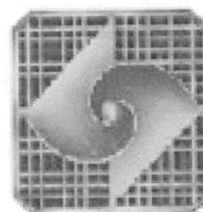


056830

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



“ELIMINACIÓN *IN VITRO* DE *XYLELLA FASTIDIOSA* UTILIZANDO
BACTERIOFAGOS, FRAGMENTOS DE ANTICUERPO Y
PÉPTIDOS LÍTICOS”

Tesis Profesional

Que para obtener el Título de:

BIOLOGO

Presenta:

Sharon Elisa María Silva Valdés

Ex 5056830 (ej2)

Ensenada, Baja California, Septiembre de 2008.

DEPARTAMENTO DE INFORMACION
ACADEMICA U.A.B.C.
CAMPUS ENSENADA

056830

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

ELIMINACIÓN *IN VITRO* DE *XYLELLA FASTIDIOSA* UTILIZANDO
BACTERIOFAGOS, FRAGMENTOS DE ANTICUERPO Y PÉPTIDOS LÍTICOS

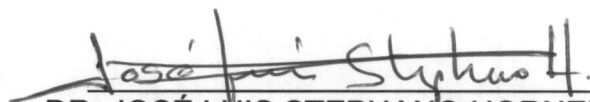
TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA:

SHARON ELISA MARÍA SILVA VALDÉS

APROBADO POR:

ADQUIRIDO por	DONACION
Fecha de Ingreso	00 NOV 2008
REG <u>TT</u>	056830
CLASIFIC <u>SB608 .G7</u>	CAMPUS ENSENADA UABC
NOTACION <u>555</u>	
No EJECS <u>2008</u>	
LJEMPLAP <u>2</u>	


DR. JOSÉ LUIS STEPHANO HORNEDO
Presidente del Jurado


DRA. AMELIA PORTILLO LÓPEZ
Secretario

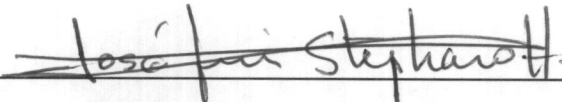

M.C. MIGUEL HUMBERTO CARRILLO
MENDÍVIL
1er. Vocal

Resumen de la tesis de Sharon Elisa María Silva Valdés presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología.
Ensenada Baja California, septiembre de 2008.

ELIMINACIÓN *IN VITRO* DE *XYLELLA FASTIDIOSA* UTILIZANDO BACTERIÓFAGOS, FRAGMENTOS DE ANTICUERPO Y PÉPTIDOS LÍTICOS.

La enfermedad de Pierce provocada por la bacteria *Xylella fastidiosa*, esta presente en la región vitivinícola de Ensenada, B. C., y es en esta región donde se produce el 90 % de los vinos finos en México. La bacteria obstruye los conductos del xilema de la planta y provoca estrés hídrico lo cual se traduce en baja producción de frutos, o frutos deshidratados que no pueden ser útiles para la producción del vino, además las plantas pueden morir de una temporada a otra. Las pérdidas se calculan cada año en 7% de toda el área cultivada en el estado. Dado que no se aplica ningún tratamiento que elimine la bacteria de la planta o del vector que la transmite se uso para eliminar a *X. fastidiosa* un fragmento de anticuerpo (scFv) unido al péptido lítico cecropin P1 por tecnología de ADN recombinante y producido por despliegue en fagos filamentosos y en forma soluble en *P. pastoris*. Se obtuvo que la concentración de los fagos scFv-cP1 que elimino totalmente *in vitro* la bacteria fue de 3.68×10^5 fagos/célula en un tiempo de 24 horas. Se determino que se requieren todos los componentes fago-scFv-cP1 para actuar sobre la bacteria. El scFv-cP1 soluble solo mostró inhibición pero no fue eliminada la bacteria. Esta estrategia tiene potencial para aplicarse en plantas enfermas con Pierce y permitir que aumente la productividad de estas.

Resumen aprobado por:



Dr. José Luis Stephano Hornedo

Presidente del Jurado

Agradecimiento

A mis papas Beatriz y Marte, y a mis hermanas Sarah, Sigrid y Samantha, por darme todo su apoyo incondicional y por comprender por que me tarde tanto.

A Jorge Arámburo, por darme buenos consejos y acompañarme en mi formación de bióloga.

A todos mis compañeros del Laboratorio "Meredith Gould" que he tenido, principalmente a José Echánove, Oscar Zavala, Jeanneth Pablo, Citlalli Harris, Paulo Álvarez, Manuel Aguilar, Paulina Gaspar, Osmín Torres, Iván Ortiz, Jando Carballo, Sebastian Gómez, por enseñarme a trabajar en equipo, por compartir la experiencia de aprender y por ser parte de una de las etapas más importantes de mi formación. También a Carolina Mendoza y Liss Sánchez por ser buenas compañeras.

A todos mis compañeros de generación 1997-2003.

A mis compañeros del curso de Despliegue en fagos filamentos del verano del 2002, por hacer posible el inicio de esta investigación.

A mis amigas biólogas Elizabeth Ortiz, Carmen Pérez, Paola Batta, y también a Guille Ortiz por contagiarme su entusiasmo.

A Tania, Dinorah, Cuquis y Ricardo (Vale) por darme ánimos.

A todos mis profesores, y a los técnicos y secretarias de la Facultad de Ciencias.

A mis sinodales Amelia Portillo y Miguel Carrillo, por su disposición y sus críticas constructivas en la redacción de esta tesis.

A Manuel Ornelas, por echarnos la mano en el laboratorio.

A la UABC por su apoyo financiero en el primer año de trabajo de este proyecto, la beca 2006 y por el espacio físico otorgado.

A la Fundación Produce por el apoyo financiero que han dado al proyecto del combate a la Enfermedad de Pierce desde 2004 hasta la fecha y haber hecho posible esta investigación.

Al profesor Stephano, amigo y mentor, gracias a usted y a Meredith por darme valiosas y generosas enseñanzas y por ser excelentes maestros. Sin preguntarse si era buena o no me enseñaron a trabajar en su laboratorio el cual forjaron con incansable trabajo, trayendo equipo donado, buscando apoyo financiero, dando de su propio bolsillo. Me dieron el ejemplo y me indicaron el camino a seguir, con sus criticas constructivas y fomentando la discusión. Gracias por mostrarnos lo que es la ciencia.

*A Meredith Gould
(1940-2006)*

Por dar de su tiempo, por su sencillez y por nunca estar cansada

Índice

Introducción.....	1
Antecedentes.....	4
Hipótesis y Objetivos.....	8
Metodología	
1. Cultivo de Microorganismos	
1.1. Confirmación de cultivos de cepas de <i>Xylella fastidiosa</i>	9
1.2. Cultivo de bacterias utilizadas como control.....	11
1.3. Producción de ADN plasmídico en <i>E.coli</i>	11
2. Clonación del ADN del fragmento variable de cadena sencilla (scFv) anti-X. <i>fastidiosa</i> en <i>Pichia pastoris</i> en el vector plasmídico pPICZ α A.	
2.1. Amplificación del fragmento de ADN recombinante scFv.....	12
2.2. Clonación del fragmento de ADN del scFv en pCR [®] 2.1-TOPO [®]	14
2.3. Digestión Doble con EcoRI y NotI.....	16
2.4. Ligación del fragmento de ADN del scFv en el vector pPICZ α A.....	16
2.5. Transformación de <i>E. coli</i> TOP10F' por método químico.	19
2.6. Verificación del marco de lectura del fragmento de ADN scFv en el vector pPICZ α A por secuenciación.....	19
2.7. Integración del fragmento de ADN del scFv en <i>P. pastoris</i> .	
2.7.1. Preparación de células competentes de <i>P. pastoris</i>	20
2.7.2. Linearización del plásmido pPICZ α A-ScFv.....	20
2.7.3. Transformación en <i>P. pastoris</i> con plásmido pPICZ α A-scFv.....	21
2.7.4. Confirmación por PCR de clones de <i>P. pastoris</i> transformadas.....	21
3. Expresión de scFv en <i>E. coli</i> y en <i>P. pastoris</i> .	
3.1. Expresión de scFv anti-X. <i>fastidiosa</i> en <i>E. coli</i>	23
3.2. Expresión de scFv anti-X. <i>fastidiosa</i> en <i>P. pastoris</i>	25
3.3. Purificación de proteínas recombinantes por Cromatografía de Afinidad Metálica al Níquel.....	26
4. Acoplamiento químico del scFv al péptido lítico.....	27
4.1. Ensayo preeliminar del efecto del acoplado químico scFv-cP1 en <i>X. fastidiosa</i>	27

5. Construcción del híbrido scFv-CP1 y su expresión en fagos filamentosos.	
5.1.1. Amplificación del fragmento de ADN cecropin P1 (cP1) con sitios SpeI y SfiI.....	28
5.1.2. Digestión enzimática de los fragmentos de ADN cP1 amplificado y scFv.....	29
5.1.3. Ligación de los fragmentos de ADN scFv y cP1.....	30
5.1.4. Amplificación por PCR del producto de ligación scFv-cP1.....	30
5.1.5. Clonación del fragmento de ADN scFv-cP1 en vector pcDNA 3.1/NT-GFP TOPO.....	31
5.2. Clonación del scFv-CP1 en pComb3x y su expresión en fagos filamentosos.	
5.2.1. Digestión del pcDNA 3.1/NT-GFP TOPO-scFv-cP1 y pComb3x-stuffer.....	32
5.2.2. Ligación del fragmento de ADN scFv-CP1 y vector pComb3x digeridos.....	32
5.2.3. Transformación en <i>E. coli</i> XL1Blue y expresión en fago filamentoso.....	33
5.2.4. Verificación de la inserción del fragmento de ADN scFv-cP1 en el vector pComb3x por secuenciación.....	34
5.2.5. Purificación de fagos filamentosos M13.....	34
5.3. Clonación del fragmento de ADN scFv-CP1 en <i>P. pastoris</i>	35
5.4. Ligación del fragmento de ADN scFv-cP1 a los vectores pPICZαA y pPICZB digeridos.....	38
5.5. Linearización de los plásmidos pPICZαA-scFv-cP1 y pPICZB-scFv-cP1 y transformación de <i>P. pastoris</i>	39
5.6. Expresión en <i>P. pastoris</i> del scFv-cP1.....	39
5.7. Purificación de cultivo de <i>P. pastoris</i> expresando M-scFv-cP1.....	40
6. Análisis de la composición de aminoácidos del scFv y scFv-cP1.....	41
7. Cuantificación de proteínas solubles scFv y scFv-cP1 y fagos expresando scFv y scFv-cP1.....	42
8. Pruebas biológicas <i>in vitro</i> con <i>X. fastidiosa</i> y los anticuerpos scFv y scFv-cP1 expresados en fagos o en forma soluble.....	43
8.1. Efecto de varias concentraciones de los fagos filamentosos sobre <i>X. fastidiosa</i>	43
8.2. Tiempo requerido para la acción de los fagos scFv y scFv-CP1 sobre <i>X. fastidiosa</i>	44
8.3. Determinación de la especificidad del fago scFv-CP1.....	44
8.4. Efecto de los fagos scFv y scFv-CP1 sobre distintas cepas de <i>X. fastidiosa</i> STL.....	45

8.5. Efecto de fagos expresando diferentes proteínas sobre <i>X. fastidiosa</i>	46
8.6. Ensayos sobre el efecto de las moléculas solubles scFv y M-scFv-cP1 sobre <i>X. fastidiosa</i>	46

Resultados

1. Confirmación de cultivos de cepas de <i>X. fastidiosa</i>	48
2. Clonación del ADN del fragmento variable de cadena sencilla (scFv) anti- <i>X. fastidiosa</i> en <i>P. pastoris</i>	49
3. Expresión de scFv anti- <i>X. fastidiosa</i> en <i>E. coli</i> y <i>P. pastoris</i>	55
4. Ensayo preeliminar del efecto de acoplado químico scFv-cP1 en <i>X. fastidiosa</i>	57
5. Construcción del híbrido scFv-cP1.....	58
6. Clonación del scFv-cP1 en pComb3x y su expresión en fagos filamentosos.....	63
7. Clonación y expresión de proteínas en forma soluble del scFv-cP1 en <i>P. pastoris</i>	65
8. Análisis de composición de aminoácidos de proteínas scFv y scFv-cP1 expresadas en <i>P. pastoris</i>	69
9. Efecto en la concentración y tiempo de los fagos filamentosos construidos sobre <i>X. fastidiosa</i>	72
10. Determinación de la especificidad del fago scFv-cP1.....	79
11. Efecto de los fagos scFv-cP1 sobre distintas cepas de <i>X. fastidiosa</i>	82
12. Efecto de las proteínas solubles scFv y scFv-cP1 sobre <i>X. fastidiosa</i>	83

Discusiones.....	86
------------------	----

Conclusiones.....	92
-------------------	----

Literatura citada.....	93
------------------------	----

Apéndice A.....	98
-----------------	----

Apéndice B.....	104
-----------------	-----

Apéndice C.....	105
-----------------	-----

Apéndice D.....	106
-----------------	-----

Lista de Figuras

Figura 1. Representación esquemática de la unión de los extremos del producto de PCR al vector al vector pCR®2.1-TOPO®. Pag. 15

Fig. 2. Representación esquemática de la serie de plásmidos pPICZ. Pag. 18

Fig. 3. Vector fasmídico pComb3X. Pag. 24.

Fig. 5. Mapa del vector pGEM-T Easy®. Pag. 37.

Fig. 6. PCR de cultivos de *X. fastidiosa* con los cebadores RST31 y RST33. Pag. 48.

Fig. 7. ELISA de cultivos de *X. fastidiosa* utilizando el equipo PathoScreen Xf (Adgia®). Pag. 48.

Fig. 8. Amplificación del fragmento de ADN del scFv anti-xylella. Pag. 50.

Fig. 9. Rastreo de transformantes de *E. coli* con el vector pCR®2.1-TOPO®-scFv por restricción enzimática. Pag. 50.

Fig. 10. Rastreo de transformantes de *E. coli* de la ligación pPICZαA-scFv. Pag. 51.

Fig. 11. Digestión enzimática del plásmido pPICZαA-scFv. Pag. 51.

Fig 12. Secuencia del fragmento de ADN del scFv clonado en el vector pPICZαA. Pag. 52.

Fig. 13. Linearización del vector pPICZαA-scFv. Pag. 53.

Fig. 14. Transformación de la levadura *P. pastoris* con el vector pPICZαA-scFv. Pag. 54.

Fig. 15. Amplificación del fragmento de ADN del scFv a partir de colonias transformantes de *P. pastoris*. Pag. 54.

Fig. 16. Comparación de la producción de varias clonas de *P. pastoris* expresando el scFv anti-*X. fastidiosa*. Pag. 55.

Fig. 17. Expresión de scFv anti-*X. fastidiosa* en *E. coli* TOP10F' y *P. pastoris*. Pag. 56.

Fig. 18. Amplificación por PCR del fragmento de ADN Cecropin P1 (cP1). Pag. 59.

Fig. 19. Digestión enzimática del fragmento scFv del vector pComb3x. Pag. 59.

Fig. 20. Resultados obtenidos de la ligación scFv-cP1. Pag. 60.

Fig. 21. Amplificación por PCR del híbrido scFv-cP1 a partir del producto de la ligación. Pag. 60.

Fig. 22. Análisis por PCR de colonias producto de la transformación en *E. coli* con el híbrido scFv-cP1 en el vector pcDNA 3.1/NT-GFP-TOPO®. Pag. 61.

Fig. 23. Digestión enzimática del vector pcDNA 3.1/NT-GFP-TOPO®-scFv-cP1. Pag. 61.

Fig. 24. Digestión enzimática del vector pComb3x. Pag. 62.

Fig. 25. Secuencia nucleotídica del fragmento scFv -cP1. Pag. 64.

Fig. 26. Amplificación del fragmento de ADN scFv-cP1 para clonación en *P. pastoris*. Pag. 66.

Fig. 27. Análisis de colonias de *P. pastoris* transformadas con el vector pPICZαA-scFvcP1. Pag. 66.

Fig. 28. Expresión extracelular negativa del híbrido scFv-CP1 en *P. pastoris*. Pag. 67.

Fig. 29. Expresión intracelular de M-scFv-cP1 en medio BMMY. Pag. 67.

Fig. 30. Expresión intracelular de M-scFv-cP1 mostrando diferentes intervalos de tiempo. Pag. 68.

Fig. 31. Concentración aproximada requerida para que el fago scFv-cP1 actúe eliminando a *X. fastidiosa*. Pag. 73.

Fig. 32. Concentración aproximada requerida para que el fago Fab-toxoide tetánico actúe eliminando a *X. fastidiosa*. Pag. 74.

Fig. 33. Diferentes tiempos de incubación requeridos para eliminar a *X. fastidiosa* STL con el fago scFv-cP1. Pag. 75.

Fig. 34. Efecto de dos concentraciones de fagos scFv-cP1, scFv y ayudador sobre *X. fastidiosa* STL con 2 horas de incubación. Pag. 77.

Fig. 35. Efecto de dos concentraciones de fagos scFv-cP1, scFv y ayudador sobre *X. fastidiosa* STL con 48 horas de incubación. Pag. 78.

Fig. 36. Determinación de la especificidad del fago scFv-cP1 con distintas especies de bacterias. Pag. 79.

Fig. 37. Especificidad de los fagos scFv-cP1 y ayudador en varias especies de bacterias con 24 horas de incubación. Pag. 80.

Fig. 38. Especificidad de los fagos scFv-cP1 y ayudador en varias especies de bacterias con 48 horas de incubación. Pag. 81.

Fig. 39. Ensayo preeliminar del efecto de las moléculas solubles scFv y scFv-cP1. Pag. 84.

Fig. 40. Efecto de las moléculas solubles scFv y scFv-cP1 sobre *X. fastidiosa* STL. Pag. 85.

Lista de Tablas

Tabla I. Lista de Oligonucleótidos utilizados para PCR. Página 13.

Tabla II. Producción de scFv de las distintas clonas de *P. pastoris* transformadas con pPICZ α -scFv. Pag. 56.

Tabla III. Efecto bactericida del péptido lítico CP1 acoplado químicamente al scFv en cultivo de *X. fastidiosa*. Pag. 57.

Tabla IV. Análisis de la composición de aminoácidos por hidrólisis ácida del scFv anti-Xf. Pag. 70.

Tabla V. Análisis composición de aminoácidos por hidrólisis ácida para scFv-cP1. Pag. 71.

Tabla VI. Número de colonias de *X. fastidiosa* sobrevivientes al tratamiento con fagos scFv-cP1 y seleccionadas después en carbencilina. Pag. 82.

Introducción

En el municipio de Ensenada, Baja California (la cual es una importante zona vitivinícola a nivel nacional), existe la enfermedad de Pierce en la vid (*Vitis vinifera*) (Guevara-Lugo, 2000), la cual es provocada por la bacteria *Xylella fastidiosa* (Wells *et al*, 1987). En México se ha reportado también en el estado en Coahuila (Raju *et al*, 1980). Otro país afectado es Estados Unidos de América, el cual tiene una amplia zona donde se distribuye esta enfermedad en los estados del sur de California hasta Florida. También se ha reportado en Centroamérica, en Costa Rica y Venezuela (Hopkins y Adlerz, 1988; Hopkins y Purcell, 2002; Dumenyo y Cooksey, 2004).

Otras enfermedades provocadas por esta bacteria que se han reportado en EE.UU., son las causadas en almendro, alfalfa, ciruelo, laurel entre otras. En Brasil, se encuentran las de café y cítricos, y en estos últimos ha ocasionado graves pérdidas al devastar la producción de naranja (Hopkins y Purcell, 2002).

La enfermedad de Pierce se detectó en el municipio de Ensenada, Baja California, en 1995, en el Valle de Guadalupe, por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Posteriormente también se detectó en los valles de San Vicente y Santo Tomás. (Guevara-Lugo, 2000). En 2006, se reportaron aproximadamente 3,400 hectáreas sembradas de vid de las cuales se calcula que se han perdido 258,000 plantas en 86 hectáreas debido a esta enfermedad. Su reemplazo tuvo un costo de 7 millones 740 mil pesos*.

*comunicación personal de Mario Zepeda Jacobo, Sistema Producto Vid.

Xylella fastidiosa es una bacteria que habita en los vasos del xilema de distintas especies de plantas. Esta bacteria gram-negativa, forma agregados de colonias por medio de la producción de una matriz que forma una biopelícula que permite su adhesión a las paredes de sus hospederos causando la oclusión de los vasos donde fluye la savia de la cual se alimenta.

Es transmitida por insectos homópteros de la familia Cicallide succionadores de savia que al alimentarse adquieren la bacteria de plantas infectadas y las introducen a plantas sanas. Una vez que adquieren las bacterias, estos vectores son capaces de mantenerlas por el resto de su vida alojadas en el aparato bucal; sin embargo pueden perderlas en el proceso de muda para luego volver a adquirirlas al alimentarse de plantas infectadas (Davis *et al.*, 1977; Wells *et al.*, 1987; Rodrigues da Silva *et al.*, 2001; Hopkins y Purcell, 2002, Chatterjee *et al.*, 2008).

En la vid los síntomas que pueden evidenciar su presencia son la quemadura en el margen de las hojas que aún verdes se tornan cafés con partes adyacentes de amarillas a rojas, pecíolos sin hojas, crecimiento irregular de tallos con manchas cafés, desarrollo tardío con tallos cloróticos y frutos deshidratados (Agrios, 1997). La susceptibilidad varía entre las variedades de vid, pero en todas causa finalmente la muerte de la planta (Hopkins y Purcell, 2002).

No ha sido posible erradicar esta enfermedad debido a que no existe un tratamiento que elimine efectivamente a la bacteria del xilema de la planta o del insecto vector y también debido a un gran número de especies de plantas hospederas (Purcell y Saunders, 1999; Hopkins y Purcell, 2002).

En este trabajo se propone el uso de un anticuerpo scFv creado específicamente en contra de *X. fastidiosa* para que la reconozca y unido a un péptido lítico que lise esta bacteria en la planta. Se utilizaron los sistemas de expresión de *Pichia pastoris* y de despliegue en fagos filamentosos para producir estas moléculas y probar su efecto *in vitro* en cepas de *X. fastidiosa* causantes de la enfermedad de Pierce.

Antecedentes

Actualmente no existe un tratamiento factible para eliminar al patógeno de la enfermedad de Pierce, por lo que lo único que se puede hacer es podar o destruir las plantas enfermas. Otra opción ha sido la elección de variedades menos susceptibles a la enfermedad, en sitios donde esta ya se ha presentado, o bien aplicar plaguicidas que eliminen al vector y/o las hierbas donde se alojan (Agrios G.N., 1997).

En el caso de la hierba hospedera de los vectores, el principal es el zacate grama o bermuda (*Cynodon dactylon*) que es común dentro de los viñedos o en sus alrededores. Para eliminarlo se practica el rastreo y el arado francés. También se aplican herbicidas como el Oxyfluorfen o sistémicos como el glifosfato (Guevara-Lugo J. 2000).

En la región de Florida, EE.UU. donde la enfermedad se propaga a altas tasas, se han generado híbridos resistentes con *Vitis rotundifolia*, la cual presenta cierta tolerancia (Hopkins D.L., *et al*, 1974 en Hopkins D.L. y Purcell A.H., 2002). Por otro lado en las regiones de California y Baja California la ocurrencia es por sitios localizados a manera de parches, la cual se relaciona con sitios en donde hay cercanía con zonas riparias, pues los insectos frecuentan estos lugares en donde puede existir reservorios de *X. fastidiosa*, y es en estas regiones donde se ve limitado el crecimiento de la bacteria de las plantas de vid debido a los

inviernos fríos, (Hill y Purcell, 1995; Purcell y Saunders, 1999; Hopkins y Purcell, 2002). El limitar estas áreas ha servido para un manejo más adecuado para el cultivo de la vid.

El uso de antibióticos como es la oxitetraciclina se ha usado para eliminar a la bacteria de plantas de vid, pero aunque es susceptible a este y otros antibióticos (Agrios, 1997; Kuzina *et al.*, 2006), su producción y aplicación es costosa, además su aplicación repetida puede generar resistencia, puede afectar la microflora de la planta, y su efecto residual es mayor pues no es biodegradable (Inal, 2003).

Se han generado plantas transgénicas de uva Thompson sin semilla que expresan un péptido lítico (Shiva I). Se probaron diferentes repeticiones del gen del péptido lítico. Las plantas que contenían con cuatro insertos de este péptido mostraron ser las más resistentes al patógeno *X. fastidiosa* (Scorza *et al.*, 2001).

En este trabajo se utilizó un anticuerpo scFv de gallina generado contra la bacteria *X. fastidiosa*. Un scFv (por sus siglas en inglés Fragmento variable de cadena sencilla) está constituido por las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo IgY, las cuales están involucradas en el reconocimiento de antígeno, y están unidas por un espaciador peptídico (con la secuencia de aminoácidos GGSSRSS). El uso de anticuerpos scFv ha sido

eficaz dada la facilidad con que pueden producirse clonas de estos con gran especificidad (Barbas *et al*, 2001).

Se han producido versiones de scFv unidos a otras proteínas, en composición farmacéutica como la exotoxina PE40 en el combate a enfermedades humanas, (Fitzgerald *et al.*, 2000) y la unión con otros scFv para producir multímeros para antígenos multivalentes (King *et al.*, 1999).

Los péptidos antibacterianos son componentes principales del sistema inmune innato y se hallan presentes en el reino animal y en el vegetal. Son potentes antibióticos contra un amplio rango de especies bacterianas y son de un tamaño de entre 15 a 45 residuos de aminoácidos con una carga neta positiva (Boman, 2003).

Yoshida *et al* en 2001, generaron un scFv unido por el extremo C-terminal al péptido lítico Shiva I en forma recombinante, para intentar bloquear la transmisión de la malaria del mosquito vector. La inmunotoxina se expresó en *Escherichia coli* y se introdujo en el intestino medio del mosquito, lo cual redujo el número de ovocitos del parásito.

En un estudio *in vitro* sobre el efecto en *X. fastidiosa* del péptido lítico Cecropin B (CB) con el fluido del xilema de *Vitis vinifera* L. variedad Chardonnay se encontró que la mayoría de las bacterias en suspensión eran eliminadas por CB

y que aquellas que formaban colonias grandes sobrevivían gracias a la agregación de las bacterias (Ishida *et al*, 2004).

En otro estudio se analizó el efecto de varios péptidos antimicrobianos contra varias cepas de *X. fastidiosa*, y se encontró que fueron inhibidas *in vitro* por los polipéptidos Magainin 2, PGQ, Indolicidin y Dermaseptin. (Kuzina *et al.*, 2006).

El péptido antimicrobiano catiónico Cecropin P1 (cP1) de 31 residuos, fue aislado del nemátodo *Ascaris* spp. (Andersson *et al*, 2003). Tiene un sitio N-terminal fuertemente básico y una región hidrofóbica en el sitio C-terminal, adopta una estructura α -hélice con una secuencia tipo bisagra de Ser-Glu-Gly en el centro de la molécula. Su estructura anfipática le permite permeabilizar las membranas celulares bacterianas. Es altamente activo contra bacterias gram-negativas y algunas gram-positivas con una rápida actividad antimicrobiana. El grupo carboxilo terminal es importante para una óptima actividad contra bacterias gram-negativas, ya que se une a los fosfolípidos ácidos de la membrana bacterial perturbando el paquete de lípidos de la bicapa (Brogden *et al.*, 2003).

Hipótesis.

La unión anticuerpo-péptido lítico (scFv-cP1) expresada en fagos y en forma soluble es capaz de eliminar a la bacteria *X. fastidiosa* específicamente. El scFv reconocerá a la bacteria y el péptido actuará lisándola.

Objetivos.

- Construir un híbrido scFv-péptido lítico que sea capaz de destruir a *X. fastidiosa* en cultivo *in vitro*.
- Expresar el híbrido scFv-péptido lítico en forma soluble y en fagos filamentosos.
- Determinar si es capaz el scFv soluble de eliminar a *X. fastidiosa*.
- Determinar la concentración y tiempo en que actúan los fagos scFv y scFv-péptido lítico creados.
- Determinar la especificidad de los fagos scFv-péptido lítico y otras construcciones en varias cepas de *X. fastidiosa* y en bacterias provenientes de la vida u otros géneros.
- Producción masiva del scFv y scFv- péptido lítico solubles en la levadura *Pichia pastoris*.

Metodología

1. Cultivo de Microorganismos.

Los siguientes medios de cultivo fueron utilizados y están descritos en el apéndice A:

- PD2 con/sin carbencilina 50 µg/ml (medio para la enfermedad de Pierce)
- LB con/sin agar y con/sin carbencilina 50 µg/ml (medio Luria-Bertani)
- LB bajo en sal con/sin zeocina 25 µg/ml (medio Luria-Bertani)
- YPD con/sin agar y con/sin zeocina 100 µg/ml (medio de extracto de levadura-peptona-dextrosa)
- YPDS con zeocina 100 µg/ml (extracto de levadura-peptona-dextrosa-sorbitol)
- SB con carbencilina 50 µg/ml (medio super broth)
- BMGY (medio complejo amortiguado conteniendo glicerol)
- BMMY (medio complejo amortiguado conteniendo metanol)
- MGY (medio mínimo conteniendo glicerol)
- MMY (medio mínimo conteniendo metanol)

1.1. Confirmación de cultivos de cepas de *Xylella fastidiosa*.

Cuatro cepas de *X. fastidiosa*, STL, Temecula, Baja #5 y M23, se cultivaron en medio líquido PD2 a partir de medio sólido PD2 (apéndice A) a una temperatura entre 28° y 30° C, sin agitación con un volumen máximo del 20% del recipiente, en un tiempo aproximado de 5 a 10 días, después de este tiempo era descartado su uso. Se hicieron subcultivos de cada cepa cada 3 a 5 días para

mantener cultivos frescos, con un número máximo de 3. Los volúmenes de cultivo líquido fueron de 5 ml en tubos cónicos de 50 ml y en frascos de vidrio de 125 ml.

Las características de la bacteria *X. fastidiosa* cuando crece en medios artificiales pueden distinguirse ya que en medios sólidos forma una colonia redonda cóncava brillante y en medio líquido forma cultivos muy poco densos que pueden formar agregados o una capa a manera de lámina en la parte superior de la columna del cultivo (Wells *et al*, 1987), lo cual fue útil para un reconocimiento rápido de los cultivos de esta bacteria.

Para confirmar la presencia de *X. fastidiosa* se verificó por PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) directo de colonia a bacterias que crecieron en medio sólido PD2. Por cada reacción de PCR de 50 µl se mezclaron con vortex 25 µl de Master Mix ABgene®, 1 µl de cebador delantero RST31 (50 pmoles), 1 µl de cebador reverso RST33 (50 pmoles) (Tabla I) y 23 µl de agua libre de nucleasas. Se mezcló con vortex y se agregó una porción de la colonia de bacterias tomada con la punta de un palillo, se volvió a mezclar con vortex. Los cebadores utilizados para la reacción de PCR fueron los descritos por Minsavage *et al* (1994), que amplifican la región del genoma 726,358-727,078 de *X. fastidiosa* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

Los parámetros de la reacción de PCR fueron un tiempo inicial de 3 minutos a 94° C, con 35 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 55° C y 2 min a 72° C.

Los cultivos líquidos de *X. fastidiosa* después de aproximadamente 7 días de crecimiento se criopreservaban a -80° C en 20% de glicerol. Además del PCR,

se confirmaron los cultivos en medio líquido de *X. fastidiosa* que fueron criopreservados, utilizando los reactivos y el manual de instrucciones del equipo de ELISA PathoScreen Xf (Adgia®).

1.2. Cultivo de bacterias utilizadas como control.

Se cultivaron las bacterias *Xanthomonas fragariae* y *Pseudomonas phaseolicola* en medio PD2 líquido y sólido a 30° C por 12 horas. *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* se cultivaron en medio de cultivo LB líquido y sólido (apéndice A) por 12 horas a 30° C. Después de cultivadas en medio líquido fueron criopreservadas a -80° C en los respectivos medios de cultivo con 20% de glicerol.

1.3. Obtención de vectores plasmídicos en *Escherichia coli*.

Todos los plásmidos producidos en la bacteria *E. coli* que fueron utilizados en este trabajo fueron extraídos con los reactivos para purificación de ADN plasmídico Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega®). Las bacterias se cultivaban a 37° C por 16 horas con agitación, se centrifugaban a 3000 x g por 5 min y se procedía a la purificación. La concentración del ADN purificado se midió en un espectrofotómetro Spectronic 21 de Milton Roy Company, a una longitud de onda de 260 nm, y se calculo utilizando la fórmula: Absorbencia de la muestra x 50 µg (ADN) / 1 Absorbencia x factor de dilución = Concentración en µg/µl. También se utilizó el espectrofotómetro ND-1000 de Nanodrop, que da una lectura de concentración automática.

2. Clonación del ADN del fragmento variable de cadena sencilla (scFv) anti-*X. fastidiosa* en *Pichia pastoris* en el vector plasmídico pPICZαA.

2.1. Amplificación del fragmento de ADN del scFv.

Inicialmente el fragmento de ADN que codifica al scFv que reconoce a *X. fastidiosa* fue producido en el curso de despliegue en fagos filamentosos impartido en esta facultad por el Dr. José Luis Stephano en el laboratorio "Meredith Gould".

Para clonar el fragmento de ADN de scFv dentro del vector pPICZαA fue necesario añadir a los extremos nuevos sitios de restricción, para esto se llevó a cabo una reacción de PCR que añadió las secuencias que reconoce la enzima EcoR I en el extremo 5' y Not I en el extremo 3' del fragmento de ADN (Tabla I). Por cada reacción de PCR de 50 µl se mezclaron con vortex 25 µl de Master Mix ABgene®, 1 µl de cebador delantero F5 (50 pmoles), 1 µl de cebador reverso AM (50 pmoles), 1 µl de ADN plasmídico pComb3x-scFv (225 ng/µl) y 22 µl de agua libre de nucleasas, se le dió un tiempo inicial de desnaturalización de 3 minutos a 94° C y luego 35 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 55° C y 2 min a 72° C. Se utilizó un termociclador Perkin-Elmer (modelo Cetus).

Tabla I. Lista de Oligonucleótidos (cebadores) para PCR utilizados en este trabajo. Las regiones subrayadas representan sitios de restricción.

Cebador	Secuencia del Cebador	Función que realiza
RST31	5'-GCGTTAATTTTCGAAGTGATTGCGATTGC-3'	Sitio 727,051-727,078 dentro del genoma de <i>X. fastidiosa</i>
RST33	5'-CACCATTCTGTATCCCGGTG-3'	Sitio 726,358-726,376 dentro del genoma de <i>X. fastidiosa</i>
F5	5'-G'AATTCGGCCYGACTAGCCG-3'	Añade el sitio de restricción EcoRI en el inicio del fragmento de ADN de scFv anti-Xf.
AM	5'-GC'GGCCGCCTGGCCGGCCT-3'	Añade el sitio de restricción NotI en el final del fragmento de ADN de scFv anti-Xf.
α -Factor	5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'	Se une a una región dentro de la secuencia señal α -factor en el vector pPICZ α A
3'AOX1	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'	Se une al fragmento de terminación de transcripción del fragmento de ADN de AOX1 y produce la cadena antisentido
5'AOX1	5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'	Se une a la región promotora del gen AOX1 y produce la cadena sentido
cecs	5'-A'CTAGTAGCTGGCTCAGCAAAACCGCCAAGAACTTG-3'	Sentido del fragmento de ADN cP1 añade el sitio de restricción Spe1
ceca	5'-GGCCG'GCCTGGCCTGCGCGCGGGCCACCC-3'	Antisentido del fragmento de ADN cP1, añade el sitio de restricción Sfi1
cscf-f	5'-GAGGAGGAGGAGGAGGAGGTGGCCAGGCGGCCCTGACTCAG-3'	Añade el sitio de restricción Sfi1 al inicio del fragmento de ADN scFv anti-Xf.
Intracon	5'-CGAATTCACAATAATGTCTCTGACTCAGCCG-3'	Sentido que añade el sitio de restricción EcoRI, la secuencia consenso de levadura y el codón de iniciación en el inicio del fragmento de ADN scFv anti-Xf.
Rp1not	5'- GCGGCCGCGCGCGGGCC-3'	Antisentido del fragmento de ADN cP1 que añade el sitio de restricción Not1

2.2. Clonación del fragmento de ADN del scFv en pCR®2.1-TOPO®.

Para la clonación en el vector pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) (figura 1, página 15) se utilizó el producto de 2 reacciones de PCR del fragmento de ADN del scFv que se purificó a partir de un gel de agarosa al 2% con el Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (ZymoResearch®). Se utilizaron los reactivos de TOPO TA cloning® (Invitrogen®) y se llevó a cabo la reacción según lo indica el manual de instrucciones: 2 µl de producto de PCR purificado, 1 µl de solución salina, 1 µl de vector pCR®2.1-TOPO® y agua para un volumen final de 6 µl. Se mezcló suavemente y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. De esta reacción se agregaron 2 µl a un vial con 50 µl células competentes (apéndice D), se dio choque térmico a 42° C por 30 seg. y se transfirió a hielo. Se añadieron 250 µl de medio de cultivo SOC (apéndice A) y se incubó por 1 hora para después seleccionar en medio sólido LB con antibiótico ampicilina 50 µg/ml y se incubó por 16 hr. Después las clonas resultantes se escogieron al azar varias de ellas y se cultivaron cada una en 5 ml de medio líquido LB carbencilina por 16 hr a temperatura ambiente con agitación.

Se extrajo el ADN plasmídico de las clonas transformadas y se cortó con la enzima EcoR I en una reacción de 30 µl que contenía 22 µl de ADN plasmídico, 1 µl de enzima (10 U) y 3 µl amortiguador O+ 10x (Fermentas®) y 4 µl de agua libre de DNasas. Se añadió solución de carga 1x. Posteriormente se realizó una electroforesis con las muestras en gel de agarosa al 1.2 %.

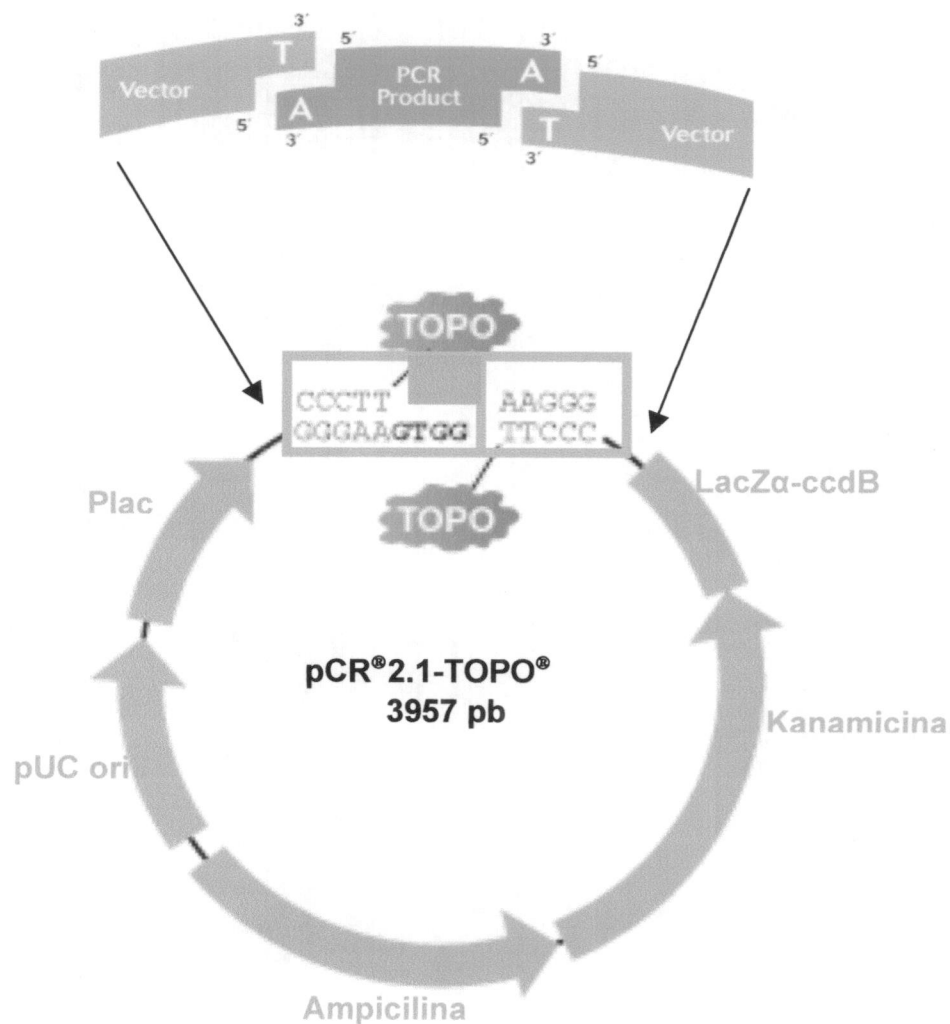


Figura 1. Representación esquemática de la unión del fragmento de ADN producto de PCR al vector pCR[®]2.1-TOPO[®]. Cuando se realiza el PCR la *Taq* polimerasa deja adenina (A) en los extremos que se unen a las timinas del vector por medio de una topoisomerasa. *Taq* polimerasa tiene una actividad transferasa terminal no dependiente del molde que añade una sola deoxiadenosina a los extremos 3' de los productos de PCR. El vector linealizado pCR[®]2.1-TOPO[®] contiene a cada extremo 3' residuos deoxitiminas y también a cada extremo una topoisomerasa I covalentemente unida (proveniente del virus *Vaccinia*) y se une a ADN duplex a sitios específicos y corta el esqueleto fosfodiéster después de 5'-CCCTT en una hebra, conservándose esta formación por medio de un enlace covalente entre el fosfato 3' de la hebra cortada y el residuo tirosil de la topoisomerasa I. Este enlace fosfo-tirosil entre el ADN y la enzima puede ser atacado por hidroxil 5' de la hebra cortada original, invirtiendo la reacción y liberando la topoisomerasa. El vector contiene una región promotor *lac*, inicio de transcripción, sitio cebador para M13 delantero y reverso, fusión del gen *LacZα-ccdB*, región promotora y gen de resistencia a kanamicina, gen de resistencia a ampicilina *bla*, origen pUC para replicación. Modificado de Invitrogen.

2.3. Digestión Doble con EcoRI y NotI.

Se realizaron dos digestiones enzimáticas en el vector pCR[®]2.1-TOPO[®] con el fragmento de ADN scFv (1.1 µg y 2.93 µg de ADN), y una del vector pPICZαA (3.96 µg de ADN), conteniendo lo siguiente en cada una de las reacciones: 22 µl de ADN plasmídico, 3 µl de amortiguador O+ (Fermentas[®]), 1 µl (10 U) de enzima EcoR I (Fermentas[®]), 1 µl (10 U) de Not I (Fermentas[®]) y agua libre de nucleasas para un volumen final de 30 µl, se incubó por 6 horas a una temperatura de 37°C. Al término se añadió solución de carga 1x a las digestiones y se corrieron en gel de agarosa al 2%. Se purificaron las bandas correspondientes al ADN tanto del scFv como del vector pPICZαA, utilizando las columnas Quiaquick (Qiagen[®]).

2.4. Ligación del fragmento de ADN del scFv en el vector pPICZαA.

El plásmido pPICZαA contiene el promotor del gen *AOX1* que permite la integración de genes de interés vía recombinación homologa en el genoma de *P. pastoris*, una señal de secreción α-factor para la expresión extracelular, una marca de polihistidinas para purificación y otra de c-myc para el reconocimiento de la proteína expresada, un sitio múltiple de clonación, un origen pUC para la replicación y mantenimiento dentro de la bacteria *E. coli* mediante un gen de resistencia al antibiótico zeocina que permite también la selección del plásmido (fig. 2, pag.19). La reacción de ligación entre el fragmento de ADN del scFv y el vector pPICZαA contenían 200ng de ADN de cada uno (relación 1:1), amortiguador de Ligasa al 10% (Fermentas[®]), 1 µl de Ligasa T4 (5 Weiss u/µl)

(Fermentas[®]) a un volumen total de 20 μ l, el tiempo de incubación fue de 12 horas a temperatura ambiente.

Mapas de Vectores pPICZ y pPICZ α

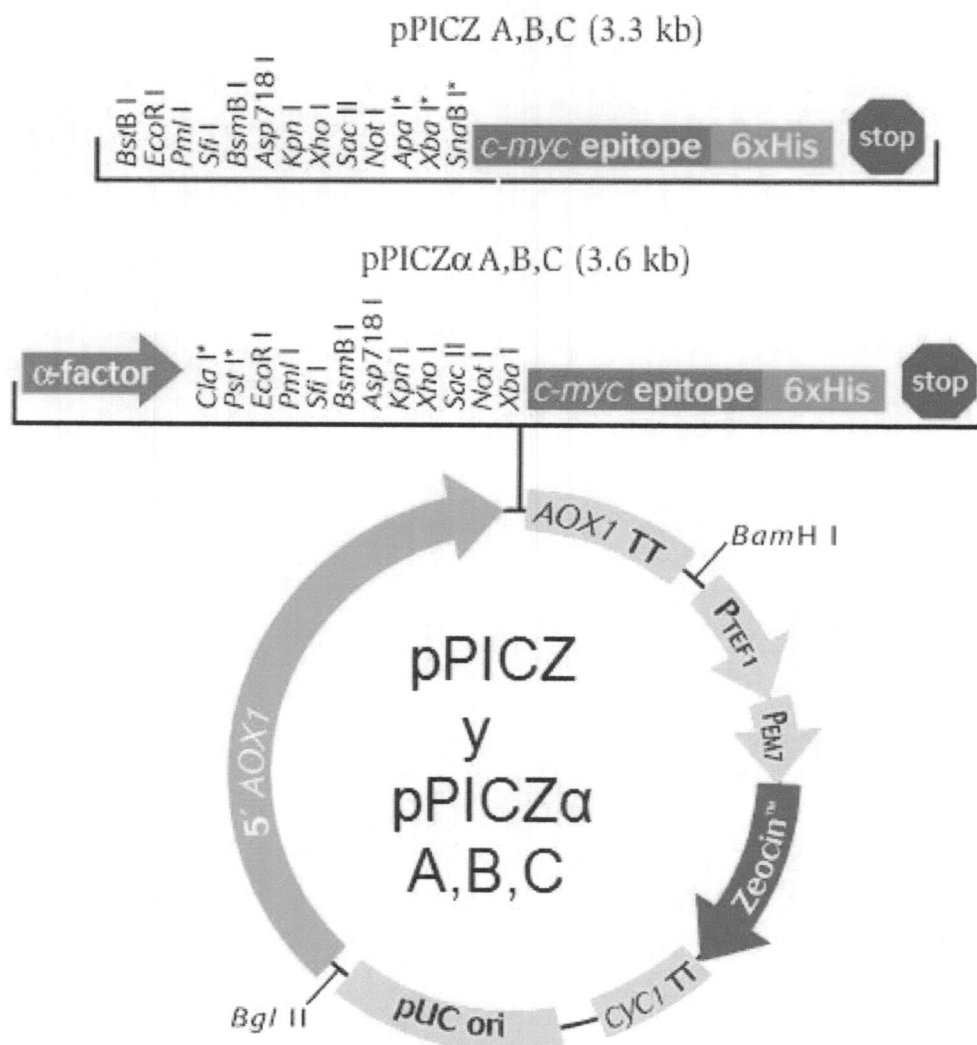


Fig. 2. Representación esquemática de la serie de plásmidos pPICZ. Contienen el promotor del gen AOX1 para la expresión en *P. pastoris* por inducción con metanol y la integración del plásmido en el locus AOX1. Un sitio de clonación múltiple con 10 sitios únicos para la inserción del gen de interés. Una marca al epitope *myc* para la detección con anticuerpos anti-*myc*, y una marca de polihistidinas (6xHis) que permite la purificación de la proteína recombinante. Un terminador de transcripción nativo y señal de poliadenilación del gen AOX1 (TT) para el procesamiento eficiente en el sitio 3' del mRNA por poliadenilación para incrementar la estabilidad del mRNA. El promotor del factor de elongación de transcripción 1 (TEF1) que conduce la expresión del gen *Sh ble* en *Pichia* y otro constitutivo que conduce la expresión del gen *Sh ble* en *E. coli* EM7 para la expresión de resistencia al antibiótico zeocina. Una región de terminación de transcripción CYC1 en el sitio 3' del gen CYC1 de *S. cerevisiae* para el procesamiento eficiente del sitio 3' del mRNA del gen *Sh ble* para incrementar estabilidad. Un origen pUC para la replicación y mantenimiento del plásmido en *E. coli*. Sitios únicos de restricción: Sac I, Pme I y BstX I, para la linealización de vectores en el locus AOX1 e integración dentro del genoma de *Pichia*. Para los vectores de expresión intracelular se requiere añadir en el extremo 5' del gen de interés una región consenso de levadura y un codón de iniciación de traducción ATG. Los vectores pPICZ α de expresión extracelular utilizan una señal de secreción α -factor nativa de *S. cerevisiae*. Invitrogen.

2.5. Transformación de *E. coli* TOP10F' por método químico.

A 50 μ l de células competentes tratadas con CaCl_2 (apéndice D) y criopreservadas a -80°C en glicerol al 20% se les descongeló en hielo para añadir 5 μ l del producto de la reacción de ligación. Se mezcló suavemente con la punta de la pipeta para luego incubar en hielo 10 min. Se dio choque térmico a 42°C por 2 min. Después, a temperatura ambiente, fueron añadidos 200 μ l de LB bajo en sal, incubándose a 37°C por 1 hora. Al término se sometieron a selección en LB bajo en sal sólido con zeocina 25 $\mu\text{g/ml}$ (Invitrogen®) a 37°C por toda una noche.

Para confirmar la presencia del fragmento de ADN de interés en el vector se realizó PCR directo de colonia, amplificando con los cebadores *F5* y *AM* (Tabla I) utilizados anteriormente (según apartado 2.1) y restricción del plásmido con las enzimas *EcoR* I y *Not* I (según apartado 2.3).

2.6. Verificación del marco de lectura del fragmento de ADN scFv en el vector pPICZ α A por secuenciación.

Se determinó la secuencia nucleotídica de la región del vector pPICZ α A que contiene el fragmento de interés, con los cebadores α -Factor y 3'AOX1 (Tabla I) (Invitrogen®). Se mandó a secuenciar a Eton Bioscience Inc. (www.etonbio.com), California. EE.UU.

2.7. Integración del fragmento de ADN del scFv en *P. pastoris*.

2.7.1. Preparación de células competentes de *P. pastoris*.

Se prepararon células competentes de *P. pastoris* cepa X-33 correspondiente al fenotipo silvestre que tiene los dos genes que codifican para la alcohol oxidasa, AOX1 y AOX2, la cual es la primer enzima en el metabolismo del metanol que lo oxida a formaldehído usando oxígeno molecular. Las células en YPD (apéndice A) se llevaron a una densidad óptica de 0.7 a 600 nm, y fueron resuspendidas en solución I, que contiene sorbitol, etilen glicol y DMSO (*Pichia Easy Comb*®, Invitrogen®) para hacerlas competentes, y se guardaron a -80° C de acuerdo al manual de instrucciones *Pichia Easy Comb* (Invitrogen®) hasta su uso en la transformación por método químico.

2.7.2. Linearización del plásmido pPICZαA-scFv.

Antes de proceder a la transformación por método químico se linearizó el plásmido con Sac I, que hace el corte dentro la región 5' AOX I del vector y permite la inserción del fragmento de ADN por medio de recombinación homóloga dentro de la región 5' AOX I del genoma de *P. pastoris*. Se cortaron 5 µg de ADN en un volumen final de 30 µl, con 3 µl amortiguador A 10x y 1 µl (10 U) de enzima Sac I (Roche®). La incubación fue por 4 horas a 37° C.

2.7.3. Transformación en *P. pastoris* con el plásmido pPICZ α A-scFv.

Las células competentes (apartado 2.7.1) de *P. pastoris* fueron transformadas con los reactivos y el método químico de choque térmico de *Pichia Easy Comb*[®] (Invitrogen[®]). Todo el producto de la digestión del apartado 2.7.2 se liofilizó a un volumen de 10 μ l y se añadió a 50 μ l de células competentes. Se agregó 1 ml de solución II, que contiene polietilenglicol, y se incubó a 30° C por 1 hr. Se mezcló con vortex cada 15 min. Se dió un choque térmico de 42° C por 10 min. Se separaron las células en dos tubos de 1.5 ml (aprox. 525 μ l cada uno) y se añadió a cada uno 1 ml de YPD y se dejó incubando por 1 hr a 30° C. Después las células fueron centrifugadas a 3000 x g (eppendorf 5417 R) por 5 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió en 500 μ l de solución III (solución salina) y se combinó en un solo tubo. Se volvió a centrifugar del mismo modo y se descartó el sobrenadante, para después resuspenderse en 100 μ l de solución III. La transformación entera se seleccionó en medio sólido YPDS (apéndice A) con antibiótico zeocina (100 μ g/ml). Como controles se trataron del mismo modo células competentes en medio YPDS con y sin zeocina transformadas con el vector pPICZ α A.

2.7.4. Confirmación por PCR de clonas de *P. pastoris* transformadas.

Se pico con un palillo estéril una colonia de *P. pastoris* y se diluyó en 1 μ l de agua libre de DNAsas en un tubo de 0.6 ml. Para lisar las células se añadió 5 μ l de solución de liticasa 5 U/ μ l y se incubó a 30° C por 10 min, luego se congeló a

-80° C por 10 min. Para una reacción de PCR de 50 µl se añadió 5 µl del lisado y se utilizaron los cebadores *F5* y *AM* con las condiciones según el apartado 2.1.

3. Expresión de scFv en *E. coli* y en *P. pastoris*.

3.1. Expresión de scFv anti-*X. fastidiosa* en *E. coli*.

El fragmento de ADN del anticuerpo scFv que reconoce a *X. fastidiosa* (denominada clona 8) se encuentra en el fásmido pComb3x el cual además de la expresión de esta proteína en la cápside del fago permite su expresión de forma soluble (fig. 3, pag. 25). La producción del scFv se llevó a cabo de la siguiente manera: se tomo 1 µl del criopreservado a -80° C de la cepa de *E. coli* TOP10F' pComb3x-scFv por cada 1 ml de medio de cultivo SB carbencilina (50 µg/ml) (apéndice A) y se dejó crecer con agitación a 37° C por 12 horas. Se inoculó este cultivo en 100 ml (1/100) de SB carbencilina (50 µg/ml) y se dejó creciendo hasta que alcanzó una densidad óptica entre 0.5 y 0.6 a 600 nm (aprox. 4 hr). Una vez esto se agregaron 2 ml de IPTG 0.5 M por cada litro de cultivo (Barbas *et al*, 2001). Después de 22 horas de incubación se centrifugo el cultivo en tubos cónicos, a 3000 x g por 20 minutos a 4° C; después se procedió a purificar la proteína del sobrenadante por cromatografía de afinidad al níquel (apartado 3.3).

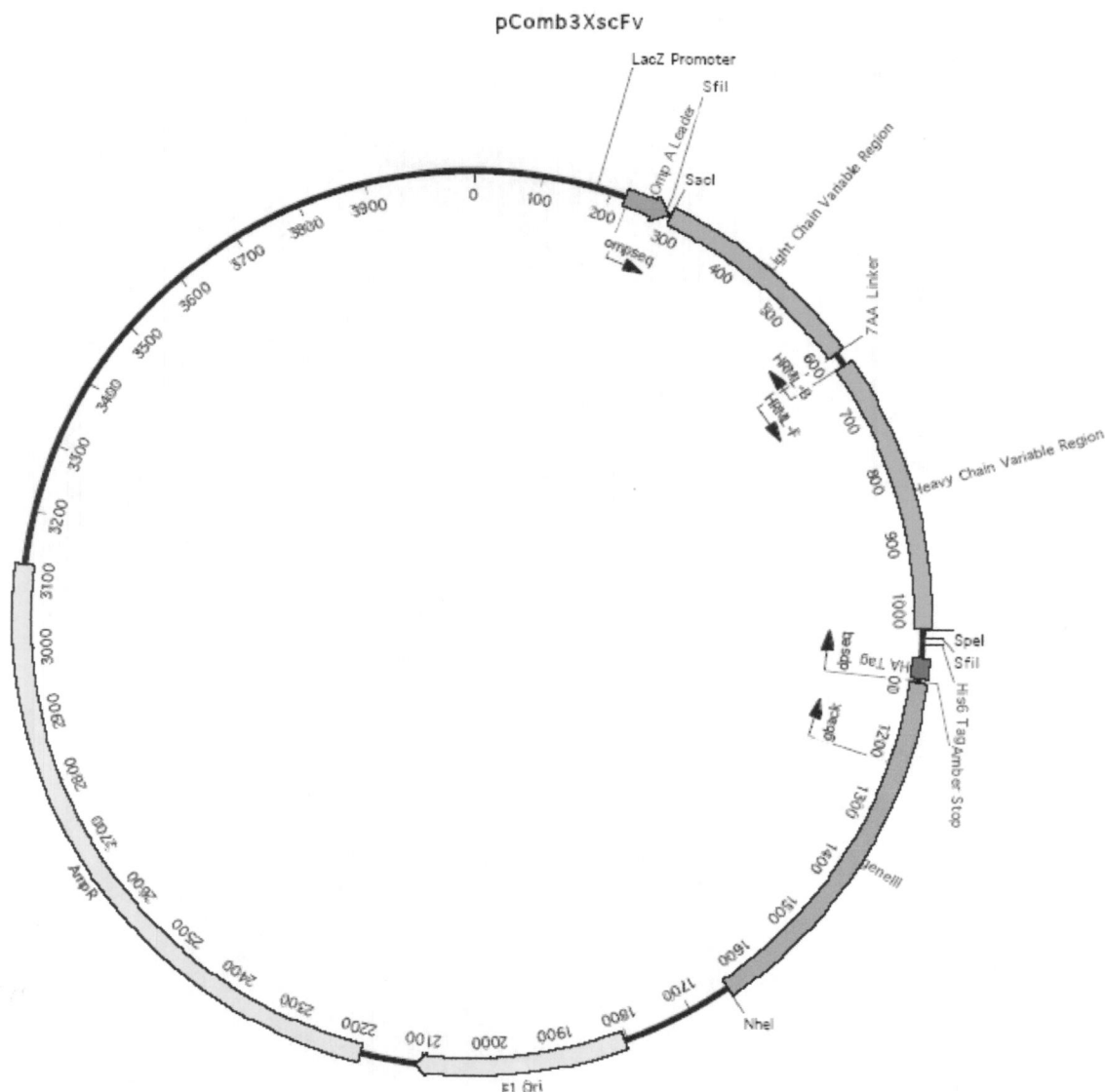


Fig. 3. Vector fasmídico pComb3x. Vector para despliegue en fagos 3+3: que significa que la proteína foránea no se despliega en todas las proteínas pIII. Diseñado para expresar fragmentos de anticuerpos (scFv) y otras proteínas sobre la superficie de fagos filamentosos o para la expresión como proteínas solubles. Los scFv están fusionados con el dominio C-terminal a la proteína de cubierta menor (pIII). El scFv es dirigido al periplasma por el péptido señal *ompA*. Dos asimétricos sitios de restricción de la enzima *Sfi* I permiten la clonación direccional del scFv en un solo paso. El codón ámbar ha sido insertado entre el sitio 3' de restricción *Sfi* I y el final 5' del *gen III*. Esto permite la expresión de la proteína soluble (con un inductor de LacZ) en cepas de *E. coli* no supresoras (por ejemplo TOP10F') sin tener que eliminar el fragmento del *gen III*. La marca de 6x histidinas (HIS) ha sido insertada en el sitio C-terminal del fragmento de interés para la purificación de la proteína. Una marca del decapeptido de hemaglutinina de influenza YPYDVPDYAS (HA) ha sido insertada al final del extremo 3' de la marca HIS para detección usando anticuerpo anti-HA.

3.2. Expresión de scFv anti-*X. fastidiosa* en *P. pastoris*.

Las clonas resultantes de la selección con zeocina se cultivaron bajo las mismas condiciones: se sembró, picando con una punta de palillo estéril, una colonia en 25 ml de medio BMGY (apéndice A) en frascos de 250 ml a una temperatura entre 28 a 30° C en un incubador longitudinal con la máxima agitación. En este medio de cultivo la levadura utiliza como fuente de carbono al glicerol que permite producir biomasa sin comenzar a expresar aún la proteína foránea. Una vez alcanzada una densidad óptica de 4 a 600 nm después de 16 a 20 horas, se centrifugó (Sorvall RC 5B PLUS) el cultivo a 1500 x g por 5 min, se retiró el sobrenadante y se diluyó en el medio de cultivo BMMY (apéndice A) a una densidad óptica (D.O.) final de 1 (aproximadamente 100 ml). Este medio contiene metanol, el cual es necesario para inducir a la expresión de la enzima alcohol oxidasa y la proteína foránea. La incubación fue por 24 horas más. Al finalizar se procedió a centrifugar a 1500 x g por 20 minutos en tubos cónicos y el sobrenadante se almacenó a -80 °C hasta su purificación.

Aquellas que resultaron con la mayor producción de scFv fueron cultivadas en el medio BMMY por 5 días más, agregando cada 24 horas metanol 100% a una concentración final de 0.5%. Se tomaron alícuotas de 500 µl a diversos tiempos; se separó el medio de las células por centrifugación y se guardó ambas muestras a -80 °C.

Al final cada cultivo se centrifugó a 1500 x g por 20 min para separar el medio de las células y se guardó el sobrenadante a -80 °C ó se procedió a purificar directamente por cromatografía con esferas de agarosa Ni-NTA (Qiagen®).

3.3. Purificación de proteínas recombinantes por Cromatografía de Afinidad Metálica al Níquel.

Tanto el scFv expresado en *E. coli* como en *P. pastoris* tienen una marca de 6 histidinas al final de cada proteína, las cuales se unen al níquel de las esferas de agarosa que contienen el complejo níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) (Qiagen®). A cada 50 ml de medio de cultivo sin células ya sea descongelado o directo de la centrifugación, se le agregó 200 µl de esferas Ni-NTA. Se dejó mezclando suavemente en agitador a 4° C desde 2 horas o alternativamente, toda la noche. Después, se centrifugó (Eppendorf 5417 R) a 1000 x g por 30 seg y se tiró el sobrenadante dejando 1 ml de medio de cultivo. Se resuspendió el volumen conservado para pasarlo a una columna cromatográfica, el cual una vez que cayó todo el líquido, las esferas retenidas en la columna fueron lavadas con 5 ml de amortiguador de lavado (apéndice A) con 20 mM de imidazol, el cual a esta concentración actúa compitiendo con aquellas proteínas que se hayan unido inespecíficamente al níquel retirándolas de la unión y reteniendo la proteína de interés. Luego se eluyó tres veces con 200 µl de amortiguador de elución (apéndice A) con 500 mM de imidazol que compite fuertemente por la unión al níquel y permite que las proteínas se suelten. Las eluciones se lavaron con 1ml de PBS 1x pH 7.4 (apéndice A) utilizando tubos centricon 3000 MW (Amicon®) centrifugando (Sorvall® Superspeed RC2-B) por 1 hr a 1,610 x g. Para los experimentos se utilizaron eluciones dializadas (bolsas de diálisis de 6,000 a 8,000 MWCO) en PBS 1x pH 7.4 por 4 a 6 horas a 4° C. Se tomaron muestras

de 10 μ l y se corrieron a 120 V en geles de poliacrilamida SDS al 10% (SDS-PAGE) visualizadas con azul coomassie al 2 % (ver apéndice A).

4. Acoplamiento químico del scFv al péptido lítico.

En un tubo de 2 ml se añadieron 50 μ g de péptido cecropin P1 (cP1) diluido en 125 μ l en PBS 1x y 20 μ g de scFv anti-Xf diluido en 125 μ l de PBS 1x. Se agregó 125 μ l de glutaraldehído 20 mM en alícuotas de 5 μ l cada 10 minutos, mientras se agitaba con una barra magnética. El glutaraldehído reacciona uniendo los grupos amino de las proteínas. Se detuvo la reacción con 31.25 μ l de glicina 1M por 30 minutos. La mezcla se dializó contra 1 L de PBS 1x por 3 horas a 4° C para retirar todo el glutaraldehído (Doolittle, 1986).

4.1. Ensayo preeliminar del efecto del acoplado químico scFv-cP1 en *X. fastidiosa*.

En tubos de 1.5 ml se mezclaron una cantidad igual de células de *X. fastidiosa* con el acoplado scFv-CP1, con el acoplado scFv-scFv como control, y con PBS 1x como control. Se dejaron incubando a 28° C por 6 horas y luego se sembraron en medio sólido PD2 y se espero a que crecieran colonias por aproximadamente 10 días.

5. Construcción del híbrido scFv-CP1 y su expresión en fagos filamentosos y en forma soluble.

5.1.1. Amplificación del fragmento de ADN Cecropin P1 (CP1).

Para la amplificación por PCR del fragmento de ADN del péptido lítico cecropin P1 (cP1), se utilizó como molde el fragmento de ADN sintetizado (www.operon.com) de una sola hebra el cual tiene la siguiente secuencia nucleotídica: 5'-AGC TGG CTC AGC AAA ACC GCC AAG AAA CTT GAG AAC TCT GCA AAG AAA CGC ATC TCT GAA GGC ATT GCT ATC GCG ATA CAG GGT GGC CCG CGC -3'. Los cebadores utilizados fueron delantero *cecs* y reverso *ceca* (Tabla I), a los cuales se les añadió los sitios de restricción para *Spe* I y *Sfi* I, respectivamente. La reacción de PCR por cada 50 µl contenía 1x de buffer de PCR, 1 µl de 18 mM de MgCl₂, 1 µl de cebador *cecs* a 12.5 pmoles/µl, 1 µl de cebador *ceca* a 25 pmoles/µl, 1 µl de enzima *Taq* polimerasa a 0.1 U/µl, y 1 µl de ADN molde (200 ng). Los parámetros con los cuales se llevo a cabo la amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94° C por 3 min y 35 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 69° C y 2 min a 72° C, con un tiempo final de extensión a 72° C por 10 min.

5.1.2. Digestión enzimática de los fragmentos de ADN cP1 amplificado y scFv.

El producto de PCR del fragmento de ADN del cP1 se purificó en gel de agarosa al 2% por columnas Qiaquick (Qiagen®). Se digirió con la enzima Spe I (New England Biolabs®), 1 µg de ADN con 1 µl de enzima (10 U) y 5 µl de amortiguador de Spe I 10x en un volumen final de 50 µl. Se incubó a 37° C por 9 horas, después se volvió a purificar directamente la digestión por columnas Qiaquick.

El plásmido pComb3x tiene un sitio de restricción Spe I que se encuentra después del extremo C-terminal del inserto de ADN foráneo y antes de un sitio de restricción Sfi I, por lo que se procedió inicialmente a cortar con Spe I. Para cortar el fragmento de ADN scFv del vector pComb3x se realizaron dos digestiones con 20 µg de ADN plasmídico, conteniendo 6 unidades por microgramo (120 U) de enzima Spe I (New England Biolabs®), 15 µl de amortiguador para Spe I, en un volumen final de 150 µl. Se incubó por 9 horas a 37° C. Para liberar el fragmento de ADN completamente del vector, se añadió 6 unidades de enzima Sfi I (New England Biolabs®), por 1 µg de ADN y 5 µl de amortiguador para Sfi I a un volumen final de 200 µl. Se incubó por 6 horas a 50° C. La reacción entera fue concentrada en 50 µl por columnas Gen elute (Sigma®) y purificada en gel de agarosa al 2%. Para eliminar cualquier fragmento de ADN que no se haya digerido totalmente, se purificó nuevamente por medio de columnas Qiaquick (Qiagen®).

5.1.3. Ligación de los fragmentos de ADN scFv y cP1.

Los fragmentos scFv y cP1 cortados con Spe I se unieron en una reacción de ligación de un volumen final de 200 µl, 1.2 microgramos del scFv digerido y 0.720 microgramos de cP1 digerido, 1 µl de enzima Ligasa T4 (Fermentas®), 20 µl de amortiguador para ligasa T4 (Fermentas®), con una incubación a 37° C por 12 horas. Se añadió a la ligación solución de carga 1x. Se corrió la reacción entera en una electroforesis de gel de agarosa al 2%. Se recuperó el producto por columna Qiaquick (Qiagen®) y se resuspendió en 50 µl de agua libre de DNAsas.

5.1.4. Amplificación por PCR del producto de ligación scFv-CP1.

Para aumentar la cantidad de producto de ligación se amplificó por PCR en una reacción de 50 µl, 40.5 µl de ADN, 5 µl de amortiguador de PCR 10x, 2 µl de MgCl₂ para 25 mM, 1 µl de cebador sentido *csc-F* a 20 pmoles (añade el sitio Sfi1) (Tabla I), 1 µl de cebador antisentido *ceca* a 20 pmoles, y 1 µl de 2.5 unidades de FastStarHighFidelity Taq polimerasa (Roche®). Se agregó solución de carga 1x a la reacción. Se purificó por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se recuperó en columna de silica (Qiagen®), al final fue eluido en 50 µl agua libre de DNAsas.

5.1.5. Clonación y transformación del fragmento de ADN scFv-CP1 en vector pcDNA 3.1/NT-GFP TOPO.

Para la clonación del nuevo fragmento de ADN híbrido en el vector pcDNA 3.1/NT-GFP TOPO (Invitrogen®) (Apéndice C), se tomaron 2 µl de la amplificación purificada y se procedió a clonar según el protocolo descrito en el apartado 2.2. Se mezclaron en 50 µl de células competentes *E. coli* TOP10 (One shot, Invitrogen®) a 4° C en hielo. Se le dió un choque térmico a 42° C por 1 min, se regresó a hielo por 2 min, luego se añadieron 200 µl de medio de cultivo SOC (Invitrogen®) (apéndice A) y se dejó por 1 hora a 37° C con agitación ligera. Después se sembró en medio de cultivo sólido LB con carbencilina (50 µg/µl). A las clonas resultantes se les extrajo el ADN plasmídico con el método de Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega®) que se cortó con la enzima Sfi I. Se secuenció el segmento de la clonación para confirmar la presencia de los dos fragmentos de ADN unidos correctamente.

5.2. Clonación del fragmento de ADN scFv-cP1 en pComb3x y su expresión en fagos filamentosos.

5.2.1. Digestión de pcDNA 3.1/NT-GFP TOPO-scFv-cP1 y pComb3x-stuffer.

Se digirió el fragmento de ADN scFv-CP1 del vector pcDNA 3.1/NT-GFP TOPO con la enzima Sfi I como anteriormente se describió, al igual que el vector pComb3x (fig. 3), el cual fue donado conteniendo el fragmento de ADN del anticuerpo Fab contra toxoide tetánico (stuffer) de 1750 pares de bases por Carlos F. Barbas III (The Scripps Reserch Institute, La Jolla, EE.UU.).

5.2.2. Ligación de fragmento de ADN scFv-CP1 y vector pComb3x digeridos.

La reacción de ligación fue de una relación 1:2 vector-inserto (70:140 ng) con un volumen final de 100 µl con una incubación de toda la noche a temperatura de cuarto, posteriormente se precipitaron en su totalidad con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2.2 volúmenes de etanol 100%, por una noche a -20° C, se lavó con 1 ml de etanol al 70%, se seco al aire y finalmente se resuspendió en 15 µl de agua libre de DNAsas.

5.2.3. Transformación en *E. coli* XL1Blue y expresión en fago filamentoso.

La transformación se llevó a cabo por el método de electroporación. A 100 μ l de células electrocompetentes (apéndice D) se les agregaron 7.5 μ l de la reacción de ligación concentrada. Las condiciones del electroporador MicroPulser (Bio Rad®) fueron un solo pulso 2.5 kV, 25 μ F, 200 Ω y τ 4.0 mseg. Las células fueron resuspendidas en 5 ml de medio de cultivo SOC y se dejó incubando 1 hora a una temperatura de 37° C. Se agregaron 10 ml de medio SB con carbencilina (20 μ g/ml concentración final) y tetraciclina (10 μ g/ml concentración final). De la primera selección con carbencilina se sembraron en placas 50 y 100 μ l en medio LB agar con carbencilina. Una hora después se agregó 4.5 μ l de carbencilina (100 mg/ml). Se agregó una hora después 2 ml de fago ayudador VCSM13 (Stratagene®) y luego de 15 minutos de incubación se transfirió todo a un frasco de 500 ml conteniendo 183 ml de SB con 92.5 μ l carbencilina y 370 μ l tetraciclina. Se incubó el cultivo por 2 horas más. Se agregó 280 μ l del antibiótico kanamicina (50 mg/ml). Se dejó incubando a 37° C a máxima agitación por 12 horas. De la primera producción se realizó un primer ensayo con *X. fastidiosa*. A las colonias de las placas sembradas se les corroboró la presencia del fragmento de ADN por digestión con Sfi I como anteriormente se describió (apartado 5.1.4).

5.2.4. Verificación de la inserción del fragmento de ADN scFv-CP1 en el vector pComb3x por secuenciación.

Se extrajo plásmido de las células XL1Blue, como ya se mencionó, y se verificó que la secuencia tuviera el marco de lectura correcto. Se compararon con las secuencias originales del fragmento de ADN del anticuerpo y del cecropin P1 por medio del programa Sequencher®.

5.2.5. Purificación de fagos filamentosos M13.

Los fagos producidos en 200 ml después de 12 horas de cultivo se centrifugaron (Sorvall® RC 5B PLUS) a 3000 x g en rotor de columpio por 15 min a 4° C. Al sobrenadante transferido en un frasco de 500 ml se le añadió 50 ml de polietilenglicol 5x (PEG-8000 al 20 %) frío y se dejó incubando por 30 minutos en hielo. Luego se centrifugó (Sorvall® RC 5B PLUS) a 15,000 x g en rotor de columpio por 30 min a 4° C. El sobrenadante fue descartado y los tubos que lo contenían se invirtieron en papel secante y se dejaron secar al aire por 10 min. El paquete se resuspendió en 2 ml de TBS-BSA 1% (apéndice A), para luego ser centrifugado a 16,000 x g a 4° C. El sobrenadante que contiene los fagos se pasó por un filtro de 0.22 µm y se almacenó a 4° C. Se cuantificaron los fagos con la fórmula: absorbancia a 269 nm x 6×10^{16} / número de nucleótidos de genoma (vector + inserto).

5.3. Clonación del fragmento de ADN scFv-cP1 en *P. pastoris*.

Dos tipos de amplificaciones del fragmento de ADN scFv-cP1 se realizaron para la clonación en la levadura *P. pastoris*. En la primera se usó como molde de ADN el vector pcDNA 3.1/NT-GFP TOPO-scFv-cP1 y la reacción contenía 1x de amortiguador de PCR, 1 μ l de 18 mM de $MgCl_2$, 1 μ l de cebador sentido *F5*, 12.5 pmoles/ μ l, 1 μ l de cebador antisentido *Rp1not*, 12.5 pmoles/ μ l (Tabla I), 1 μ l de enzima *Taq* polimerasa a 0.1 U/ μ l y 1 μ l de ADN molde (200ng) en un volumen final de 50 μ l. Los parámetros con los cuales se llevó a cabo la amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94° C por 3 minutos y 35 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 69° C y 2 min a 72° C, con un tiempo final de extensión a 72° C por 10 min. Los productos de tres reacciones de PCR fueron corridas en gel de agarosa 2% y después se purificaron por columnas de sílice Qiaquick (Qiagen®) para eluirse en 50 μ l de agua. De este concentrado se tomaron 4 μ l a los cuales se le añadió 1 μ l de solución salina y 1 μ l de vector pcDNA 3.1/NT-GFP TOPO. Se mezcló ligeramente y se centrifugó (eppendorf 5417 R) a máxima velocidad por 10 seg a temperatura ambiente. La reacción se dejó a temperatura ambiente por 30 min para permitir la clonación. Después se tomaron 3 μ l que se añadieron a 100 μ l de células competentes TOP10 (one shot, Invitrogen®) en hielo para ser transformadas. Se dió choque térmico por 1.5 min a 42° C y se regresó a hielo por 2 min. Se añadieron 200 μ l de LB y se incubó por 1 hora. Se sembró toda la transformación en placas con LB carbencilina (50 μ g/ μ l). Las colonias resultantes se rastrearon por PCR de colonia y también se purificó el plásmido con las mismas condiciones ya

mencionadas. Se cortó el fragmento de ADN del scFv-cP1 y el vector pPICZαA con las enzimas de restricción EcoR I y Not I. Se llevó a cabo de la siguiente manera: 1 x de amortiguador de digestión con 10 unidades de cada enzima. Se incubaron por 4 horas a 37° C. Se añadió a cada reacción solución de carga 1x. Se corrieron las digestiones en gel de agarosa al 1.5 %. Las bandas correspondientes se cortaron del gel con navaja y se purificaron por squeeze-freeze con las columnas Ultrafree-MC de 0.45µm (Amicon®). Se precipitó el eluido por acetato de sodio 3 M y etanol como anteriormente fue descrito (apartado 5.2.2).

En la segunda amplificación el fragmento de ADN del scFv-cP1 que se encontraba en el vector pcDNA 3.1/NT-GFP TOPO se amplificó por PCR para cambiar los sitios de restricción inicial y final del fragmento que fueron para EcoR I el cebador *Intracon* y para Not I el cebador *Rp1not*, respectivamente (Tabla I) y se llevó a cabo como arriba se mencionó. El cebador *Intracon* tiene un codón ATG detrás de una secuencia consenso para levadura, que permite que sea reconocida cuando sea expresada por *P. pastoris* (Cigan *et al.*, 1988). Para diferenciarla del anterior producto se denominó M-scFv-cP1. El producto de PCR se ligó al vector pGem-T Easy (Promega®), en un tubo de 1.5 ml se mezcló 50 ng de vector y 50 ng de inserto (3:1). Este vector comercial está fosforilado con timina a cada extremo (fig. 5, pag. 35). Se añadió 5 µl de amortiguador y 1 µl T4 DNA ligasa, que unirán las adeninas del producto de PCR con las timinas del vector. Se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Se llevo a cabo una transformación en *E. coli* TOP10 (Allele®), en un volumen de 100 µl de células

se añadió 5 µl de la ligación, se dio choque térmico a 42° C por 45 segundos y se pasó a hielo por 2 min. Se añadió 1 ml de medio SOC para la recuperación de las células por 1 hora a 37° C. Al final se sembró 250 µl en 4 cajas de medio LB carbencilina 50 µg/ml a 37° C.

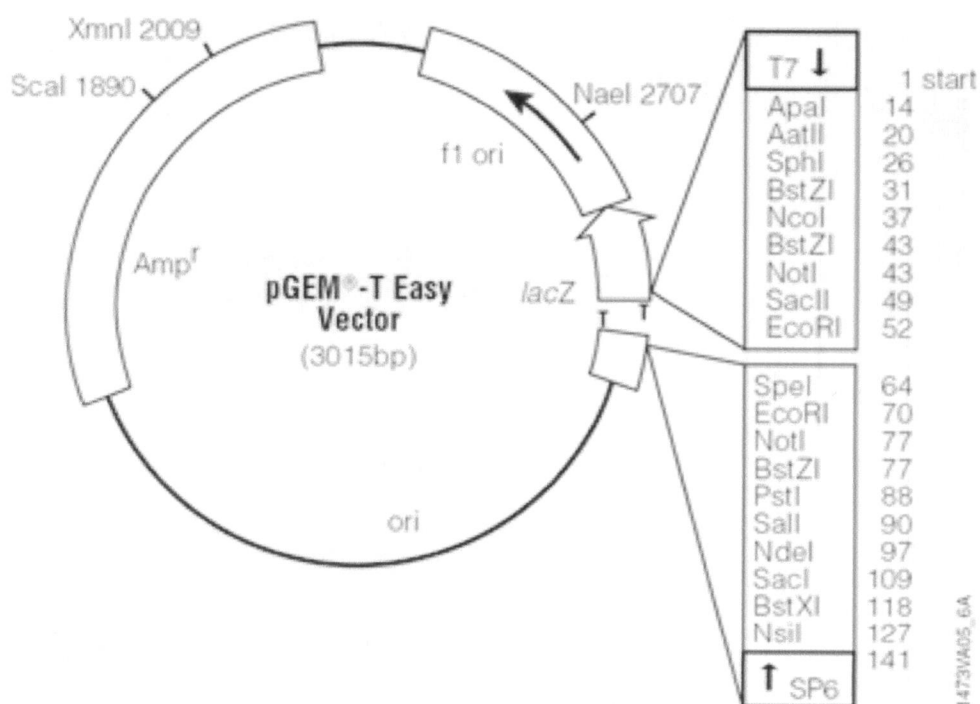


Fig. 5. Mapa del vector pGEM-T Easy (Promega[®]). Contiene un sitio múltiple de clonación. Secuencias del operon *lac*, operador *lac* y codón de inicio *lacZ*. Región fago f1. Un sitio de iniciación de transcripción de T7 ARN polimerasa y promotor de T7 ARN polimerasa. Un sitio de iniciación de transcripción de SP6 ARN polimerasa y promotor SP6 ARN polimerasa. Un origen pUC de replicación y secuencias de unión de cebadores pUC/M13 delantero y reverso.

Después de 24 horas aproximadamente las colonias resultantes fueron analizadas para hallar aquellas que tuvieran el inserto. A 10 colonias se les hizo un PCR directo y las que resultaron positivas se cultivaron para extracción de plásmido y/o criopreservación a -80° C. Se confirmó la presencia correcta del fragmento de ADN por secuenciación. Se cultivaron las clonas con los plásmidos positivos. Los plásmidos extraídos se sometieron a digestión enzimática con EcoR I y Not I. La restricción se realizó con 1 μ l de EcoR I (10 U/ μ l), 1 μ l de Not I (10 U/ μ l), 5 μ l buffer 2 10x (New England Biolabs®) con aproximadamente 5 μ g de plásmido a un volumen final de 50 μ l. Se incubó por 4 horas a 37° C. El plásmido pPICZB se sometió a la misma reacción de digestión. Ambas digestiones se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%. El tamaño correspondiente de cada producto se cortó con una navaja limpia y se purificó por el método de Qiaquick (Qiagen®).

5.4. Ligación de fragmento de ADN scFv-cP1 a los vectores pPICZ α A y pPICZB digeridos.

La ligación del scFv-cP1 y pPICZ α A digeridos, se llevó a cabo con 200 ng de inserto y 200 ng de vector, con 1x de amortiguador de ligasa, 1 μ l de T4 DNA ligasa (Fermentas®) en un volumen final de 20 μ l. Se tomaron 10 μ l de la reacción de ligación para añadirse a 100 μ l de células competentes *E. coli* TOP10 (one shot, Invitrogen®) y se dejó a 4° C por 10 min, se dió choque térmico a 42° C por 1.5 min y se pasó a hielo por 2 min. Se agregó LB bajo en sal y se dejó incubando a 37° C por 2 horas. Se añadió 4 ml de LB bajo en sal

zeocina (25 µg/ml) y se incubó por otras 2 horas. Una vez termina la incubación, se centrifugó (eppendorf 5417 R) a 2200 x g por 10 min. El paquete de células se resuspendió en 200 µl de LB bajo en sal zeocina (25 µg/ml) y se plaqueó en medio sólido LB bajo en sal zeocina (25 µg/ml). Las colonias resultantes fueron analizadas por PCR de colonia, como se ha descrito anteriormente (apartado 5.3)

La ligación del scFv-cP1 y pPICZB digeridos, se llevo a cabo en un volumen de 10 µl que contenía 5 µl de amortiguador, 1 µl de T4 DNA ligasa (Promega®) con una relación 1:3 vector:inserto utilizando el producto de la digestión de 5 µg de plásmido pGem-T Easy-scFv-cP1. La transformación se realizó del mismo modo descrito en este apartado.

5.5. Linearización de los plásmidos pPICZαA-scFv-cP1 y pPICZB-scFv-cP1 y transformación de *P. pastoris*.

Se realizó con las mismas concentraciones y condiciones que anteriormente fueron descritas en el apartado 2.7.2.

5.6. Expresión en *P. pastoris* del scFv-cP1.

La expresión extracelular de la proteína scFv-cP1 se realizó como ya se describió (apartado 3.2). La expresión intracelular en *P. pastoris* se llevó a cabo según el protocolo del apartado 3.2 utilizando el medio MGY para producir biomasa y el medio MM para inducir a la expresión de la proteína recombinante.

Se produjeron cultivos con de dos días y medio, con 2 inducciones con metanol 100% a una concentración final de 0.5%, cada 24 hr.

5.7. Purificación de cultivo de *P. pastoris* expresando M-scFv-cP1.

El cultivo fue centrifugado (Sorvall® RC 5B PLUS) a 3000 x g por 10 min, decantado y luego lavado en aproximadamente 10 ml de la solución Amortiguador de Rompimiento (AR) (apéndice A). Se determinó la D.O. a 600 nm y se volvió a centrifugar de igual manera. Se decantó la solución y el paquete celular se resuspendió nuevamente a una D.O. final de 75 a 100 en AR. Se añadió en una primera ocasión inhibidor de proteasas CompleteMini 1x final (Roche®). Se añadió un volumen igual de esferas de vidrio previamente lavadas en ácido de 0.5 mm estimando el volumen por desplazamiento. Para el rompimiento celular se mezcló con vortex durante 30 seg y después se incubó en hielo por 30 seg, repitiendo este procedimiento de 10 a 15 veces. Se revisaron muestras de las células bajo microscopio. Se centrifugó a 4000 x g por 20 min a 4° C. Se separó el sobrenadante claro a tubos de 1.5ml y se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4° C. De cultivos de 100 ml se obtenían extractos de aproximadamente 2 ml que se diluían con PBS 1x pH 7.4 con un volumen final de 50ml en tubos cónicos de 50 ml para posteriormente agregar 200 µl de esferas de agarosa Ni-NTA. Se realizó esto con el fin de prevenir que las esferas Ni-NTA se quelaran con el EDTA contenido en la solución AR. El procedimiento para la purificación con Ni-NTA se llevó a cabo como ya se describió anteriormente (apartado 3.3)

6. Análisis de la composición de aminoácidos del scFv y scFv-cP1.

Se determino la composición de aminoácidos de las proteínas solubles scFv y M-scFv-cp1 comparando dos tipos de análisis, el ExpasyProtParam que calcula una secuencia peptídica en base a la nucleotídica determinada por secuenciación del fragmento de ADN, y un análisis realizado con hidrólisis ácida con 6 N ácido clorhídrico al vacío, separado por cromatografía y cuantificado por UV, realizado en el AAA Service Laboratory, Inc., por Jay Gambee (Damascos, Oregon, EE.UU.).

7. Cuantificación de proteínas solubles scFv y scFv-cP1 y fagos expresando scFv y scFv-cP1.

Las proteínas scFv y M-scFv-cP1 se cuantificaron en espectrofotómetro utilizando el coeficiente de extinción calculado por el programa Expasy ProtParam basado en la traducción proteica de la secuencia de ADN. Los coeficientes de extinción fueron para scFv 1.34 y para M-scFv-cP1 1.194.

Los fagos utilizados se cuantificaron por espectrofotómetro utilizando la fórmula:
absorbencia a Ajuste 269 nm (=medida A_{269} -medida A_{320}) $\times 6 \times 10^{16}$ / numero de nucleótidos del genoma del fago = partículas de fago / ml.

8. Pruebas biológicas *in vitro* con *X. fastidiosa* y los anticuerpos scFv y scFv-cP1 expresados en fagos o en forma soluble.

En todos los casos *X. fastidiosa* fue cultivada en medio PD2 a 28° C por 4 a 6 días. Se determinó la concentración de células por mililitro por absorbancia a 600 nm considerando que 0.1 de densidad óptica (Absorbancia) son 1×10^8 células por mililitro. En todos los experimentos se utilizaron 1×10^6 en 50 μ l de medio PD2.

8.1. Efecto de varias concentraciones de los fagos filamentosos sobre *X. fastidiosa*.

En tubos de 1.5 ml, se colocaron 50 μ l de células de *X. fastidiosa* STL en medio PD2, se agregaron 50 μ l de distintas diluciones de la producción de fagos en TBS-BSA 1%, las cuales fueron 1:2, 1:10 y 1:100 y se cuantificaron como se indica en el apartado 8. Como controles se agregaron a los 50 μ l de células en 50 μ l de amortiguador TBS-BSA 1% diluido 1:2, 1:10 y 1:100. Se incubaron a una temperatura de 28° C por 48 horas. Las células se centrifugaron (eppendorf 5417 R) por 10 min a 10,500 x g para retirar el sobrenadante. Se resuspendió el pellet con 20 μ l de medio PD2. Después se sembró el total escurriendo la gota de 20 μ l en medio de cultivo sólido PD2. Los resultados se observaron después de 10 días de crecimiento.

8.2. Tiempo requerido para la acción de los fagos scFv y scFv-cP1 sobre *X. fastidiosa*.

Se probaron los fagos scFv-cP1 y fagos scFv para determinar el tiempo en el que ocurre un efecto eliminatorio sobre *X. fastidiosa* STL. En tubos de 1.5 ml, que contenían cada uno 50 μ l de células se agregaron 50 μ l de fagos a una concentración de 6×10^5 partículas por célula bacteriana. Se incubaron a 28° C por 20 min, 2, 4, 9, 16, 28 y 150 hr. Las células se centrifugaron (eppendorf 5417 R) por 10 min a 10,500 x g y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió en 20 μ l de PD2 y se sembraba una gota escurrida en medio de cultivo sólido PD2. Se observaron los resultados a los 10 días de crecimiento.

Se realizó un siguiente experimento en el que se analizaron a las 2 horas y 48 horas dos concentraciones de fagos diluidos 1/10 y 1/50, con dos fagos diferentes scFv-cP1 y ayudador. Se sembraron e incubaron con las mismas condiciones descritas.

8.3. Determinación de la especificidad del fago scFv-CP1.

Se probaron distintas especies de bacterias, con el fago scFv-CP1 a una concentración de 6×10^5 partículas por célula bacteriana. Cada una de las especies de bacterias se ajustó a la misma concentración que *X. fastidiosa* STL a un volumen final de 100 μ l. Se incubaron por 48 horas a 28° C. Las células se centrifugaron por 10 min a 10,500 x g, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 20 μ l de PD2. Después se sembró el total en medio de cultivo

sólido PD2 con gota escurrida. Los resultados se observaron a los 10 días de crecimiento.

En otro experimento se probaron distintas especies de bacterias con diferentes fagos, scFv-cP1 y ayudador a una misma concentración, con dos distintos tiempos de incubación, 24 y 48 horas. Se sembraron e incubaron con las mismas condiciones descritas en este apartado.

8.4. Efecto de los fagos scFv y scFv-CP1 sobre distintas cepas de *X. fastidiosa*.

Se probaron las cepas STL, Temecula, M23 y Baja #5 de *X. fastidiosa*. Se ajustaron las distintas cepas a una misma concentración y se agregaron los fagos scFv-CP1 a una concentración de 6×10^5 partículas por célula bacteriana en un volumen final de 100 μ l. Se incubaron a una temperatura de 28° C por 24, 48, 72, 96 y 120 hr. Como controles las bacterias se incubaron en TBS-BSA 1%. Réplicas del tiempo a 24 horas fueron sembradas aparte en medio sólido PD2 con carbencilina a una concentración de 50 μ g/ml. Todos los experimentales se centrifugaron por 10 min a 10,500 x g y se lavaron en 20 μ l de PD2. Se sembraron en medio de cultivo sólido PD2 con gota escurrida de 20 μ l. Se observaron los resultados después de 10 días de crecimiento.

8.5. Efecto de fagos expresando diferentes proteínas sobre *X. fastidiosa*.

Se probaron el efecto de los fagos filamentosos M13 ayudador, fago anti-salmonella (producido en el curso de despliegue en fagos filamentosos impartido en esta facultad por el Dr. José Luis Stephano en el laboratorio "Meredith Gould"), fago anti-toxoide tetánico, fago scFv anti-*X. fastidiosa* y fago scFv-cP1, sobre *X. fastidiosa* STL. En un tubo de 1.5 ml conteniendo 50 µl de células se agregaron 50 µl de los fagos a una concentración 6×10^5 partículas en TBS-BSA 1% por célula bacteriana a un volumen final de 100 µl. Se incubaron por 48 horas a 28° C y posteriormente se centrifugaron por 10 min a 10,500 x g para retirar el sobrenadante y resuspender en 20 µl de PD2. Se sembró en medio de cultivo sólido PD2 por gota escurrida. Se observaron los resultados a los 10 días de crecimiento.

8.6. Ensayos sobre el efecto de las moléculas solubles scFv y M-scFv-cP1 sobre *X. fastidiosa*.

En este primer experimento se utilizaron dos distintas concentraciones máximas producidas de la purificación de cada cultivo de expresión para determinar el efecto de las moléculas scFv y M-scFv-cP1 dializadas en PBS 1x pH 7.4 (apartado 3.3), sobre *X. fastidiosa*. En tubos de 1.5 ml conteniendo 50 µl con 10^5 células en PD2 se mezclaron con: scFv 3.3 µg/µl final, scFv-cP1 0.86 µg/µl final, y PBS 1x pH 7.4 como control. Todos a un volumen final de 100 µl. Se mezcló suavemente, se centrifugó (eppendorf 5417 R) por 3 seg a máxima velocidad y

se incubó a 28° C por 72 hr. Una vez pasado el tiempo de incubación, se mezcló suavemente, se centrifugo por 3 segundos a máxima velocidad y se sembró el total de cada tubo en una caja petri conteniendo medio sólido PD2 y se incubaron a 28° C. Después de seis días se observó el resultado y se registró con fotografía. Cuando fueron los diez días desde la siembra se registro de nuevo con fotografía.

En un segundo experimento se analizaron tres diferentes concentraciones de las proteínas de scFv y scFv-cP1, 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M. El tiempo de incubación fue de 96 hr. Se sembró e incubó con las mismas condiciones descritas en este apartado. Se registro con fotografía después de los 10 días a partir de la siembra en medio sólido.

Resultados

1. Confirmación de cultivos de cepas de *X. fastidiosa*.

Los cultivos de *X. fastidiosa* verificados por PCR con los cebadores *RST31* y *RST33* dieron un producto positivo aproximado de 700 pb (fig. 6). El resultado se corroboró con el ensayo de ELISA PathoScreen Xf (Adgia®) (fig. 7).

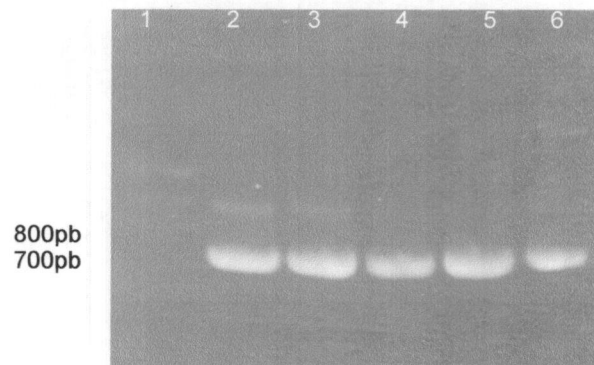


Fig. 6. PCR de cultivos de *X. fastidiosa* con los cebadores *RST31* y *RST33*. Carril 1, marcador de peso molecular (no se distingue en la foto). Carril 2 a 6 corresponden a las cepas STL, M23, Temecula, Baja #5 y STL respectivamente, con un producto de 730 pb aproximado. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

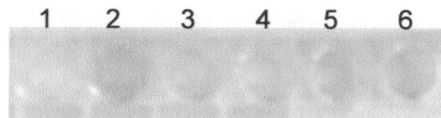


Fig. 7. ELISA de cultivos de *X. fastidiosa* utilizando los reactivos de PathoScreen Xf (Adgia®). Pozo 1, control negativo. Pozo 2, control positivo. Pozo 3, cepa STL. Pozo 4, Temecula. Pozo 5, Baja #5. Pozo 6, M23. Se observa que todas las cepas fueron positivas.

2. Clonación del ADN del fragmento variable de cadena sencilla (scFv) anti-*X. fastidiosa* en *Pichia pastoris*.

A partir de ADN del plásmido pComb3x conteniendo el fragmento del scFv anti-*X. fastidiosa*, se amplificó por PCR un producto que corrió alineado a la banda de 700 pb del marcador de peso molecular (fig. 8, pag. 50). El producto del PCR del scFv se clonó en el vector pCR[®]2.1-TOPO[®]. Este vector asegura que todo el fragmento de interés fuera digerido. Se examinaron las transformantes de *E. coli* TOP10F' por digestión de plásmido con la enzima EcoRI que produjeron un fragmento del tamaño aproximado entre 700 y 800 pb (fig. 9, pag 50), lo cual sirvió para asegurar la existencia del fragmento y para realizar el corte de digestión doble EcoRI-NotI, el cual se ligó al vector pPICZαA y se transformó de nuevo en células de *E. coli*. Las colonias resultantes se verificaron por reacción de PCR directo de colonia (fig. 10, pag 51). La colonia que resultó positiva al PCR se sometió a digestión enzimática con EcoR I y Not I (fig. 11, pag 51). Se demostró por secuenciación que el fragmento de ADN era del scFv dentro del vector pPICZαA y se encontraba dentro del marco de lectura (fig. 12, pag. 52).

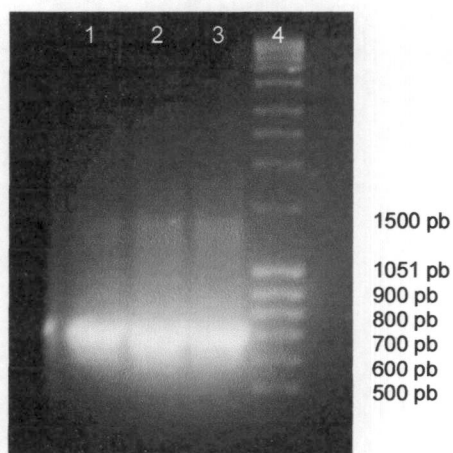


Fig. 8. Amplificación del fragmento de ADN del scFv anti-xylella. Producto de 734 pares de bases. Carril 1, 2 y 3 corresponden a la amplificación del fragmento de ADN scFv, y Carril 4 al marcador de peso molecular. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

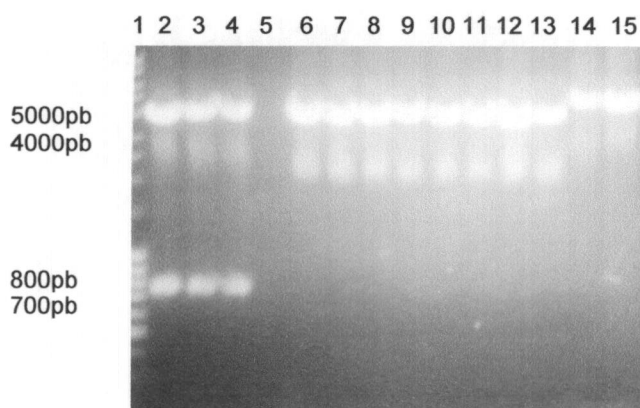


Fig. 9. Análisis de transformantes de *E. coli* con el vector pCR[®]2.1-TOPO-scFv por restricción enzimática. El plásmido extraído de cada clona se cortó con la enzima EcoR1. Los resultados positivos dieron un único fragmento entre 700 y 800 pb. Carril 1, marcador de peso molecular, Carril 2-4, clonas positivas, Carril 6-15, clonas que no presentaron el fragmento. Gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio.

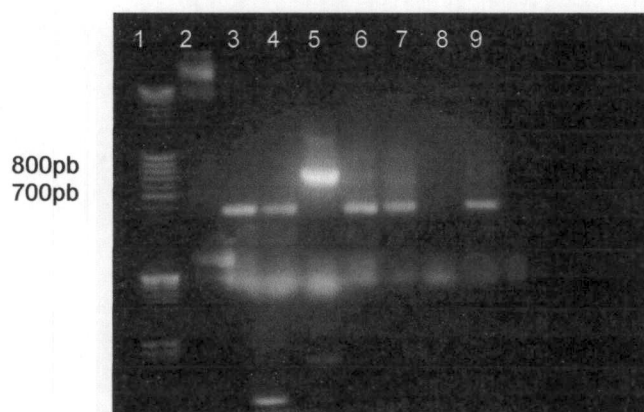


Fig. 10. Análisis de transformantes de *E. coli* de la Ligación pPICZαA-scFv. Amplificación del fragmento de ADN del scFv anti-xylella a partir de transformantes de *E. coli*. En la Carril 5 se observa una sola clona que dio un producto correspondiente a los 734 pares de bases. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

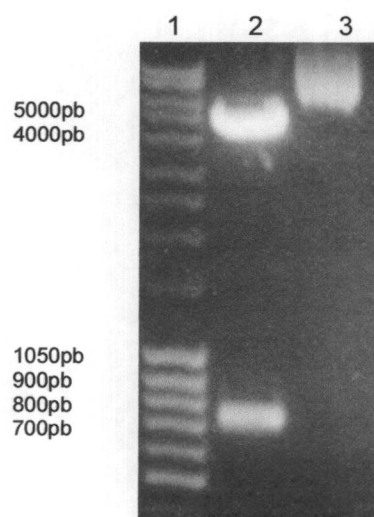


Fig. 11. Digestión enzimática de la clona pPICZαA-scFv, donde se demostró la ligación del producto de la amplificación del scFv y el vector pPICZαA. Carril 1: estándar, Carril 2: plásmido digerido con enzimas de restricción EcoRI y NotI con un fragmento de 730 pb, Carril 3: plásmido control. Gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.

5' GAATTCGGCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCAGG
 AGAAACGGTCAACATCACCTGCTCAGGCAGTGGTGGCAACCACTATG
 GCTGGTATCAGCAGAAGTCACCTGGCAGTGCCCCTGTTACTCTGATC
 TATGACAACACCAACAGACCCTCGGACATCCCTTCACGATTCTCCGG
 TTCCGAGTCCGGCTCCACAGGCACATTGACATCACTGGGGTCCAAGT
 CGACGACGAGGCTGTCTATTACTGTGGGAGCTGGGAAAGCAACAATA
 ATCCTGGTATATTTGGGGCCGGGACAGCCCTGACCGTCCTAGGTCAG
 TCCTCTAGATCTTCCACCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCT
 CCAGACGCCCCGAGGAGGGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGT
 TTGACTTCAGTGACCGTGGCATGCACTGGGTGCGACAGGCGCCCGGC
 AAGGGGCTGGAATACGTCGCAGGCATTAACACTCATAGTGAGACAGG
 ATATGGGGCAGTGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACG
 GGCAGAGTACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGAC
 ACCGGCACCTACTACTGCGCCAAAAATGCTGATCGTGGTTATGATGG
 AGACGAGATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCT
 CCACTAGTGGCCAGGCCGGCCAGGCGGCCGCCAGCTTTCTAGAACAA
 AAACTCATCTCANAANAAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATC
 ATCATCATCAT TGA 3'

Fig. 12. Secuencia del fragmento de ADN scFv clonado en el vector pPICZαA. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la secuenciación fueron α -factor y 3'AOX1. Se indica: la región del primer que confirió el sitio de restricción EcoRI (azul), región del primer que confirió el sitio de restricción NotI (amarillo), región que codifica para el epítipo anti-myc (rosa), región que codifica para la marca de polihistidinas (verde).

Se transformaron células de *P. pastoris* X-33 a partir de plásmido pPICZαA-scFv linearizado (fig. 13). Las colonias resultantes fueron comparadas con un control de células competentes X-33 sin transformar seleccionadas en medio con antibiótico zeocina (fig. 14, pag. 54). La amplificación del fragmento de ADN de scFv por PCR de colonia fue del tamaño esperado en las ocho colonias de *P. pastoris* transformadas produciendo el tamaño aproximado de 730 pb (fig. 15, pag. 54).

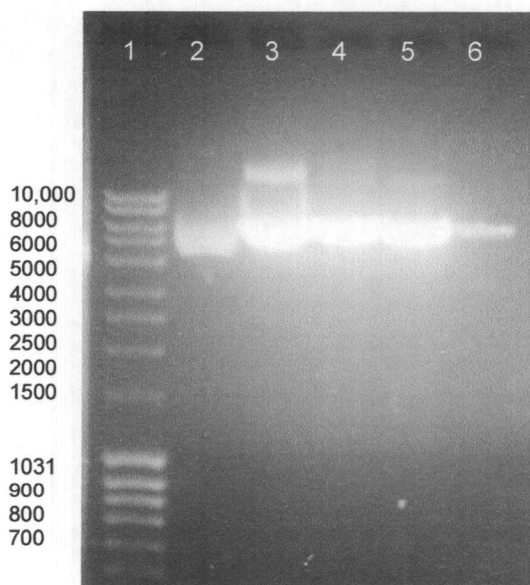


Fig. 13. Ejemplo de Linearización del vector pPICZαA-scFv para integración en el genoma del *P. pastoris*. Carril 1: marcador de peso molecular MassRuler (Fermentas®), carril 2: vector pPICZαA-scFv sin digerir, carril 3 al 6: vector pPICZαA-scFv digerido con Sac I. Gel de agarosa 1.2 % teñido con bromuro de etidio.

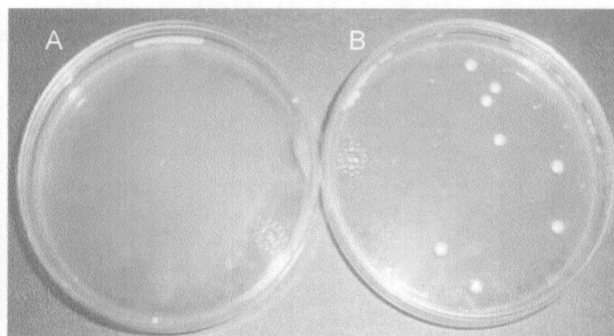


Fig. 14. Transformación de la levadura *P. pastoris* con el vector pPICZαA que contiene el fragmento de ADN del scFv. A, no hay crecimiento en el control con la levadura sin transformar en medio YPDS con zeocina. B, transformantes de la levadura en medio YPDS con zeocina. Placas con medio sólido YPDS con zeocina (100 $\mu\text{g/ml}$).

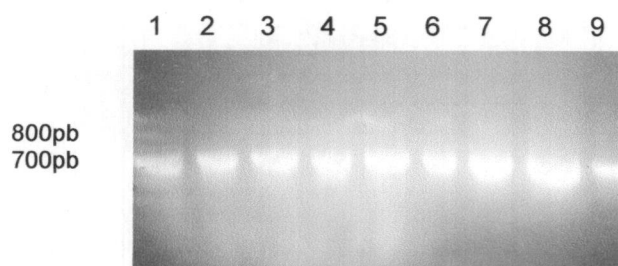


Fig. 15. Amplificación del fragmento de ADN del scFv a partir de colonias transformantes de *P. pastoris*. Carril 1: estándar, Carril 2 a 9: producto único entre los 700 y 800 pb. Gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

3. Expresión de scFv anti-*X. fastidiosa* en *E. coli* y *P. pastoris*.

El anticuerpo expresado soluble en *E. coli* mediante el sistema pComb3x da un tamaño aproximado de 33 kDa en geles SDS-PAGE al 10% (fig. 16, pag. 56). En *P. pastoris* se obtuvo la expresión del scFv de todas las colonias, con un tamaño aproximado de 35 kDa. En la figura 15 y tabla II (pag. 56) se muestran las expresiones de todas las clonas. De todas estas se eligió la clona 4 por que cuando se cuantifico por espectrofotometría y se visualizo en geles de poliacrilamida presento buena expresión por lo que fue la que se produjo para los experimentos posteriores. En una prueba tiñendo con azul alician (apéndice A) las proteínas de estas clonas en geles de poliacrilamida no revelo bandas teñidas que corresponden a carbohidratos que pudieran haber sido añadidos por la levadura.

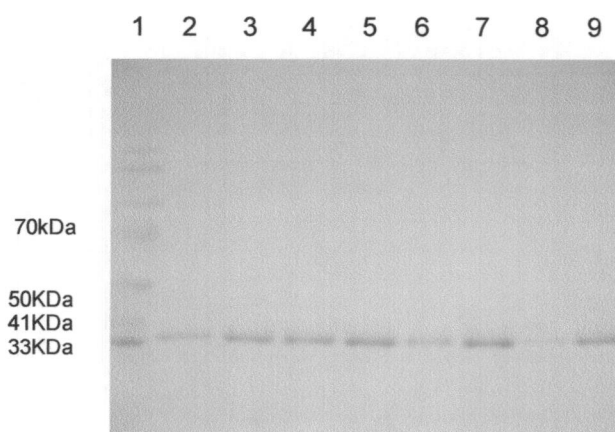


Fig. 16. Comparación de la expresión del scFv anti-*X. fastidiosa* de varias clonas resultantes de la transformación en *P. pastoris*. Carril 1, marcador de peso molecular. Carril 2 a 9, clonas 1 a 8 respectivamente con 10 μ l de muestra del producto purificado de cultivos en medio BMMY. Gel de poliacrilamida al 10 % con SDS, teñido con azul coomassie.

Tabla II. Producción de scFv de las distintas clonas de *P. pastoris* transformadas con pPICZαA-scFv. Se muestra la densidad óptica (O.D.) a la que se indujo con metanol y el tiempo en horas en que tardo en alcanzarla

Producción de scFv de las distintas clonas de <i>P. pastoris</i> transformadas con pPICZαA-scFv						
Numero de clona productora de scFv	Tiempo en generar biomasa con BMGY	O.D. _{280nm} al tiempo de la Inducción	Volumen final con medio BMMY	Cantidad producida de elusión en µg/µl	Cantidad total producida de scFv en µg	Concentración por volumen total de cultivo
1	25 hr	4.4	110 ml	0.50	75.0	0.68 µg/ml
2	20 hr	3.7	95 ml	0.85	93.5	0.98 µg/ml
3	23 hr	4.6	115 ml	0.35	63.0	0.54 µg/ml
4	23 hr	3.6	90 ml	0.28	57.2	0.63 µg/ml
5	20 hr	6.0	150 ml	0.14	18.6	0.12 µg/ml
6	21 hr	6.0	150 ml	0.50	105.0	0.7 µg/ml
7	21 hr	4.2	105 ml	0.14	22.8	0.21 µg/ml
8	17 hr	4.4	110 ml	0.14	41.4	0.37 µg/ml

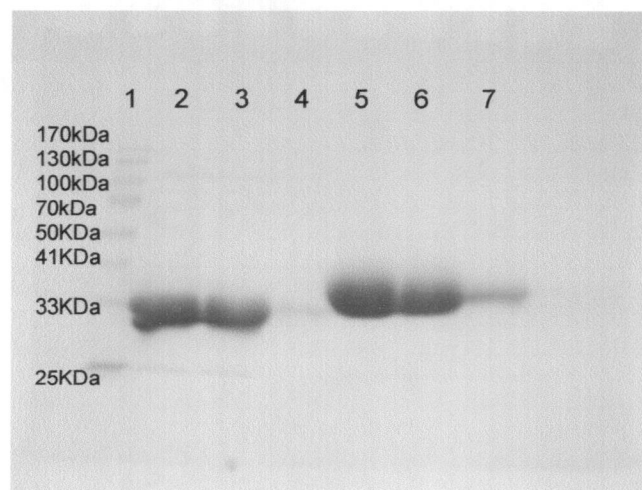


Fig. 17. Expresión de scFv anti-*X. fastidiosa* en *E. coli* TOP10F' y *P. pastoris*. Carril 1, marcador de peso molecular. Muestras de 10 µl. Carril 2, 3 y 4, 1era, 2da, y 3era elusión respectivamente de cultivo de *E. coli*. Carril 5, 6 y 7, 1era, 2da y 3era elusión respectivamente, de cultivo de *P. pastoris*. Por cada 100 ml de scFv producido en *E. coli* fue 0.814 mg por 100 ml y en *P. pastoris* fue 1.11 mg por 100 ml. Gel de poliacrilamida al 10% con SDS, teñido con azul coomassie.

4. Ensayo preeliminar del efecto de acoplado químico scFv-cP1 en *X. fastidiosa*.

El acoplamiento químico del scFv al péptido cP1 mostró efecto bactericida en *X. fastidiosa*, en el cual solo creció 1 ufc diez días después de la siembra en el medio sólido, mientras que en el control crecieron 300 ufc. El experimental con el acoplado scFv resultó con 10 ufc, el cual también eliminó las bacterias. Después de los diez días no hubo más crecimiento aun después de dejar incubando por 7 días mas (ver Tabla III).

Tabla III. Muestra el efecto bactericida del péptido lítico CP1 acoplado químicamente al scFv en cultivo de *X. fastidiosa*.

Efecto Antibacterial del péptido Cecropin P1 acoplado al scFv anti-<i>X. fastidiosa</i> (cepa STL)		
<u>Después de 6 horas de incubación a los 10 días de cultivo</u>		
	Ufc	%
Control sin scFv ni péptido ^a	300	100.0
0.05 µg/µl scFv ^b	10	3.3
0.05 µg/µl scFv acoplado a ^c 0.125 µg/µl de CP1	1	0.3

5. Construcción del híbrido scFv-cP1.

A partir de una sola hebra sintetizada el cP1 se amplificó adicionando los sitios de restricción Spe I y Sfi I (Fig. 18, pag. 59). Posteriormente se digirieron ambos scFv (Fig. 19, pag. 59) y cP1 con Spe I y Sfi I y se ligaron (Fig. 20 en carril 3, pag 60) dando un nuevo fragmento aproximado de 840 pb con el tamaño esperado constituido por 730 pb del scFv mas 100 pb de cecropin P1, que pone en sus extremos dos sitios de restricción Sfi I (Fig. 21, pag. 60). El fragmento construido se clono en el vector pcDNA 3.1/NT-GFP-TOPO (Fig. 22, pag 61), fue cortado y posteriormente ligado al vector pComb3x digerido con Sfi I (Fig. 23, pag 61 y fig. 24, pag. 62). La construcción pcDNA 3.1/NT-GFP-TOPO-scFv-cP1 sirvió como templete para realizar las amplificaciones del scFv-cP1 y añadir nuevos sitios de restricción para la clonación en el vector pPICZαA y pPICZB.

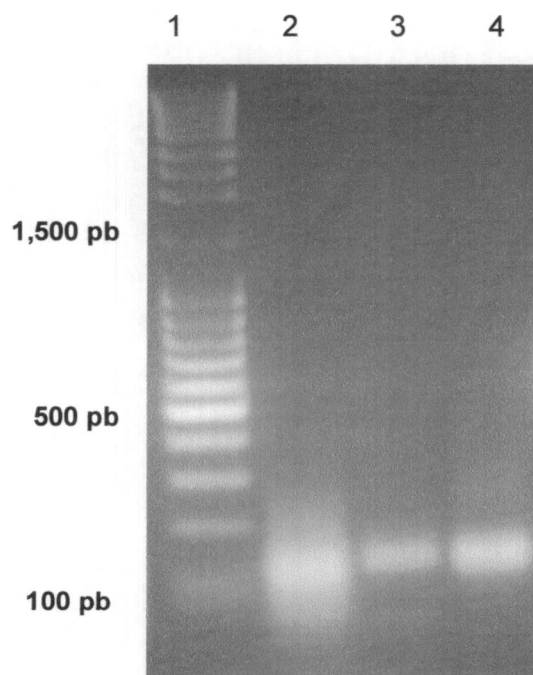


Fig. 18. Amplificación del péptido lítico Cecropin P1 (CP1) por PCR. Carril 1, marcador de peso molecular. Carril 2, CP1_{ss}ADN como control. Carril 3 y 4, CP1 amplificado con los cebadores cecs y ceca. Gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio.



Fig. 19. Corte del fragmento de ADN del scFv a partir del vector pComb3x. Carril 1, marcador de peso molecular. Carril 2, vector pComb3x-scFv sin cortar. Carril 3, vector pComb3x-scFv cortado con enzimas restricción SfiI y SpeI, el scFv corresponde al tamaño de 730 pb aproximadamente. Gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio.

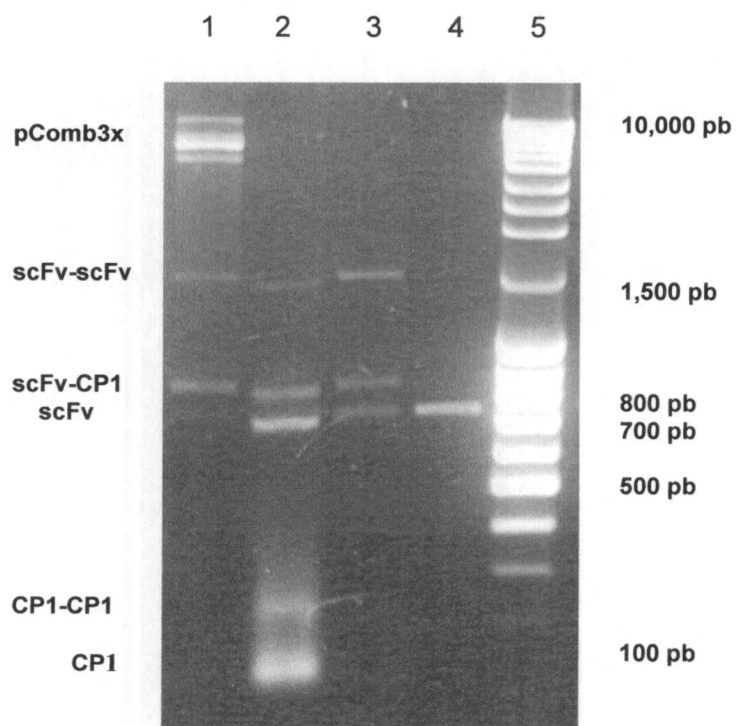


Fig. 20. Se muestran los diversos resultados obtenidos de la ligación scFv-CP1. Carril 1: scFv-scFv, scFv-cP1, scFv, cP1-cP1 y cP1. Carril 2: scFv-scFv, scFv-cP1, scFv. Carril 3: scFv. Carril 4: marcador de peso molecular. Gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio.

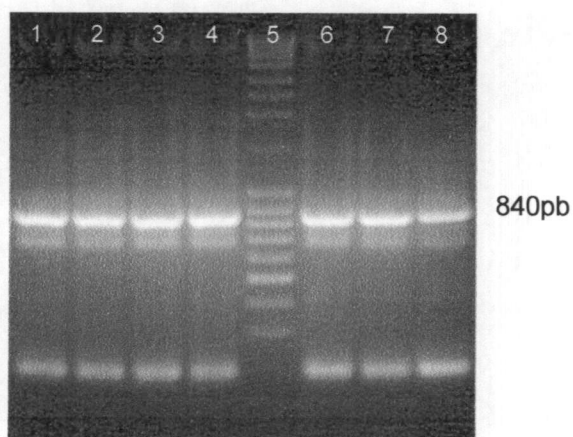


Fig. 21. Amplificación por PCR del híbrido scFv-CP1 a partir del producto de la ligación. Se muestran varias reacciones de PCR en carriles 1-4 y 6-8 y el marcador de peso molecular en el carril 5. Gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio.

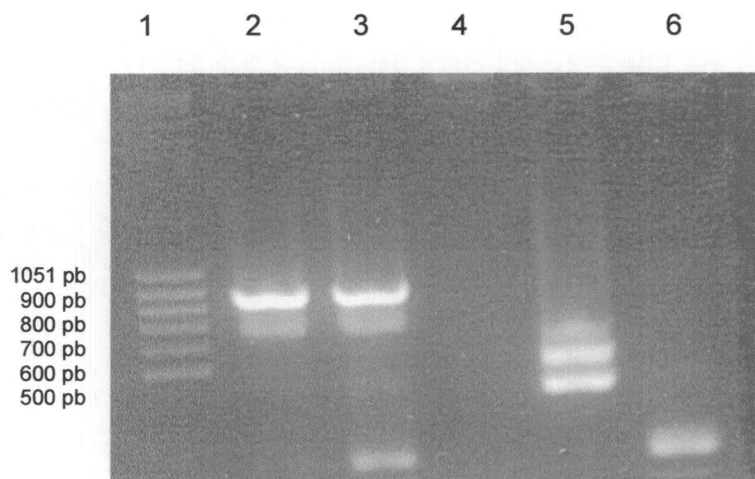


Fig. 22. Resultado del análisis por PCR de colonias producto de la transformación en *E. coli* con el híbrido scFv-CP1 en el vector pcDNA 3.1/NT-GFP-TOPO. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2 y 3: misma muestra corrida dos veces correspondiente a scFv-cP1. Gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio.

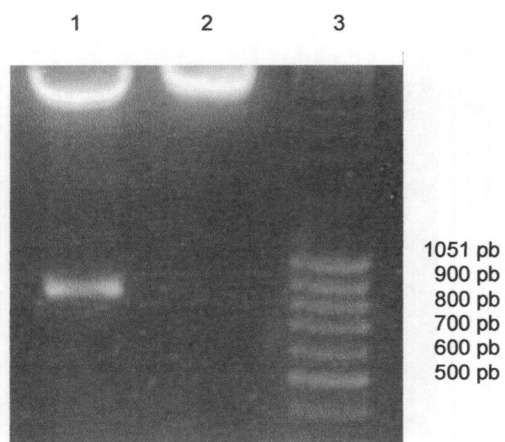


Fig. 23. Resultado de la digestión del vector pcDNA 3.1/NT-GFP-TOPO-scFv-cP1 con la enzima SfiI. Carril 1, plásmido cortado con producto de 800pb. Carril 2, plásmido control. Carril 3, marcador de peso molecular. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

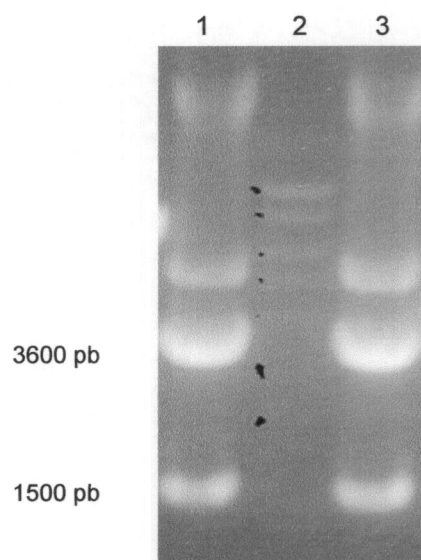


Fig. 24. Digestión del vector pComb3x. Carril 1 y 3, plásmido cortado con fragmento *stuffer* de 1500 pb. Carril 2, marcador de peso molecular. Gel de agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio.

6. Clonación del scFv-CP1 en pComb3x y su expresión en fagos filamentosos.

El fragmento de 840 pb cortado con SfiI obtenido de la construcción pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO-scFv-cP1 fue ligado al vector pComb3x y transformado en *E. coli* XL1Blue lo cual se seleccionó con carbencilina y tetraciclina y posteriormente se infectó con el fago ayudador VCSM13 que se seleccionó a su vez con kanamicina. La secuenciación del fragmento de ADN confirmó que el marco de lectura era correcto (Fig. 25, pag. 64).

5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GTG GCC CAG GCG GCC
CTG ACT CAG CTG ACT CAG CCG TCC TCG GTG TCA GCA
 AAC CCA GGA GAA ACG GTC AAC ATC ACC TGC TCA GGC
 AGT GGT GGC AAC CAC TAT GGC TGG TAT CAG CAG AAG
 TCA CCT GGC AGT GCC CCT GTT ACT CTG ATC TAT GAC
 AAC ACC AAC AGA CCC TCG GAC ATC CCT TCA CGA TTC
 TCC GGT TCC GAG TCC GGC TCC ACA GGC ACA TTG ACC
 ATC ACT GGG GTC CAA GTC GAC GAC GAG GCT GTC TAT
 TAC TGT GGG AGC TGG GAA AGC AAC AAT AAT CCT GGT
 ATA TTT GGG GCC GGG ACA GCC CTG ACC GTC CTA GGT
 CAG TCC TCT AGA TCT TCC ACC GTG ACG TTG GAC GAG
 TCC GGG GGC GGC CTC CAG ACG CCC GGA GGA GGG CTC
 AGC CTC GTC TGC AAG GCC TCC GGG TTT GAC TTC AGT
 GAC CGT GGC ATG CAC TGG GTG CGA CAG GCG CCC GGC
 AAG GGG CTG GAA TAC GTC GCA GGC ATT AAC ACT CAT
 AGT GAG ACA GGA TAT GGG GCA GTG GTG AAG GGC CGT
 GCC ACC ATC TCG AGG GAC AAC GGG CAG AGT ACA GTG
 AGG CTG CAG CTG AAC AAC CTC AGG GCT GAG GAC ACC
 GGC ACC TAC TAC TGC GCC AAA AAT GCT GAT CGT GGT
 TAT GAT GGA GAC GAG ATC GAC GCA TGG GGC CAC GGG
 ACC GAA GTC ATC GTC TCC TCC ACT AGT *AGC TGS CTC*
AGC AAA ACC GCC AAG AAA CTT GAG AAC TCT GCA AAG
AAA CGC ATC TCT GAA GGC ATT GCT ATC GCG ATA CAG
GGT GGC CCG CGC GCA GGC CAG GCCGGCC 3'

Fig. 25. Secuencia nucleotídica del scFv unido con el CP1. Las áreas subrayadas indica el sitio de unión de cebadores para la amplificación por PCR. Las letras en negro son la secuencia del scFv y en verde (cursivas) la secuencia del CP1.

7. Clonación y expresión de proteínas en forma soluble del scFv-CP1 en *P. pastoris*.

El fragmento de 840 pb de scFv-cP1 se amplificó para cambiar por nuevos sitios de restricción (fig. 26, pag. 66), el cual se ligó a los vectores pPICZαA de expresión extracelular y pPICZB de expresión intracelular.

La construcción pPICZαA-scFv-CP1 linearizado se transformó en varias clonas de *P. pastoris* X-33, lo cual pudo ser confirmado por reacción de PCR (fig. 27, pag. 66), sin embargo la inducción a expresión extracelular de 10 clonas positivas al PCR no produjo proteínas recombinantes visualizadas en geles SDS-PAGE 10% cuando se eluyó en la purificación por Ni-NTA (fig. 28, pag. 67). Se optó por la expresión intracelular utilizando el vector pPICZB. Se observó que la expresión intracelular con la construcción M-scFv-cP1 con 2 días y medio de cultivo, produjeron una proteína que corrió aproximadamente con un peso molecular de ~38 kDa (fig. 29, pag. 67). Un muestreo del cultivo a diferentes intervalos de tiempo, mostraron que aumento la expresión de una única proteína de aproximadamente 70 kDa se observa que el aumento en el tamaño de la proteína expresada se debe a que tiende a formar dímeros cuando está concentrada. Se observa que obtiene su pico máximo de expresión a las 24 horas (fig. 30, pag 68).

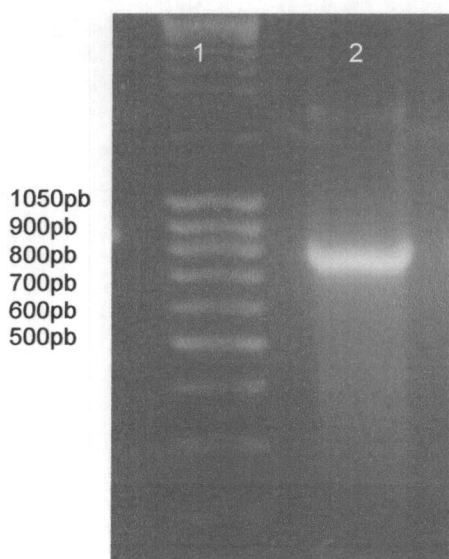


Fig. 26. Amplificación del fragmento de ADN híbrido scFv-CP1 para expresión soluble en *P. pastoris*. Carril 1, marcador de peso molecular. Carril 2, producto de PCR de 840 pb. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

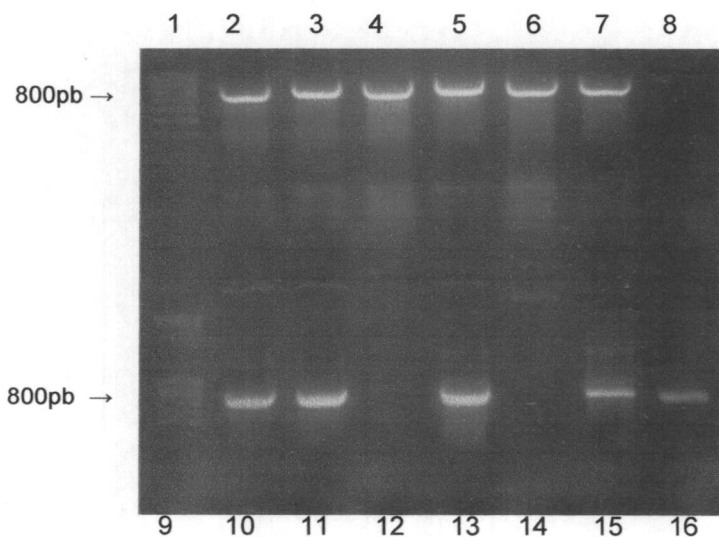


Fig. 27. Amplificación del fragmento de ADN scFv-CP1 a partir de colonias de *P. pastoris* transformadas con el vector pPICZαA-scFvcP1. Arriba y abajo, Carril 1 y 9 corresponden al marcador de peso molecular. Arriba, Carriles 2 a 7 corresponden al análisis de clonas 1 a 6. Abajo, Carriles 10 a 16 corresponden al análisis de clonas 7 a 12. Carril 8 control de PCR (fragmento de ADN scFv-CP1 amplificado de plásmido pPICZαA-scFvcP1). Productos aproximados de 800 pb. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

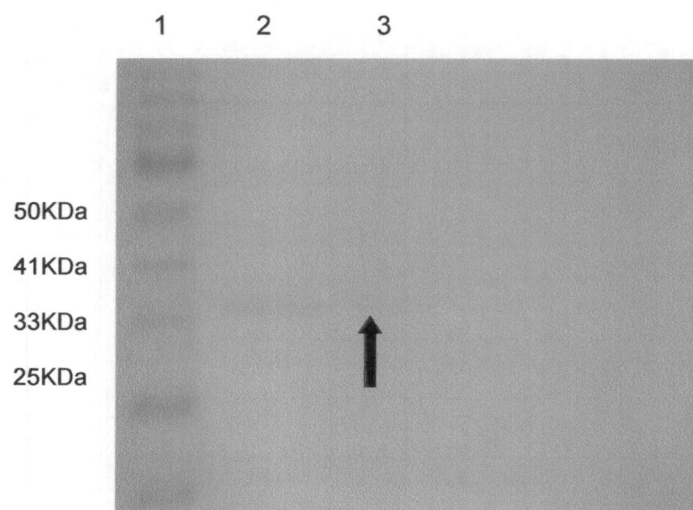


Fig. 28. Expresión extracelular negativa del híbrido scFv-CP1 en *P. pastoris*. Carril 1, marcador de peso molecular. Carril 2, control scFv. Carril 3 la flecha señala una banda ligera obtenida del lavado de la purificación por cromatografía Ni-NTA. Gel de poliacrilamida al 10%, teñido con azul coomassie.

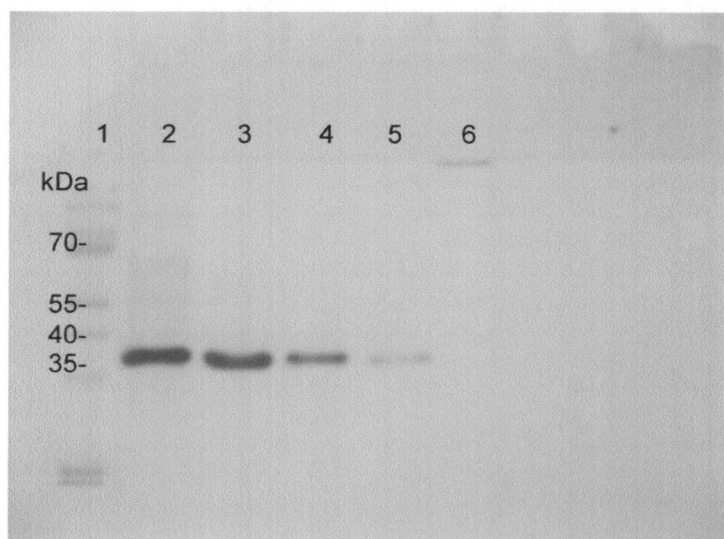


Fig. 29. Expresión intracelular de M-scFv-cP1 de un cultivo en medio BMMY de *P. pastoris*. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, primera elusión; carril 3, segunda elusión; carril 4; tercera elusión; carril 5, cuarta elusión. Cada muestra son 10 μ l con un volumen igual de sample buffer. Gel de poliacrilamida al 10% con SDS, teñido con azul coomassie.

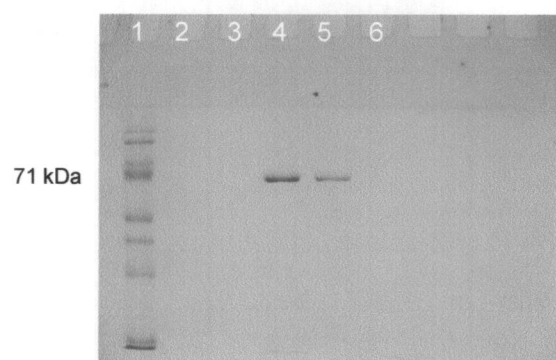


Fig. 30. Expresión intracelular de M-scFv-cP1 mostrando diferentes intervalos de tiempo de un cultivo en medio BMMY inducido cada 24 horas. Carril 1, marcador de peso molecular. Carril 2, 0 horas, inicio de cultivo inducido. Carril 3, 12 horas. Carril 4. Carril 5, 96 horas. Gel de poliacrilamida al 10% con SDS. Teñido con azul coomassie.

8. Análisis de composición de aminoácidos de proteínas scFv y scFv-cP1 expresadas en *P. pastoris*.

Este método se utilizó para demostrar que la proteína scFv-cP1 difiere en su composición de aminoácidos del scFv. En las tablas IV (pag. 70) y V (pag. 71) se muestran los resultados del número de residuos de aminoácidos (aa.) y los porcentajes correspondientes a las moléculas scFv y M-scFv-cP1, obtenidos por el método de hidrólisis ácida (HA) comparado con los obtenidos a partir de la secuencia de ADN (EPP) (fig. 12, pag. 52 y fig. 25, pag. 64). Para las moléculas scFv y scFv-cP1 los residuos fueron muy similares en porcentaje a excepción de los aa. asparagina y glutamina que fueron aproximadamente el doble por el método de HA. Comparando entre si al scFv y al M-scFv-cP1 por el método HA se obtiene que aumentaron los aminoácidos lisina principalmente, y ligeramente isoleucina y alanina según lo pronosticado por la adición del cP1 al scFv. El peso molecular determinado por HA del M-scFv-cP1 fue 34,206 el cual fue mayor al del scFv de 30,973, si tomamos en cuenta que el péptido cP1 sintético pesa 3,338.86, y la diferencia en peso molecular entre las dos moléculas analizadas es de 3,233 es una evidencia mas de que el cP1 va unido al scFv. Se tomó en consideración el hecho de que la muestra del M-scFv-cP1 fue casi ocho veces mayor en microgramos que la del scFv.

Tabla IV. Análisis de la composición de aminoácidos por hidrólisis ácida del scFv anti-Xf. En la tabla se compara el resultado por la hidrólisis ácida (HA) y el calculado por el programa Expasy ProtParam (EPP) (www.expasy.ch/tools/protparam.html) del número de los residuos presentes en la muestra de la proteína purificada y el proveniente del pronosticado a partir de la secuencia de ADN. Se muestra la cantidad de nanogramos y picomoles de la proteína para análisis por HA de cada uno de los residuos hallados y del total de la muestra

Análisis de la composición de aminoácidos de scFv anti-Xf							
Aminoácido	Residuos experimentales		Composición % moles		Peso molecular	nanogramos	picomoles
	HA	EPP	HA	EPP			
CYSO2 (C)	0.00	4	0.00	0.0	151.2	0.0	0
ASP (D)	32.10	15	10.70	5.7	115.09	203.8	1771
THR (T)	21.02	22	7.01	8.4	101.11	117.2	1159
SER (S)	29.84	32	9.95	12.3	87.08	143.3	1646
GLU (E)	39.55	14	13.18	5.4	129.12	281.7	2181
PRO (P)	10.64	9	3.55	3.4	97.12	57.0	587
GLY (G)	50.10	35	16.70	13.4	57.05	157.7	2763
ALA (A)	23.78	18	7.93	6.9	71.08	93.2	1312
VAL (V)	18.56	17	6.19	6.5	99.13	101.5	1024
MET (M)	0.00	1	0.00	0.4	131.2	0.0	0
ILE (I)	10.62	9	3.54	3.4	113.16	66.3	586
LEU (L)	18.09	16	6.03	6.1	113.16	112.9	998
TYR (Y)	10.24	10	3.41	3.8	163.18	92.1	565
PHE (F)	5.97	5	1.99	1.9	147.18	48.5	329
HIS (H)	11.17	10	3.72	3.8	137.14	84.5	616
LYS (K)	6.53	6	2.18	2.3	128.18	46.2	360
ARG (R)	11.78	10	3.93	3.8	156.19	101.5	650
Totales	300.00	261	100.00	100.0		1707.4	16547
			PM calculado H		30973		
			PM calculado E		27464.6		

Tabla V. Análisis composición de aminoácidos por hidrólisis ácida para scFv-cP1. En la tabla se compara el resultado por la hidrólisis ácida (HA) y el calculado por el programa Expasy ProtParam (EPP) (www.expasy.ch/tools/protparam.html) del número de los residuos presentes en la muestra de la proteína purificada y el proveniente del pronosticado a partir de la secuencia de ADN. Se muestra la cantidad de nanogramos y picomoles de proteína utilizada el análisis por hidrólisis ácida de cada uno de los residuos hallados y del total de la muestra.

Análisis de la composición de aminoácidos en scFv-cP1							
Aminoácido	Residuos experimentales		Composición % moles		Peso molecular	nanogramos	picomoles
	HA	EPP	HA	EPP			
CYSO2 (C)	0.00	5	0.00	1.7	151.2	0.0	0
ASP (D)	36.30	15	11.09	5.1	115.09	1119.5	9727
THR (T)	17.38	23	5.31	7.8	101.11	470.8	4656
SER (S)	22.74	37	6.95	12.6	87.08	530.6	6094
GLU (E)	38.11	16	11.64	5.4	129.12	1318.6	10212
PRO (P)	16.36	10	5.00	3.4	97.12	425.7	4383
GLY (G)	47.19	38	14.42	12.9	57.05	721.5	12646
ALA (A)	27.84	22	8.51	7.5	71.08	530.3	7461
VAL (V)	24.39	17	7.45	5.8	99.13	647.8	6535
MET (M)	0.00	2	0.00	0.7	131.2	0.0	0
ILE (I)	16.29	14	4.98	4.8	113.16	494.0	4365
LEU (L)	23.79	18	7.27	6.1	113.16	721.5	6376
TYR (Y)	8.92	10	2.72	3.4	163.18	390.0	2390
PHE (F)	7.17	5	2.19	1.7	147.18	283.0	1922
HIS (H)	7.54	10	2.30	3.4	137.14	277.0	2020
LYS (K)	21.46	10	6.56	3.4	128.18	737.0	5750
ARG (R)	11.81	12	3.61	4.1	156.19	494.5	3166
Totales	327.27	294	100.00	100.0		9161.6	87703
			PM calculado HA		34206		
			PM calculado EPP		30905.7		

9. Efecto de la concentración y tiempo de los fagos filamentosos contruidos sobre *X. fastidiosa*.

Se probaron las construcciones del fago scFv-CP1 y el fago Fab-anti toxoide tetánico. Las diluciones de los fagos scFv-CP1 1:2, 1:10 y 1:100 correspondieron a 1.84×10^6 , 3.68×10^5 y 3.68×10^4 por célula bacteriana respectivamente. El fago scFv-CP1 tuvo efecto mortal en las diluciones 1:2 y 1:10 (fig. 31, A y B, pag. 73), y en la dilución 1:100 ya no se observa efecto sobre las bacterias (fig. 31-C, pag. 76). El fago Fab-anti-toxoide tetánico tuvo un efecto mortal sobre las bacterias en la primera dilución de fagos (fig. 32-A, pag. 74), sin embargo, en la dilución 1:10 no se observa eliminación total (fig. 32-B, pag. 74). En la siguiente dilución (fig. 32-C, pag. 74) ya no se observó la disminución de bacterias.

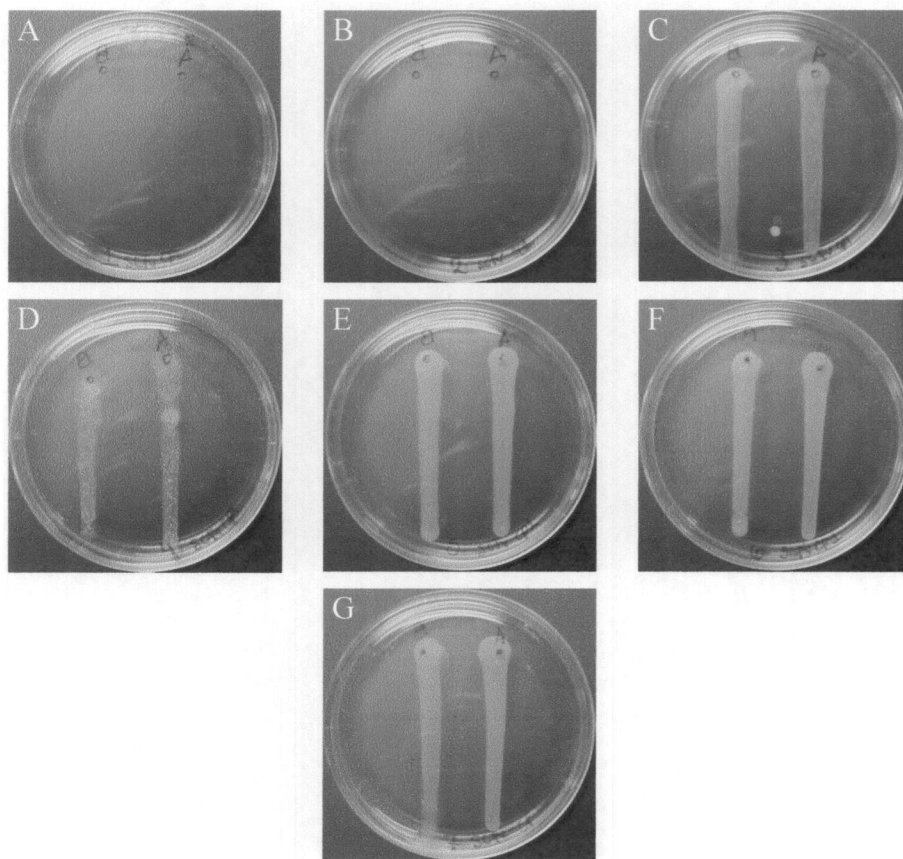


Fig. 31. Concentración aproximada requerida para que el Fago scFv-CP1 actúe eliminando a *X. fastidiosa*. Con fagos scFv-cp1, (A) 1:2, (B) 1:10 y (C) 1:100; con solo TBS-BSA 2% como control, (D) 1:2 control, (E) 1:10 control y (F) 1:100 control; (G) *X. fastidiosa* control en medio PD2. Resultados observados a los 10 días de haber sembrado en la placa. Gota escurrida por duplicado, en medio sólido PD2.

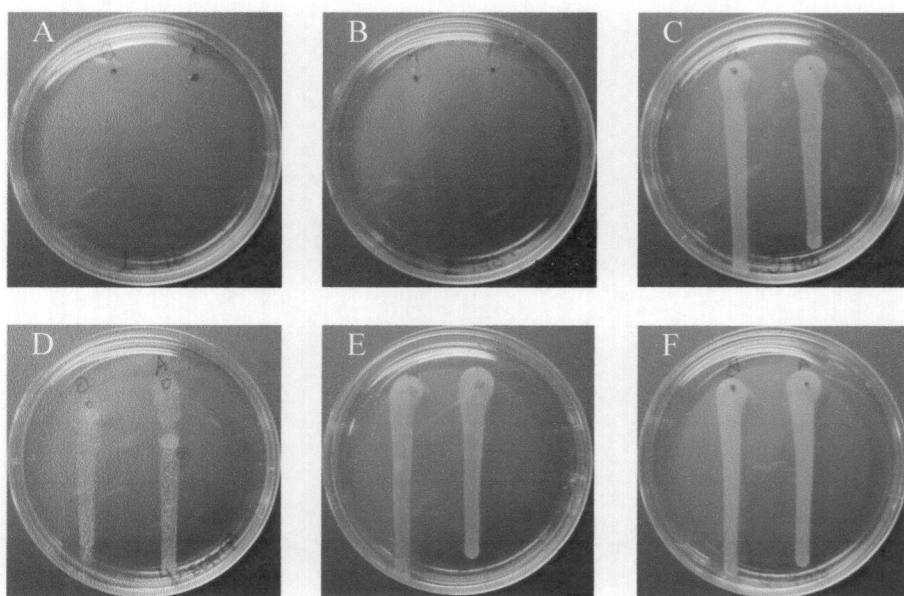


Fig. 32. Concentración aproximada requerida para que el Fago Fab-toxoide tetánico actúe eliminando a *X. fastidiosa*. (A) 1:2, (B) 1:10, (C) 1:100, (D) 1:2 control, (E) 1:10 control, (F) 1:100 control, (G) *X. fastidiosa* en medio PD2. Resultados observado a los 10 días de haber sembrado en la placa. Gota escurrida por duplicado, en medio sólido PD2.

Los resultados obtenidos con diferentes tiempos de incubación (fig. 33) muestran que entre 28 y 150 horas los fagos scFv-CP1 eliminan a la bacteria en un 100%, comparando con los controles donde el crecimiento continúa hasta las 150 horas. El fago scFv necesitó más de 28 horas, aunque se observa una ligera disminución. La concentración de fagos por célula utilizada fue de 6×10^5 partículas de fago/célula bacteriana.

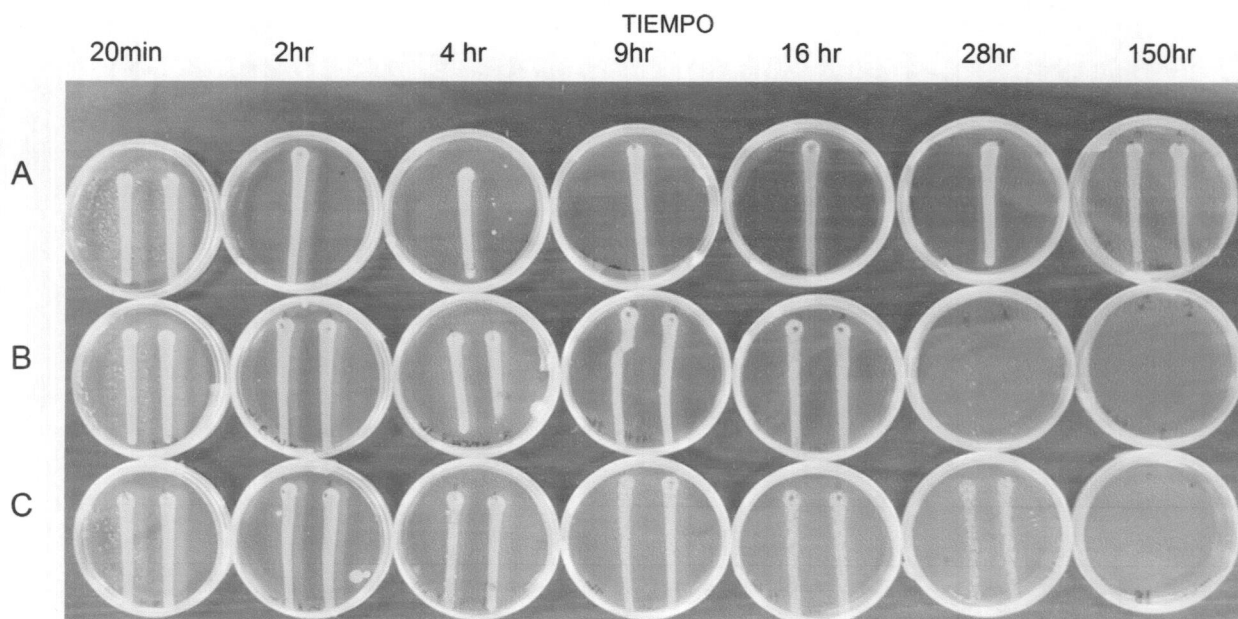


Fig. 33. Diferentes tiempos de incubación requeridos para eliminar a *X. fastidiosa* STL con el fago scFv-CP1 con una concentración de 6×10^5 partículas de fago/célula bacteriana. (A) Controles, (B) tratamiento con fago scFv-cP1 y (C) tratamiento con fago scFv. Resultados observados 7 días después de la siembra en PD2. Gota de 20 μ l escurrida. En algunas cajas solamente se sembró una sola gota.

En adición a los anteriores se realizaron dos experimentos más de tiempo y concentración que incluyeron los fagos scFv-cP1, scFv y ayudador. En el primer experimento en el cual se incubaron por 2 horas con dos diferentes concentraciones, se muestra que con 360,000 fagos/célula hay una disminución en todos los tratamientos con respecto al control (fig. 34, A1, B1 y C1, pag. 77). En el mismo experimento a la concentración de 72,000 fagos/célula no se observa una disminución con los tratamientos scFv-cP1 y scFv, pero si con el tratamiento de fago ayudador (fig. 35, A2, B2 y C2, pag. 78).

En el segundo experimento se incubaron por 48 horas a las mismas concentraciones descritas antes (fig. 34, pag. 80), se observó que a la concentración de 72,000 fagos/célula hubo una ligera disminución (A2) con respecto al control, pero no en los tratamientos scFv-cP1 y scFv (B2 y C2). A la concentración de 360,000 fagos/célula se observó una eliminación de 100% con los tratamientos scFv-cP1 y scFv (A1 y B1) y una ligera disminución en con ayudador (C1), lo que indica que este fago trabaja mejor a bajas concentraciones con poco tiempo, aunque con una concentración mas alta y mas tiempo de incubación también hay una disminución.

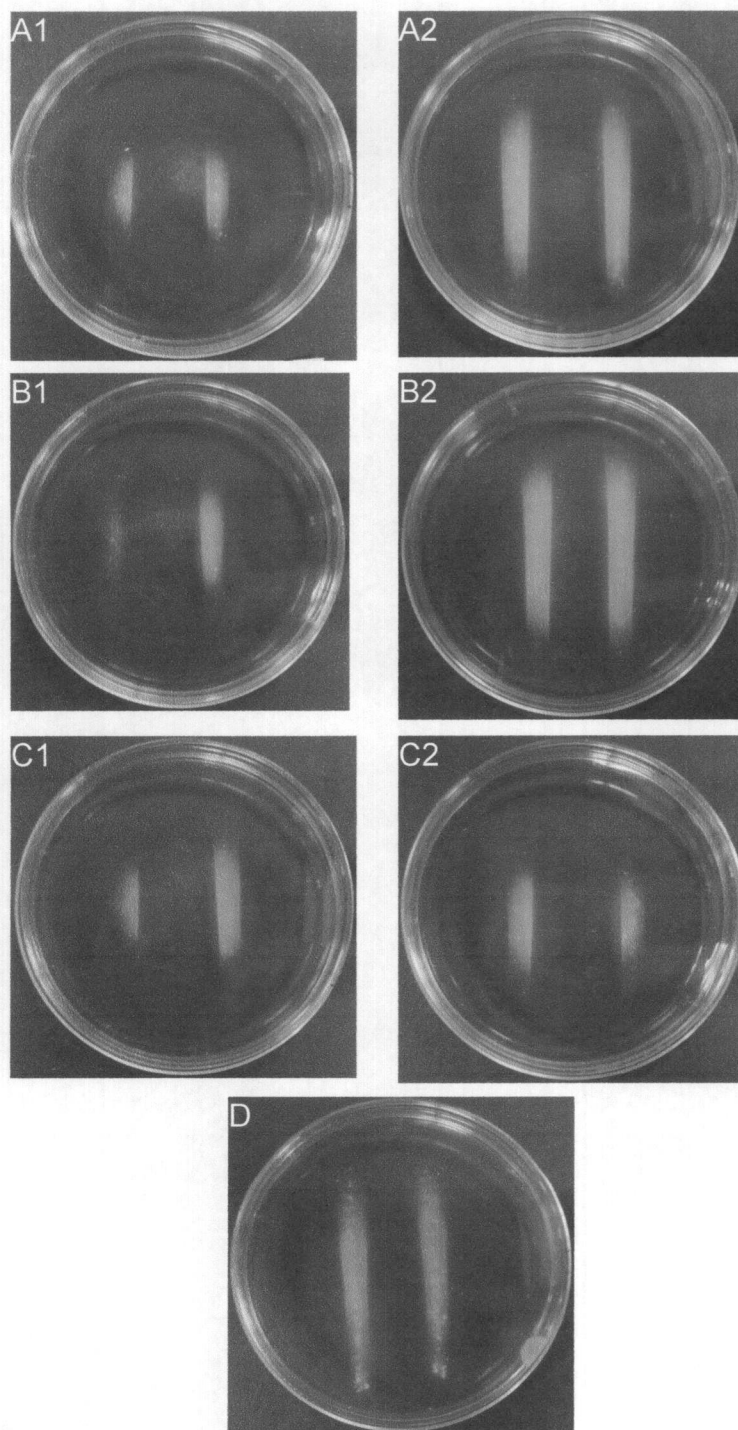


Fig. 34. Efecto de dos concentraciones de fagos scFv-cP1, scFv y ayudador sobre *X. fastidiosa* STL con 2 horas de incubación. A1 y A2, *X.f.* con 3.6×10^5 fagos/cel y 7.2×10^4 fagos/cel de fago scFv-cP1 respectivamente; B1 y B2, *X.f.* con 3.6×10^5 fagos/cel y 7.2×10^4 fagos/cel de fago scFv respectivamente; C1 y C2, *X.f.* con 3.6×10^5 fagos/cel y 7.2×10^4 fagos/cel de fago ayudador, respectivamente. Gota escurrida con experimentos por duplicado en medio sólido PD2 a 28° C.

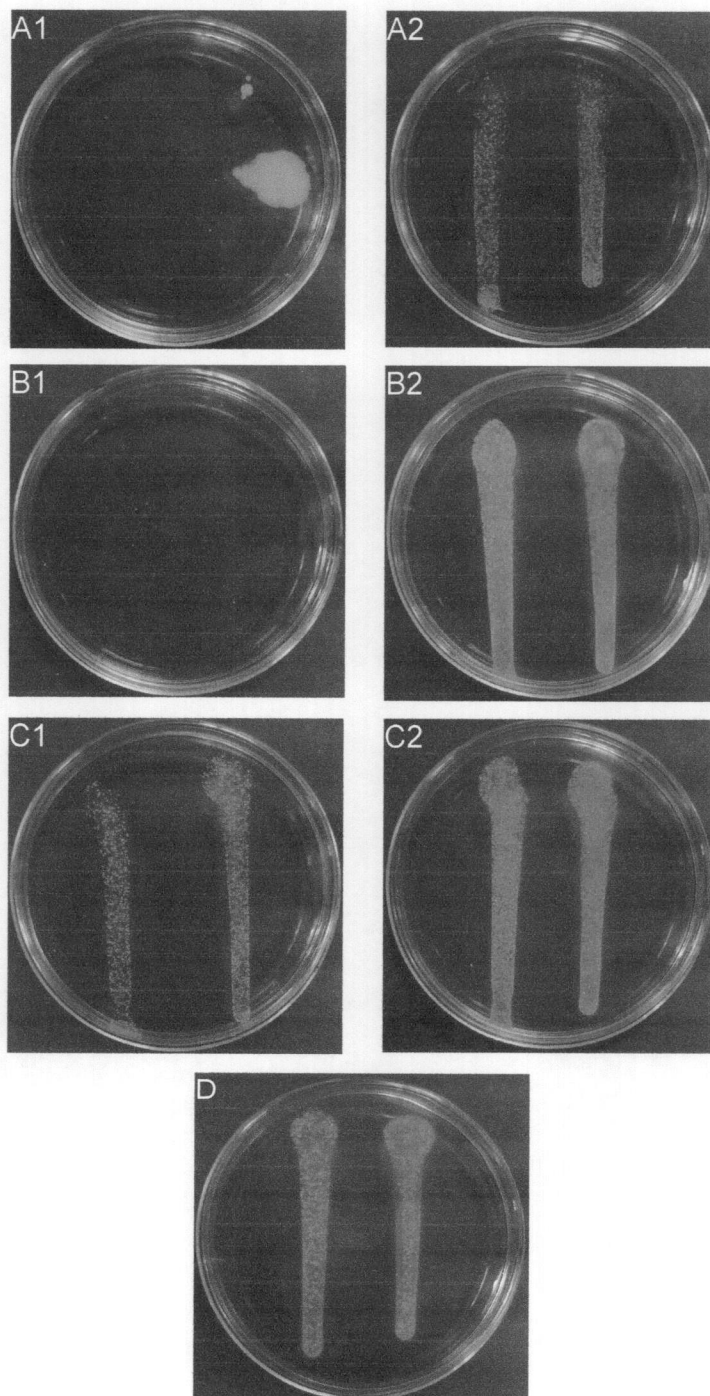


Fig. 35. Efecto de dos concentraciones de fagos scFv-cP1, scFv y ayudador sobre *X. fastidiosa* STL con 48 horas de incubación. A1 y A2, *X.f.* con 3.6×10^5 fagos/cel y 7.2×10^4 fagos/cel de fago scFv-cP1 respectivamente; B1 y B2, *X.f.* con 3.6×10^5 fagos/cel y 7.2×10^4 fagos/cel de fago scFv respectivamente; C1 y C2, *X.f.* con 3.6×10^5 fagos/cel y 7.2×10^4 fagos/cel de fago ayudador, respectivamente. Gota escurrida con experimentos por replicado en medio sólido PD2 a 28° C. A1 presenta contaminación con colonias bacterianas no identificadas.

10. Determinación de la especificidad del fago scFv-CP1.

Los resultados obtenidos con el fago scFv-CP1 sobre otras bacterias muestran la especificidad sobre *X. fastidiosa* (fig. 36). En todos los casos el crecimiento se comparó al control sin fago. En dos experimentos adicionales utilizando la misma concentración pero con dos diferentes tiempos 24 y 48 horas, se observó el mismo efecto con scFv-cP1 (fig. 37, pag. 80 y fig, 38, pag. 81) aunque en la figura 38-F1 se vio un ligero crecimiento debido a la contaminación.

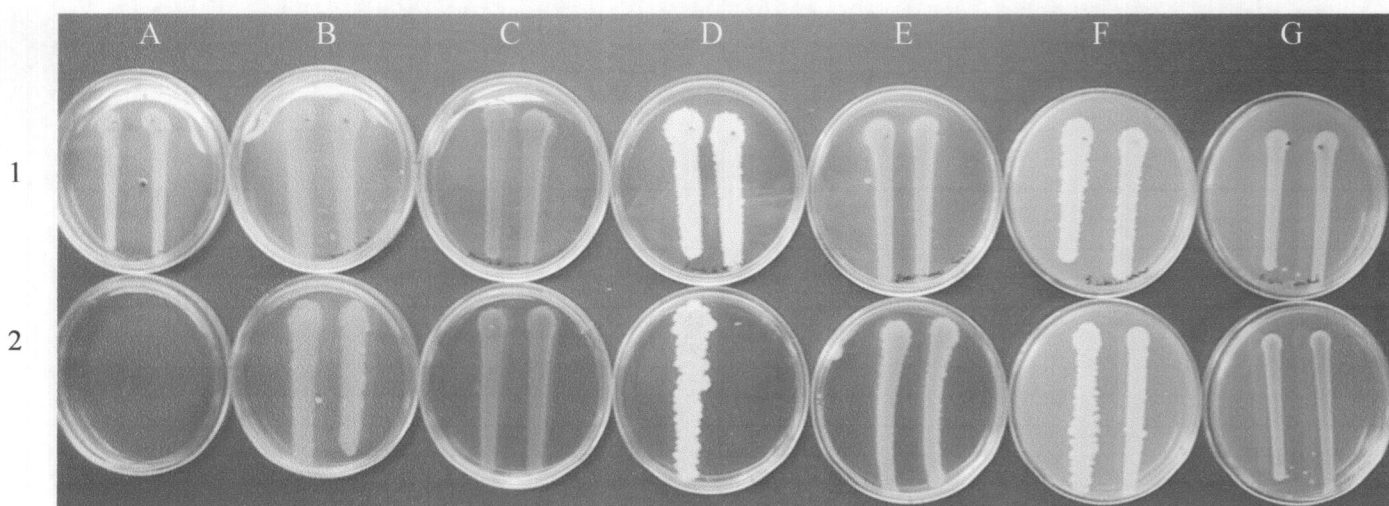


Fig. 36. Determinación de la especificidad del fago scFv-CP1 con distintas especies de bacterias. La concentración de fagos por célula fue de 6.1×10^5 fagos/cel incubadas por 48 horas a 30°C . Las especies son: (A) *X. fastidiosa* STL, (B) *X. fragariae*, (C) No identificada extraída de la uva no. 1, (D) No identificada extraída de la uva no.2, (E) *P. phaseolicola*, (F) *B. subtilis*, y (G) *E. coli* JM109. Todas cultivadas en PD2 excepto F y G en LB. Resultados obtenidos 16 horas después de la siembra, excepto para A dado que crece lentamente. Carril 1 sin fagos y Carril 2 con fagos. Gota escurrida de 20 μl .

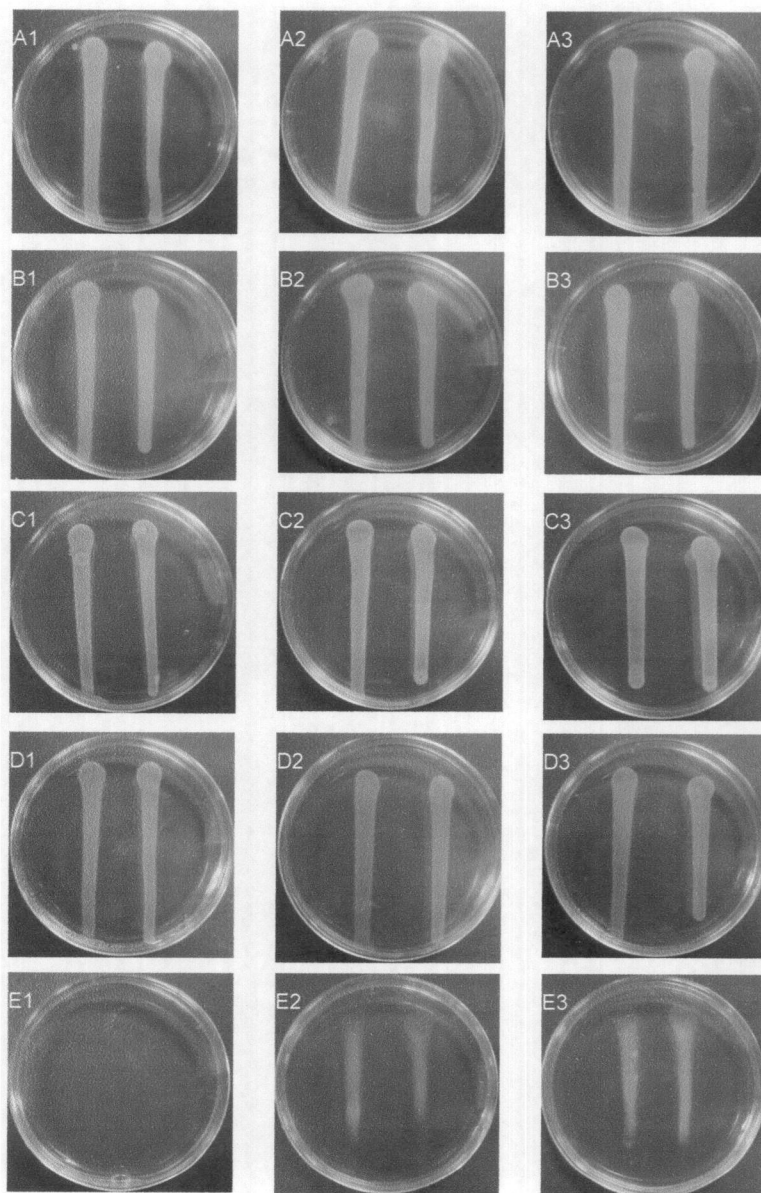


Fig. 37. Especificidad de los fagos scFv-cP1 y ayudador en varias especies de bacterias con 24 horas de incubación. A1, A2 y A3 *Pseudomonas phaseolicola* con scFv-cP1, fago ayudador, y control sin fago, respectivamente. B1, B2 y B3 *Xanthomonas fragariae* con scFv-cP1, fago ayudador, y control sin fago, respectivamente. C1, C2 y C3 Bacteria extraída de la uva P2, con scFv-cP1, fago ayudador, y control sin fago, respectivamente. D1, D2 y D3, *E. coli* con scFv-cP1, fago ayudador, y control sin fago, respectivamente. E1, E2 y E3 *X. fastidiosa* STL, con scFv-cP1, fago ayudador, y control sin fago. Todos los experimentos por duplicado a una concentración de 360,000 fagos/célula. Gota escurrida concentrada en 20 μ l sembrada en medio sólido PD2, incubación a 28° C.

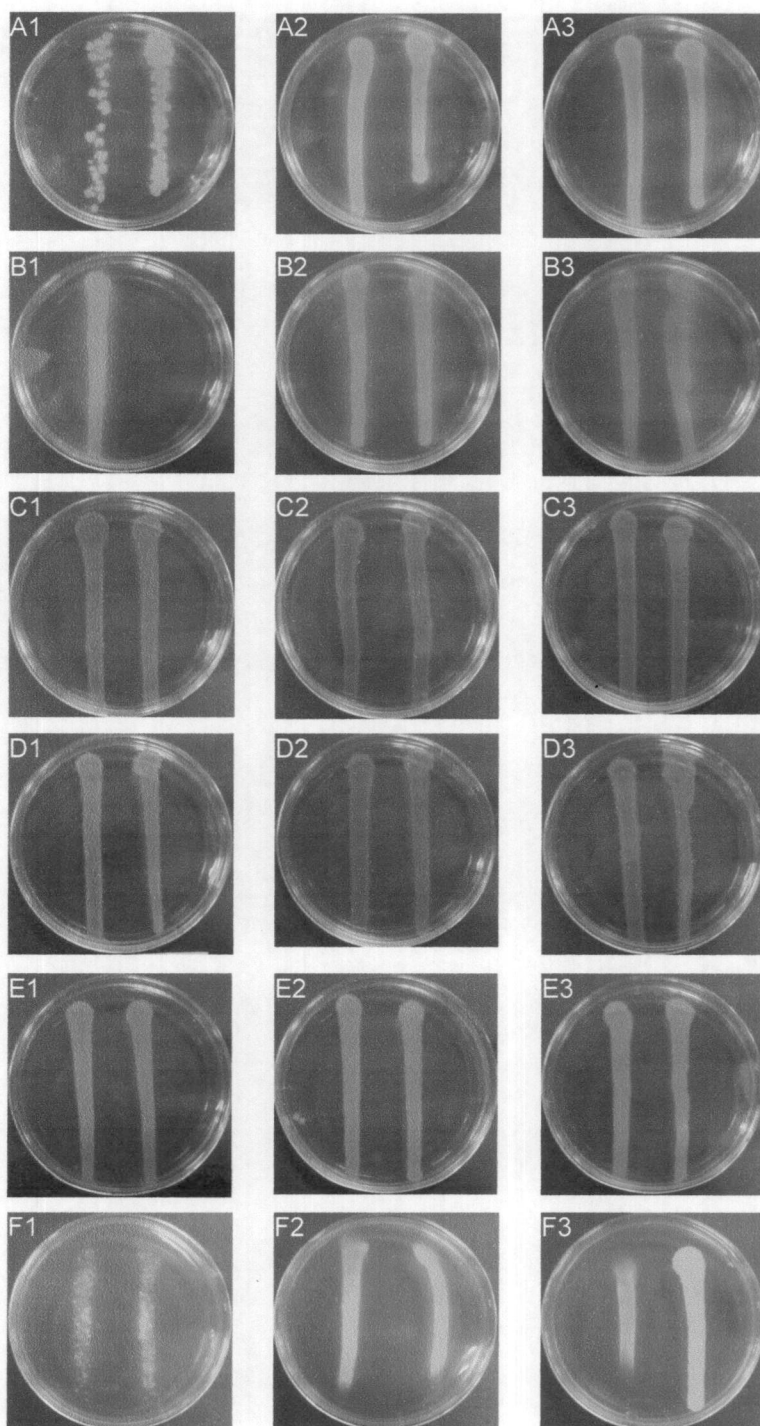


Fig. 38. Especificidad de los fagos scFv-cP1 y ayudador en varias especies de bacterias con 48 horas de incubación. A1, A2 y A3 *Pseudomonas phaseolicola* con scFv-cP1, fago ayudador, y control sin fago, respectivamente. B1, B2 y B3 *Xanthomonas fragariae*. C1, C2 y C3 Bacteria extraída de la uva P1. D1, D2 y D3, bacteria extraída de la uva P2. E1, E2 y E3, *E. coli*. F1, F2 y F3, *X. fastidiosa* STL. Todos los experimentos por duplicado (excepto *X. fragariae*) a una concentración de 360,000 fagos/célula. Gota escurrida concentrada en 20 μ l sembrada en medio sólido PD2, incubación a 28° C.

11. Efecto de los fagos scFv-CP1 sobre distintas cepas de *X. fastidiosa*.

El efecto en otras cepas de *X. fastidiosa*, Temecula, Baja #5 y M23, con los fagos scFv-cP1 fue muy similar al observado con la cepa STL.

Se observó que en los tratamientos con los fagos scFv-cP1 con 24 horas de incubación y sembradas en cajas con medio PD2 carbencilina crecieron colonias en un numero similar a aquellas sobrevivientes sin selección (Tabla VI).

Tabla VI. Colonias de varias cepas de *X. fastidiosa* sobrevivientes del tratamiento con fagos scFv-cP1 y seleccionadas después en carbencilina. Después de aproximadamente 10 días se contaron las colonias resultantes de la incubación a 28° C.

Numero de colonias de varias cepas de <i>X. fastidiosa</i> sobrevivientes con y sin tratamiento con fagos scFv-cP1 y después sembrados en medio PD2 con o sin carbencilina.									
Cepa de <i>X. fastidiosa</i>		Temecula		Baja #5		M23		STL	
Cajas PD2	Tratamiento	A	B	A	B	A	B	A	B
Con Carbencilina	Control	0	0	0	0	0	0	0	0
	scFv-cP1	14	7	31	39	128	46	0	3
Sin Carbencilina	Control	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶
	scFv-cP1	16	1	21	5	68	35	13	30

12. Efecto de las proteínas solubles scFv y scFv-CP1 sobre *X. fastidiosa*.

En experimentos de 100,000 células de bacteria con 72 horas de incubación, los primeros 6 días después de la siembra en los experimentos tanto con scFv y scFv-cP1 se vio una inhibición del crecimiento con respecto al control (fig. 39 comparar 1A con 1B y 1C, pag. 84), y 4 días después se observó aumento en crecimiento (fig. 39, control 2A, experimentales 2B y 2C). En un segundo experimento se aumentaron las concentraciones a 50, 100 y 200 μM (fig. 40, pag. 85, experimento con concentración de 50 μM) en el cual solo se observó un retardo en el crecimiento con la molécula scFv-cP1 (datos no mostrados) en los primeros 4 días comparados con el control y después de 6 días se observó que se iguala con los controles.

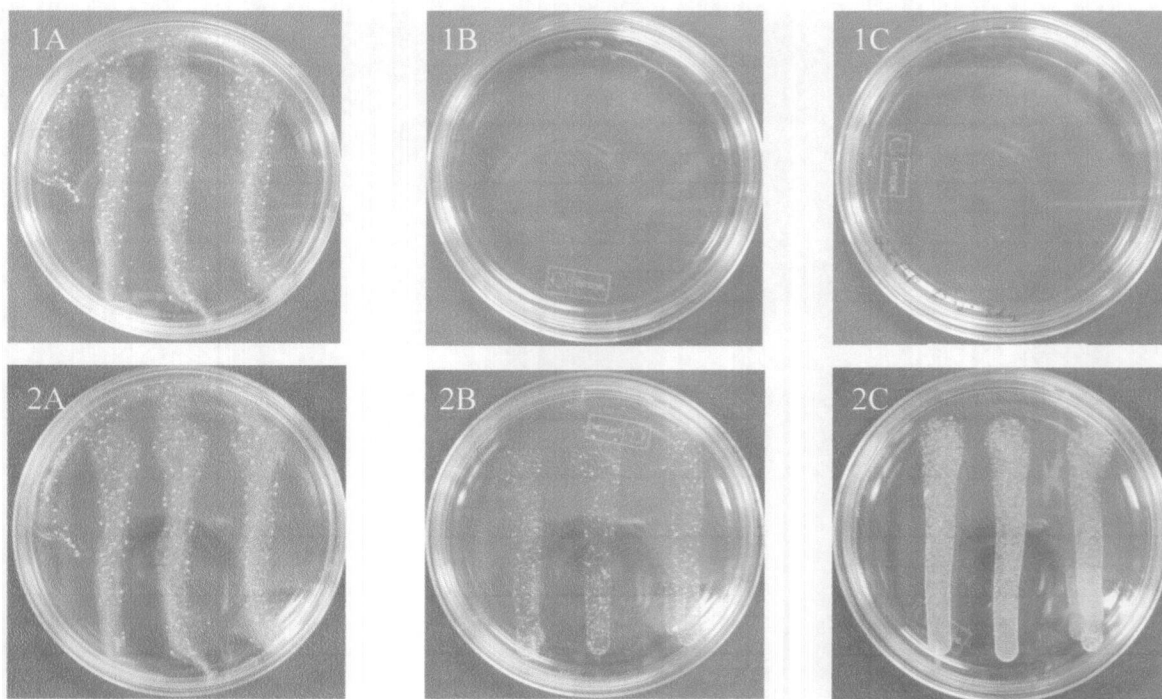


Fig. 39. Ensayo preeliminar del efecto de las moléculas solubles scFv y scFv-cP1. 1A, bacterias de *X. fastidiosa* como controles; 1B, bacterias con scFv 3.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 1C, bacterias con scFv-cP1 0.86 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, después de 6 días de incubación en caja. Las figuras 2A, 2B y 2C son las mismas cajas después de 10 días después de la incubación. En este experimento se utilizaron por cada experimental 100,000 células incubadas previamente por 72 horas con las moléculas solubles y después sembradas en medio PD2 a 28° C.

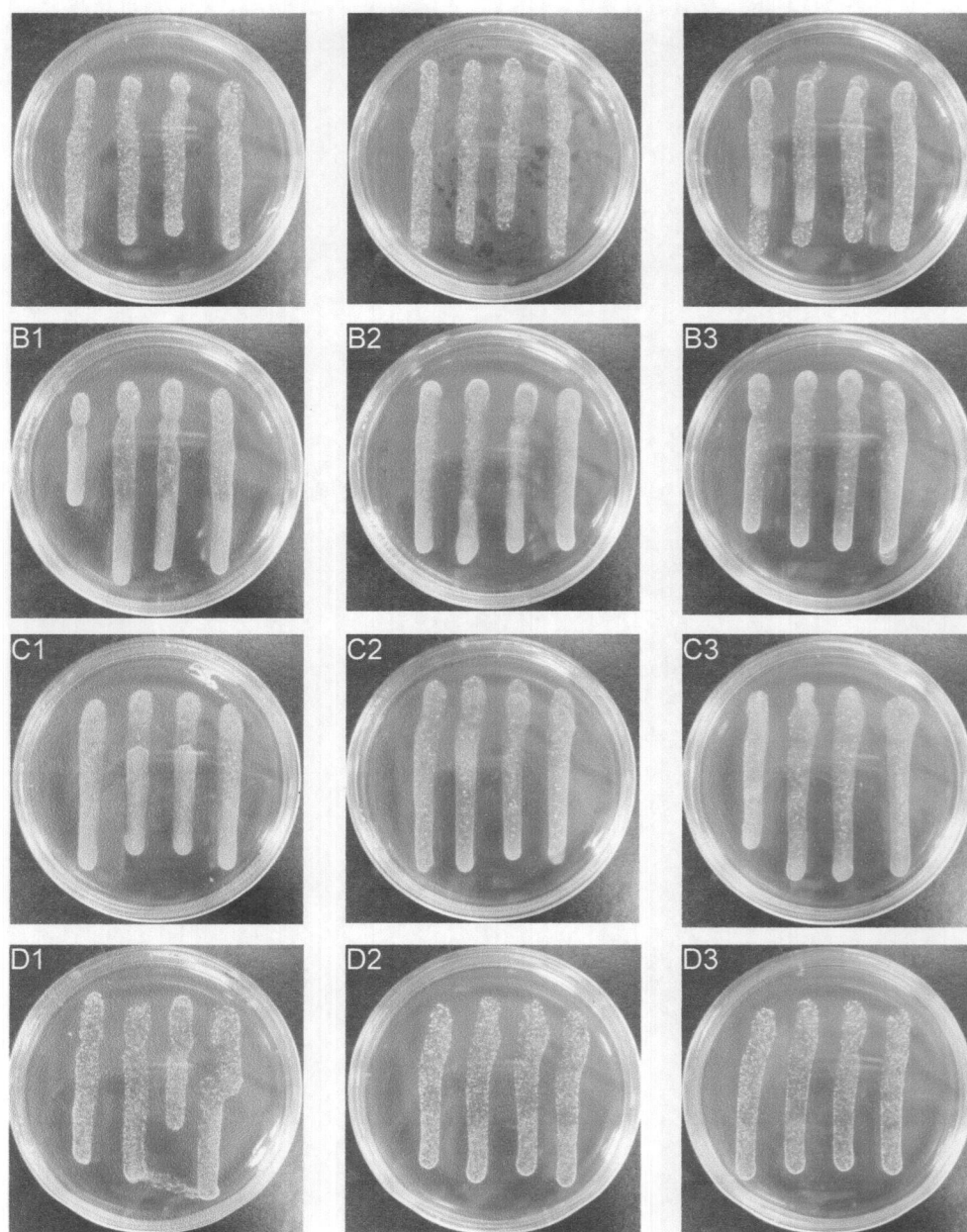


Fig. 40. Efecto de las moléculas solubles scFv y scFv-cP1.sobre *X. fastidiosa* STL a una concentración de 50 μ M. A1, A2 y A3 bacterias de *X. fastidiosa* controles. B1, B2 y B3 bacterias con scFv a 50 μ M. C1, C2 y C3 bacterias con albúmina como proteína control a 50 μ M. D1, D2 y D3 bacterias con scFv-cP1 a 50 μ M. Cada placa representan una replica de un volumen de 100 μ l con 50 μ l de 10,000 bacterias en medio PD2 con su respectivo tratamiento en 50 μ l de PBS 1x, con 4 días de incubación a 28° C. Gota escurrida de aproximadamente 25 μ l cultivada en placa por 10 días en medio sólido PD2 a 28° C.

Discusiones

La producción en *P. pastoris* de ambos anticuerpos recombinantes fue para el scFv de 0.1 g/L y para el scFv-cP1 de 0.12 g/L cuando se expresaron por 120 horas. Ridder *et al* (1995), reportaron la producción de un anticuerpo de conejo de cadena sencilla un poco mas arriba de 0.1 g/litro y Xianzong *et al* (2003), recientemente produjeron un scFv de ratón a un pH de 7.0 y 15° C que alcanzó una producción de 0.025 g/L. Se puede hacer más eficiente la producción en esta levadura con el escalamiento en fermentación (Sreekrishna *et al.*, 1988).

La razón por la que no se pudo obtener la proteína scFv-cP1 expresada en *P. pastoris* utilizando el vector pPICZαA para expresión extracelular, fue debido a que el fragmento de ADN cP1 codifica una secuencia peptídica Lys-Arg (AAA-CGC) (Sipos *et al*, 1992) que es reconocida como una señal de corte para la enzima Kex2 que es expresada por la levadura (Brake *et al*, 1984) y es utilizada por el vector de expresión para evitar que la señal α-Factor vaya en el producto final de la proteína recombinante; al cortarse debido a esta señal el scFv-cP1 perdió parte del fragmento de ADN cP1 y la marca de polihistidinas lo cual impidió su purificación por cromatografía Ni-NTA, como se pudo evidenciar al presentarse una única proteína en alícuotas del lavado previas a la purificación final. Otra evidencia de que esto ocurrió es que si hubo purificación de la proteína scFv-cP1 al utilizar el vector de expresión intracelular pPICZB que carece de esta señal de corte.

Para demostrar cual de los componentes era esencial para producir el efecto eliminatorio, se probaron los fagos expresando scFv y ayudador VSCM13 sin expresar proteínas foráneas. El fago scFv a las 48 hr eliminó totalmente a *X. fastidiosa*. Sin embargo el fago scFv-cP1 actuó más rápidamente, a las 24 horas, lo que sugiere que el péptido lítico contribuye a que esto ocurra.

Se observó también que el fago ayudador contribuía a la disminución en el número de bacterias. Se desconoce el mecanismo por el cual actuó sobre *X. fastidiosa*. Se observó que este fago trabaja mejor a bajas concentraciones con poco tiempo, aunque con una concentración más alta y más tiempo de incubación tiene un ligero efecto.

La combinación de estos tres componentes bacteriófago-scFv-péptido lítico parecen todos contribuir en el efecto eliminatorio observado.

El numero de colonias de cepas de *X. fastidiosa*, STL, Temecula y Baja #5 (que causan la enfermedad de Pierce) y M23 (que causa la quemadura de hoja en almendro) que sobrevivieron cuando fueron incubadas con fagos scFv-cP1 y después sembradas en placas con medio PD2 sin antibiótico, fue similar en número de colonias que resistieron al medio PD2 con antibiótico carbencilina después de la incubación con fago scFv-cP1 (Tabla VI). Esta resistencia a carbencilina puede explicarse de dos maneras: que los fagos actuaron desde fuera y a la vez infectaron o que todos actuaron desde adentro y que una proporción sobrevive debido a la concentración. El elucidar lo que ocurrió ayudará a conocer el mecanismo por el que actúa el fago scFv-cP1 construido

sobre *X. fastidiosa*. Se sabe que el proceso de infección del fago filamentoso en *E. coli* requiere el complejo proteico TolA, R y Q localizado en la membrana citoplasmática, el cual es necesario para la translocación del ADN del fago dentro del citoplasma y la translocación de las proteínas de cubierta dentro de la membrana citoplasmática (Russel *et al.* 1988; Click and Webster 1998). El dominio N2 de la proteína pIII de la cápside del fago interacciona con la punta del pilus F de la bacteria, el cual se retracta conduciendo a la proteína pIII en el periplasma y permitiendo que el dominio N1 de la proteína pIII interactúe con el dominio D3 de la proteína TolA, y esta junto con TolQ y R permiten que se expanda la membrana en un mecanismo que aun no esta elucidado por completo (Barbas *et al.* 2001). *X. fastidiosa* posee los paralogos TolA, TolR y TolQ que podrían estar implicados en el reconocimiento y la entrada del fago a la bacteria, además se descubrió la presencia de profagos dentro del genoma (Simpson *et al.* 2000) y posee pili largo tipo IV y otro corto tipo I que permiten movilidad en contracción y migración, y la adhesión y formación de biofilm, respectivamente (Chatterjee *et al.* 2008), pero se desconoce si algunas de estas funciones están implicadas en una infección del fago filamentoso. También se requiere elucidar el antígeno al cual se une el anticuerpo pues estos experimentos de resistencia a antibiótico fueron realizados con fagos expresando scFv-cP1, lo cual podría ayudar en el reconocimiento del sitio de entrada a la bacteria. Anteriormente, Álvarez-Delgado (2006), utilizando varias técnicas de purificación para el posible antígeno, encontró que este anticuerpo

scFv se unió a varias proteínas de *X. fastidiosa* STL en lo que pudiera ser un complejo proteico, sin embargo no fue posible caracterizarlas.

En experimentos con fagos scFv-cP1 se observó una ligera disminución con *Xanthomonas fragariae* con respecto al control (datos no mostrados), pero después su crecimiento tiende a igualarse al control. Existe una relación filogenética de *X. fastidiosa* con varias especies del género *Xanthomonas* (Simpson *et al*, 2000) ya que comparten genes del grupo de reguladores de factores de patogenicidad (Chatterjee *et al*, 2008). Quizás por eso se observó una inhibición inicial ya que pudieran ser reconocidas por el anticuerpo del cual aun se desconoce su epítipo.

Con la bacteria *Pseudomonas phaseolicola* también se observó inhibición con respecto al control, aunque este género se considera distante de *X. fastidiosa*. Wells *et al* (1987) realizaron experimentos con anticuerpos monoclonales que reaccionaron con varias cepas de *X. fastidiosa*, los controles incluían a *P. syringae* la cual no reacciona a la prueba. Aunque el género no guarda relación cercana con *X. fastidiosa* se desconoce la razón de la inhibición inicial. Probablemente ambas especies *X. fragariae* y *P. phaseolicola* pudieron haber sido susceptibles a la acción del péptido cecropin P1.

En experimentos realizados con proteínas solubles scFv-cP1 y scFv, estas mostraron precipitación antes y después de dializar cuando las muestras estaban más concentradas. El efecto inhibitorio con estas moléculas a los 6 días

de siembra en placa con respecto al control fue con concentraciones más diluidas de ambos scFv y scFv-cP1. Sin embargo, cuando se probaron concentraciones más altas de ambos anticuerpos con menos células y más tiempo de incubación no ocurrió inhibición de colonias con respecto al control. Probablemente aunque se encontraban en forma soluble las concentraciones de scFv-cP1 a 0.86 µg/µl y de scFv a 3.3 µg/µl no fueron suficientes para eliminar al 100% a la bacteria.

Se propone aquí la aplicación por inyección de bacteriófagos expresando un híbrido scFv-cP1 que reconozca específicamente a la bacteria *X. fastidiosa* para el combate a la enfermedad de Pierce, y dado que la bacteria se aloja exclusivamente en el xilema de las plantas, una aplicación de tipo foliar o radicular probablemente reduciría el contacto con el blanco a combatir.

Aunque anteriormente se han utilizado antibióticos para eliminar a *X. fastidiosa* en plantas de vid aplicados por inyección, estos presentan ciertas desventajas como son lo caro de producir, la capacidad de eliminar otras bacterias que pudieran ser benéficas y el problema de crear resistencia después de varias aplicaciones. Aunque se desconocen los costos a gran escala de la producción de los fagos y las proteínas solubles contruidos, sugiere, dado que es producido por biología molecular que su costo será mucho más barato (Inal, 2003).

Actualmente la aplicación de bacteriófagos en alimentos de consumo humano se considera no peligrosa e inocua ya que no se ha hallado que tengan

repercusiones negativas importantes en humanos (Inal, 2003; Hagens y Loessner, 2007). En los Estados Unidos de America recientemente la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) aprobó la aplicación de ciertos bacteriófagos líticos como medida higiénica en alimentos vegetales susceptibles de contaminación por patógenos bacterianos humanos (Hagens y Loessner, 2007).

Las moléculas como los fragmentos de anticuerpo y los péptidos antimicrobiales expresadas en fagos o en forma soluble aplicados en plantas de vid son una gran ventaja ya que no tienen efecto residual y pueden degradarse después de un tiempo, además este sistema puede ser una alternativa para combatir otras enfermedades causadas por otras cepas de *X. fastidiosa* y otros géneros de bacterias fitopatógenas.

La acción de esta construcción sobre el patógeno fue dependiente de la concentración de bacteriófagos y del tiempo de incubación de estos.

Conclusiones

Se construyó un híbrido scFv-péptido lítico que es capaz de eliminar totalmente a *X. fastidiosa* en cultivo *in vitro*.

Se expreso el híbrido scFv-péptido lítico en forma soluble en *E. coli* y *P. pastoris* y en fagos filamentosos.

Se determinó que los fagos scFv-péptidos líticos eliminan específicamente a *X. fastidiosa* pero no a los otros géneros de bacterias probados.

La concentración y el tiempo que se determino que los fagos scFv-péptido lítico eliminan 100% a *X. fastidiosa* es 3.6×10^5 fagos/célula entre 24 y 28 horas.

Las proteínas solubles scFv y scFv-péptido lítico expresados en *P. pastoris*, inhibieron pero no eliminaron a *X. fastidiosa* debido a la concentración.

Ambos sistemas de expresión de proteína recombinante en *P. pastoris* y de fagos filamentosos tienen potencial para la producción a gran escala para la aplicación del tratamiento a un gran número de plantas enfermas en el campo.

Literatura citada

- Álvarez-Delgado, P.C., 2006. Proteínas reconocidas por un Fragmento variable de cadena sencilla (scFv) de gallina dirigido en contra de *Xylella fastidiosa*. Tesis Profesional. Universidad Autónoma de Baja California. México. Pags. 66.
- Andersson, M., A. Boman, H.G. Boman. 2003. *Ascaris* nematodes from pig and human make three anti-bacterial peptides: isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides. Cellular and molecular life sciences. 60: 599-606.
- Agrios, G.N. 1997. Plant pathology. 4ta edición. Academic Press. Estados Unidos de América. 453-456.
- Barbas, C.F., D.R. Burton, J.M. Scott, G.J. Silverman (editores). 2001. Phage Display: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Estados Unidos de América. Capítulos 1-23.
- Boman, H.G. 2003. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. Journal of internal medicine. 254: 197-215.
- Boman, H.G., H. Jörnvall, J. Y. Lee, V. Mutt. 1992. Antibacterial porcine polypeptide. Patente No. 5,096,886. Estados Unidos de América.
- Brake, A. J., Merryweather, J.P., Coit, D.G., Heberlein, U.A., Masiarz, F.R., Mullenbach, G.T., Urdea, M.S., Valenzuela, P., Barr, P.J. 1984. α -Factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. 81:4642-4646.

- Brogden, K.A., M. Ackermann, P.B. McCray, B.F. Tack. 2003. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defenses. *International journal of antimicrobial agents*. 22: 465-478.
- Chatterjee, S., Almeida, R.P.P, Lindow, S. 2008. Living in two worlds: The plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46: 243-271.
- Cigan, A.M., Pabich E.K., Donahue, T. 1988. Mutational analysis of the *HIS4* translational initiator region in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 8: 2964-2975.
- Click E. M., R.E. Webster. 1997. Filamentous phage infection: Required interactions with the TolA protein. *J. Bacteriology*. 179: 6464-6471.
- Costa, H.S., Raetz, E., Pinckard, T.R., Gispert, C., Hernandez-Martinez, R., Dumenyo, C.K., Cooksey, D.A. 2004. Plant host of *Xylella fastidiosa* in and near southern California vineyards. *Plant Disease*. 88: 1255-1261.
- Davis. M.J., A.H. Purcell, S.V. Thompson. 1977. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. *Science*. 199: 75-77.
- Fitzgerald, D., V.K. Chaudhary, I.H. Pastan, T.A. Waldmann, C.L. Queen. 2000. Constructs encoding recombinant antibody-toxin fusion proteins. Patente No. 6,051,405. Estados Unidos de América.
- Guevara-Lugo, J. 2000. La enfermedad de Pierce en el cultivo de la vid en la costa de Ensenada, B.C. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Folleto técnico No. 20. No de paginas 24.
- Guevara-Lugo, J. 2002. Importancia de la enfermedad de Pierce. *Memorias XXV congreso nacional de control biológico*. 15-17.

- Doolittle, Russell F. 1986. Of URFs and ORFs: a primer on how to analyze derived amino acid sequences.
- Higgins, D.R., J.M. Gregg. *Pichia* protocols. 1988. Humana Press Inc. Estados Unidos de América. 270 paginas.
- Hill, B.L., A.H. Purcell. 1995. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. *Phytopathology*. 85: 1368-1372.
- Hopkins, D.L. 1984. Variability of virulence in grapevines among isolates of the Pierce's disease bacterium. 74: 1395-1398.
- Hopkins, D.L., W.C. Adlerz. 1988. Natural hosts of *Xylella fastidiosa* in Florida. *Plant Disease*. 72: 429-431.
- Hopkins, D.L., A.H. Purcell. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathology*. 34: 131-151.
- Hopkins, D.L., A.H. Purcell. 2002. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant disease*. 86: 1056-1066.
- Ishida, M.L., P.C. Andersen, B. Leite. 2004. Physiological and molecular plant pathology. 64: 73-81.
- King, D.J., A. Mountain, R.J. Owens, G.T. Yarranton. Multivalent antigen-binding proteins. Patente No. 5,864,019. Estados Unidos de América.
- Kuzina, L.V., T.A. Miller, D.A. Cooksey. 2006. *In vitro* activities of antibiotics and antimicrobial peptides against the plant pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa*. *Letters in applied microbiology*. 42: 514-520.
- Lai, J., J.H. Lee, Y.L. Lin, D.S. Ray, G. Wilcox. Cecropins fusion proteins. Patente No. 5,357,044. Estados Unidos de América.

- Minsavage, G.V., C.M. Thompson, D.L. Hopkins, R.M. Leite, R.E. Stall. 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology*. 84: 456-461.
- Purcell, A.H., S.R. Saunders. 1999. Fate of Pierce's disease strains of *Xylella fastidiosa* in common riparian plants in California. *Plant Disease*. 83: 825-830.
- Raju, B.C., A.C. Goheen, D. Teliz, G. Nyland. 1980. Pierce's disease of grapevines in México. *Plant Disease*. 64: 280-282.
- Rodrigues da Silva, F., A.L. Vettore, E.L. Kemper, A. Leite, P. Arruda. 2001. Fastidium gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *FEMS Microbiology letters*. 203: 165-171.
- Romanos, M. A., C.A. Scorer, J.J. Claire. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*. 8: 423-488.
- Russel M., H. Whirlow, T.P. Sun, R.E. Webster. 1998. Low frequency infection of F-bacteria by transducing particles of filamentous bacteriophages. *J. Bacteriology*. 170: 5312-5316.
- Ryals, J.A., P.B. Gay, P.A. Ahl-Goy. 1997. Anti-pathogenically effective compositions comprising lytic peptides and hydrolytic enzymes. Patente No. 5,631,007. Estados Unidos de América.
- Scorza, R., D.J. Gray. 2001. Disease resistance in vitis. Patente No. 6,232,528 B1. Estados Unidos de América.
- Simpson, A.J.G., F.C. Reinach, P. Arruda, F.A. Abreu, M. Acencio, R. Alvarenga, *et al.* 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*. 406: 151-159.

- Sipos. D., M. Andersson, A. Ehrenberg. 1992. The structure of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 in solution determined by proton-NMR. European journal of biochemistry. 209: 163-169.
- Wells, J.M., B.C. Raju, H. Hung, W.G. Weisburg, L. Mandelco-Paul, D.J. Brenner. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp.
- Yoshida, S., D. Ioka, H. Matsuoka, H. Endo, A. Ishii. 2001. Bacteria expressing single-chain immunotoxin inhibit malaria parasite development in mosquitoes. Molecular & Biochemical Parasitology. 113: 89-96.

Apéndice A

Amortiguador de Elusión

50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

300 mM NaCl

250 a 500 mM Imidazol

Ajustar a pH 8.0 con NaOH

Amortiguador de Lavado

50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

300 mM NaCl

10 a 20 mM Imidazol

Ajustar a pH 8.0 con NaOH

Amortiguador de Rompimiento (AR)

Para 1 litro disolver lo siguiente en 900 ml de agua destilada:

6 g fosfato de sodio monobásico

372 mg EDTA

50 ml glicerol

Ajustar pH 7.4 con NaOH y aforar a 1 litro. Almacenar a 4° C.

Opcional, añadir inhibidores de proteasas.

BMGY

En 700 ml de agua destilada, disolver:

10 g extracto de levadura

20 g peptona

Esterilizar por autoclave 20 minutos en ciclo líquido

Enfriar a ~60° C y añadir las siguientes soluciones estériles:

100 ml de Amortiguador de fosfato de potasio 1M a pH 6.0

100 ml YNB 10x

2 ml Biotina 500x

100 ml Glicerol 10x

Gel de Agarosa 1%

Mezclar:

0.5 g de Agarosa

50 ml de Amortiguador TAE 1x

Calentar hasta derretir la agarosa y dejar enfriar hasta ~60° C y añadir 2 µl de solución de Bromuro de Etidio, verter en el molde y esperar a que solidifique.

Amortiguador TAE 100x

484 g de Tris-base

114.2 ml ácido acético

200 ml de 0.5 M EDTA pH 8.0

Llevar a 1 litro con agua destilada

Bromuro de Etidio (solución) 5mg/ml
Disolver 0.1 g en 20 ml agua destilada
Almacenar en la oscuridad

Solución de carga 10x

Para 10 ml:

5 ml de Glicerol (50%)

1 ml de Amortiguador 10x (de cualquier enzima de restricción)

4 ml de Agua destilada

1 mg de Azul de Bromofenol (0.01%)

-Para la Electroforesis con gel de agarosa: colocar el molde con el gel en la cámara de electroforesis y añadir una adecuada cantidad de amortiguador TAE que cubra el gel. Poner a cada muestra de ADN solución de carga a 1x. Aplicar 80 V por ~1 hora. Visualizar con luz ultravioleta.

Gel de Poliacrilamida SDS al 10% (SDS-PAGE).

-Minigel para cámara BioRad para un volumen máximo de 30 µl por muestra.

-Se prepara el persulfato de amonio fresco 0.02 g en 125 µl.

Running gel 10%

Agua bidestilada 0.625 ml

RGB amortiguador 1.875 ml

A/MBA (poliacrilamida) 1.25 ml

1:10 TEMED 12.5 µl

Persulfato de Amonio 37.5 µl

-Mezclar, colocar en la cámara dejando un espacio libre para el corrimiento en stacking gel de aproximadamente de 1 cm, e inmediatamente después poner 100 µl de isopropanol para nivelar el gel y dejar polimerizando.

Stacking gel 5%

Agua bidestilada 0.625 ml

SGB amortiguador 0.9375 ml

A/MBA (poliacrilamida) 0.3125 ml

1:10 TEMED 6.25 µl

Persulfato de Amonio 18.75 µl

-Mezclar y colocar inmediatamente el peine que moldea los carriles.

-Muestras se mezclan 1:1 con sample buffer.

-Amortiguador de electroforesis 1x con un voltaje de 120 V.

-Teñir con solución de tinte por una noche. Desteñir con solución de desteñido.

Sample buffer

SGB 2.5 ml, Agua destilada 4.0 ml, Glicerol 1ml, SDS 10% 2 ml, 2-Mercaptoetanol 0.5 ml, Azul de bromofenol 0.001%

Amortiguador de electroforesis 10x

Trizma base 0.25 M, pH 8.3 con HCl 6 M, Glicina 1.92 M, SDS 1%

RGB (Running gel buffer)

Trizma base 0.75 M, pH 8.8 con HCl 6 M, SDS 0.2%

SGB (Stacking gel buffer)

Trizma base 0.25 M, pH 6.8 con HCl 6 M, SDS 0.2%

TEMED

TEMED 1:10 en agua destilada

A/MBA

30% Acrilamida, 0.86% Metilenbisacrilamida, en agua bidestilada.

Solución para geles después del corrido

Azul coomassie 0.2%, Metanol o isopropanol 40%, Agua 50%, Acido acético 10%.

Solución de destañido

Metanol o isopropanol 40%, Agua 50%, Acido acético 10%.

LB (con o sin Agar)

Para 1 litro disolver lo siguiente en 950 ml de agua destilada:

10 g de triptona

5 g extracto de levadura

10 g NaCl

para LB Agar: 15 g de agar

Ajustar el pH a 7.0 y ajustar a 1 litro

Esterilizar por autoclave 20 minutos en ciclo líquido

Enfriar a ~55° C y añadir los antibióticos deseados

LB bajo en sal

Para 1 litro disolver lo siguiente en 950 ml de agua destilada:

10 g de triptona

5 g extracto de levadura

5 g NaCl

Ajustar el pH a 7.5 y ajustar a 1 litro

Esterilizar por autoclave 20 minutos en ciclo líquido

Enfriar a ~55° C y añadir los antibióticos deseados

LB bajo en sal Agar

Para 1 litro disolver lo siguiente en 950 de agua destilada:

10g de triptona

5g extracto de levadura

5g NaCl

15g de agar

Ajustar el pH a 7.5 y ajustar a 1 litro

Esterilizar por autoclave 20 minutos en ciclo líquido

Enfriar a ~55° C y añadir los antibióticos deseados

MGY (Medio Mínimo con Glicerol)

Para 1 litro:

Esterilizar 800 ml de agua destilada por autoclave 20 minutos en ciclo líquido

Enfriar a ~60° C y añadir las siguientes soluciones estériles:

100 ml de YNB 10x

2 ml Biotina 500x

100 ml de Glicerol 10x

MM (Medio Mínimo con Metanol)

Para 1 litro:

Esterilizar por autoclave 800 ml por 20 minutos en ciclo líquido

Enfriar a ~60° C y añadir las siguientes soluciones estériles:

100 ml de YNB 10x

2 ml Biotina 500x

100 ml de Metanol 10x

PBS 1x (amortiguador de fosfatos salino)

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

12 mM Na₂HPO₄

1.2 mM KH₂PO₄

pH 7.4 HCl

Llevar a un litro con agua destilada y esterilizar por autoclave 20 minutos a ciclo líquido.

PD2

Para 1 litro disolver lo siguiente en 900 ml de agua destilada:

4 g triptona

2 g soytona

1 g citrato trisódico

1 g succinato disódico

1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1.5 g K_2HPO_4

1 g KH_2PO_4

10 ml Hemina al 0.1% en NaOH 0.05 N

Ajustar el pH entre 6.8 y 7.1 con NaOH

Para medio sólido añadir 8 g Gelrite

Esterilizar por autoclave 20 minutos en ciclo líquido.

SB (Super broth)

Para 1 litro disolver lo siguiente en 900 ml de agua destilada:

30 g triptona

20 g extracto de levadura

10 g de MOPS (3 N-Morfolino) ácido propanosulfónico.

Ajustar pH 7.0 con NaOH

Esterilizar por autoclave 20 minutos en ciclo líquido.

SOC

Para 1 litro disolver lo siguiente en 950 ml de agua destilada:

20 g triptona

5 g extracto de levadura

0.5 g NaCl

186 mg KCl

Ajustar pH 7.0 con NaOH

Esterilizar por autoclave por 20 minutos en ciclo líquido

Añadir 10 ml de MgCl_2 1 M y 1 ml de Glucosa 1 M.

TBS-BSA 1%

50 mM de Tris-base pH 7.5

150 mM de NaCl

Por cada 100 ml agregar 1 g de Albúmina (BSA)

Esterilizar por filtración (0.22 μm). Almacenar a 4° C.

YPD (+ Zeocina) Por cada 1 litro:

Disolver lo siguiente en 900 ml de agua destilada:

10 g Extracto de levadura

20 g Peptona

Para medio sólido agregar 20 g de agar

Esterilizar por autoclave 20 minutos en ciclo líquido

Esperar a que la solución se enfríe después de la autoclave (~60° C) y agregar:

100 ml de Dextrosa 10x estéril.

Para YPD zeocina agregar 1 ml de 100 mg/ml de zeocina.

YPDS + Zeocina Por cada 1 litro:

Disolver lo siguiente en 900ml de agua destilada:

10 g Extracto de levadura

182.2 g Sorbitol

20 g Peptona

20 g de agar

Esterilizar por autoclave 20 minutos en ciclo líquido

Esperar a que la solución se enfríe después de la autoclave (~60° C) y agregar:

100 ml de Dextrosa 10x estéril.

Agregar 1 ml de 100 mg/ml de zeocina.

Apéndice B

Tabla VII. Producción de bacteriófagos scFv y scFv-cP1 en 200 ml de cultivo.

Producción de Bacteriófagos SCFV y SCFV-CP1 en 200 ml de cultivo.		
Proteínas expresadas en fagos	Cultivo	Concentración de partículas virales por μl .
Fagos scFv-cP1	A	2.556×10^{11}
	B	2.13×10^{11}
	C	2.414×10^{11}
	D	7.778×10^{11}
	F	1.838×10^{11}
	G	1.06×10^{11}
	H	1.271×10^{11}
	I	6.364×10^{10}
Fagos scFv	A	8.674×10^{10}
	B	1.084×10^{11}
	C	2.168×10^{11}
	D	1.012×10^{11}

Tabla VII. Producción en μg de Proteínas Solubles SCFV y SCFV-CP1 expresadas en *P. pastoris* en cultivos de 100 ml con medio complejo

Producción en μg de Proteínas Solubles SCFV y SCFV-CP1 expresadas en <i>P. pastoris</i> en cultivos de 100 ml con medio complejo.			
Proteína	Cultivo	Horas de cultivo	Microgramos totales por 100ml de cultivo
scFv	A	60	1.2 μg
	B	60	3.7 μg
	C	120	10.76 μg
scFv-cP1	A	60	3.0 μg
	B	60	7.0 μg
	C	120	12.0 μg

Apéndice C

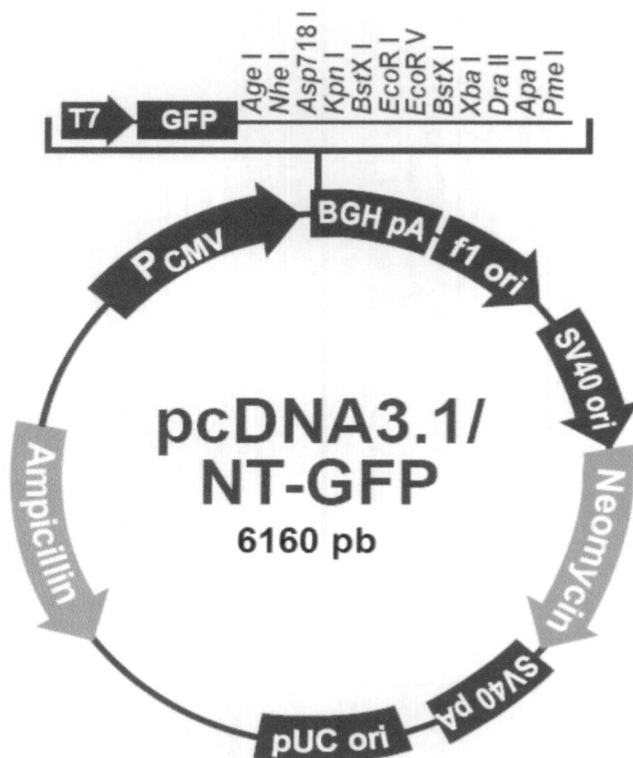


Fig. 40. Vector pcDNA3.1/NT-GFP. Contiene un promotor CMV, sitio promotor y de cebador T7, un ORF GFP, sitio múltiple de clonación, sitio cebador reverso BGH, origen de replicación f1, promotor y origen SV40 y señal de poliadenilación SV40, gen de resistencia a neomicina y a ampicilina, origen pUC para replicación del plásmido. Invitrogen®.

Apéndice D

Preparación de células competentes con CaCl_2 .

1. Preparar medio de cultivo LB sólido tetraciclina 50 $\mu\text{l/ml}$ y esterilizarlo por autoclave. Preparar placas, y sembrarlas con la cepa de bacterias XL1Blue, cultivar toda la noche a 37° C.
2. Escoger colonias, ponerlas a cultivar en tubos con medio LB tetraciclina 50 $\mu\text{l/ml}$ con agitación y a 37° C toda la noche.
3. Diluir los cultivos a una concentración no mayor a 40 unidades Klett y poner aproximadamente 25 ml en frascos Erlenmeyer de 250 ml, incubarlos con agitación (200-240 rpm) a 37° C hasta que lleguen a 60-80 unidades Klett (fase logarítmica) (0.375 D.O. a 590 nm).
4. Centrifugar (Sorvall RC 5B PLUS) a 4500 x g por 5 min en tubos estériles, desechar sobrenadante, resuspender el paquete (bacterias) en un medio de volumen (12.5 ml) de 0.1 M de CaCl_2 en frío (baño de hielo) por 20 min o toda la noche a 4° C. Centrifugar de nuevo y resuspender en 1.25 ml de CaCl_2 . Hacer alícuotas de 50 μl con 20% glicerol en tubos estériles y guardar a -80° C hasta su uso.

Preparación de células electrocompetentes

1. Sembrar bacterias de cepa XL1Blue en placas de LB agar y dejar creciendo toda la noche a 37° C. Tomar una colonia e inocular 15 ml de SB tetraciclina (5 mg/ml). Incubar toda la noche a 250 rpm a 37° C.
2. En dos frascos conteniendo 500 ml de SB con 10 ml de glucosa 20% y 5 ml de $MgCl_2$ 1 M, inocular con 2.5 ml del cultivo líquido del paso 1. Incubar a 37° C a 250 rpm hasta que alcance una Densidad Óptica de 0.7 a 600 nm (aprox. en 2 ½ horas). Una vez alcanzada la D.O. enfriar en hielo por 15 min.
3. Pasar el contenido de los 2 frascos en 20 tubos de 50 ml (previamente enfriados). Centrifugar a 3000 x g por 20 min a 4° C. Descartar el sobrenadante.
4. Resuspender el paquete celular en 25 ml de glicerol frío al 10% (v/v). Agregar glicerol frío al 10 % hasta los 50 ml. Centrifugar a 3000 x g por 20 min a 4° C.
5. Descartar el sobrenadante y resuspender el paquete en 50 ml de glicerol frío al 10%. Centrifugar a 3000 x g por 20 min a 4° C.
6. Descartar el sobrenadante y resuspender el paquete en 25 ml de glicerol frío al 10% (v/v). Centrifugar a 2500 x g por 15 min a 4° C.
7. Preparar 20 viales de 1 ml en un baño de hielo seco/etanol. Descartar el sobrenadante hasta que el paquete comience a deslizarse hacia fuera.
8. Con una pipeta fría de 5 ml resuspenda cada paquete con el volumen restante del sobrenadante (1 a 2 ml).

9. Con una punta de 1 ml cortada prepare alícuotas de 300 μ l en cada uno de los tubos que se encuentran en el baño en hielo seco. Tapar los tubos y almacenar a -80° C.