

Restauración en el Inmunoblotting de proteínas de *Neisseria meningitidis* dañadas por calor y agentes reductores

Eric Estrada, Rolando Ochoa, Xenia Ferriol, Ana García, Juan Carlos Martínez, Franklin Sotolongo.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: eestrada@finlay.edu.cu

En este trabajo se utilizaron cinco detergentes para restaurar las proteínas de membrana externas (PME) del meningococo dañadas por el efecto del calor y de agentes reductores utilizados en el Inmunoblotting. La acción de los detergentes fue evaluada en la solución de lavado, en el diluyente de la muestra y del conjugado. Las bandas de proteínas, reconocidas por la IgG del suero, fueron identificadas usando un conjugado anti IgG humana peroxidasa. Los antígenos reconocidos por el control positivo se corresponden con las proteínas P1, P3, P4 y P5 atendiendo a su peso molecular. Además, fueron reconocidas bandas de 80, 70, 24 kDa y otra con peso mayor a 150 kDa. En general el reconocimiento de todas las PME, excepto esta última de alto peso molecular (APM), se vieron favorecidas con la utilización del Tween 20, con el que se logró un incremento del número y la intensidad de las bandas así como la disminución de los fondos con respecto al resto de detergentes evaluados (Empigen BB, Triton X-100, Nonidet NP-40 y CHAPS). El reconocimiento de la proteína de APM (>150 kDa) se vio afectado por la presencia de detergente como el Tween 20 y Empigen BB. Los lavados con Tween 20 constituyeron los pasos más importantes en la *renaturalización* de los sitios de unión de la IgG a las PME.

Palabras claves: Inmunoblotting, *Neisseria meningitidis*, detergentes, proteínas de membrana externa, renaturalización, proteínas desnaturalizadas.

Introducción

El estudio de la respuesta inmune humoral en convalecientes de infecciones con *Neisseria meningitidis* (*Nm*) o después de la aplicación de candidatos vacunales ha estado centrado en la seroconversión, a través de la determinación de anticuerpos específicos por el método de ELISA, y la Prueba de Actividad Bactericida (PAB) (1-4). Para lograr una mejor comprensión de los factores que intervienen en la respuesta inmunológica frente a este preparado, se hace necesario el estudio de la inmunogenicidad de sus componentes.

El inmunoblotting (IB) es un procedimiento técnico que es utilizado para evaluar la inmunogenicidad de los componentes proteicos de preparados vacunales contra la *Nm* (5). Este procedimiento, por lo general, se utiliza para analizar proteínas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS) (SDS-PAGE) después de haber sometido a los antígenos a la acción desnaturalizante de agentes reductores (dithiothreitol o 2-mercaptoethanol) y del calor.

En el afán de rescatar epítopes conformacionales perdidos durante el proceso de IB se han evaluado diferentes modificaciones al método tales como, diferentes agentes de bloqueo y tiempos más prolongados de incubaciones, tratamiento con urea, transferencias en amortiguadores alcalinos, así como el uso de detergente (6). En nuestro trabajo nos propusimos

evaluar la capacidad restauradora de cinco detergentes durante los pasos críticos de esta técnica.

Materiales y Métodos

Detergentes

Se evaluaron los siguientes detergentes; Tween 20 (T-20) (SIGMA, MO, USA), CHAPS (SIGMA, USA), Nonidet P-40 (NP-40)(BDH, England), Triton X-100 (TX-100) (Fluka, Switzerland) y Empigen BB (EBB) (Albrighth and Wilson, UK).

SDS-PAGE e Inmunoblotting

Las proteínas de membrana externa (PME), de *N. meningitidis* serogrupo B, cepa Cu385/83 (B:4:P1.15), fueron hervidas durante 5 min, en una solución que contenía SDS y 2-mercaptoetanol, y separadas en geles de 12, 5% de 9 x 6 cm con 0,75 mm de espesor (7). En cada gel se colocó un patrón de peso molecular a partir del cual se calcularon los pesos moleculares relativos de las (PME). Se realizó la electrotransferencia a las membranas de Nitrocelulosa (NC) (0,45 μ m) durante 2 h a 0,3 A, con amortiguador de transferencia frío (4 °C) (pH 8,3) (8).

El IB se realizó a temperatura del laboratorio (entre 20 y 25 °C) con leche descremada al 3% y 1,5% en Solución Salina Tamponada con Fosfato 0,15 M, pH 7,2 (SSTF) como agente bloqueador y diluyente del control positivo y el conjugado respectivamente. Se utilizó como control positivo (C+) una mezcla de sueros de donantes, que recibieron dos dosis de la vacuna antimeningocócica

cubana VA-MENGOC-BC® con los que se obtuvieron altos títulos de IgG anti-PME. El C+ y el conjugado se incubaron durante 16-20 h en presencia de los diferentes detergentes a 0,05 y 0,1% v/v. Las tiras se lavaron cinco veces con SSTF en dos combinaciones (con y sin detergente). La IgG específica fue determinada con un conjugado anti IgG humana peroxidasa (1:1000).

Figura 1: SDS PAGE de Proteínas de Membrana Externa. Peso Molecular (PM) (Pharmacia Biotech, Low Molecular Weight Calibration Kit for Electrophoresis Cat. 17-0446) con las siguientes proteínas (pesos moleculares): fosfolipasa b (94000 kDa), albúmina (67000 kDa), Ovalbúmina (43000 kDa), Anhidrasa Carbónica (30000 kDa), Inhibidor Tripsina (20100 kDa) y α Lactoalbúmina (14400 kDa). Antígeno de serotipo (STA) de la Neisseria meningitidis (cepa 385/83, B:4:P1.15).

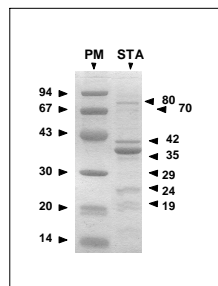
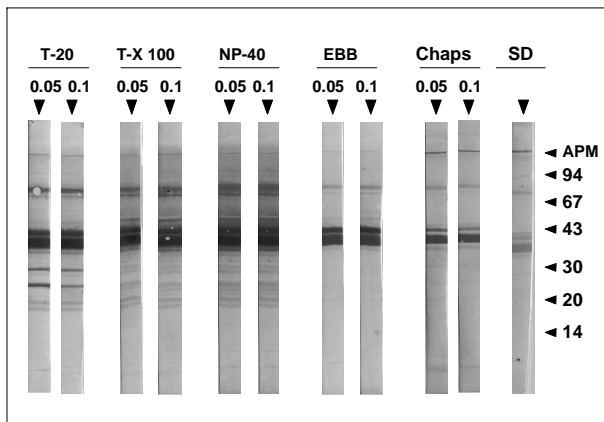


Figura 2. Inmunoblotting que muestra la influencia de los detergentes utilizados y las diferencias entre estos para la renaturalización de los sitios de unión de la IgG a las PME de la Nm (B:4:P1.15). Se utilizaron dos concentraciones (0,05 y 0,1% v/v). En todos los casos se incubó y se lavó con el detergente correspondiente. Tween-20 (T-20), Triton X-100 (TX-100), Nonidet (NP-40), Empigen BB (EBB) y Chaps (Chaps) y sin detergente (SD).



Resultados y Discusión

En la tinción con Azul Brillante de Coomassie de la corrida electroforética realizada al antígeno de serotipo de la cepa vacunal (Cu 385/83, B:4:P1,15) se distinguen, de arriba hacia abajo, bandas de 80, 70, 42, 38, 35, 29, 24 kDa y 20 (Figura 1). Las proteínas de 42, 38, 35 kDa por sus pesos moleculares aproximados coinciden con el señalado para las proteínas de clase 1, 3, 4 (P1, P3, P4) descritas en la literatura (9,10).

Algunos autores reportan las proteínas, entre los que se encuentran: i) el tratamiento con urea (11), diferentes condiciones de bloqueo o alargando el tiempo de este paso (12), ii) transferencias en amortiguadores alcalinos (13) iii) la utilización de detergentes en los pasos de transferencia y en la incubación de las muestras (14). En nuestro laboratorio se evaluó la utilización de cinco detergentes haciendo diferentes combinaciones en los lavados y en la solución diluyente de las muestras de sueros y el conjugado.

Teniendo en cuenta la aparición, definición e intensidad de las bandas y el fondo de las tiras de NC, entre los cinco detergentes probados, los mejores resultados se obtuvieron con el Tween 20 (Figura 2). En general todos los antígenos (80, 70, 42, 38 y 29 kDa), excepto el de APM, se vieron favorecidos con la utilización del Tween 20 y además aparecieron bandas de 24, 19 y

17 kDa que no fueron detectadas sin el uso de este o al utilizar otros como el EBB y el Chaps. Se sugiere que la liberación de algunas interacciones débiles, establecidas entre las proteínas y el filtro de NC, hacen más flexible las cadenas de las proteínas permitiendo su renaturalización (15).

El reconocimiento del antígeno APM (>150 kDa) se vio afectado por la presencia de detergentes fuertes y apareció con una mayor intensidad cuando se usó el detergente débil Chaps (Figura 2). La máxima intensidad de esta última proteína se logró cuando no se usó detergente.

El EBB, que Wedege y col (1988) (10) describen como uno de los que logran mayor restablecimiento proteico, en nuestro estudio no resultó ser un buen restaurador, si lo comparamos con el incremento de las intensidades que se logran con los demás detergentes y en especial el Tween 20. Al analizar los resultados de las dos variantes de lavados, con y sin detergente, se observó que es de gran utilidad su uso y en especial el Tween 20 (Figura 3). Este

resultado le imprime la mayor importancia al uso de este en los pasos de lavado, ya que al evaluar su introducción en la solución diluyente de las muestras de sueros y del conjugado no se observó un gran incremento de la intensidad de las bandas. Por otro lado, cuando se lavó con Tween 20 y se incubó con los otros, como el EBB, (Figura 4) aparecieron bandas que no se observaban cuando se lavaba con el mismo detergente de la incubación, reafirmando que el Tween 20 es un detergente necesario en los pasos de lavado, al menos para nuestras condiciones de trabajo. Es posible que la causa principal de las diferencias de resultados, con relación a los encontrados por Wedege y Col. (1988), cuando compararon 14 detergentes, radique precisamente en que no se utilizaron los detergentes en los pasos de lavados. No obstante, no se puede descartar que PME de cepas diferentes, necesiten distintas condiciones para lograr una óptima renaturalización que permitan el mayor reconocimiento posible por parte de los anticuerpos séricos.

Figura 3. Inmunoblotting que muestra la influencia del Tween 20 en los diferentes pasos del ensayo. Incubación de las Muestras (M), Incubación del conjugado (C), en ambas incubaciones (MC) y sin detergentes (SD). Los lavados se realizaron sin detergente (I) y con Tween 20 al 0,1% v/v (II). Se utilizaron, para la incubación en cada paso, dos concentraciones del detergente (0.05 v 0.1% v/v).

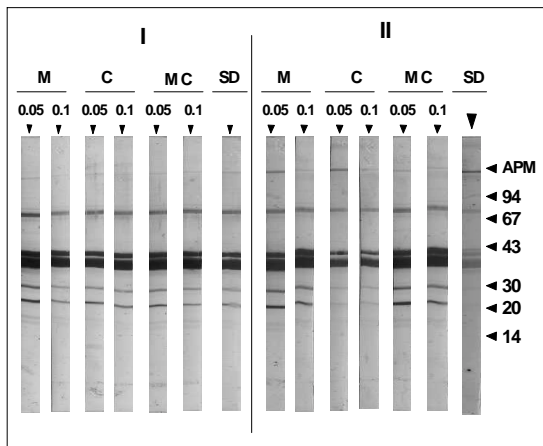
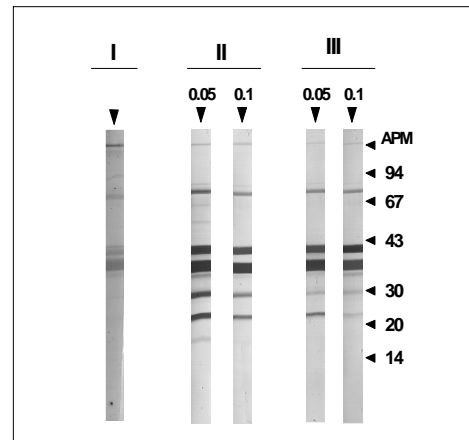


Figura 4. Inmunoblotting que muestra los resultados de la incubación con dos detergentes diferentes (Tween 20 (I) y Empigen BB (II). Cada detergente se utilizó en dos concentraciones (0,05 y 0,1%, v/v. Todos los lavados, en ambas variantes, se realizaron con Tween 20 al 0,1% v/v en solución salina



El reconocimiento, aunque pobre, en las tiras de NC que no fueron tratadas con detergentes puede deberse posiblemente a: i) la eliminación del SDS de la proteína durante el paso de bloqueo después

de la transferencia, permitiendo una discreta renaturalización y ii) la presencia de algunos epítopes no conformacionales.

Es conocida la necesidad de emplear soluciones bloqueadoras de espacios libres en las fases sólidas durante el desarrollo de inmunoensayos y en particular su empleo obligado en el IB (6). Varios autores han reportado que la utilización de detergentes, como el NP-40 y el TX-100, durante el paso del bloqueo causa la pérdida de entre el 80 y el 90% de las proteínas transferidas (6). Con el empleo del Tween 20 se han logrado mejores resultados, pero existen también reportes de que concentraciones de 0,05% de Tween 20 en el bloqueo elimina hasta un 95% de determinadas proteínas (16). De acuerdo con nuestros resultados creemos que la solución bloqueadora sin detergente, como se usó en nuestro trabajo, favorece a un mejor anclaje de las proteínas a la fase sólida pues no se encontró pérdida de proteínas con el uso de concentraciones altas de Tween 20 (0,1%) en los pasos restantes del ensayo. La aplicación de este detergente, en las soluciones de lavados, además de lograr renaturalizar considerablemente los sitios de unión de la IgG sérica a las PME, disminuyó los fondos con respecto a otros detergentes como el NP-40 y el TX-100.

Para nuestras condiciones el valor del detergente en la incubación de las muestras de suero, aunque existe, es bajo si tenemos en cuenta que sólo aparece un débil incremento de la intensidad. En este sentido parece tener mayor importancia la variante en que solamente se incubó el suero con 0,05% (Figura 3). La acción de concentraciones mayores, durante la incubación de las muestras (16 a 20 h), podría desprender pequeñas cantidades de las proteínas transferidas. Esto no ocurre con los lavados al parecer porque el tiempo de exposición al detergente en estos pasos es corto, lo que quizás permita sólo la liberación de interacciones débiles, que se establecen entre las proteínas y la NC.

Referencias

1. Sierra GV, Campa HC, Valcárcel N. M, García IL, Izquierdo PL Sotolongo P. F, *et al.* Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination result in Cuba. NIPH (Natl. Inst. Public Health) Ann (Oslo) 1991; 14:195-207.
2. Fernández JA, Malberty JA, Sotolongo FT, Bacallao J, Camaraza MA, Nerey M, *et al.* Cinética de la respuesta de anticuerpos bactericidas y de la IgG específica en individuos vacunados con VA-

El detergente en la incubación del conjugado produjo una disminución muy discreta en la intensidad de las bandas que podría estar explicado por dos razones: i) la acción del detergente pudiera ser excesiva después de 16 horas de incubación en la muestra, lo que contribuiría a remover los complejos proteínas-IgG sérica, formados en la superficie de la NC o ii) el Tween 20 podría interferir el reconocimiento por la IgG sérica del conjugado.

Está reportado que existe una buena correlación entre los altos títulos de anticuerpos bactericidas y el reconocimiento a las proteínas de clase 1 en el IB (3, 17), independientemente del uso de los detergentes. Creemos que con el uso del Tween 20, al restaurar epítopes conformacionales, se podría lograr una mejor correlación, no restringida a las proteínas de clase 1. En este sentido se debe explorar, utilizando nuestras condiciones, la funcionalidad de anticuerpos contra otras proteínas que quizás tengan papel protector contra la *N. meningitidis*.

El estudio de sueros de vacunados, a través de este ensayo, contribuirá a conocer más sobre la respuesta que se produce frente a este preparado, mediante la identificación de la especificidad del reconocimiento de cada antígeno presente en el mismo. El estudio tiene en este sentido dos limitaciones: en primer lugar --como se ha señalado anteriormente--, los antígenos vacunales pueden estar presentados de una forma diferente a la expresada en la membrana de la bacteria, tanto estructuralmente como por la interacción que existe entre los mismos, y en segundo lugar, no brinda información sobre la funcionalidad de los anticuerpos detectados. No obstante, este tipo de técnica contribuye de una forma particular a conocer la especificidad de la respuesta y la inmunodominancia de los diferentes antígenos vacunales

MENGOC-BC®. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1997; 10:38-45.

3. van der Voort ER, van Dijken H, Kuipers B, van der Biezen J, van der Ley P, Meylis J, Claassen I, Poolman J. Human B- and T-cell responses after immunization with a hexavalent PorA meningococcal outer membrane vesicle vaccine. *Infect Immun.* 1997, 65:5184-90.
4. Milagres LG, Gorla MCA, Sacchi CT, Rodrigues MM. Specificity of bactericidal antibody response to serogroup B meningococcal strains in brazilian

- children after immunization with an outer membrane vaccine. *Infect Immun* 1998; 66:4755-61.
5. Wedege E, Frhølm LO. Human antibody response to a group B serotype 2a meningococcal vaccine determined by immunoblotting. *Infect Immun* 1986; 51:571-578.
 6. Stott DI. Immunoblotting and dot blotting. *J Immunol Meth* 1989; 119:153-187.
 7. Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
 8. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76:4350-4356.
 9. Tsai Ch-M, Frasch CE, Mocca LF. Five structural classes of membrane proteins in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol*. 1981; 146:69-78.
 10. Frasch CE, Gotschlich EC. An outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* group B responsible for serotype specificity. *J Exp Med* 1974;140:87-102.
 11. Erickson PF, Minier LN, Lasher RS. Quantitative electrophoretic transfer of polypeptides from SDS polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: a method for their re-use in immunoautoradiographic detection of antigens. *J Immunol Methods* 1982; 51:241-245.
 12. Petit C, Sauron ME, Gilbert M, Theze J. Direct detection of idiotypic determinants on blotted monoclonal antibodies. *Ann Immunol*. 1982; 133D:77-81.
 13. Hauri HP, Bucher K. Immunoblotting with monoclonal antibodies: Importance of blocking solutions. *Anal Biochem* 1986;159:386-391.
 14. Wedege E K, Bryn K, Frhølm LO. Restoration of antibody binding to blotted meningococcal outer membrane proteins using various detergents. *J Immunol Methods* 1988; 113:51-59.
 15. Flanagan SD, Yost B. Calmodulin-binding proteins: visualization by ¹²⁵I-Calmodulin overlay on blots quenched with Tween 20 or bovine serum albumin poly(ethylene oxide). *Anal Biochem* 1984; 140:510-516.
 16. Farrah SR, Shah DO, Ingram LO. Effects of chaotropic and antichaotropic agents on elution of poliovirus adsorbed on membrane filters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; 78:1229-1233.
 17. Lin W, Kasamatsu H. On the electrotransfer of polypeptides from gels to nitrocellulose membranes. *Anal Biochem* 1983; 128: 302-307.
 18. Hoffman WL, Jump AA. Tween 20 removes antibodies and other proteins from nitrocellulose. *J Immunol Meth* 1986; 94:191-198.
 19. Wedege E, Michaelsen TE. Human immunoglobulin G subclass immune response to outer membrane antigens in meningococcal group B Vaccine. *J Clin Microbiol*. 1987; 25:1349-1355.

Restoration in Immunoblotting of *Neisseria meningitidis* proteins denatured by reducing agents and heat.

Abstract

Five different detergents for restoration of IgG antibody binding were studied in the washing steps and in the buffer solution used for the dilution of the conjugate and samples. Binding of human serum IgG antibodies to outer membrane protein (OMP) was detected with class-specific peroxidase-conjugated human antibodies. The positive control reacted with those proteins whose molecular weight corresponded approximately to P1, P3, P4 and P5. Proteins of 80 kDa, 70 kDa and 24 kDa and another protein of >150 kDa were also recognized. Our studies indicated that Tween 20 was the best detergent for restoration of OMP antigenicity, except for the 150 kDa protein. Tween 20 achieved a greater number and intensity of bands and a lower background with respect to Empigen BB, Triton X-100, Nonidet NP-40 and CHAPS. The use of detergents affected the antigenicity of the 150 kDa protein. Washing with Tween 20 were the most important steps for restoration of IgG antibody binding sites of heat-denatured OMPs.

Key words: Immunoblotting, *Neisseria meningitidis*, detergents, outer membrane proteins, renaturation, denatured proteins.