutos após colocar o reagente de Bradford e homogeneização dos tubos. Primeiramente, fazer a leitura do tubo em branco, sem a proteína. Determinar a equação da reta, no próprio equipamento, e obter a concentração da proteína em $\mu$g/100 $\mu$L.

# Preparo da Amostra

As sementes de mamona devem ser descascadas, trituradas e prensadas para a retirada do óleo. A fim de eliminar o óleo residual, a amostra deve ser colocada em hexano por 16 horas, em recipiente fechado, de preferência sob agitação e, no dia seguinte, o hexano deve ser retirado e a amostra deixada em capela de exaustão para eliminação total do solvente. Preparada a amostra, ela deve ser diluída em solução de NaCl 0,15M na proporção de 1:10, deixada sob agitação por 30 minutos e centrifugada a 4 ºC, 33.000 x g, por 20 minutos para separação do sobrenadante. O procedimento de centrifugação deve ser repetido, acrescentando-se NaCl 0,15M na proporção 1:2 e agitação por 30 minutos. Após preparação da amostra, ela deve ser colocada em coluna de

afinidade de goma de guar e deixada em repouso por uma hora. Para a retirada das moléculas sem afinidade, deve-se proceder, em seguida, a lavagem da coluna com NaCl 0,15M e com glicina 0,1M e NaCl 0,15M pH 2,6 para eluição das proteínas ligantes na coluna (ricina e aglutinina), em um fluxo de eluição de, aproximadamente, 0,5 mL/min. As proteínas eluídas, tanto com NaCl quanto com a glicina, devem ser coletadas no volume de 2 mL, até a absorbância do espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm ser nula. O material eluído com glicina, na sua totalidade ou apenas os picos da cromatografia, devem ser dialisados contra água e, posteriormente, liofilizados e armazenados à temperatura ambiente ou em freezer (-20 ºC), dentro de frascos bem vedados para evitar a entrada de umidade.

## Imunização

A metodologia é recomendada para produção de anticorpos policlonais em coelhos da raça Nova Zelândia, com aproximadamente seis meses de idade. Para a imunização, 93 $\mu$g do material liofilizado solubilizado em NaCl 0,15M (concentração de proteína definida de acordo com o método de Bradford (1976)) deve ser corrido em eletroforese de gel de poliacrilamida 12%, em condições desnaturantes, sob amperagem constante de 20 mA. O gel deve ser deixado em água destilada por pelo menos três dias para eliminação da solução descorante. As bandas correspondentes a 32 e 34 kDa devem ser recortadas do gel e maceradas em almofariz de porcelana e pistilo. O material macerado deve ser diluído em NaCl 0,15M; quanto menor o volume da solução para ser injetado em coelho melhor, preferencialmente, não ultrapassar 1 mL. Os animais devem receber a imunização pela via subcutânea (0,8 mL) e aplicados 0,2 $\mu$L nos lados esquerdo e direito dos ombros e nas pernas traseiras. Como controle do ensaio, antes da primeira inoculação, uma sangria de cerca de 10 mL para a coleta do soro pré-imune é recomendada. As sangrias do animal serão realizadas a cada sete dias para a coleta do soro e, três semanas após a primeira imunização, um reforço com a mesma quantidade de proteína da imunização inicial deve ser aplicado. A sangria será conduzida até o 42º dia após a imunização do animal. Após cada sangria, o material coletado será coagulado por

uma hora e centrifugado a 2.500 x g, por 20 minutos, para retirada das hemácias remanescentes. Os soros obtidos serão então armazenados à temperatura de congelamento, até a sua purificação.

## Purificação dos Anticorpos Anti-Ricina

Para a purificação dos anticorpos é recomendada a aquisição de sepharose 4B, ativada com brometo de cianogênio. Após a preparação da coluna, ela deve ser equilibrada (pelo menos cinco vezes o volume da coluna) com tampão Tris 0,1M pH 8,5 acrescido de galactose 0,2M. Os anticorpos serão eluídos com glicina 0,1M e NaCl 0,5M, pH 2,6. As frações eluídas com os anticorpos devem ser coletadas em tubos de ensaio pequenos com cerca de 3 mL até a absorbância no comprimento de onda de 280 nm ser nula. O fluxo de eluição deve ser de 0,5 mL/minuto e o volume das frações de 2 mL. Os anticorpos purificados devem ser dialisados contra água, liofilizados e congelados a -20 ºC. Para períodos de armazenamento maiores que seis meses deve-se adicionar glicerol 0,2 %.

## Análise dos Anticorpos Produzidos

### ELISA

Para este ensaio as placas de 96 poços destinadas a ELISA serão sensibilizadas com 0,3 $\mu$g do antígeno (ricina)/poço a 4 ºC por 16 horas e lavadas três vezes com solução de PBS-Tween 0,05%. O bloqueio dos poços deve ser realizado com solução de PBS-BSA (albumina sérica bovina) (1%) a 4 ºC por 16 horas seguido de lavagens com PBS-Tween. Os anticorpos primários, armazenados serão diluídos, seriadamente, na razão 2, a partir de uma diluição inicial de 1:1.000 e deixados em repouso "overnight" a 4 ºC. Após as lavagens, os anticorpos secundários serão diluídos 1:10.000 e distribuídos em cada poço 100 $\mu$L. A placa será deixada em repouso por 16 horas a 4 ºC e, posteriormente, lavada com PBS-Tween 0,05%. A revelação da reação deve ser conduzida com solução cromogênica de uma pastilha de ortofenilenodiamina (OPD), 25 $\mu$L de tampão citrato fosfato e 8,1 $\mu$L de peróxido de hidrogênio a 30%. Para paralisar a reação, recomenda-se a adição de 50 $\mu$L

de ácido sulfúrico 2,5 N em cada poço. A leitura das absorbâncias deve ser realizada a 492 nm. Para a determinação do ponto de corte (*cut-off*) ou limiar de reatividade da reação, observar a média do limiar dos valores de absorbância verificados para o controle e somar três vezes o desvio padrão dos mesmos. A reação será considerada positiva, se a absorbância encontrada for maior do que o valor do ponto de corte.

## Western Blot

Para o Western blot, é recomendada a utilização de membrana de nitrocelulose e gel de poliacrilamida a 12% em condições nativas. É aconselhável também que se tenham dois géis de poliacrilamida, um para ser utilizado no Western blot e o outro para ser corado em solução de Comassie e servir de referência no final. No gel de poliacrilamida devem ser corridas amostras de extrato bruto de mamona. A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose umedecida com tampão de transferência será realizada por duas horas, aplicando-se 38 mA e 38 V. A parte de incubação da membrana com as proteínas do bloqueio, anticorpos primários e secundários deve ser realizada em estufa a 37 ºC. O bloqueio pode ser feito em placas de Petri com PBS adicionado de leite desnatado 5%, virando a membrana de nitrocelulose a cada 15 min por um período de uma hora. Os anticorpos primários serão diluídos em PBS molico na proporção 1:100 e colocados sob agitação branda à temperatura de 37 ºC, por duas horas. A seguir, procede-se a lavagem com PBS, virando-se a membrana a cada 15 minutos, por um período de uma hora. Após descarte da solução anterior, os anticorpos secundários conjugados à peroxidase serão diluídos 1:500 e colocados sob agitação branda a temperatura de 37 ºC por duas horas. Quatro lavagens de 15 minutos em placa de Petri são recomendadas, as duas primeiras com PBS molico 5%, a terceira somente com PBS e a quarta lavagem com água destilada. A revelação da reação pode ser feita em Placa de Petri com 100 $\mu$L de cloreto de níquel (80 mg/mL), 100 $\mu$L de DAB (20 mg/mL) e 7,5 $\mu$L de peróxido de hidrogênio 30% diluídos em 20 mL de Tris -HCl 0,1M. Verificar se as bandas que aparecem na membrana de nitrocelulose correspondem às bandas da ricina no gel de poliacrilamida.

# Referências


APPUKUTTAN, P. S.; SUROLLA, A; BACHHAWAT, B. K. Isolation of two galactose-binding proteins from *Ricinus communis* by affinity chromatography. **Indian Journal Biochemistry Biophysics**, v. 14, n.4, p.382-384, 1977.

BELTRÃO, N.E.M. **Informações sobre o biodiesel, em especial feito com o óleo de mamona**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 3p. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 177).

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

FODSTAD, O.; OLSNES, S.; PIHI, A. Toxicity, distribution and elimination of the cancerostatic lectins abrin and ricin after parenteral injection into mice. **British Journal of Cancer**, v. 34, p. 418-425, 1976.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.;SHLMCHIK, M.J. **Imunobiologia**: o sistema imunológico na saúde e na doença. Porto Alegre: Artmed, 2007. 848p.

LORD, J.M.; ROBERTS, L.M.; ROBERTUS, J.D. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. **The Federation of American Societies for Experimental-FASEB**, v. 8, p.201-208, 1994.

OLSNES, S. The history of ricin, abrin, and related toxins. **Toxicon**, v.44, p.361-370, 2004.

Embrapa

Agroindústria Tropical

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

BRASIL
UM PAÍS DE TODOS
GOVERNO FEDERAL