

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



Despliegue de anticuerpos (scFv) monoclonales de
gallina en fagos filamentosos contra Cr^{3+} .

TESIS

Que para obtener el Título de

Biólogo

presenta:

Osiris Marroquín Belaunzarán

Ensenada, Baja California. Marzo de 2003

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

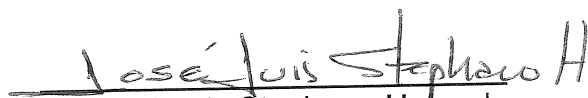
“ Despliegue de anticuerpos (scFv) monoclonales de gallina en fagos filamentosos contra Cr³⁺ ”

TESIS PROFESIONAL

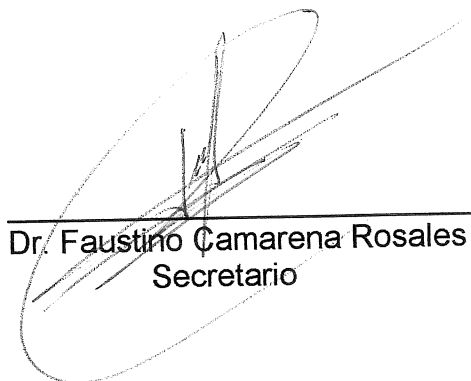
QUE PRESENTA

OSIRIS MARROQUÍN BELAUNZARÁN

Aprobada por:



Dr. José Luis Stephano Hornedo
Presidente



Dr. Faustino Camarena Rosales
Secretario



Dr. Jorge de la Rosa Vélez
1er. Vocal

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesor y director de tesis Dr. en C. José Luis Stephano Hornedo, por todo el apoyo, la ayuda y la confianza que me brindó, además de todas las aportaciones invaluable de su conocimiento tanto en el laboratorio como personales. Agradezco a la Dra. en C. Meredith Gould por su apoyo en el desarrollo de esta tesis y por el placer de haber sido su alumno durante la carrera. Agradezco a Adriana Ortigón Lizarraga por su amistad, su amor y su invaluable ayuda en el trabajo teórico y experimental de la tesis, gracias por todo lo que me has dado. A mis sinodales, Dr. en C. Jorge de la Rosa, Dr. en C. Faustino Camarena y al M. en C. Mauricio García, por sus importantes aportaciones en el manuscrito. A mis maestros que han contribuido en mi desarrollo académico a lo largo de mi carrera y a la Facultad de Ciencias que fue mi casa por varios años.

Agradezco a mi Madre y a mi Padre por el respaldo que han sido en mi vida y en mi desarrollo. Les agradezco todo su apoyo, comprensión, cariño y amistad. Gracias por todo lo que han aportado a mi persona y el significado de la vida que en mi crearon, los quiero mucho. A mi hermana por su amistad, compañía y cariño que siempre he apreciado, muchas gracias Isis. A mis peques hermanos Fernanda y Jesús Antonio por su cariño y por la hermosa vida que en ellos se gesta. A mi abuelita Guadalupe por el gran cariño que siempre me ha demostrado, te quiero mucho abue.

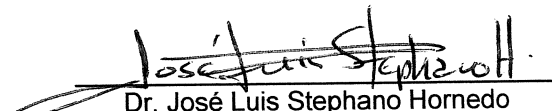
Agradezco a mi buen amigo Arturo Moreno que ha sido un apoyo importante en mi vida, agradezco tu amistad. A Aurora Cervantes por su amistad y cariño que me ha brindado siempre. A mi amigo y compañero de laboratorio Eduardo Prieto. A Sahuako Hori por sus consejos en el laboratorio y por su amistad. A todos mis amigos que no menciono y que me han acompañado a lo largo de mi carrera y de mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca parcial otorgada.

RESUMEN:

Resumen de la tesis de **Osiris Marroquín Belaunzarán** presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en **Biología**. Ensenada, Baja California, México. Febrero 5 de 2003.

Título: **Despliegue de anticuerpos (scFv) monoclonales de gallina en fagos filamentosos contra Cr³⁺**.



Dr. José Luis Stephano Hornedo

El presente trabajo informa sobre la generación de fragmentos variables de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) monoclonales de gallina afines a Cr³⁺. Con la construcción de una biblioteca de scFv's expresados en fagémidos en la cepa *Escherichia Coli* XL1-B y utilizando la técnica de despliegue de anticuerpos en fagos filamentosos, se seleccionaron scFv policlonales afines a Cr³⁺ empleando la cisteína como presentador del metal. El DNA de los fagémidos de la última ronda de selección se utilizó para producir scFv monoclonales en la cepa *E. coli* TOP10F', donde se obtuvo un scFv específico hacia Cr³⁺ con una sensibilidad de hasta 5 µg/L, útil para detectar el máximo nivel permitido de cromo total (50 µg/L) en agua potable y residual en México (NOM-127-SSA1-1994), con la capacidad de capturar hasta 2.94 mg/L de Cr³⁺ soluble por cada 1.2 g de scFv.

Los equipos de detección de metales actuales son muy costosos, lentos y una gran desventaja es la ubicación del equipo, ya que en muchos de los casos no se encuentran cerca del sitio de colecta. El uso de anticuerpos para detección de metales busca ser un método sensible, barato, rápido y con potencial aplicación en la recuperación de metales de interés.

ABSTRACT:

Thesis resume of **Osiris Marroquin Belaunzaran** presented as a partial requisite for obtaining the Bachelor degree in Biology. Ensenada, Baja California, Mexico. February 5, 2003.

Title: **Display of monoclonal antibodies (scFv) of chicken in filamentous phage against Cr³⁺.**

The present work reports the generation of a single chain fragment variable (scFv) monoclonal chicken antibody specific for Cr³⁺. An scFv library was produced in phagemids and expressed in *Escherichia coli* XL1-B using the technique of phage display of antibodies in filamentous phage. Polyclonal scFv fragments against Cr³⁺ were selected using cysteine as the metal bearer. The phagemid DNA from the last round of selection was used to express monoclonal scFv in *E. coli* TOP10F'. A monoclonal scFv specific for Cr³⁺ was selected, which could detect as little as 5 µg/L of soluble Cr³⁺. Therefore this antibody could be useful for the detection of the highest level allowed of total chromium (50 µg/L) in potable water in Mexico (NOM-127-SSA1-1994). The antibody also has the capacity to capture up to 2.94 mg/L of soluble Cr³⁺ per 1.2 g of scFv.

Instruments that detect metals are very expensive, time consuming, and they can not be taken to the place of sampling. The use of antibodies for metal detection could be a rapid, sensitive, specific and cheaper method, with potential application for the recovery of metals of interest.

ÍNDICE:

Escrito de aprobación	i
Agradecimientos	ii
Resumen	iii
Índice	v
Índice de figuras	ix
Índice de tablas	xii
I Introducción	1
II Antecedentes	6
III Hipótesis	10
IV Objetivos	11

V Material y método:

1. Preparación del antígeno.	12
1.1 Unión de glutatión con KLH (keyhole limpet hemocyanine)	12
1.2 Unión de KLH-glutatión con Cr^{3+} y Cr^{6+}	13
1.3 Unión de glutatión y cisteína con Cr^{3+} y Cr^{6+}	14
2. Inmunizaciones	14
3. Detección de anticuerpos en suero por ELISA.	14
3.1 Extracción de suero de gallina	15
3.2 ELISA de anticuerpos en suero	15
4. Purificación de RNA total y síntesis de mRNA a cDNA.	16
4.1 Purificación de RNA total a partir de bazo de gallina	17
4.2 Reacción RT-PCR	17
5. Construcción de la biblioteca de DNA de scFv.	18
5.1 PCR de las cadenas variables ligeras (V_L) y pesadas (V_H)	19
5.2 PCR de traslape (DNA de scFv)	19
6. Digestión y purificación del DNA de scFv y del vector pComb3X.	22
6.1 Digestión y purificación del DNA de scFv	22
6.2 Digestión y purificación de pComb3X	22
7. Ligación del DNA de scFv en el vector de expresión pComb3X	22
8. Producción de fagémidos expresando el fragmento de anticuerpo de cadena sencilla scFv	24
9. Rondas de selección con la biblioteca de scFv policlonales trasportados en fagémidos	26
10. Detección del fagémido de interés con anticuerpos anti-M13 por ELISA y en resina cargada con Cr^{3+}	29
10.1 Detección del fagémido de interés por ELISA	29

10.2	Detección del fagémido de interés de la segunda biblioteca en resina cargada con Cr^{3+}	30
11.	Determinación de especificidad de fagémidos de la tercer ronda de selección en presencia de distintos metales.	
11.1	Especificidad de fagémidos por ELISA	31
11.2	Especificidad de fagémidos utilizando resina unida a distintos metales	31
12.	Expresión de scFv monoclonales en <i>E. coli</i> TOP10F'.	
12.1	Extracción de pComb3X-scFv de la tercer ronda de selección ...	32
12.2	Electroporación en <i>E. coli</i> TOP10F' con pComb3X-scFv	32
12.3	Expresión de scFv soluble	32
12.4	Purificación del scFv del sobrenadante con Ni-NTA	34
13.	Determinación de afinidad y especificidad de scFv's monoclonales.	
13.1	ELISA de selección de scFv's monoclonales	35
13.2	Detección de scFv's monoclonales por medio de Western blot	36
13.3	ELISA de especificidad de scFv monoclonales	37
14.	Determinación de sensibilidad del scFv monoclonal.	
14.1	ELISA de sensibilidad del scFv monoclonal	38
14.2	Control positivo de sensibilidad por espectrofotometría de absorción atómica	38

IV Resultados:

1.	Preparación del antígeno	40
2.	Inmunizaciones	41
3.	ELISA de suero de gallina	
3.2.1	ELISA del suero de gallina para detección de anticuerpos contra Cr^{3+}	42
3.2.2	ELISA del suero de gallina para detección de anticuerpos contra Cr^{6+}	45
4.	Purificación de RNA total y síntesis de mRNA a cDNA	
4.1	Purificación de RNA total a partir de bazo de gallina	47
4.2	Reacción RT-PCR	47
5.	Construcción de la biblioteca de DNA de scFv	
5.1	PCR de las cadenas variables ligeras (V_L) y pesadas (V_H)	48
5.2	PCR de traslape (DNA de scFv)	49
6.	Digestión y purificación del DNA de scFv y del vector pComb3X	
6.1	Digestión y purificación del DNA de scFv	50
6.2	Digestión y purificación de pComb3X	51
7.	Ligación del DNA de scFv en el vector de expresión pComb3X	52
8.	Producción de fagémidos expresando el fragmento de anticuerpo de cadena sencilla (scFv)	52
9.	Rondas de selección con la biblioteca de scFv policlonales transportados en fagémidos	52

10. Detección del fagémido de interés con anticuerpos anti-M13 por ELISA y en resina cargada con Cr ³⁺	
10.1 Detección del fagémido de interés por ELISA	
10.1.1 ELISA de la primer biblioteca de fagémidos	53
10.1.2 ELISA de la segunda biblioteca de fagémidos	54
10.2 Detección del fagémido de interés de la segunda biblioteca en resina cargada con Cr ³⁺	55
11. Determinación de especificidad de fagémidos en presencia de distintos metales	
11.1 ELISA de especificidad de fagémidos	56
11.2 Especificidad de fagémidos utilizando resina unida a distintos metales	57
12. Expresión de scFv monoclonales en <i>E. coli</i> TOP10F'.	
12.1 Extracción de pComb3X-scFv de la tercer ronda de selección ..	59
12.2 Electroporación en <i>E. coli</i> TOP10F' con pComb3X-scFv	60
12.3 Expresión de scFv soluble	61
12.4 Purificación del scFv del sobrenadante con Ni-NTA	61
13. Determinación de afinidad y especificidad de scFv's monoclonales.	
13.1 ELISA de selección de scFv's monoclonales	62
13.2 Detección de scFv's monoclonales por medio de Western blot	63
13.3 ELISA de especificidad de scFv monoclonales	64
14. Determinación de sensibilidad del scFv monoclonal.	
14.1 ELISA de sensibilidad del scFv monoclonal	69
14.2 Control positivo de sensibilidad por espectrofotometría de absorción atómica	70
V Discusiones:	72
1. Preparación del antígeno	75
2. Inmunizaciones	76
3. Detección de anticuerpos en suero por ELISA	77
4. Purificación de RNA total y síntesis de mRNA a cDNA	81
5. Construcción de la biblioteca de DNA de scFv	82
6. Digestión y purificación del DNA de scFv y del vector pComb3X	83
7. Ligación del DNA de scFv en el vector de expresión pComb3X	84
8. Producción de fagémidos expresando el fragmento de anticuerpo de cadena sencilla (scFv)	85
9. Rondas de selección con la biblioteca de scFv policlonales transportados en fagémidos	85
10. Detección del fagémido de interés con anticuerpos anti-M13 por ELISA y en resina cargada con Cr ³⁺	86

11. Determinación de especificidad de fagémidos de la tercer ronda de selección en presencia de distintos metales	88
12. Expresión de scFv monoclonales en <i>E. coli</i> TOP10F'	90
13. Determinación de afinidad y especificidad de scFv's monoclonales	91
14. Determinación de sensibilidad del scFv monoclonal	93
VI Conclusiones	95
VII Bibliografía	96
VIII Apéndice	104

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Representación esquemática de KLH (proteína acarreadora) transportando al glutatión+Cr (Yang *et al.*, 1994).

Figura 2. Proceso de recuperación de los mRNA's (RNA mensajeros) extraídos del bazo de la gallina, principal órgano en la maduración de linfocitos B productores de anticuerpos.

Figura 3. Proceso de síntesis de mRNA a cDNA con el uso de la enzima transcriptasa reversa que polimeriza una molécula de cDNA con los cebadores oligo dT, utilizando como molde mRNA.

Figura 4. Representación general de un anticuerpo IgG.

Figura 5. Proceso de amplificación de las V_L y las V_H a partir de cDNA.

Figura 6. Proceso de digestión y ligación de la biblioteca de DNA de scFv en el vector pComb3X.

Figura 7. Proceso de selección para obtener una biblioteca de fragmentos variables de anticuerpos de cadena sencilla (scFv).

Figura 8: Proceso de las rondas de selección para la selección de los fagémidos que expresan un scFv afín a la cisteína+Cr³⁺.

Figura 9. Producción del fragmento variable de cadena sencilla (scFv) monoclonal, expresado sin la Proteína III del fago filamentoso M13 en *E. coli* TOP10F', cepa no supresora, que reconoce el codón ámbar como codón de terminación.

Figura 10: Inmunización en el músculo pectoral en la gallina Leghorn blanca.

Figura 11: ELISA del suero de gallina inmune (Inm) diluido 1:10. Análisis de Cr³⁺.

Figura 12: ELISA del suero de gallina preinmune (pre) diluido 1:10. Análisis de Cr³⁺.

Figura 13: Diferencia entre los resultados de las unidades de absorbencia del suero inmune y preinmune de la gallina inmunizada con los acarreadores del Cr³⁺.

Figura 14: ELISA del suero de gallina inmune (Inm) diluido 1:10. Análisis de Cr⁶⁺.

Figura 15: Diferencia entre los resultados de las unidades de absorbencia del suero inmune y preinmune de la gallina inmunizada con los acarreadores del Cr⁶⁺.

Figura 16: Disección de la gallina en abertura por la quilla.

Figura 17: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR de las cadenas V_L y V_H .

Figura 18: Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR de traslape (DNA de scFv).

Figura 19: Electroforesis en gel de agarosa al 2% con muestras de DNA de scFv con y sin digestión por *Sfi* I.

Figura 20: Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% con muestras del vector de expresión pComb3X digerido con *Sfi* I.

Figura 21: ELISA de la primer biblioteca de DNA de scFv después de dos rondas de selección.

Figura 22: ELISA de la segunda biblioteca de DNA de scFv después de tres rondas de selección.

Figura 23: Afinidad de los fagémidos de la segunda biblioteca hacia Cr^{3+} después de tres rondas de selección, utilizando la resina afín a metales.

Figura 24: ELISA de especificidad de fagémidos de la tercer ronda de selección de la segunda biblioteca de DNA de scFv.

Figura 25: Ensayo de especificidad con la resina afín a metales de los fagémidos de la tercer ronda de selección de la segunda biblioteca.

Figura 26: Electroforesis en gel de agarosa al 1% con muestras de DNA de pComb3X-scFv de la tercer ronda de selección. Carriles: 1: Escalera molecular de 1 Kb; 2 - 4: pComb3X-scFv de la tercer ronda de selección.

Figura 27: Placa con agar LB *amp*⁵⁰, con clonas de *E. coli* TOP10F' transformadas con el vector pComb3X-scFv de la tercer ronda de selección.

Figura 28: ELISA para la selección de scFv monoclonales afines a Cr^{3+} , obtenidos a partir de la purificación con Ni-NTA.

Figura 29: Western blot con muestras de scFv's monoclonales purificados con Ni-NTA.

Figura 30: ELISA de especificidad utilizando PBS de lavado a pH 7.4 de las cuatro clonas seleccionadas que expresaron scFv's monoclonales afines a Cr^{3+} .

Figura 31: ELISA de especificidad utilizando PBS de lavado a pH 6.0 de cuatro clonas seleccionadas que expresaron scFv's monoclonales afines a Cr³⁺.

Figura 32: ELISA de especificidad del scFv de la clona #19, probando distintos metales y utilizando PBS de lavado a pH 6.0.

Figura 33: ELISA de especificidad con distintos metales del scFv de la clona # 20, utilizando PBS de lavado a pH 6.0.

Figura 34: Análisis de sensibilidad por ELISA del scFv monoclonal de la clona #19.

Figura 35: Determinación de la cantidad de cromo a distintas concentraciones unido al scFv monoclonal de la clona #19 por espectrofotometría de absorción atómica.

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla I: Tabla de inmunizaciones en gallina Leghorn blanca.

Tabla II: Cebadores utilizados para la amplificación del DNA que codifica para las cadenas V_L y las V_H de los anticuerpos de gallina.

Tabla III: Cebadores utilizados para unir el DNA amplificado de las cadenas V_L con las V_H de los anticuerpos de gallina.

Tabla IV: Cuantificación a 280 nm de los scFv de las 20 clonas inducidas.

Tabla V: Valores obtenidos del ELISA de sensibilidad con distintas concentraciones de Cr^{3+} .

INTRODUCCIÓN:

El cromo (Cr) es un metal pesado que se localiza en el grupo VIb en la tabla periódica con valencias 0, I, II, III, IV, V y VI. En la naturaleza los principales compuestos del cromo se encuentran en los estados II, III y VI, siendo el de valencia VI el estado más tóxico. El cromo forma parte de hasta 6.4×10^{-3} % de la corteza terrestre y se encuentra principalmente como cromita (FeCr_2O_4). El cromo es un metal blanco, duro, brillante y frágil, que en forma pura es dúctil y maleable. A temperaturas elevadas el cromo se combina directamente con los halógenos, azufre, silicio, boro, nitrógeno, carbono y oxígeno (Cotton *et al.*, 1981). Dependiendo de su estado de oxidación puede ser un agente oxidante o reductor (Cr^{2+} , Cr^0); es útil en la industria de cromado, aleación, pinturas, papel, cintas magnéticas, soluciones preservadoras de maderas, etc. Numerosos experimentos y casos sobre padecimientos por contacto e ingestión de cromo en alimentos y aguas residuales y potables han sido reportados, estos incluyen: enfermedades crónicas (Telisman, 1995), daños neurodegenerativos (Campbell *et al.*, 2001), daños a pulmones (Ruegger, 1995), inhibición de citocinas (Marth *et al.*, 2000), daños al hígado y riñones (Certulli *et al.*, 1998; Wasser *et al.*, 1997), alteraciones en el metabolismo (Saner *et al.*, 1983) y

daños al DNA (Beyersmann, 2001; D'Agostini *et al.*, 2002; Madeiros *et al.*, 2003; Speetjens *et al.*, 1999).

El cromo en su forma trivalente es un nutriente requerido en cantidades traza (David, 2002); actúa como cofactor de la insulina que regula la cantidad de glucosa en la sangre (Anderson *et al.*, 1997). Existen opiniones encontradas sobre el uso y consumo de cromo trivalente; por una parte, un grupo sugiere que el picolinato de cromo utilizado como suplemento alimenticio y el cloruro de cromo no son tóxicos (Anderson *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1997; Mertz *et al.*, 1993). Sin embargo, reportes recientes informan que el consumo de picolinato de cromo y cloruro de cromo daña el DNA, el hígado, los riñones, el metabolismo y promueve el desarrollo de carcinomas (Beyersmann, 2001; Certulli *et al.*, 1998; Madeiros *et al.*, 2003; Speetjens *et al.*, 1999; Wasser *et al.*, 1997).

El cromo en su forma hexavalente es un potente carcinógeno (D'Agostini *et al.*, 2002; Madeiros *et al.*, 2003), al cual se han asociado numerosas enfermedades. Su uso en la industria requiere de rigurosas medidas de seguridad, debido a que es el segundo contaminante inorgánico más abundante en aguas residuales (Blowes, 2002).

El límite máximo permisible de cromo total en agua potable en México es de 0.05 mg/L según la Norma Oficial Mexicana (NOM-127-SSA1-1994). El cromo puede ser cuantificado utilizando equipos como el

espectrofotómetro de absorción atómica (flama y electrotérmicos), el espectrofotómetro de emisión de plasma acoplado, cromatografía de intercambio iónico y por métodos colorimétricos. Para el caso del cromo total, el espectrofotómetro de absorción atómica electrotérmico (horno de grafito) es útil para detectar cantidades de 5-100 $\mu\text{g/L}$ en agua potable y en agua residuales; el espectrofotómetro de absorción atómica con flama detecta de 2 a 100 $\mu\text{g/L}$; el de plasma acoplado detecta hasta 7 $\mu\text{g/L}$; la cromatografía de intercambio iónico detecta hasta 0.3 $\mu\text{g/L}$ y por último, el método colorimétrico detecta de 40-400 $\mu\text{g/L}$ (Eaton *et al.*, 1995). Los equipos de detección de metales son muy costosos (Blake *et al.*, 1998) y una gran desventaja es su ubicación, ya que no pueden transportarse hasta el sitio de colecta. El método colorimétrico, que es menos sensible, es útil para la detección de Cr^{6+} únicamente, sin embargo, se puede detectar Cr^{3+} al oxidarlo a Cr^{6+} . De igual manera, bajo condiciones reductoras el Cr^{6+} se reduce a Cr^{3+} , si se desea transformar a una forma menos tóxica (Ellis *et al.*, 2002; Erdem *et al.*, 2001).

El uso de anticuerpos para la detección de metales en muestras contaminadas se reduce a la detección de Hg^{2+} , Pb^{2+} , In^{3+} , U^{6+} y Ni^{2+} (Blake *et al.*, 1998; Blake *et al.*, 2001; Darwish *et al.*, 2002; Khosraviani *et al.*, 2000) cuando estos se encuentran unidos a agentes quelantes como EDTA (Ácido Etilendiamino Tetraacético), DTPA (Ácido Dietilentriamino Pentaacético) y

CHXDTPA (Ácido *Trans*-ciclohexil Dietilenatriamino Pentaacético) (Blake *et al.*, 1998); y al de un anticuerpo que reconoce Hg^{2+} y Cd^{2+} , como iones y acoplados a glutatión (Kosraviani *et al.*, 1998; Wiley *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1994).

El uso de anticuerpos policlonales y monoclonales para la detección de metales busca ser un método específico, sensible, barato y rápido, con uso potencial en la recuperación de metales específicos.

La ruta más común para la obtención de anticuerpos monoclonales es a base de inmunizaciones en ratón con el antígeno de interés, seguido de una selección de antígeno-anticuerpo con la técnica de hibridoma (Kohler *et al.*, 1975). Una vía alternativa para el desarrollo de anticuerpos monoclonales, es el uso de la técnica despliegue de anticuerpos en fagos filamentosos (Barbas *et al.*, 2001).

Los anticuerpos, que son proteínas del plasma, se producen en respuesta a la introducción de agentes externos al cuerpo conocidos como antígenos. Todos los antígenos tienen el potencial de ser reconocidos por anticuerpos, a excepción de los pequeños químicos (haptenos) que no generan una respuesta inmune. Para que los haptenos generen una respuesta inmune necesitan estar unidos a un inmunógeno, generalmente una proteína de alto peso molecular, esta unión transporta al hapteno y lo expone para que los anticuerpos lo reconozcan (Abbas *et al.*, 1997). En

general los haptenos deben acoplarse a proteínas solubles tales como la BSA (albúmina de suero bovino) o la KLH (hemocianina) (Harlow *et al.*, 1999).

El cromo, por su bajo peso molecular se considera como un hapteno, por esto, no es capaz de producir una respuesta humoral. El tripéptido glutatión (ácido glutámico-cisteína-glicina) es un acarreador del cromo debido a la alta afinidad que el metal muestra hacia el grupo sulfhidrilo de la cisteína, unión que se da en el radical SH^- (Yang *et al.*, 1994). La hemocianina es un inmunógeno muy potente con la capacidad de transportar haptenos al ser unidos con agentes de unión, tal y como el glutaraldehído, que tiene la capacidad de unir los grupos aminos de la hemocianina con el grupo amino del glutatión (acarreador del cromo).

ANTECEDENTES

Los inicios de la tecnología de despliegue de anticuerpos en fagos filamentosos, comienzan cuando George Smith en 1985, demostró que fragmentos de DNA foráneo podían ser insertados en el *gen III* del fago filamentososo M13 que codifica para la proteína PIII de la cápside, generando la PIII fusionada con un péptido foráneo. El gen que transcribe la proteína fusionada se incorporó al DNA del virión manteniendo su infectividad y expresó la proteína foránea en su cápside, siendo accesible para que un anticuerpo específico la reconociera. La fusión pudo ser detectada con un anticuerpo inmovilizado en placa de ELISA afín al péptido foráneo, las pruebas indicaron la presencia de fagos que expresaban el péptido de interés dando paso a la tecnología de despliegue de péptidos en fagos filamentosos. En 1989, Huse y colaboradores demostraron que las bibliotecas de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos proveían una ruta alternativa para la selección de anticuerpos monoclonales en fagos; poco después, la técnica de despliegue de anticuerpos en fago fue ampliamente utilizada (Barbas *et al.*, 2001). Esta técnica hace posible la selección de anticuerpos utilizando cualquier cDNA de animal inmunizado, siempre y cuando la secuencia que flanquean los genes que codifican para las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos sea conocida.

La diversificación molecular de las inmunoglobulinas en mamíferos se da por recombinación somática individual de cada cadena; por ejemplo, el fragmento variable de la cadena pesada en el humano esta unida por secuencias de DNA seleccionadas al azar de tres distintos segmentos de genes asignados como V_H (variables), D_H (diversidad) y J_H (unión), y las cadenas ligeras por dos segmentos de genes asignados V_L (variables) y J_L (unión). Cada gen se presenta en distintas combinaciones; en el humano, existen 200 genes del grupo V_H , 20 genes del grupo D_H , y 4 del grupo J_H para la cadena pesada, y para la cadena ligera existen 300 genes del grupo V_L y 4 del grupo J_L (Abbas *et al.*, 1997). Dada la recombinación, el número total de posibles combinaciones llega a ser de hasta 19 millones. La amplificación completa de las cadenas variables de humano requiere del uso de 33 cebadores y de 57 reacciones de PCR; en el ratón (principal animal utilizado para la generación de anticuerpos monoclonales por hibridoma), la recombinación somática que es muy similar a la del humano y se requieren de 43 cebadores y 21 reacciones de PCR (Barbas *et al.*, 2001).

En la gallina, el evento de recombinación somática es conocido como conversión génica (McCormack *et al.*, 1993), donde los loci tanto de la cadena pesada y la ligera consisten de una sola región de genes funcionales V y J, además de segmentos múltiples D en la cadena pesada que son transcritos usando mecanismos de recombinación convencionales

V(D)J. Los reordenamientos individuales en el gen se dan al introducirse bloques de secuencias de pseudogenes en la cadena variable ligera y pesada excluyendo los extremos; esto último, facilita la amplificación de los genes para la construcción de bibliotecas de anticuerpos (Reynaud *et al.*, 1987). La amplificación de las cadenas variables a partir de mRNA de gallina, requiere de únicamente 6 cebadores y de 4 reacciones de PCR (Barbas *et al.*, 2001). Otra ventaja en la generación de anticuerpos en gallinas es la producción y recuperación de IgY (IgG) en altas concentraciones de los huevos para los análisis de la respuesta inmune.

Aunque una de las características implicadas en la inmunogenicidad es la complejidad estructural y el tamaño del antígeno, en 1992, se reportó la presencia de anticuerpos monoclonales de ratón hechos con la técnica de hibridoma que reconocían iones solubles del metal mercurio con la inyección intraperitoneal de un complejo proteico, diseñado para permitir la máxima exposición del mercurio al sistema inmune del organismo (Wylie *et al.*, 1992). Estos anticuerpos fueron utilizados para la detección de muestras de suelos y de tejido de peces contaminados con mercurio (Carlson *et al.*, 1996; Schweitzer *et al.*, 1994). En 1992, Wylie y colaboradores, reportaron experimentos contra cromo realizados en ratón en los que no hubo respuesta inmune contra el metal. En 1994, Jun Yang y Katharine Merritt

identificaron anticuerpos que se unían al cromo-cobalto en 20 pacientes que poseían implantes compuestos con ese tipo de aleación.

En 1998, Blake y colaboradores diseñan un ensayo inmunoenzimático para detectar Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , y Ni^{2+} , cuando estos se encuentran acoplados con agentes quelantes. En 1999, Connie Westhoff y colaboradores demuestran que la presencia del aminoácido cisteína en una región hipervariable de anticuerpos monoclonales de ratón específicos contra mercurio, es crítica para la unión del metal al anticuerpo, al sustituir por mutagénesis la cisteína por serina y tirosina, evitó la reacción entre el mercurio y el anticuerpo.

Los anticuerpos que detectan metales son escasos y se encuentran pocas citas de trabajos en la literatura, los disponibles han utilizado al ratón como sistema generador de anticuerpos y como método de selección de anticuerpos monoclonales, la técnica del hibridoma (Kohler *et al.*, 1975). No hay referencias sobre trabajos relacionados con la producción de anticuerpos contra metales en gallina, además de no haber reportes sobre el uso de la técnica de despliegue de anticuerpos en fagos filamentosos para la generación de anticuerpos contra metales aunque, Lee y colaboradores en el año 2002, informan sobre la generación de un fago filamentosos que se une a cristales de ZnS, la unión no es mediada por anticuerpos, en vez utilizan un péptido afín a este metal.

HIPÓTESIS

1. Con la inyección de un complejo proteico que transporta y expone al cromo al sistema inmune en gallina (*Gallus domesticus*), es posible la generación de anticuerpos contra Cr^{3+} y Cr^{6+} .
2. Con la técnica de despliegue de anticuerpos en fagos filamentosos, se podrán seleccionar fragmentos variables de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) monoclonales afines al Cr^{3+} y Cr^{6+} , utilizando a la cisteína como presentador del metal.

OBJETIVO PRINCIPAL

Generar fragmentos variables de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) monoclonales de gallina afines a Cr^{3+} y a Cr^{6+} .

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Generar anticuerpos en gallina contra Cr^{3+} y Cr^{6+} , unidos a un complejo proteico.
2. Seleccionar scFv afines al Cr^{3+} y Cr^{6+} con el uso de la técnica de despliegue de anticuerpos en fagos filamentosos.
3. Expresar y seleccionar scFv monoclonales específicos y sensibles a Cr^{3+} y Cr^{6+} .
4. Detectar Cr^{3+} y Cr^{6+} a través de un ensayo inmunoenzimático (ELISA).

MATERIAL Y MÉTODO:

1. Preparación del antígeno.

1.1 Unión de glutatión con KLH (keyhole limpet hemocyanine).

En un tubo de reacción con agitador se adicionaron 11 mg de glutatión (Glu-Cys-Gly) en 1.5 mL de Na_2CO_3 100 mM y 5 mg de KLH disuelto en 0.5 mL de PBS (amortiguador de fosfatos salino). Se agregó 1 mL de glutaraldehído al 2% por goteo y después de 45 minutos se bloquearon los sitios activos del glutaraldehído con 0.2 mL de glicina 1 M (Harlow *et al.*, 1999).

1.2 Unión de KLH-Glutatión con Cr^{3+} y Cr^{6+} .

A los 2 mL de la reacción se adicionó DTT (ditiotreitól) 1 mM; a 1 mL se le adicionó 1 mL de CrCl_3 1 M y al mL restante se le adicionó 1 mL de CrO_3 1 M. Ambas reacciones se transfirieron por separado a filtros centricón de 30 kDa (Amicon), donde se lavó tres veces por separado cada reacción con 1 mL de PBS. Se determinó la cantidad de Cr^{3+} y Cr^{6+} unido al complejo proteico por espectrofotometría de absorción atómica, analizado en el laboratorio SALIP (Laboratorio Industrial y de Control, S. de RL. Ensenada, B.C.).

Este complejo proteico se utilizó en la 1^{era}, 2^{da} y 3^{era} inmunización, inyectando el acarreador de Cr^{3+} en una gallina y el de Cr^{6+} en otra (tabla I).

1.3 Unión de glutatión y cisteína con Cr^{3+} y Cr^{6+} .

Para la 4^{ta} y 5^{ta} inmunización (tabla I) se utilizó glutatión+Cr y cisteína+Cr, respectivamente. Se unió el cromo con glutatión 1 M, disuelto en Na_2CO_3 100 mM con DTT 1 mM; por cada 500 μL se adicionó CrCl_3 y CrO_3 1 M por separado. Se unió el cromo con cisteína 1 M disuelta en 1 mL de Na_2CO_3 100 mM con DTT 1mM; por cada 500 μL se adicionó CrCl_3 y CrO_3 1 M por separado. Ambos antígenos se prepararon antes de cada inmunización.

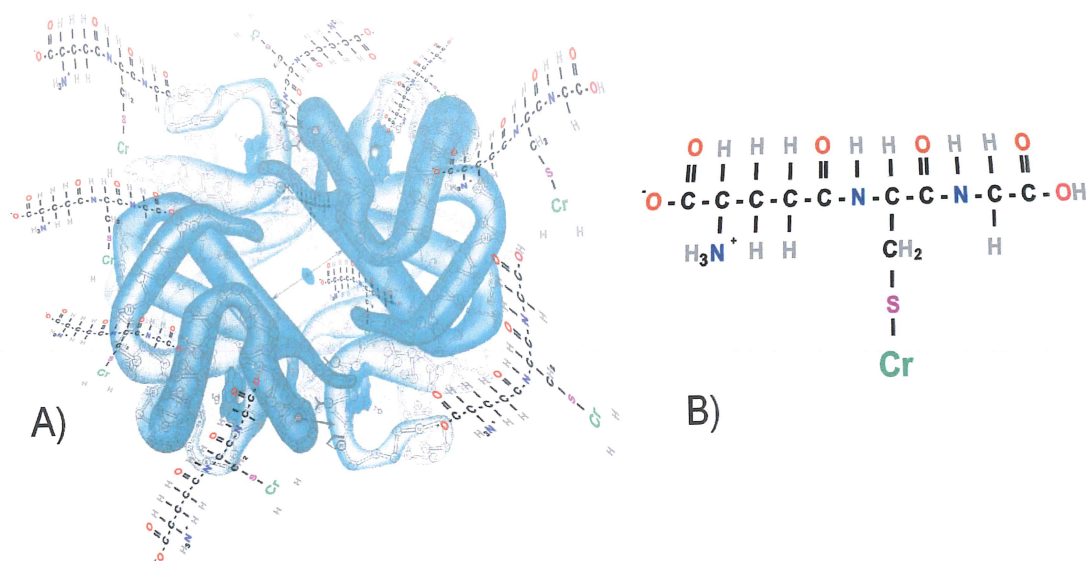


Figura 1. A) Representación esquemática de KLH (proteína acarreadora) transportando al glutatión+Cr (figura B, unida al KLH). B) Representación esquemática de Cr unido a glutatión (Yang *et al.*, 1994).

2. Inmunizaciones.

Se inmunizaron dos gallinas Leghorn blancas en los músculos pectorales, los tiempos y cantidad de antígeno se muestran en la tabla I. Una se inmunizó con acarreadores que exponen al Cr^{3+} y a la otra con acarreadores que exponen al Cr^{6+} . Por cada 500 μL de solución con antígeno se inyectaron 250 μL en el músculo izquierdo y 250 μL en el músculo derecho.

Tabla I: Tabla de inmunizaciones en gallina Leghorn blanca.

Inmunizaciones	día	Antígeno	Adyuvante	Sol. Salina
1 ^{era}	0	~20 μg de KLH+Glu+Cr	250 μL Adyuvante completo de Freud	Volumen final a 500 μL .
2 ^{da}	12	~20 μg de KLH+Glu+Cr	250 μL Adyuvante incompleto de Freud	Volumen final a 500 μL .
3 ^{era}	20	~20 μg de KLH+Glu+Cr	—	Volumen final a 500 μL .
4 ^{ta}	30	10 μg de glutatión+Cr	—	Volumen final a 500 μL .
5 ^{ta}	40	10 μg de cisteína+Cr	—	Volumen final a 500 μL .

3. Detección de anticuerpos en suero por ELISA.

3.1 Extracción de suero de gallina.

Se extrajo sangre de gallina antes de las inmunizaciones (suero preinmune) y cinco días después de cada inmunización. Mediante la inducción de la vasodilatación en la cresta de la gallina con un poco de xileno, se cortó la punta de la cresta con tijeras para disección, recuperando aproximadamente 3 mL de sangre por sangrado. Se dejó la sangre a

temperatura ambiente por 15 minutos hasta la formación de un coágulo, que se separó de las paredes del tubo utilizando una pipeta Pasteur. Se almacenó el tubo toda la noche a 4°C; al siguiente día se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos para recuperar el sobrenadante (suero).

3.2 ELISA de anticuerpos en suero.

Se realizaron ensayos inmunoenzimáticos cinco días después de cada inmunización. Se adicionó por triplicado en pozos de placas para ELISA (costar EIA/RIA) 50 μ L de cisteína, metionina y glutatión 1 M por separado, disueltos en 1 mL de Na_2CO_3 100 mM, con DTT 1 mM. Se incubó la placa toda la noche a 4°C. Al siguiente día se adicionó por pozo 50 μ L de CrCl_3 1 M y de CrO_3 1 M por separado, excepto a los controles (cisteína, metionina, glutatión y BSA) cada uno en triplicado. Se incubó la placa 1 hora a 37°C y se bloquearon los sitios inespecíficos adicionando 100 μ L de BSA al 3% en PBS por 1 hora a 37°C. Se lavó la placa 3 veces con PBST y se agregó a cada pozo 50 μ L de suero de gallina preinmune e inmune por separado, en diluciones 1:1 y 1:10 en PBS. Se incubó la placa toda la noche a 4°C. Al siguiente día se lavó la placa tres veces con 200 μ L de PBST y se adicionaron 50 μ L de anticuerpos anti-gallina IgG conjugados con fosfatasa alcalina (Sigma) diluidos 1:2000. Se incubó la placa durante 1 hora a 37°C. Se lavó la placa 3 veces con PBST, se adicionaron 50 μ L de solución de substrato para fosfatasa (ver apéndice) por pozo y se registraron las

unidades de absorbencia a 405 nm (Harlow *et al.*, 1999). En total se hicieron cinco ensayos de ELISA, cada uno después de la obtención de suero inmune.

4. Purificación de RNA total y síntesis de mRNA a cDNA.

4.1 Purificación de RNA total a partir de bazo de gallina.

Siete días después de la última inmunización, se sacrificó a la gallina que se inyectó con el antígeno que transportaba al Cr^{3+} para extraer el bazo que se localiza debajo de las costillas izquierdas, unido por tejido conectivo con el estómago y el colon. Se aisló el RNA total según el protocolo del proveedor (RNA stat, Tel-Test) a partir de 100 mg de tejido del bazo.

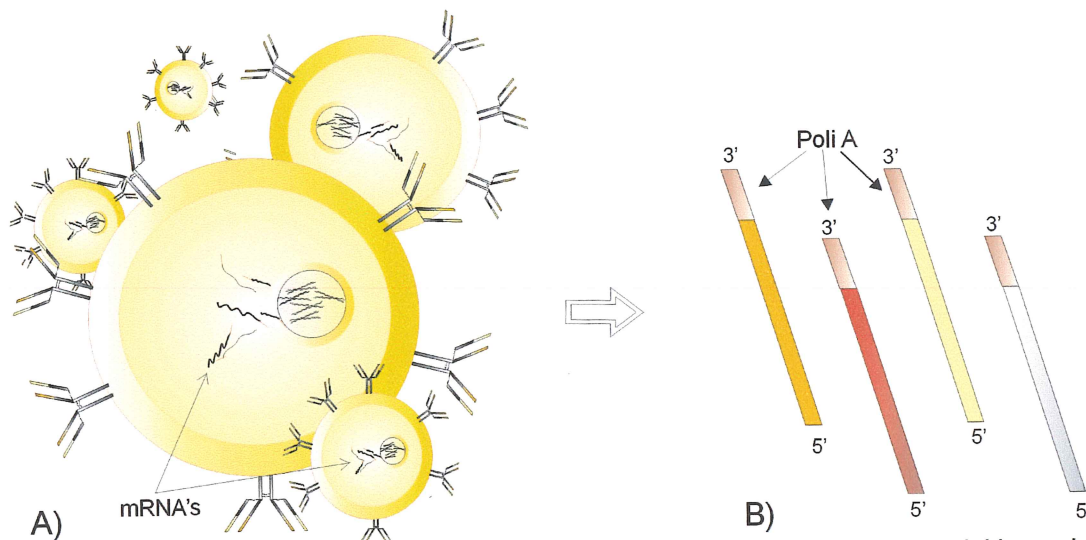


Figura 2. Proceso de recuperación de los mRNA's (RNA mensajeros) extraídos del bazo de la gallina, principal órgano en la maduración de linfocitos B productores de anticuerpos. **A)** Representación esquemática de un linfocito B localizado en el bazo de la gallina produciendo mRNA's que codifican para anticuerpos. **B)** Representación esquemática de mRNA's extraídos y purificados de bazo de gallina. Los mRNA's tienen una secuencia repetitiva de adeninas, conocida como poli A, importante para la unión con cebadores en la transformación a cDNA.

4.2 Reacción RT-PCR.

Se utilizaron 20 μg de RNA total aislado y purificado para llevar cabo la síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir de mRNA (RNA mensajero) (fig. 3), con el uso del kit de transcriptasa reversa (Superscript First Strand System, BRL).

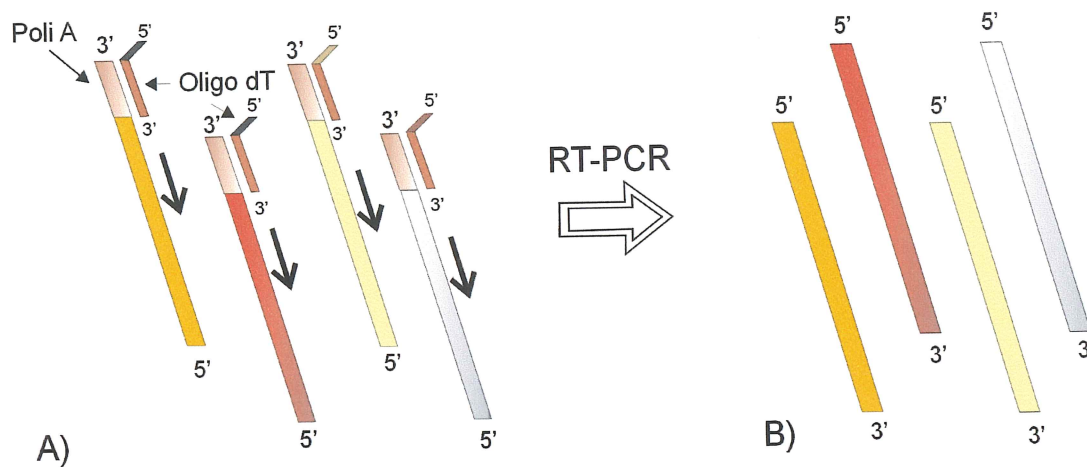


Figura 3. Proceso de síntesis de mRNA a cDNA con el uso de la enzima transcriptasa reversa que polimeriza una molécula de cDNA con los cebadores oligo dT, utilizando como molde mRNA. **A)** Representación esquemática de mRNA's que tienen unidos cebadores oligo dT en la región poli A. **B)** Representación esquemática de cDNA como producto final de la reacción RT-PCR.

5. Construcción de la biblioteca de DNA de scFv.

Se realizaron dos bibliotecas de DNA de scFv. El método de la construcción del DNA de scFv de la primer biblioteca se omitió debido a que los scFv seleccionados no fueron afines al Cr^{3+} (fig. 21), por lo tanto únicamente se muestra el método que se utilizó para la construcción de la segunda biblioteca de DNA de scFv.

5.1 PCR de las cadenas variables ligeras (V_L) y pesadas (V_H).

Se amplificaron los genes que codifican para la cadena variable ligera y variable pesada de los anticuerpos (fig. 4) con la técnica de PCR, utilizando como molde 1 μL de cDNA. Se utilizaron los cebadores CSCVHo-F en sentido y CSCG-B antisentido para la V_H y los cebadores CSCVK en sentido y CKJo-B antisentido para la V_L (Barbas *et al.*, 2001) (tabla II; Fig. 5A). Se programaron 30 ciclos en el termociclador utilizado los siguientes tiempos: 94°C 15 segundos, 56°C 15 segundos, y 72°C 90 segundos (Barbas *et al.*, 2001). Se realizó una electroforesis de las muestras de PCR en gel de agarosa al 2% (Sambrook *et al.*, 2001). Las bandas de DNA identificadas se cortaron con una navaja estéril y se purificaron del gel de agarosa utilizando filtros Ultrafree MC (Millipore). Los fragmentos amplificados para las V_H deben tener un tamaño de ~400 pb, y las V_L un tamaño de ~350 pb.

Tabla II: Cebadores utilizados para la amplificación del DNA que codifica para las cadenas V_L y las V_H de los anticuerpos de gallina.

Cebadores	Secuencia
CSCVHo-F	5' GGT CAG TCC TCT AGA TCT TCC GCC GTG ACG TTG GAC GAG 3'
CSCG-B	5' CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GGA GAC GAT GAC TTC GGT CC 3'
CSCVK	5' GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG CCG TCC TCG GTG TC 3'
CKJo-B	5' GGA AGA TCT AGA GGA CTG ACC TAG GAC GGT CAG G 3'

5.2 PCR de traslape (DNA de scFv).

Se traslaparon las V_L con las V_H (fig. 5C) con la técnica de PCR, utilizando como molde 200 ng de cada cadena de DNA purificada del gel de agarosa. Se utilizaron los cebadores CSC-F en sentido y CSC-B antisentido (Barbas *et al.*, 2001) (tabla III, fig. 5B). Se realizó una electroforesis de las muestras de PCR en gel de agarosa al 1.2% (Sambrook *et al.*, 2001), donde el fragmento amplificado de DNA debe tener un tamaño aproximado de ~800 pb (fig. 5C). La banda de DNA identificada se cortó con una navaja estéril y se purificó del gel de agarosa utilizando filtros Ultrafree MC (Millipore).

Tabla III: Cebadores utilizados para unir el DNA amplificado de las cadenas V_L con las V_H de los anticuerpos de gallina.

Cebadores	Secuencia
CSC-F	5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG 3'
CSC-B	5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GG 3'

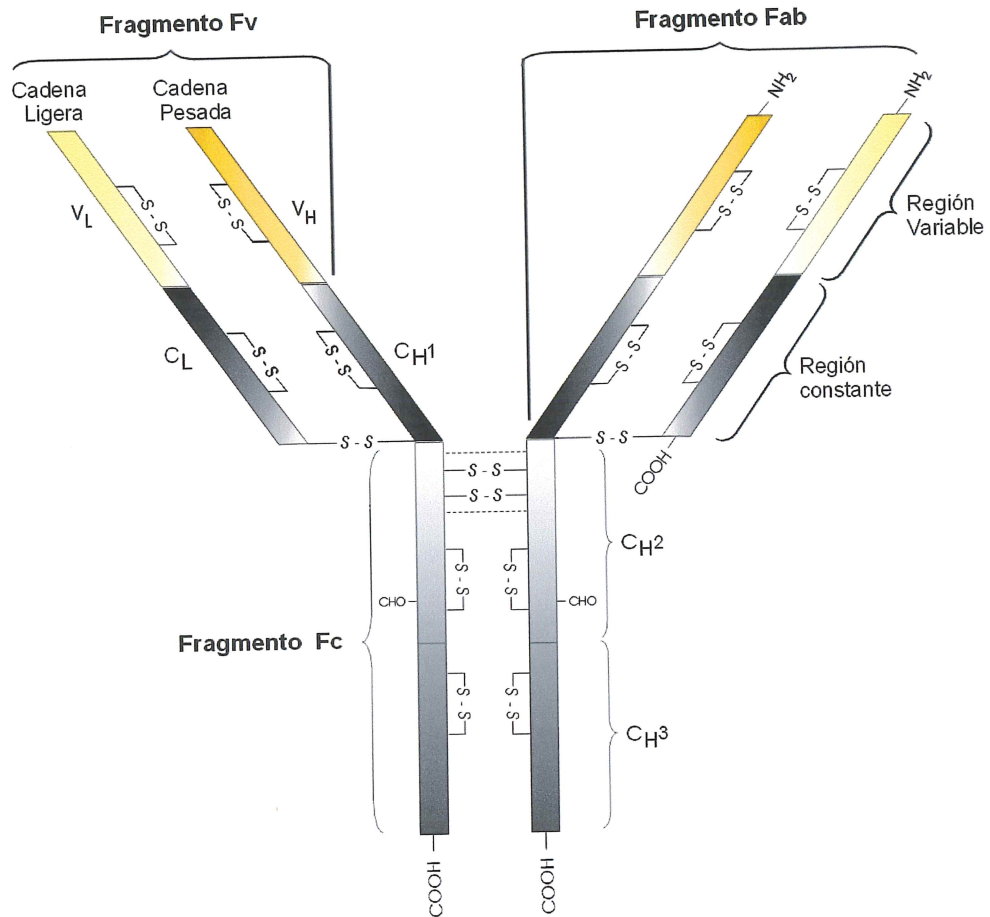


Figura 4. Representación general de un anticuerpo IgG. El fragmento variable (Fv) consiste en la cadena variable ligera (V_L) y la cadena variable pesada (V_H). El Fv es la región que se va a amplificar mediante PCR (fig. 5) para construir la biblioteca de fragmentos variables de anticuerpos de cadena sencilla (scFv).

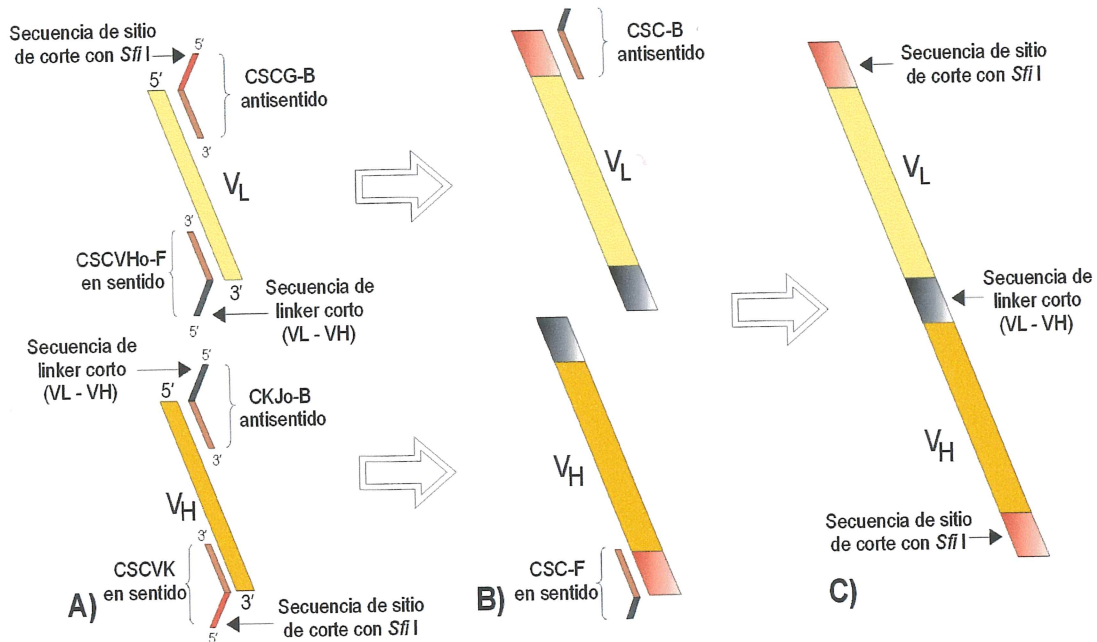


Figura 5. Proceso de amplificación de las V_L y las V_H a partir de cDNA. **A)** Representación esquemática de la unión de cebadores específicos para la amplificación de las V_L y las V_H a partir de cDNA, que aportan la secuencia de corte con *Sfi* I, y la secuencia de un péptido de unión corto (7 aminoácidos). **B)** Representación esquemática del producto del PCR amplificado de las V_L y las V_H , con la unión de cebadores específicos requeridos para el traslape de las V_L y las V_H . **C)** Representación esquemática del producto de DNA de traslape que codifica para el fragmento variable de cadena sencilla (scFv).

6. Digestión y purificación del DNA de scFv y del vector pComb3X.

6.1 Digestión y purificación del DNA de scFv.

Se cortaron los extremos del DNA de scFv con el uso de la enzima de restricción *Sfi* I (Gibco, BRL). La digestión se llevó a cabo utilizando 36 unidades de *Sfi* I por cada μg de DNA a 50°C por 12 horas. Los productos de las digestión se identificaron en gel de agarosa al 1.2 %. Se cortaron con una navaja estéril del gel y se purificaron con filtros Ultrafree MC (Millipore) según protocolo de proveedor.

6.2 Digestión y purificación de pComb3X.

Se cortaron los extremos de vector pComb3X *amp^r* (Rader y Barbas., 1997) (fig. 6A), con el uso de la enzima de restricción *Sfi* I (Gibco, BRL). La digestión se llevó a cabo utilizando 12 unidades de *Sfi* I por μg de DNA a 50°C por 12 horas. Los productos de las digestión fueron identificados y purificados del gel de agarosa al 1.2 % como se describe en el paso 6.1.

7. Ligación del DNA de scFv en el vector de expresión pComb3X.

Antes de la creación de la biblioteca, se hizo una prueba de ligación, para verificar en gel de agarosa la unión de los fragmentos. Se ligó $1.4 \mu\text{g}$ de pComb3X con $0.7 \mu\text{g}$ de DNA de scFv y 10 U de enzima ligasa (Gibco, BRL), la mitad del producto se cortó con la enzima *Sfi* I, y la otra se dejó como control; ambas se corrieron en gel de agarosa al 1.2 %.

La biblioteca se creó al ligar el DNA de scFv con el vector pComb3X (fig. 6B) utilizando 1.4 μg de vector y 0.7 μg de DNA de scFv en un tubo de reacción con 10 U de enzima ligasa por μg de DNA (Ausbel *et al.*, 1997).

El DNA ligado se purificó con la técnica de precipitación con etanol-acetato de Na 3 M, pH 5.2 (Sambrook *et al.*, 2001) y se resuspendió en 20 μL de H_2O libre de nucleasas.

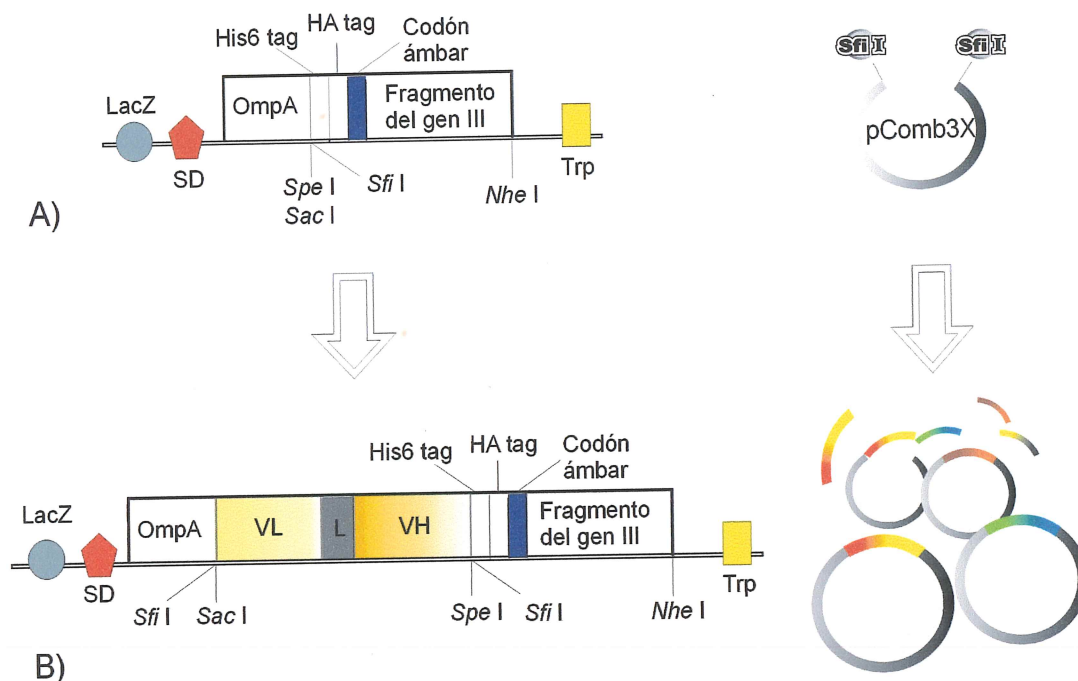


Figura 6. Proceso de digestión y ligación de la biblioteca de DNA de scFv en el vector pComb3X. **A)** Representación esquemática del fragmento del vector pComb3X donde se lleva a cabo el corte con la enzima de restricción *Sfi I* para la introducción del scFv. **B)** Representación esquemática de la ligación del DNA de scFv en el vector pComb3X, en una región donde el DNA de scFv se alinea junto al DNA que codifica para la región de la Proteína III (proteína de la cápside del fago filamentoso, AA 230-406). El vector contiene la región *ompA* que se codifica junto con el scFv, que tiene como función la de transportarlo hacia el periplasma; contiene una secuencia de 6 histidinas que le sirve para purificación en columna de Niquel; contiene el epítipo HA (hemaglutinina) que sirve para detección con un anticuerpo anti-HA; contiene un codón ámbar que sirve como codón de terminación cuando se utilizan células no supresoras, y contiene un fragmento del gen que codifica para la Proteína III del fago M13 que se va a expresar junto con el scFv, con la función de anclaje para que los fagémidos lo transporten en su cápside (figura 7).

8. Producción de fagémidos expresando el fragmento de anticuerpo de cadena sencilla (scFv).

El producto total ligado (fig. 7A) se utilizó para transformar a células *Escherichia coli* XL1-Blue *tet^r* (Stratagene), competentes con CaCl_2 (Sambrook *et al.*, 2001) (fig. 7B). Las células transformadas se transfirieron a medio SOC, se plaquearon 100 μL , 10 μL y 1 μL en cajas petri con LB *amp⁵⁰* y se tituló el número de colonias. El cultivo restante se llevó a un volumen de 10 mL de SB con ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para seleccionar a las células transformadas y se les adicionó 2 mL de fago ayudador VCSM13 *kan^r* (Stratagene) (5×10^{11} fagos/mL), para la expresión de fagémidos en el sobrenadante (fig. 7C). El cultivo se llevó a un volumen de 100 mL de SB con kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se dejó toda la noche en crecimiento y al día siguiente se removieron las bacterias para transferir el sobrenadante a tubos cónicos estériles. Se precipitaron los fagémidos al añadir al sobrenadante 1:5 volúmenes de 20% PEG / 2.5 M NaCl, se incubó durante 30 minutos en hielo y se centrifugó por 30 minutos a 9000 rpm a 4°C. El pellet de fagémidos se resuspendió en 2 mL (volumen final) de BSA al 1% en PBS.

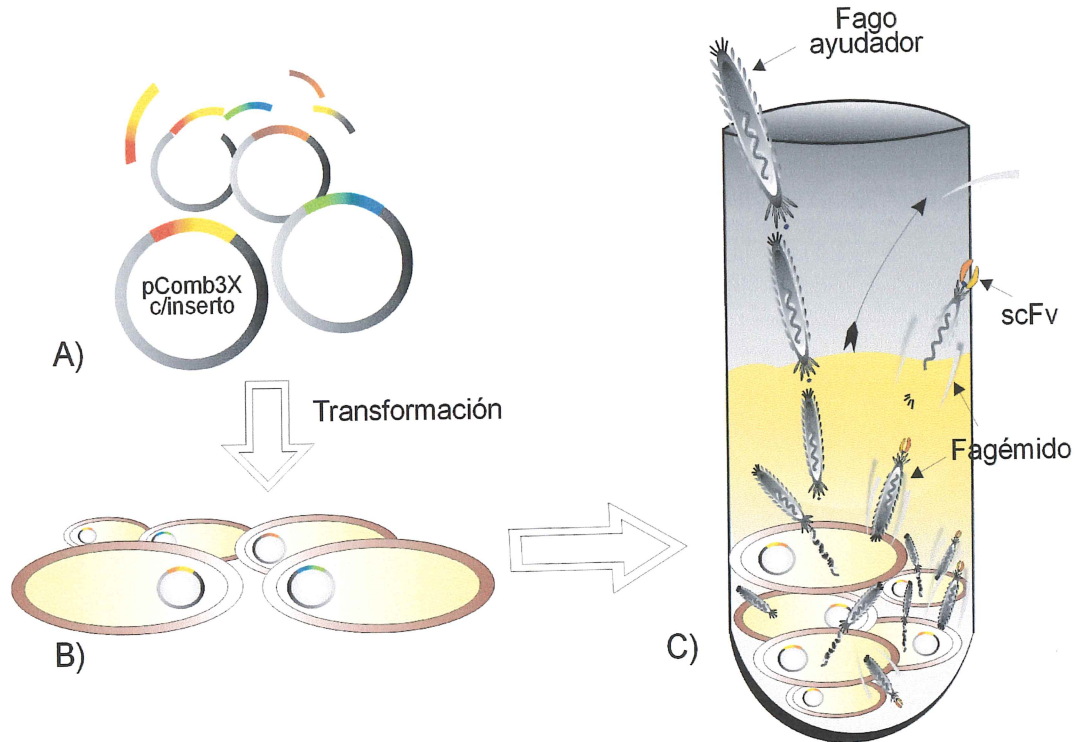


Figura 7. Proceso de selección para obtener una biblioteca de fragmentos variables de anticuerpos de cadena sencilla (scFv). Dado que el vector de expresión pComb3X contiene únicamente el origen de replicación del fago filamentoso F1, y carece de todos los genes requeridos para la replicación y ensamblaje de partículas de fago, el fago ayudador provee proteínas al citoplasma de la bacteria necesarias para encapsular y ensamblar al vector pComb3X, para que éste se comporte como un fago filamentoso que se expresa extracelularmente, es infeccioso y además transporta al scFv en su cápside; a este vector se le conoce como fagémido. **A)** Representación esquemática de la biblioteca de DNA de scFv's que se ligó en el vector de expresión pComb3X. **B)** Representación esquemática de la transformación de *E. coli* XL1-Blue *tet^r*, que son células supresoras, es decir que no reconocen el codón ámbar del vector pComb3X, lo que implica la producción del scFv con el fragmento de la Proteína III del fago M13 (fig. 6). El vector pComb3X le confiere resistencia a ampicilina a las células. **C)** Representación esquemática del proceso de infección con fago ayudador VCSM13 que les confiere a las células resistencia a kanamicina, además de proveer las proteínas necesarias para el ensamblaje y producción del fagémido que transporta al scFv en su cápside.

9. Rondas de selección con la biblioteca de scFv policlonales transportados en fagémidos.

Se adicionó en tres pozos de placas de ELISA (costar EIA/RIA) 50 μ L de cisteína 1 M disuelta en 1 mL de Na_2CO_3 100 mM con DTT 1 mM y CrCl_3 1 M. Se incubó la placa toda la noche a 4°C. Al siguiente día se removió la solución y se bloquearon los sitios inespecíficos con 150 μ L de BSA al 3% en PBS. Se agregaron 25 μ L de fagémidos preparados ese mismo día y se incubó la placa por 2 horas a 37°C. Se desecharon los fagémidos inespecíficos lavando cinco veces con 150 μ L de PBST, en la primer ronda de selección se lavó cinco veces cada pozo, en la 2da, 3era y 4ta ronda de selección se lavó diez veces cada pozo. Se adicionó 50 μ L de solución de elusión (ver apéndice) por pozo para la liberación de los fagémidos pegados al antígeno en la placa (fig. 8A). La solución con fagémidos eluidos se neutralizó con 9 μ L de tris base 2 M, y se transfirió directamente a un cultivo de 3 mL de *E. coli* XL1-B competentes vírgenes cultivadas en SB dos horas antes de la infección (fig. 8B). Se agregó ampicilina (50 μ g/mL) para seleccionar a las células infectadas con el fagémido y se infectó con 2 mL de fago ayudador (5×10^{11} de fagos/mL) (fig. 8C). El cultivo se llevó a un volumen de 100 mL de SB con kanamicina (50 μ g/mL), ampicilina (50 μ g/mL) y tetraciclina (5 μ g/mL). Se dejó toda la noche en crecimiento (12 horas) y se transfirió el cultivo a tubos cónicos estériles para precipitar

las bacterias; el pellet bacteriano se guardó a -80°C agregando 1:5 volúmenes de glicerol para posterior extracción de DNA de fagémidos. Se precipitaron los fagémidos del sobrenadante añadiendo 1:5 volúmenes de PEG 20%, NaCl 2.5 M en H_2O y se incubó durante 30 minutos en hielo. Se centrifugó por 30 minutos a 9000 rpm a 4°C y se resuspendió el pellet de fagémidos en 2 mL (volumen final) de BSA al 1% en PBS.

Los fagémidos recuperados se utilizaron directamente para la siguiente ronda de selección (fig. 8D), repitiendo el proceso de selección y reamplificación de fagémidos (fig. 8). Solo los fagémidos preparados el mismo día pueden utilizarse, si no están frescos se deben de reamplificar primero.

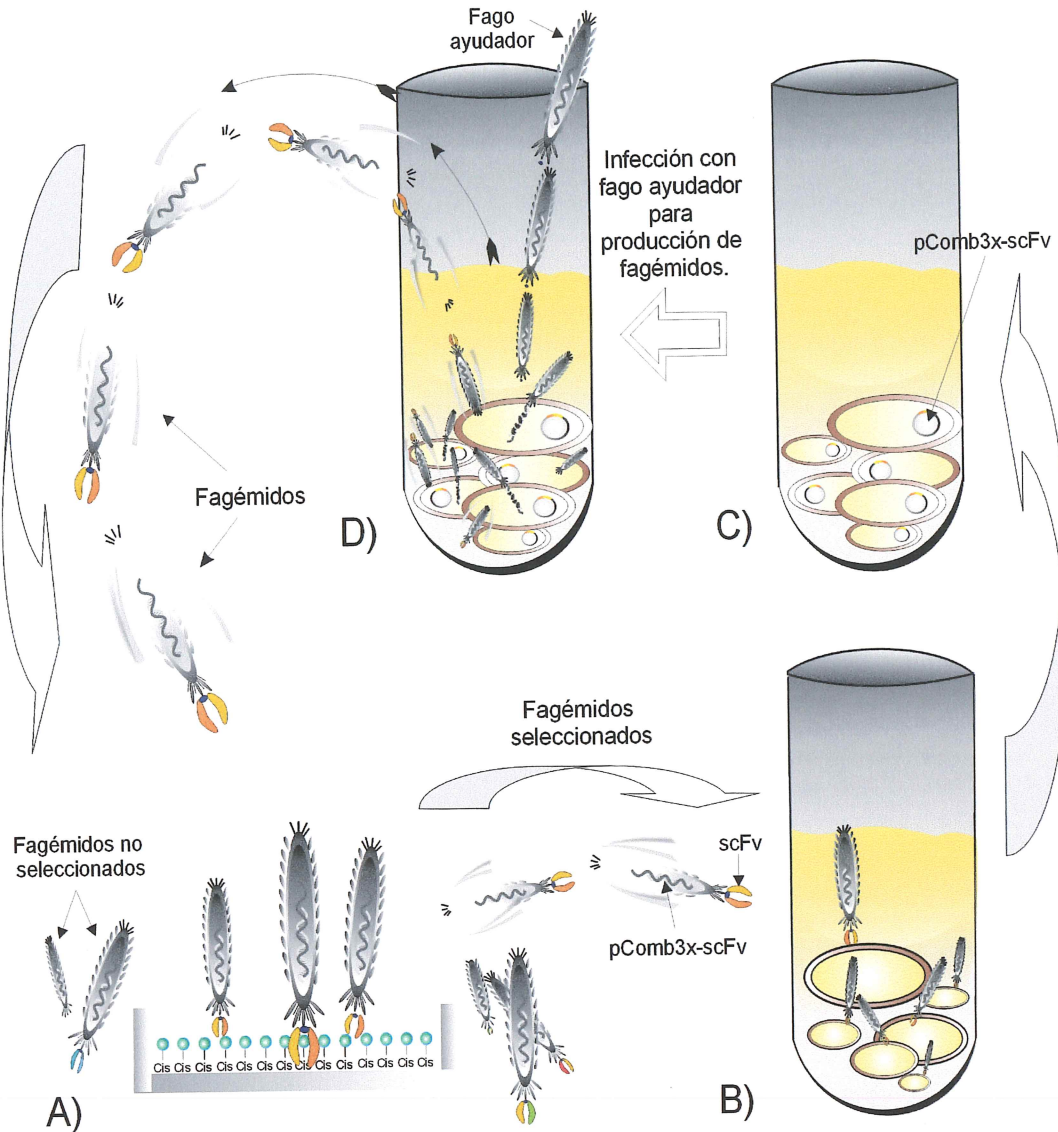


Figura 8: Proceso de las rondas de selección para la selección de los fagémidos que expresan un scFv afín a la cisteína+Cr³⁺. **A)** Representación esquemática de la selección en placa de ELISA del fagémido con el anticuerpo de interés que reconoce a la cisteína + Cr³⁺ **B)** Representación esquemática del proceso de infección a células *E. coli* XL1-B vírgenes con el fagémido seleccionado afín a la cisteína + Cr³⁺. **C)** Representación esquemática de la función del fagémido en las células *E. coli* XL1-B, que las transforma con el vector de expresión pComb3X-scFv y que por lo tanto les confiere resistencia a ampicilina. **D)** Representación esquemática del proceso de infección del fago ayudador que le provee resistencia a kanamicina a las células además de proveer las proteínas necesarias para la producción del fagémido.

10. Detección del fagémido de interés con anticuerpos anti-M13 por ELISA y en resina cargada con Cr³⁺.

10.1 Detección del fagémido de interés por ELISA.

Se adicionó por triplicado en pozos de placas de ELISA (costar EIA/RIA) 50 μL de cisteína y metionina 0.1 M por separado, disueltos en 1 mL de Na_2CO_3 100 mM con DTT 1 mM. Se incubó la placa toda la noche a 4°C. Al siguiente día se adicionó a los pozos 50 μL de CrCl_3 0.1 M, excepto a controles (cisteína, metionina, y BSA) cada uno en triplicado. Se incubó la placa 1 hora a 37°C y se bloquearon los sitios inespecíficos con 150 μL de BSA al 3% en PBS. Se lavó la placa dos veces con H_2O y se adicionaron 25 μL de fagémidos de todas las rondas de selección por separado. Se incubó 2 horas a 37°C y posteriormente se lavó diez veces con 200 μL de H_2O . Para detectar los fagémidos que se unieron al antígeno se adicionaron 50 μL de anticuerpos anti-M13 conjugados con peroxidasa (Amersham Pharmacia Biotech) diluidos 1:5000 en BSA al 1% en PBS. Se dejó la placa 1 hora a 37°C y se lavó diez veces con 200 μL de H_2O . Se adicionaron 50 μL de solución de substrato para peroxidasa (ver apéndice) y se registraron las unidades de absorbencia a 405 nm.

10.2 Detección del fagémido de interés de la segunda biblioteca en resina cargada con Cr³⁺.

En tubos eppendorff bloqueados con 200 μ L de BSA al 3% se adicionaron 20 mg de resina afin a metales (Amersham Pharmacia Biotech), cargada con una solución de CrCl₃ 0.1 M. El exceso de Cr³⁺ se eluyó con 200 μ L de H₂O en tres ocasiones. Al tubo con resina se le adicionó 25 μ L de fagémidos de las rondas de selección y se incubó 1 hora a 37°C. Para remover los fagémidos no afines al Cr³⁺ se lavó la resina cinco veces con 200 μ L de amortiguador de lavado (ver apéndice), se agregaron 50 μ L de anticuerpos anti-M13 conjugados con peroxidasa diluidos 1:5000. Se incubó la placa 1 hora a 37°C y se lavó tres veces con 200 μ L de amortiguador de lavado. Se adicionaron 50 μ L de solución de substrato para peroxidasa (ver apéndice) y se registraron las unidades de absorbencia a 405 nm.

11. Determinación de especificidad de fagémidos de la tercer ronda de selección en presencia de distintos metales.

11.1 Especificidad de fagémidos por ELISA.

Se detectó la especificidad de los fagémidos de la tercer ronda de selección utilizando el método descrito en el paso #10.1. Se unieron a la cisteína por separado, los siguientes metales: 50 μ L de CrO_3 , HgCl_2 , PbNO_3 , MgCl_2 , CoCl , NiCl_2 y CrCl_3 , 0.1 M en triplicado.

11.2 Especificidad de fagémidos utilizando resina unida a distintos metales.

Se detectó la especificidad de los fagémidos de la tercer ronda de selección con resina afín a metales, utilizando el método descrito en el paso #10.2. Se unieron a la resina por separado, los siguientes metales: 50 μ L de CrO_3 , HgCl_2 , PbNO_3 , MgCl_2 , CoCl , NiCl_2 y CrCl_3 , 0.1 M en triplicado. Como control se utilizaron fagémidos sin selección de la primer biblioteca de DNA de scFv.

12. Expresión de scFv monoclonales en *E. coli* TOP10F'.

12.1 Extracción de pComb3X-scFv de la tercer ronda de selección.

Se purificó el plásmido pComb3X-scFv con el método mini-prep (Sambrook *et al.*, 2001), del pellet bacteriano recuperado y almacenado en glicerol a -80°C de la tercer ronda de selección.

12.2 Electroporación en *E. coli* TOP10F' con pComb3X-scFv.

Se electroporaron 100 ng del plásmido purificado en 100 μL de células *E. coli* TOP10F' (Invitrogene) electrocompetentes a 2.5 kV, 25 μF , 200 Ω , y $\tau = 4.6$ msec.

12.3 Expresión de scFv soluble.

Las células transformadas se diluyeron 1:10, 1:100 y 1:1000 en medio SOC precalentado a 37°C , se plaquearon 100 μL de cada dilución en cajas Petri con LB *amp*⁵⁰. Se escogieron 20 colonias al azar, cada una se transfirió por separado a 10 mL de medio SB precalentado a 37°C con ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se dejó el cultivo por 8 horas a 37°C y a 250 rpm. Se indujo la expresión del fragmento scFv con IPTG (Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido) 3 mM y se dejó creciendo por 20 horas a 37°C a 250 rpm. Se centrifugó a 2800 g por 15 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante donde se encuentran los scFv a un tubo estéril. El pellet se almacenó a -80°C en 1:5 volúmenes de glicerol al 100%.

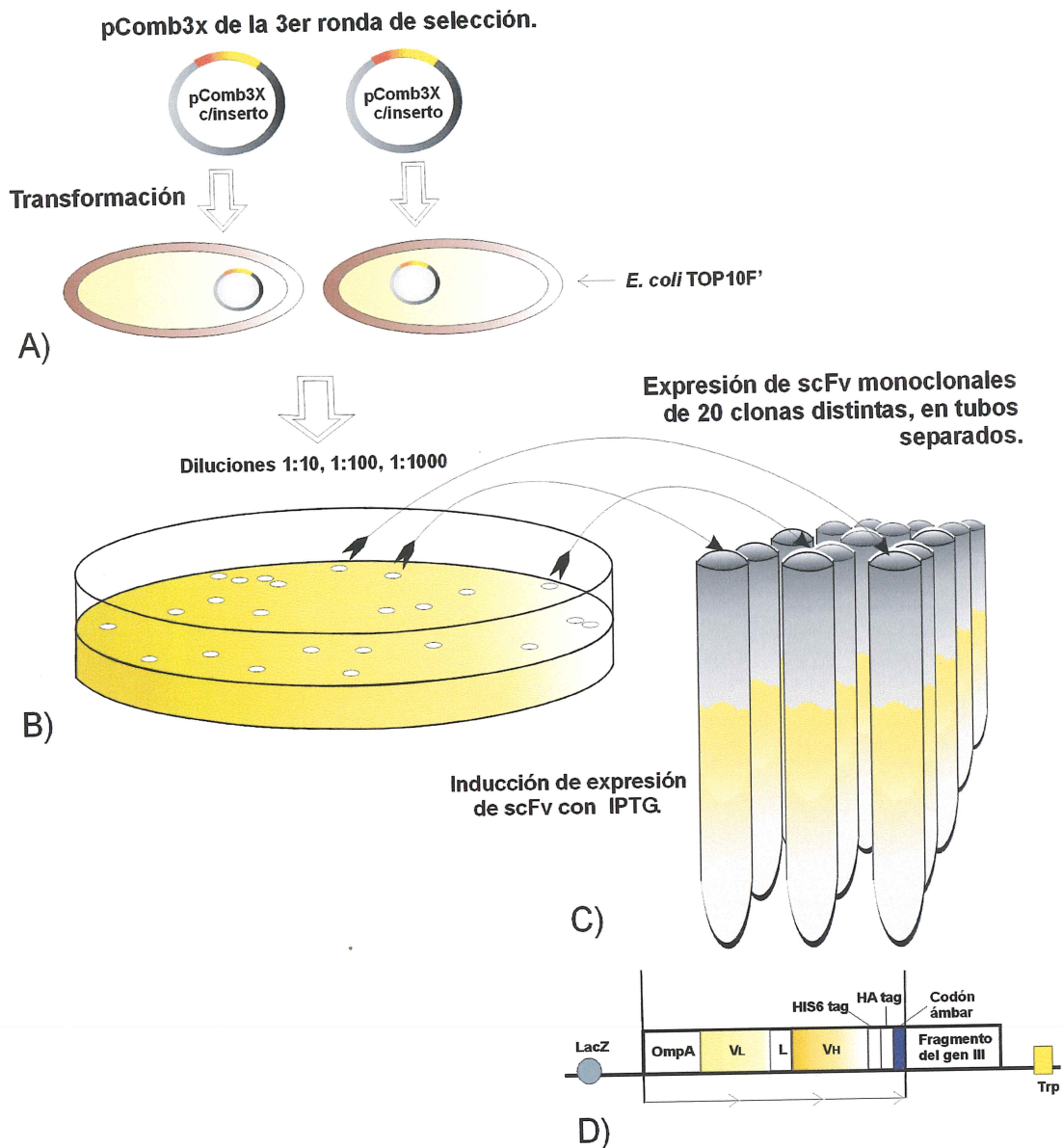


Figura 9. Producción del fragmento variable de cadena sencilla (scFv) monoclonal, expresado sin la Proteína III del fago filamentoso M13 en *E. coli* TOP10F', cepa no supresora, que reconoce el codón ámbar como codón de terminación. **A)** Representación esquemática del proceso de transformación del vector pComb3X-scFv de la tercer ronda de selección en la cepa de *E. coli* TOP10F'. **B)** Representación esquemática del cultivo de clonas individuales *E. coli* TOP10F' en placas LB *amp*⁵⁰. **C)** Representación esquemática de la transferencia de cada clona que expresa un scFv monoclonal a tubos con medio SB y ampicilina para la posterior inducción de expresión del scFv con IPTG. **D)** Representación esquemática del fragmento de pComb3X-scFv que se expresa en la cepa *E. coli* TOP10F' al reconocer el codón ámbar como codón de terminación.

12.4 Purificación del scFv del sobrenadante con Ni-NTA.

Se purificaron los scFv's añadiendo directamente a 10 mL del sobrenadante 250 μ L de Ni-NTA superflow (Qiagen) en agitación suave a 4°C por 2 horas. Se centrifugó por 3 minutos a 2800 g para precipitar el Ni-NTA. Se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces el Ni-NTA con 500 μ L de amortiguador de lavado (ver apéndice). Se eluyó el scFv unido al Ni-NTA adicionando en tres ocasiones 133 μ L de amortiguador de elusión (ver apéndice). El producto recuperado se transfirió a tubos eppendorff estériles y se almacenó a -20°C.

Se cuantificó indirectamente la concentración de scFv's espectrofotométricamente a 280 nm, donde 1 Unidad de Absorbencia = 0.739 mg de IgG (Hudson *et al.*, 1980).

13. Determinación de afinidad y especificidad de scFv's monoclonales.

13.1 ELISA de afinidad de scFv's monoclonales.

Los scFv de las 20 clonas inducidas se utilizaron para determinar la selección de la clona mas afín hacia cis+Cr³⁺ utilizando la técnica de ELISA. Se adicionó por triplicado en los pozos de la placa (Costar EIA/RIA) 25 μ L de cisteína y metionina 0.01 M por separado, disueltos en Na₂CO₃ 100 mM con DTT 1 mM y 25 μ L de CrCl₃ 0.01 M, excepto a controles (cisteína, metionina y BSA) en triplicado. Se incubó la placa toda la noche a 4°C. Al siguiente día se quitó la solución y se bloquearon los sitios inespecíficos con 150 μ L de BSA al 3 % en PBS. Se lavó la placa dos veces con PBST y se adicionaron 25 μ L de scFv's purificados de cada clona. Se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó la placa cinco veces con 200 μ L de PBST y se adicionaron 50 μ L de anticuerpos anti-HA conjugados con peroxidasa (Roche Molecular Biochemicals) diluidos 1:500 en BSA al 1% en PBS. Se dejó la placa 1 hora a 37°C y se lavó cinco veces con PBST. Se adicionaron 50 μ L solución de substrato para peroxidasa (ver apéndice) y se registraron las unidades de absorbencia a 405 nm.

13.2 Detección de scFv's monoclonales por medio de Western blot.

Los scFv expresados afines al Cr³⁺ de las cuatro clonas seleccionadas, se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10% (Sambrook *et al.*, 2001) para la posterior realización de un Western blot. Se tomaron 15 µL de las muestras con 15 µL de amortiguador de muestra (ver apéndice) por carril. La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó a 120 V por 1 hora 30 minutos; terminado la electroforesis se cortó el gel de separación y se transfirió el gel de corrido a la solución TB (amortiguador de transferencia) por 10 minutos. Se cortó la membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno) del tamaño del gel de corrido; se colocó en metanol al 50% por 5 segundos y rápidamente se lavó en TB agitando suavemente y adicionando TB fresco por 5 minutos. Se hizo el "sandwich" para la transferencia de las proteínas del gel hacia la membrana de PVDF. La transferencia se realizó a 180 V por 60 minutos en frío, colocando un bloque con hielo en la cámara de corrido y manteniendo una agitación constante dentro de la cámara para tener la temperatura homogénea. Terminada la transferencia, se colocó bocabajo la membrana PVDF en leche en polvo al 30% en TBST para bloquear los sitios inespecíficos de la membrana; se dejó toda la noche a 4°C. Al siguiente día se adicionó 1:1000 anti-HA conjugados con peroxidasa (Roche Molecular Biochemicals) diluidos en leche en polvo al 30% en TBST. Se incubó toda la

noche a 4°C. Al siguiente día se lavó cinco veces la membrana con TBST y se dejó 15 minutos en agitación suave en cada lavado. Se quitó de la membrana el exceso de TBST y se colocó boca arriba sobre plástico "saran wrap". Se adicionó el reactivo ECL 1:1 (1 mL de solución A y 1 mL de solución B) (ECL Western Blotting Analysis System; American Pharmacia Biotech) sobre la membrana, se dejó 3 minutos y se drenó el exceso levantando por un lado la membrana con una pinza. Se colocó bocabajo la membrana en plástico "saran wrap" y se selló. Se expuso la membrana a la película Kodak Biomax BML durante 1 minuto, y se reveló la película con Kodak RP X-OMAT por ~20 segundos, se lavó con H₂O corriente y se fijó con Kodak RP X-OMAT LO.

13.3 ELISA de especificidad de scFv monoclonales.

Se seleccionaron cuatro clonas de la prueba de afinidad para hacer la prueba de especificidad. Se utilizó el método 13.1, utilizando los siguientes metales unidos a la cisteína por separado: 25 µL de CrO₃, HgCl₂, PbNO₃, MgCl₂, CoCl, NiCl₂ y CrCl₃ 0.01 M, en triplicado.

El ensayo inmunoenzimático se realizó dos veces modificando en cada placa el pH del PBS de lavado; se utilizó pH 7.4 y pH 6.0 respectivamente, este último, inhibe la interacción de las 6 histidinas con los metales.

14. Determinación de sensibilidad del scFv monoclonal.

14.1 ELISA de sensibilidad de scFv monoclonal.

Se determinó la sensibilidad del scFv purificado de la clona #19 seleccionada en el paso 13.2. Se realizó el ensayo inmunoenzimático como el descrito en el paso 13.1, con concentraciones de Cr^{3+} en mg/L: 52, 5.2, 0.52, 0.052 y 0.005, por triplicado y utilizando PBS de lavado a pH 6.0. Se repitió en tres ocasiones el ELISA para corroborar la reproducción del método y se obtuvo un control positivo para determinar la cantidad de cromógeno unido a cada scFv (paso 14.2).

14.2 Control positivo de sensibilidad por espectrofotometría de absorción atómica.

Como control positivo se colocaron 100 μL de scFv (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) por pozo en 50 pozos de placas de ELISA. Se incubó la placa toda la noche a 4°C. Al siguiente día se quitó el exceso de scFv's y se bloquearon los sitios inespecíficos con 150 μL de BSA al 3% en PBS. Se lavó la placa dos veces con PBST a pH 6.0 y se adicionaron 100 μL de Cr^{3+} en mg/L: 52, 5.2, 0.52, 0.052 y 0.005, por cada 10 pozos se adicionó una de las diluciones. Se incubó toda la noche a 4°C y al día siguiente se lavó la placa cinco veces con 200 μL de PBS pH 6.0. Se adicionaron 100 μL de solución de elusión (ver apéndice) por pozo y se dejó por 30 minutos; cada pozo se pipeteó

vigorosamente 20 veces y se transfirió cada dilución a un tubo eppendorff bloqueado con BSA al 3%. Se determinó la cantidad cromo total por espectrofotometría de absorción atómica de cada muestra en el laboratorio SALIP (Laboratorio Industrial y de Control, S. de RL. Ensenada, B.C.).

RESULTADOS:

1. Preparación del antígeno:

El glutaraldehído que unió a la hemocianina (KLH) con el glutatión produjo la formación de pequeños grumos. Se obtuvo la concentración total del antígeno en base a la cantidad de moléculas de glutatión obtenidas del número total de moléculas de cromo, según lo descrito por Wylie *et al.*, (1992) y Yang *et al.*, (1994). La cantidad de cromo analizada por complejo proteico mediante espectrofotometría de absorción atómica fue:

- KLH-glutatión- Cr^{3+} = 0.191 mg/mL de Cr^{3+} . Si por cada molécula de Cr^{3+} hay una molécula de glutatión, entonces, hay 2.57 mg de glutatión unido a 5 mg de KLH (96 moléculas de glutatión+ Cr^{3+} / molécula de KLH) = 7.761 mg/mL. En 20 μg que se utilizaron por inmunización hay 13.43 μg de KLH (1.2×10^{14} moléculas), 6.57 μg de glutatión (1.15×10^{16} moléculas) y 1 μg de Cr^{3+} (1.15×10^{16} moléculas).
- KLH-glutatión- Cr^{6+} = 0.067 mg/mL de Cr^{6+} . Si por cada molécula de Cr^{6+} hay una molécula de glutatión, entonces, hay 0.86 mg de glutatión unido a 5 mg de KLH (32 moléculas de glutatión+ Cr^{6+} / molécula de KLH) = 5.927 mg/mL. En 20 μg que se utilizaron por

inmunización hay 16.7 μg de KLH (1.53×10^{14} moléculas), 2.86 μg de glutatión (5.17×10^{15} moléculas) y 0.447 μg de Cr^{6+} (1.15×10^{15} moléculas).

2. Inmunizaciones.



Figura 10: Inmunización en el músculo pectoral en la gallina Leghorn blanca.

3. ELISA de suero de gallina.

3.2.1 ELISA del suero de gallina para detección de anticuerpos contra Cr^{3+} .

El valor de las unidades de absorbencia de $\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$ no aumentaron durante las inmunizaciones (barra naranja); sin embargo, si se comparan las absorbencias contra su control (barra blanca), se observa una tendencia positiva en la diferencia (barra gris), indicando una gradual afinidad de los anticuerpos hacia el $\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$ conforme cada inmunización.

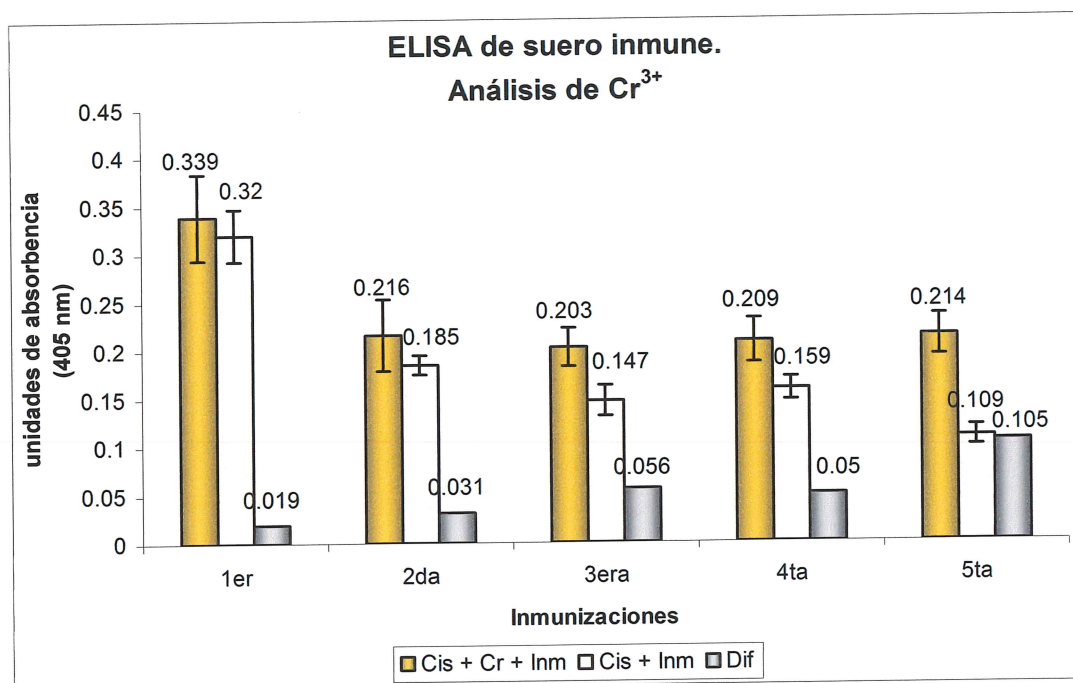


Figura 11: ELISA del suero de gallina inmune (Inm) diluido 1:10. Como antígeno en placa se utilizó cisteína+ Cr^{3+} (naranja) y como control cisteína sin Cr^{3+} (blanco). Dif. (gris) es la resta ($\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$) – (cis) de cada inmunización.

El suero preinmune en presencia de $\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$ muestra una tendencia errática (barra naranja), sin embargo, si se compara contra su control (barra blanca), la diferencia (barra roja) muestra que el valor de los anticuerpos que son afines al Cr^{3+} mantienen un valor constante, indicándonos que a pesar de que las unidades de absorbencia de cada inmunización varían en cada ensayo, no hay anticuerpos en el suero preinmune que reconocen al Cr^{3+} . El control (suero preinmune) se mantiene debajo del suero inmune (barra gris).

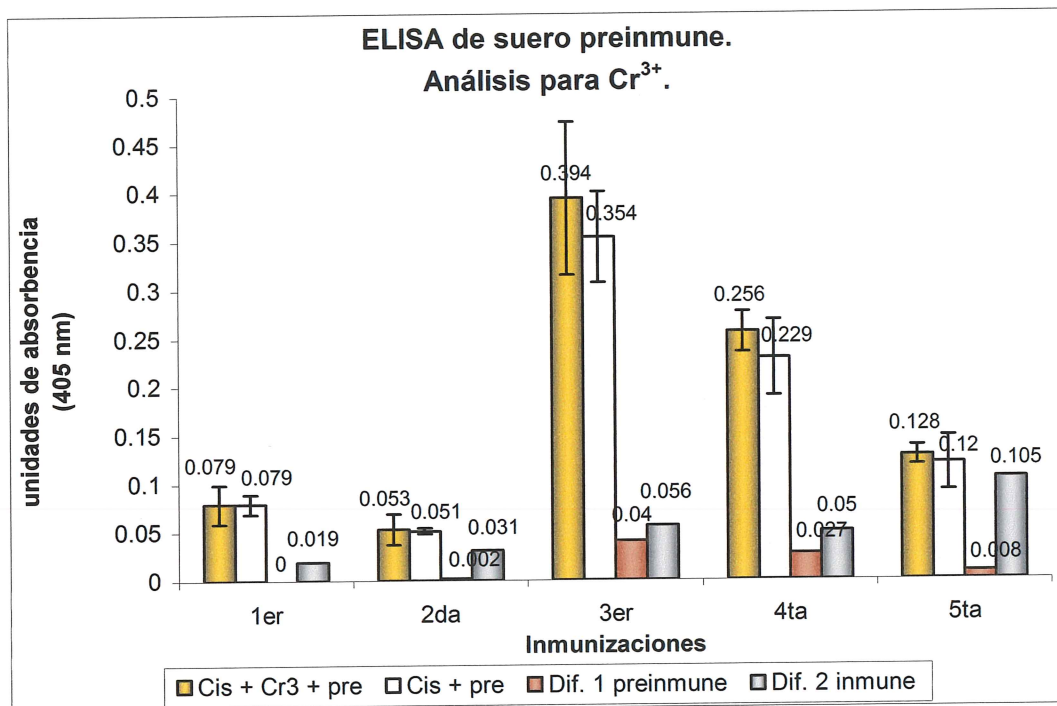


Figura 12: ELISA del suero de gallina preinmune (pre) diluido 1:10. Como antígeno en placa se utilizó cisteína+ Cr^{3+} (amarillo) y como control cisteína sin Cr^{3+} (blanco). Dif. 1 (rojo) es la resta entre la absorbencia de ($\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$) - (cis) de cada ELISA con suero preinmune. Dif. 2 (gris) es la resta entre la absorbencia de ($\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$) - (cis) de cada inmunización con suero inmune obtenido de la figura 11.

La figura 13 muestra una tendencia positiva del suero inmune hacia la $\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$ (gris) con respecto al suero preinmune (rojo), y se corrobora con la diferencia de las unidades de absorbencia del suero inmune utilizando glutatión (verde). Se observa una disminución gradual en la afinidad de los anticuerpos hacia el glutatión en la última inmunización y un aumento en la población de anticuerpos afines hacia la Cr^{3+} después de cinco inmunizaciones. El siguiente paso fue el de extraer el mRNA que codifica para los anticuerpos del bazo de la gallina (paso 4).

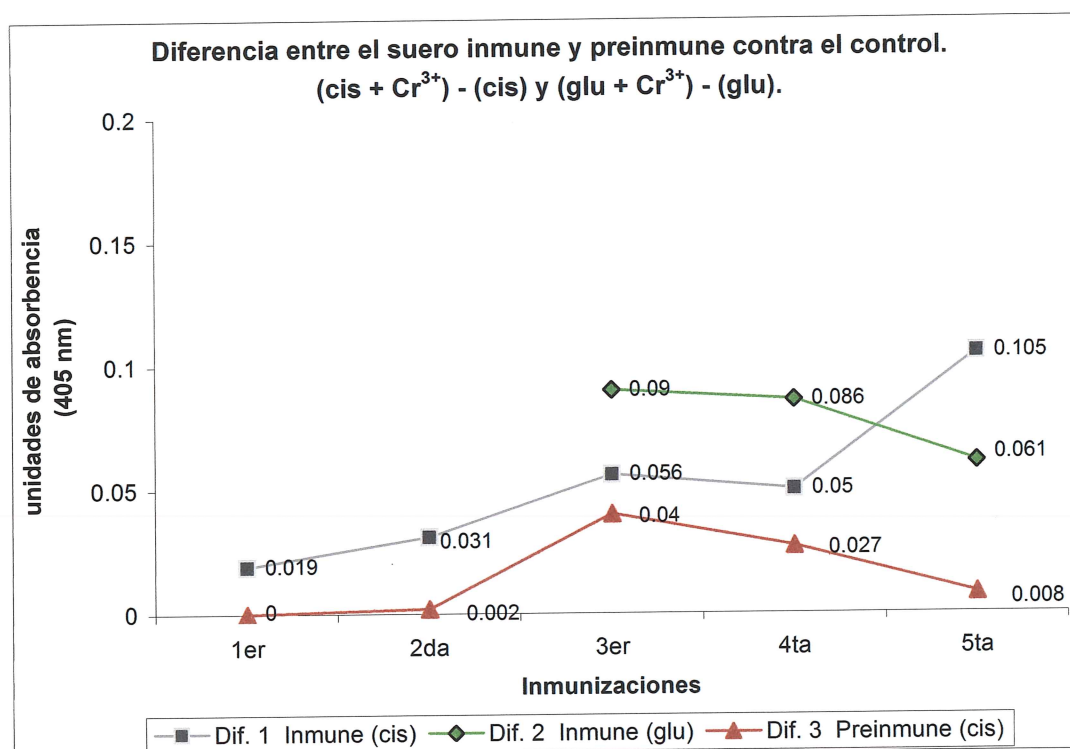


Figura 13: Diferencia entre los resultados de las unidades de absorbencia del suero inmune y preinmune de la gallina inmunizada con los acarreadores del Cr^{3+} . La gráfica muestra la diferencia del suero inmune de $\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$ (gris) y glutatión+ Cr^{3+} (verde); y la diferencia del suero preinmune de $\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$ (rojo). Las diferencias se obtienen de la resta de $(\text{cis}+\text{Cr}^{3+}) - (\text{cis})$, y $(\text{glu}+\text{Cr}^{3+}) - (\text{glu})$, respectivamente de cada inmunización. Los resultados de las diferencias se obtuvieron de las figuras 11 y 12, a excepción de las de glutatión (figura no mostrada).

3.2.2 ELISA del suero de gallina para detección de anticuerpos contra Cr^{6+} .

Las absorbancias de $\text{cis}+\text{Cr}^{6+}$ (barra amarilla) de cada inmunización fueron constantes a partir de la 2da inmunización; sin embargo, al comparar los valores contra el control (barra blanca), se observa una tendencia errática en la diferencia de cada inmunización (barra gris), indicando la ausencia de anticuerpos contra Cr^{6+} después de cinco inmunizaciones.

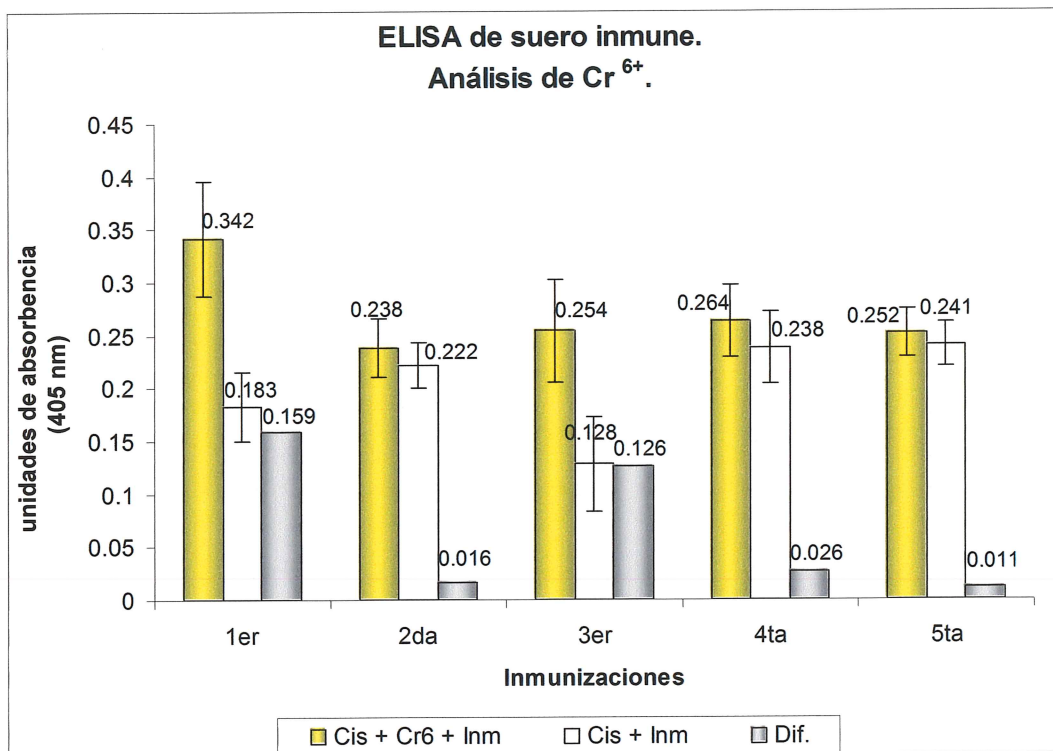


Figura 14: ELISA del suero de gallina inmune (Inm) diluido 1:10. Como antígeno en placa se utilizó cisteína+ Cr^{6+} (amarillo) y como control cisteína sin Cr^{6+} (blanco). Dif. (gris) es la resta entre la absorbancia del ($\text{cis}+\text{Cr}^{6+}$) – (cis) de cada inmunización.

La gráfica muestra una tendencia negativa del suero inmune hacia la $\text{cis}+\text{Cr}^{6+}$ (gris) con respecto al suero preinmune (rojo). No hubo presencia de anticuerpos afines hacia Cr^{6+} después de cinco inmunizaciones. No se extrajo el bazo de esta gallina.

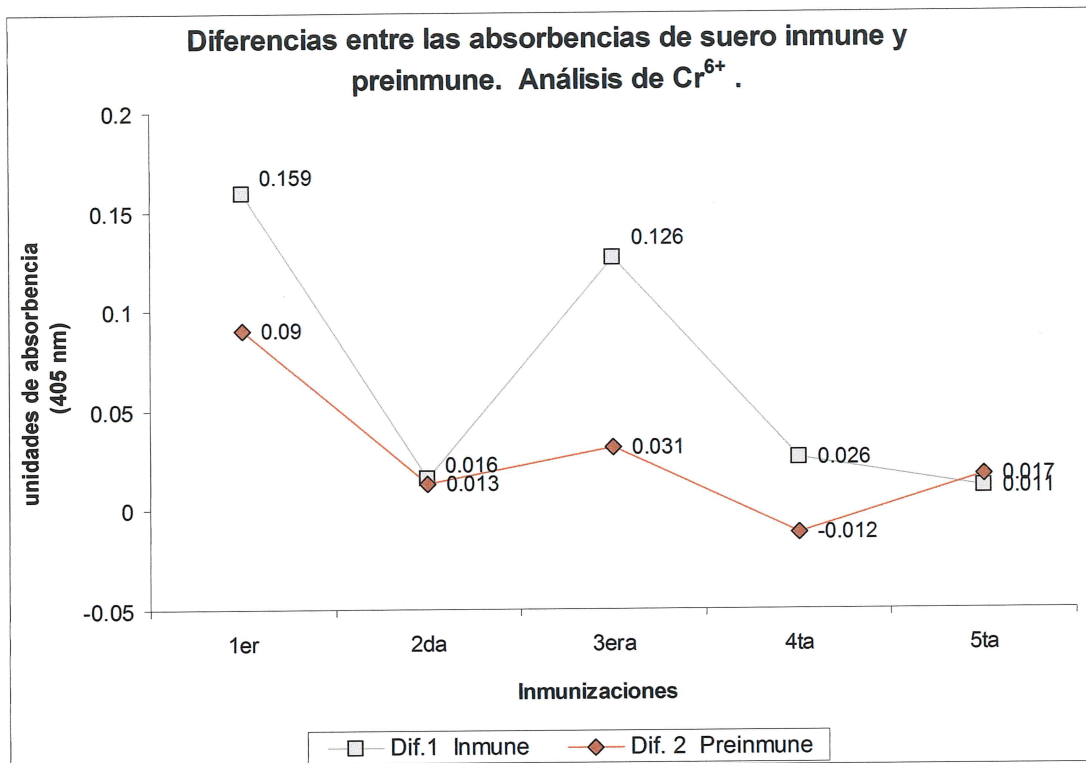


Figura 15: Diferencia entre los resultados de las unidades de absorbencia del suero inmune y preinmune de la gallina inmunizada con los acarreadores del Cr^{6+} . La gráfica muestra la diferencia del suero inmune de $\text{cis}+\text{Cr}^{6+}$ (gris) y la diferencia del suero preinmune de $\text{cis}+\text{Cr}^{6+}$ (rojo).

4. Purificación de RNA total y síntesis de mRNA a cDNA.

4.1 Purificación de RNA total a partir de bazo de gallina.

Se sacrificó a la gallina que se inyectó con el antígeno que transportaba al Cr^{3+} y se le extrajo el bazo para purificar el RNA total (fig. 16). Se obtuvo de la extracción 2.34 mg de RNA total, con una pureza (260 nm / 280 nm) de 0.79. Se purificó nuevamente el RNA total utilizando el mismo método de extracción y se obtuvo como producto final 1.36 mg de RNA con una pureza de 1.69, en un volumen final de 2 mL.

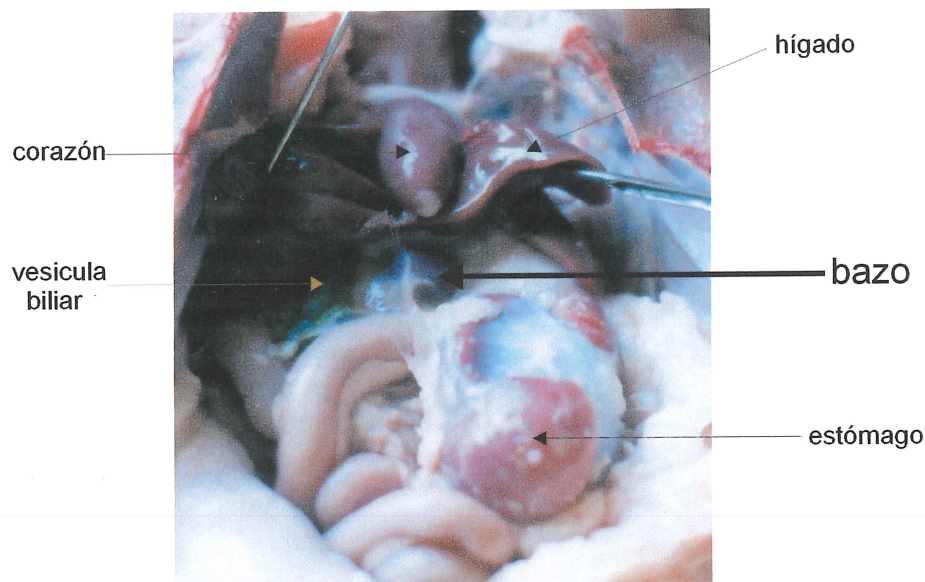


Figura 16: Disección de la gallina en apertura por la quilla. El bazo se encuentra debajo del hígado y está rodeado de tejido conectivo que se une con el estómago. Se separó el bazo cuidadosamente del tejido conectivo.

4.2 Reacción RT-PCR.

El producto cDNA sintetizado del mRNA, no se cuantificó y se utilizó directamente para el PCR de las cadenas variables.

5. Construcción de la biblioteca de DNA de scFv.

5.1 PCR de las cadenas variables ligeras (V_L) y pesadas (V_H).

El producto de PCR de las cadenas variables amplificadas fue de ~350 pb para la cadena variable ligera (V_L) y de ~400 pb para la cadena variable pesada (V_H) (fig. 17).

Los productos del PCR se purificaron del gel de agarosa al 2%, recuperando 5 μ g de DNA de V_L con una pureza (260nm / 280nm) de 1.25, y 12 μ g de DNA de V_H con una pureza de 1.33. Ambos productos se unen en un PCR de traslape (fig. 18).

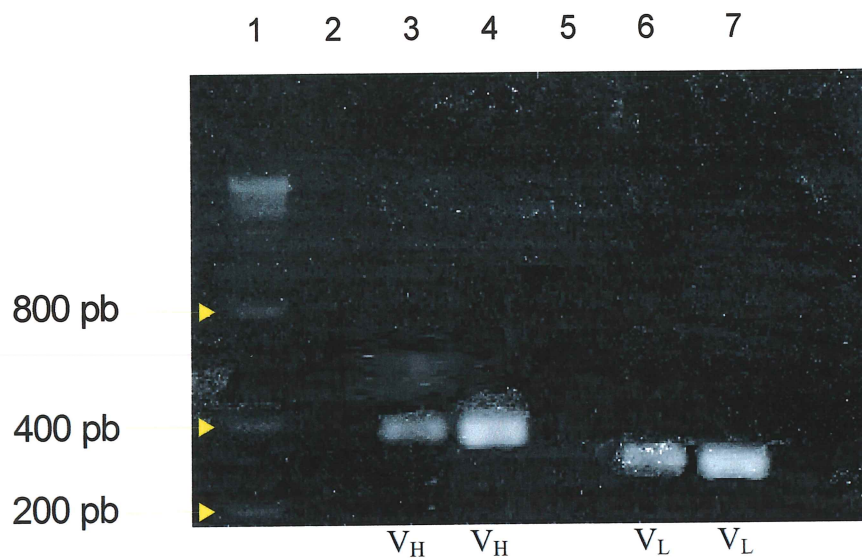


Figura 17: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR de las cadenas V_L y V_H . Carriles: 1: Escalera de bajo peso molecular (Gibco); 2: vacío; 3 y 4: muestra de PCR de cadenas variables pesadas (V_H); 5: vacío; 6 y 7: muestra de PCR de cadenas variables ligeras (V_L).

5.2 PCR de traslape (DNA de scFv).

El producto del PCR de traslape fue de ~750 pb (fig. 18), se purificó del gel de agarosa al 2% y se recuperaron 5.62 μg de DNA de scFv con una pureza de 1.5.

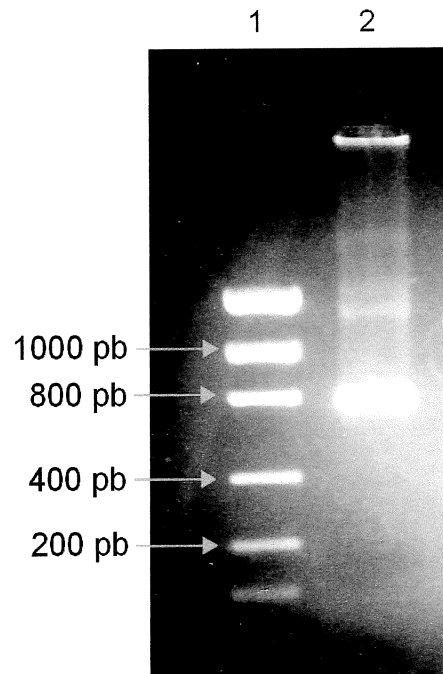


Figura 18: Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR de traslape (DNA de scFv). Carriles: 1: Escalera de bajo peso molecular; 2: muestra del producto de PCR de traslape.

6. Digestión y purificación del DNA de scFv y del vector pComb3X.

6.1 Digestión y purificación del DNA de scFv.

La banda del DNA de scFv (PCR de traslape) (fig. 18), se cortó en los extremos con la enzima de restricción *Sfi* I (fig. 19). Identificada la banda de ~850 pb digerida, se purificó del gel de agarosa; se recuperaron 4 μ g de DNA de scFv digerido con *Sfi* I, con una pureza de 1.67. El DNA purificado se unió con el vector pComb3X (paso 7).

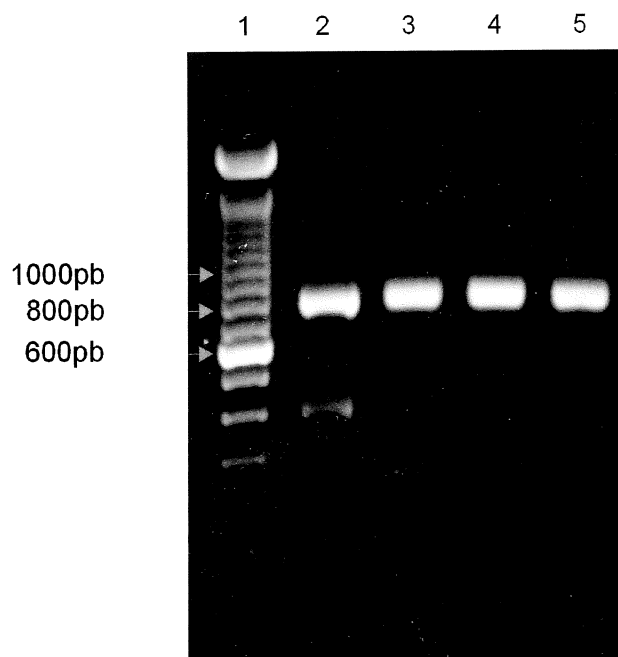


Figura 19: Electroforesis en gel de agarosa al 2% con muestras de DNA de scFv con y sin digestión por *Sfi* I. Carriles: 1: 100 pb escalera molecular (Gibco); 2: DNA de scFv sin digerir; 3-5: DNA de scFv digerido con *Sfi* I. Las bandas de DNA de scFv digeridas se extrajeron del gel para su posterior purificación.

6.2 Digestión y purificación de pComb3X.

Se extrajeron 80 μg del vector pComb3X, con una pureza de 1.6 (fig. 20). La banda de DNA del vector pComb3X digerida con la enzima de restricción *Sfi* I (figura 20) se purificó del gel de agarosa, recuperando 60 μg con una pureza de 1.8. El DNA purificado se utilizó para la ligación con el DNA de scFv (paso 7).

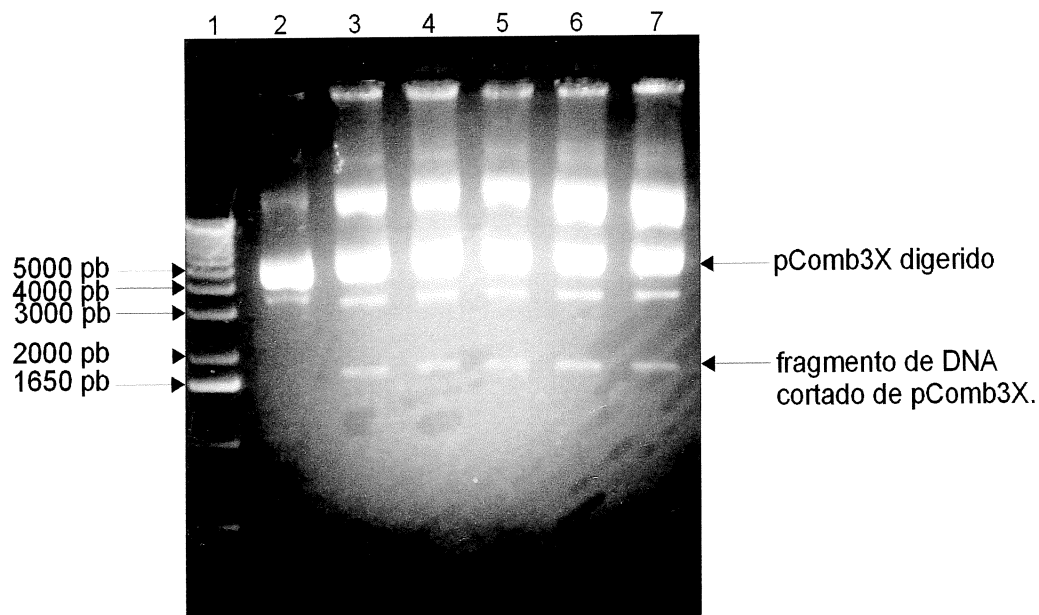


Figura 20: Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% con muestras del vector de expresión pComb3X digerido con *Sfi* I. Carriles: 1: 1 Kb Escalera molecular (Gibco); 2: DNA de pComb3X no digerido; 3 - 7: pComb3x digerido con *Sfi* I.

7. Ligación del DNA de scFv en el vector de expresión pComb3X.

La prueba de ligación confirmó la unión de los productos de DNA. La biblioteca de scFv se resuspendió en 20 μ L de H₂O libre de nucleasas y se utilizó directamente para transformar a células *E. coli* XL1-B competentes con CaCl₂ (paso 8).

8. Producción de fagémidos expresando el fragmento de anticuerpo de cadena sencilla (scFv).

Se obtuvo una eficiencia de transformación de 1×10^7 colonias por μ g de plásmido (pComb3X-scFv) en las células competentes *E. coli* XL1-B.

9. Rondas de selección con la biblioteca de scFv policlonales transportados en fagémidos.

Se recuperaron 2 mL de fagémidos por cada ronda de selección de la primer biblioteca de DNA de scFv; se utilizaron directamente para análisis de afinidad por ELISA (paso 10.1.1).

Se recuperaron 2 mL de fagémidos por cada ronda de selección de la segunda biblioteca de DNA de scFv; se utilizaron directamente para análisis de afinidad por ELISA (paso 10.1.1).

10. Detección del fagémido de interés con anticuerpos anti-M13 por ELISA y en resina cargada con Cr^{3+} .

10.1 Detección del fagémido de interés por ELISA.

10.1.1 ELISA de la primer biblioteca de fagémidos.

Ensayo inmunoenzimático (fig. 21), que muestra la afinidad de los fagémidos de la primer biblioteca hacia la cisteína (barra blanca), y la ausencia de afinidad hacia la $\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$ (barra naranja) y metionina (barra amarilla). Los fagémidos obtenidos de esta biblioteca no cumplieron con los objetivos de este trabajo. Se hizo una nueva biblioteca de DNA de scFv para la búsqueda de anticuerpos afines hacia la $\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$.

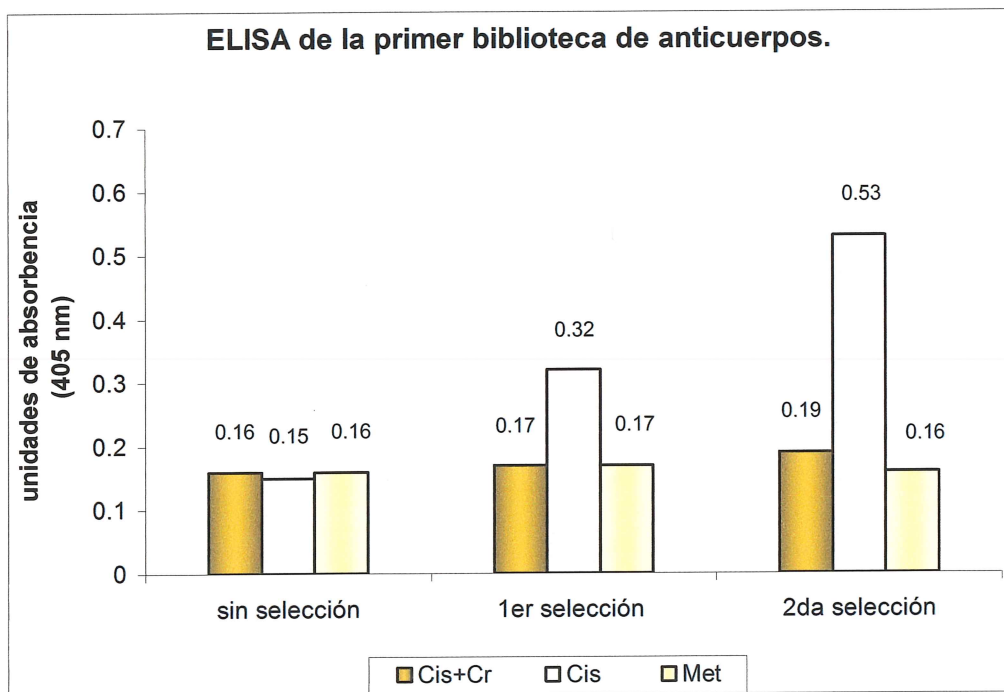


Figura 21: ELISA de la primer biblioteca de DNA de scFv después de dos rondas de selección. Se utilizó como antígeno $\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$ (naranja), como control se utilizó cisteína sin Cr^{3+} (blanco) y metionina (amarillo).

10.1.2 ELISA de la segunda biblioteca de fagémidos.

Ensayo inmunoenzimático (fig. 22), que muestra fagémidos afines hacia la $\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$ (barra naranja) después de tres rondas de selección. Para corroborar los resultados de esta ELISA, se utilizó resina afín a metales cargada con Cr^{3+} (fig. 23).

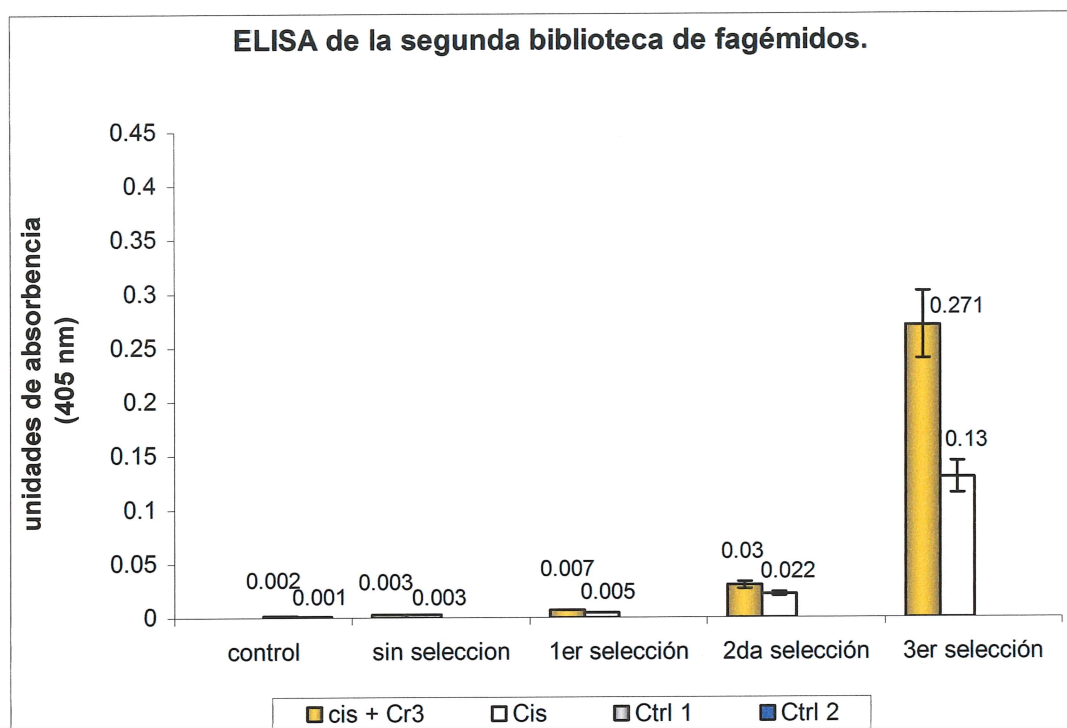


Figura 22: ELISA de la segunda biblioteca de DNA de scFv después de tres rondas de selección. Se utilizó como antígeno $\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$ (naranja), y como control se utilizó cisteína sin Cr^{3+} (blanco), metionina (ctrl. 1, gris), y BSA (ctrl. 2, azul).

10.2 Detección del fagémido de interés de la segunda biblioteca en resina cargada con Cr^{3+} .

La afinidad de los fagémidos hacia el Cr^{3+} (barra naranja) aumenta gradualmente conforme cada selección, siendo los valores de la tercer ronda de selección los más altos (fig. 23), corroborando el resultado de la ELISA de la figura 22. Se determinó la especificidad de los fagémidos de la tercer ronda de selección en presencia de distintos metales (fig. 24 y 25).

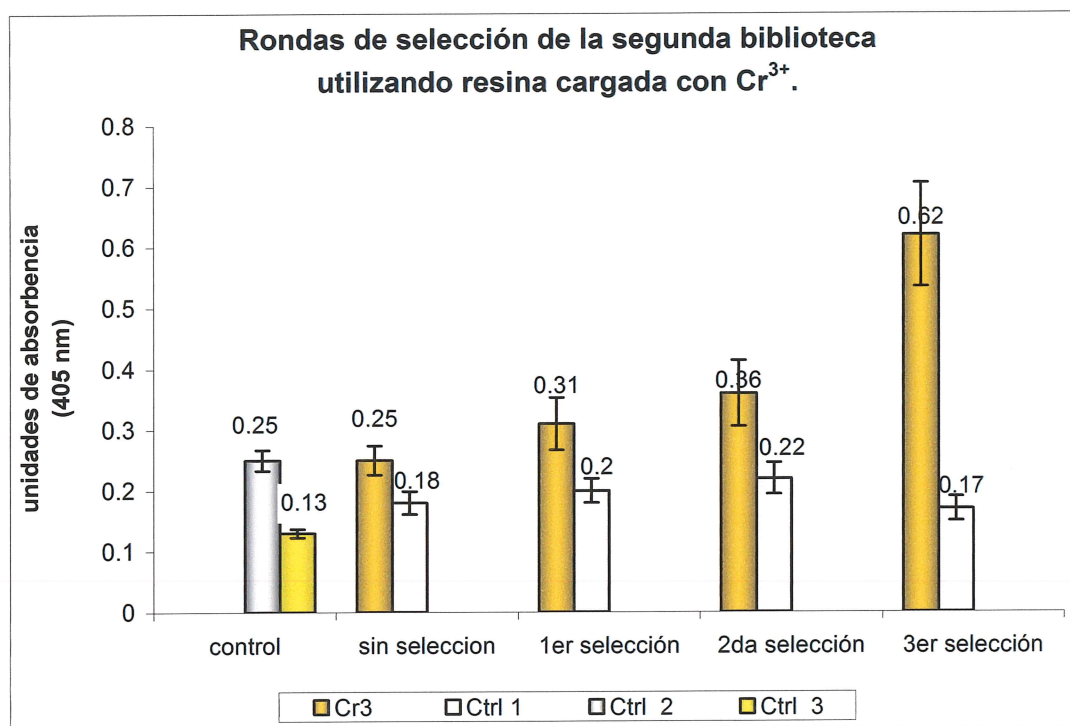


Figura 23: Afinidad de los fagémidos de la segunda biblioteca hacia Cr^{3+} después de tres rondas de selección utilizando la resina afín a metales. Se utilizó como antígeno Cr^{3+} (naranja) unido a la resina, como control se utilizó resina sin Cr^{3+} (ctrl. 1, blanco), resina con Cr^{3+} sin fagémido (ctrl. 2, gris) y resina sin Cr^{3+} sin anti-M13 (ctrl. 3, amarillo).

11. Determinación de especificidad de fagémidos de la tercer ronda de selección en presencia de distintos metales.

11.1 ELISA de especificidad de fagémidos.

Ensayo inmunoenzimático (fig. 24), que muestra fagémidos de la tercer ronda de selección que reconocen al Cr^{3+} y en menor cantidad al Pb^{2+} y al Hg^{2+} . La interacción con otros metales sugiere que hay fagémidos que transportan scFv's policlonales afines a otras moléculas, o bien, son inespecíficos. Para corroborar estos resultados, se determinó la especificidad utilizando resina afín a metales (fig. 25).

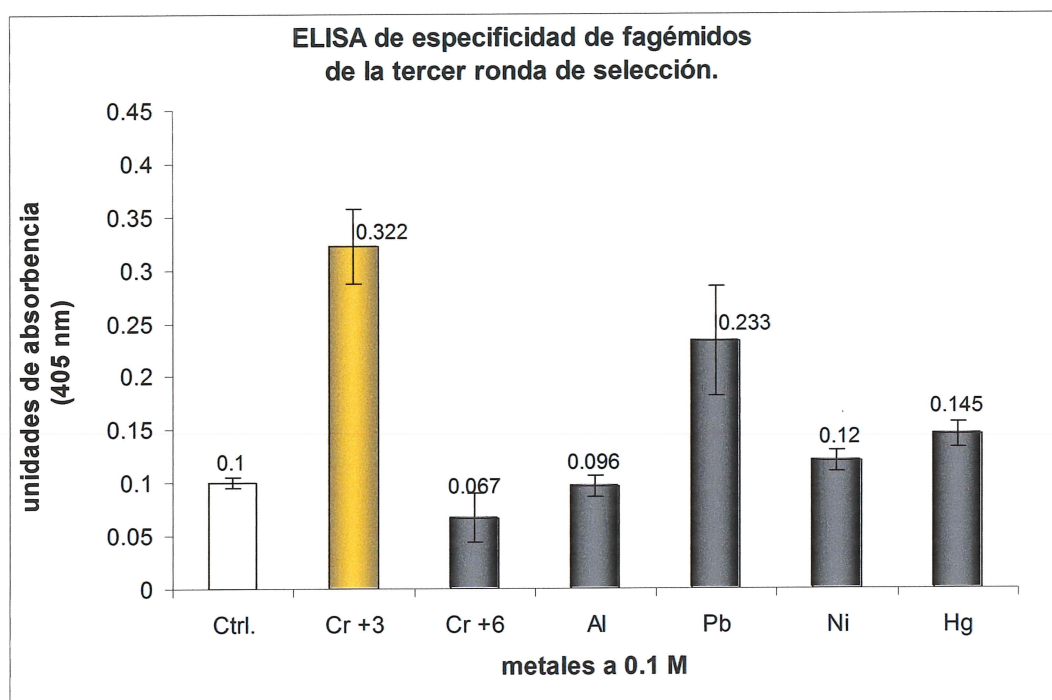


Figura 24: ELISA de especificidad de fagémidos de la tercer ronda de selección de la segunda biblioteca de DNA de scFv, utilizando como antígeno $\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$ 0.1 M (naranja), Cr^{6+} , Al^{3+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} y Hg^{2+} 0.1 M (gris) por separado y como control cisteína sin metal (blanco).

11.2 Especificidad de fagémidos utilizando resina unida a distintos metales.

Los resultados de este ensayo (fig. 25) muestran la presencia de falsos-positivos generados por alguna proteína de los fagémidos. El fagémido control (barra blanca) está reaccionando fuertemente con el Al^{3+} y el Pb^{2+} , indicando la unión inespecífica de alguna proteína del fagémido que no es el scFv. El fagémido de la tercer ronda de selección (barra naranja) muestra más afinidad hacia el Pb^{2+} y Al^{3+} , que hacia el Cr^{3+} , sin embargo, las diferencias (barra gris) indican que a pesar que las interacciones con otros metales son significativamente altas, existe una mayor especificidad hacia el Cr^{3+} que hacia los demás metales, ya que el fagémido control se une muy poco a Cr^{3+} .

Para eliminar las proteínas del fagémido que son posibles generadoras de falsos-positivos y para eliminar inespecificidades de los scFv, se expresaron scFv's monoclonales libres de proteínas de fagémido (paso 12).

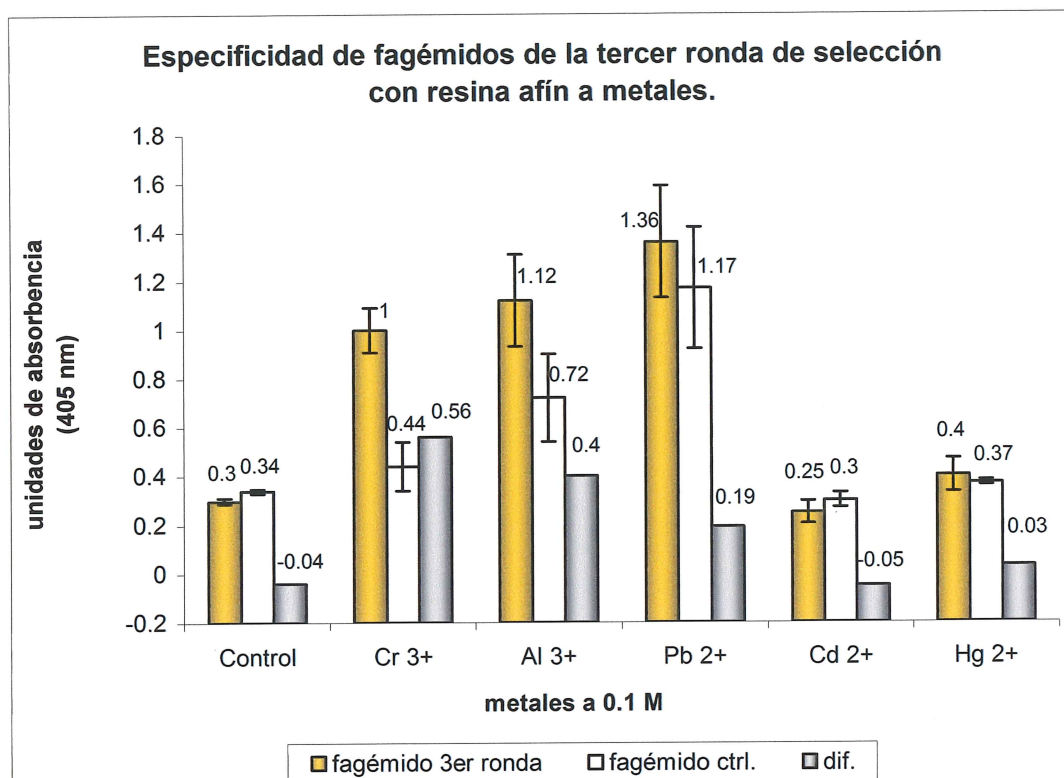


Figura 25: Ensayo de especificidad con resina afín a metales de los fagémidos de la tercer ronda de selección de la segunda biblioteca (naranja). Como control se utilizó resina cargada con fagémidos sin selección de la primer biblioteca de DNA de scFv (blanco) y resina sin metales (control, eje X). Dif. (gris) es la diferencia entre el valor de las absorbancias de los fagémidos de la tercer ronda de selección, con el fagémido control (blanco).

12. Expresión de scFv monoclonales en *E. coli* TOP10F'.

12.1 Extracción de pComb3X-scFv de la tercer ronda de selección.

Se extrajeron 10 μ g de DNA del vector pComb3X-scFv de la tercer ronda de selección de la segunda biblioteca de DNA de scFv (fig. 26), con una pureza de 1.8. El DNA se utilizó directamente para transformar a la cepa no supresora *E. coli* TOP10F'.

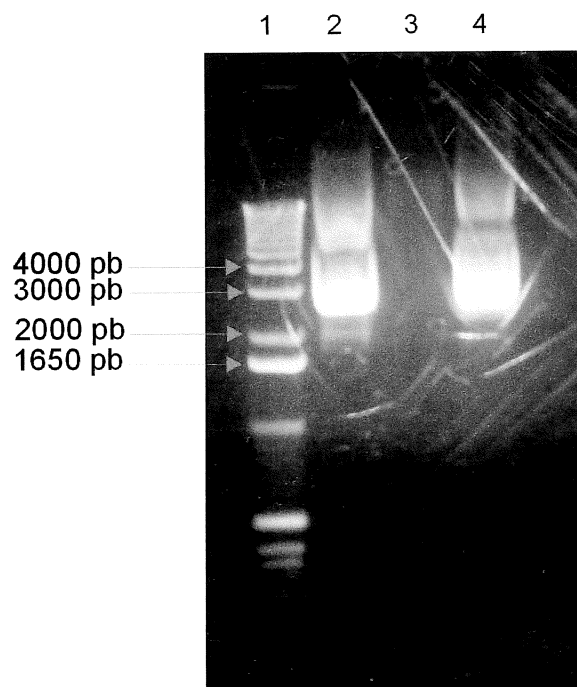


Figura 26: Electroforesis en gel de agarosa al 1% con muestras de DNA de pComb3X-scFv de la tercer ronda de selección. Carriles: 1: Escalera molecular de 1 Kb; 2 - 4: pComb3X-scFv de la tercer ronda de selección.

12.2 Electroporación en *E. coli* TOP10F' con pComb3X-scFv.

Placa seleccionada de la cepa no supresora *E. coli* TOP10F' (fig. 27), dilución 1:1000, que fue útil para seleccionar colonias aisladas productoras de scFv's monoclonales (paso 12.3)

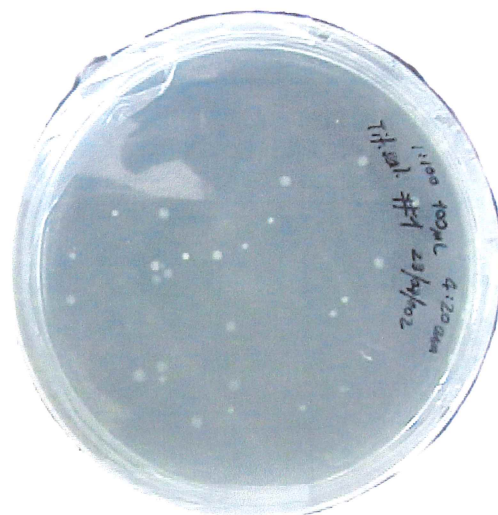


Figura 27: Placa con agar LB amp^{50} , con clonas de *E. coli* TOP10F' transformadas con el vector pComb3X-scFv de la tercer ronda de selección. Se tomaron 20 clonas por separado y se transfirieron a medio LB amp^{50} con IPTG para la expresión del scFv monoclonal.

12.3 Expresión de scFv soluble.

Expresados los scFv de 20 clonas, se purificaron directamente con Ni-NTA y se determinó su concentración en espectrofotómetro a 405 nm (paso 12.4).

12.4 Purificación del scFv del sobrenadante con Ni-NTA.

Los scFv's purificados se cuantificaron utilizando 5 μ L de muestra (tabla IV).

Tabla IV: Cuantificación a 280 nm de los scFv de las 20 clonas inducidas.

# de clona	Cantidad (μ g/ μ L)	# de clona	Cantidad (μ g/ μ L)
1	1.2	11	2.0
2	0.08	12	0.8
3	0.6	13	2.4
4	1.2	14	1.4
5	1.0	15	2.0
6	2.2	16	3.0
7	1.4	17	1.0
8	1.6	18	2.4
9	3.2	19	2.8
10	0.4	20	3.2

Se igualó la concentración de las muestras a 1 μ g/ μ L para las pruebas de selección en ELISA. Las concentraciones debajo de 1 μ g/ μ L no se modificaron.

13. Determinación de afinidad y especificidad de scFv's monoclonales.

13.1 ELISA de afinidad de scFv's monoclonales.

Ensayo inmunoenzimático de afinidad (fig. 28), donde se muestran scFv's monoclonales con distintas afinidades tanto hacia cisteína, como hacia cis+Cr^{3+} . Los scFv's con mayor afinidad hacia la cis+Cr^{3+} (barras naranjas), fueron seleccionados para análisis posteriores de especificidad (fig. 30, 31, 32 y 33). Las clonas que se indican en color azul no se les hizo ningún análisis posterior.

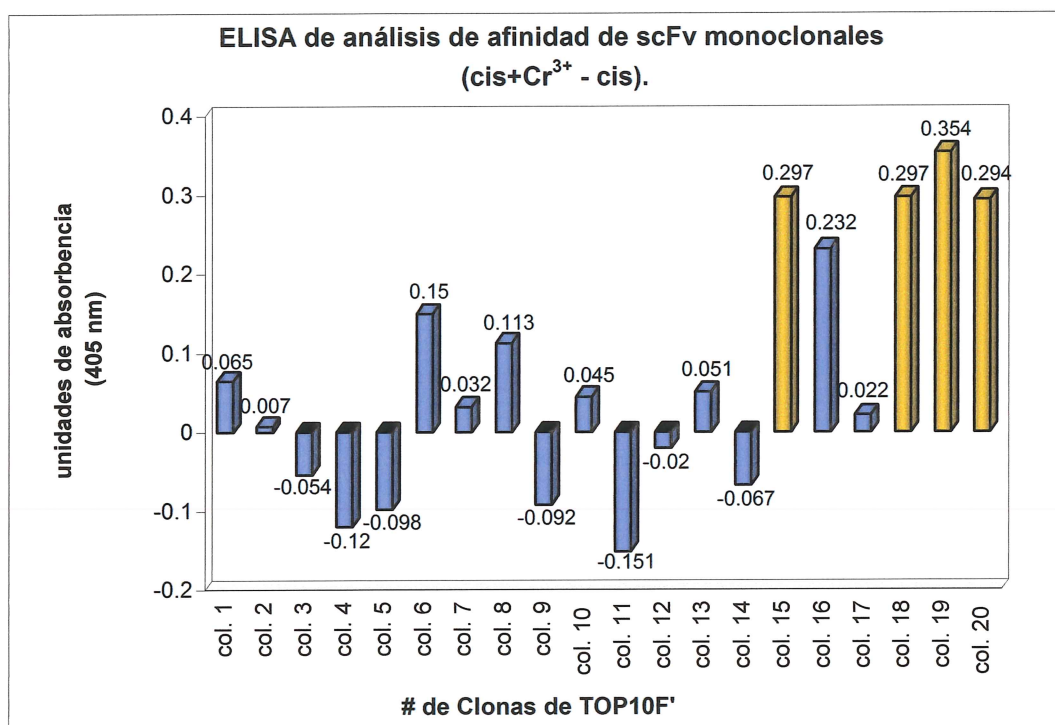


Figura 28: ELISA para la selección de scFv monoclonales afines a Cr^{3+} , obtenidos a partir de la purificación con Ni-NTA.

13.2 Detección de scFv's monoclonales por medio de Western blot.

Las cuatro clonas seleccionadas para análisis de especificidad en el paso #13.1, expresaron un scFv monoclonal en el sobrenadante detectado con la técnica de Western blot. El tamaño estimado del scFv es de 25 kDa, como se indica en la figura 29.

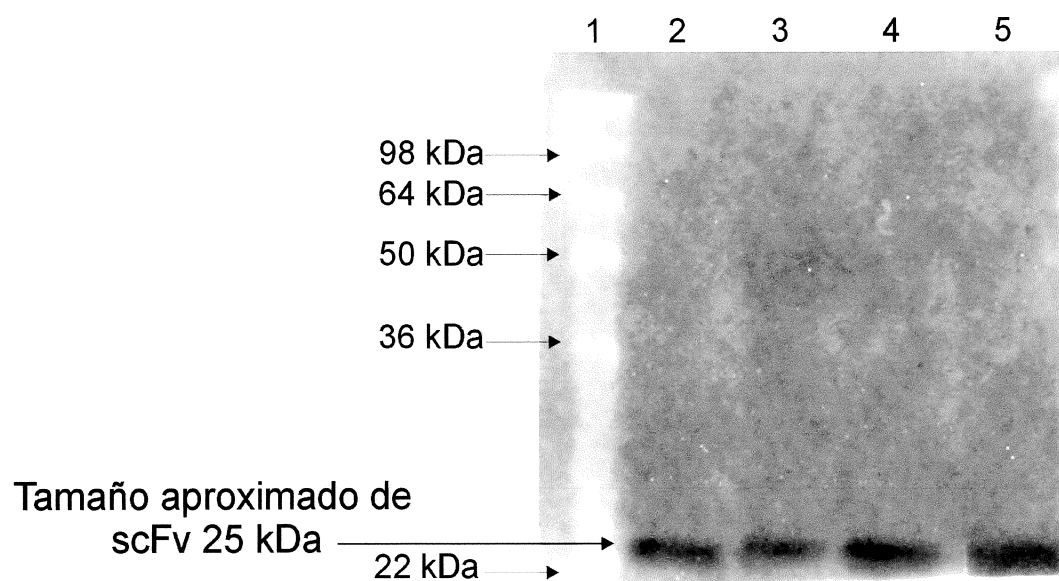


Figura 29: Western blot con muestras de scFv's monoclonales purificados con Ni-NTA. Carriles: 1: Escalera de proteína preteñida, (SeeBlue Plus2, Invitrogene); 2: scFv purificado de la clona #15; 3: scFv purificado de la clona #18; 4: scFv purificado de la clona #19; 5: scFv purificado de la clona # 20.

13.3 ELISA de especificidad de scFv monoclonales.

Ensayo inmunoenzimático de especificidad, utilizando Pb^{2+} y PBS de lavado a pH 7.4 (fig. 30). Los scFv de las cuatro clonas son afines hacia el Cr^{3+} (barra naranja) cuando se comparan con el control cisteína (barra blanca), sin embargo el Pb^{2+} (barra gris) esta uniéndose con el scFv de todas las clonas. Los scFv de las clonas #18 y19 muestran una mayor afinidad hacia el Cr^{3+} que hacia el Pb^{2+} y a cisteína, sin embargo, la unión hacia Pb^{2+} es significativamente alta. El scFv de las clonas #15 y 20 muestran mayor afinidad hacia el Pb^{2+} que hacia Cr^{3+} . Las unidades de absorbencias muestran que la unión de los scFv's hacia el Pb^{2+} no cambio con lo observado en los resultados de especificidad con fagémidos (fig. 24), donde se demuestra la unión inespecífica de proteínas que reconocen el Pb^{2+} . Para disminuir la unión inespecífica de las 6 histidinas se probó PBS de lavado a pH 6.0, para inhibir el grupo imidazol de la histidina (Nelson *et al.*, 2000) (fig. 31).

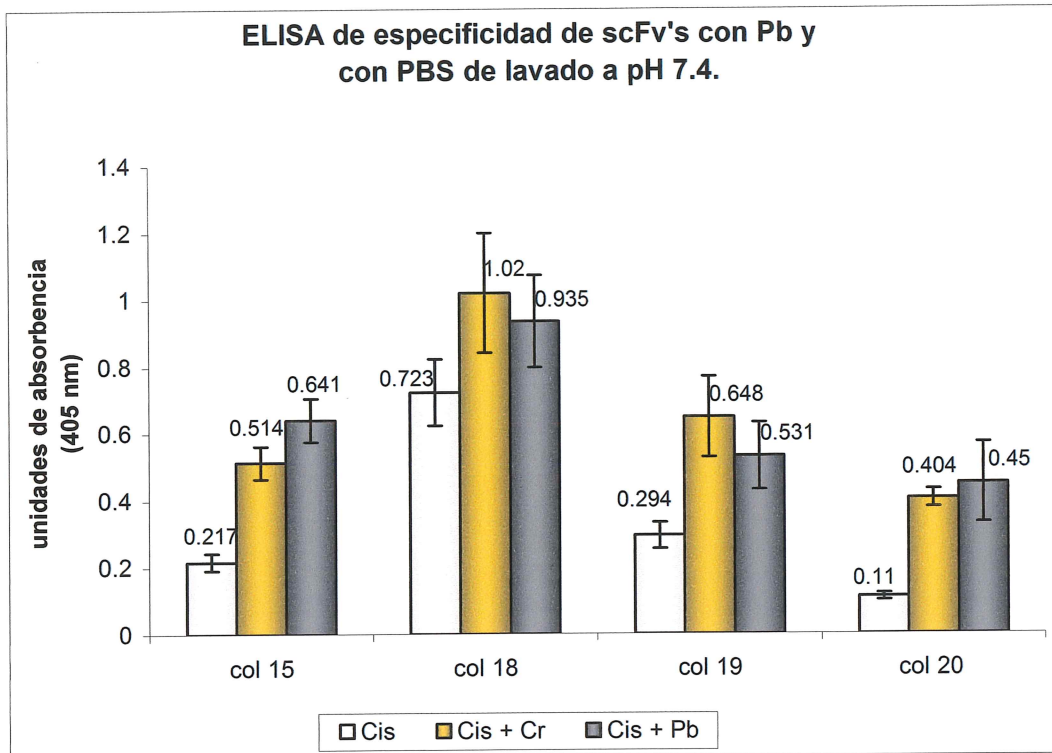


Figura 30: ELISA de especificidad utilizando PBS de lavado a pH 7.4 de las cuatro clonas seleccionadas que expresaron scFv's monoclonales afines a Cr^{3+} . Como control se utilizó cisteína (blanco), como antígeno $\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$ (naranja) y $\text{cis}+\text{Pb}^{2+}$ (gris).

Ensayo inmunoenzimático (fig. 30), que muestra un aumento en la afinidad de los scFv's hacia el Cr^{3+} con el uso de PBS de lavado a pH 6.0. El scFv de la clona #15 aumento su afinidad hacia Cr^{3+} , pero se unió fuertemente con el Pb^{2+} ; el scFv de la clona #18 muestra mayor afinidad hacia el Cr^{3+} , sin embargo, sigue uniéndose tanto a la cisteína como al Pb^{2+} ; el scFv de la clona #19 y 20 se esta uniendo específicamente con Cr^{3+} , los valores del control (cisteína) son muy similares a los del Pb^{2+} . Los scFv de las clonas #19 y 20 se escogieron para análisis posteriores de especificidad (fig. 32 y 33).

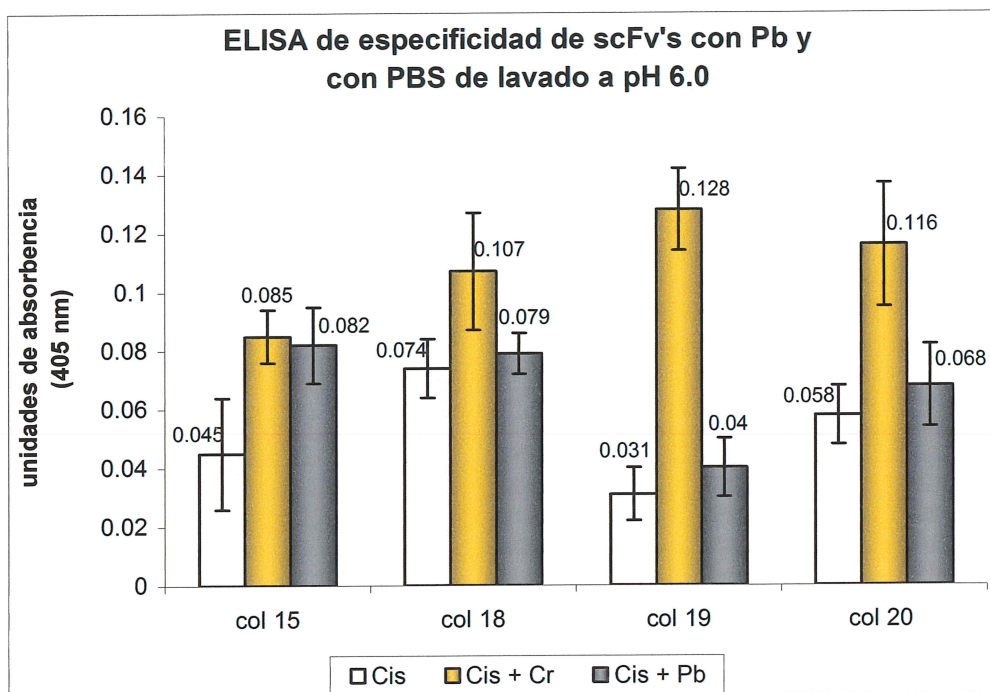


Figura 31: ELISA de especificidad utilizando PBS de lavado a pH 6.0 de cuatro clonas seleccionadas que expresaron scFv's monoclonales afines a Cr^{3+} . Se utilizó como control cisteína (blanco), como antígeno se utilizó cis+ Pb^{2+} (gris) y cis+ Cr^{3+} (naranja).

El ensayo inmunoenzimático de especificidad (fig. 32), muestra la alta afinidad del scFv purificado de la clona #19 (barra naranja) hacia el Cr^{3+} . Se seleccionó el scFv de la clona #19 para análisis de sensibilidad (fig. 34 y 35).

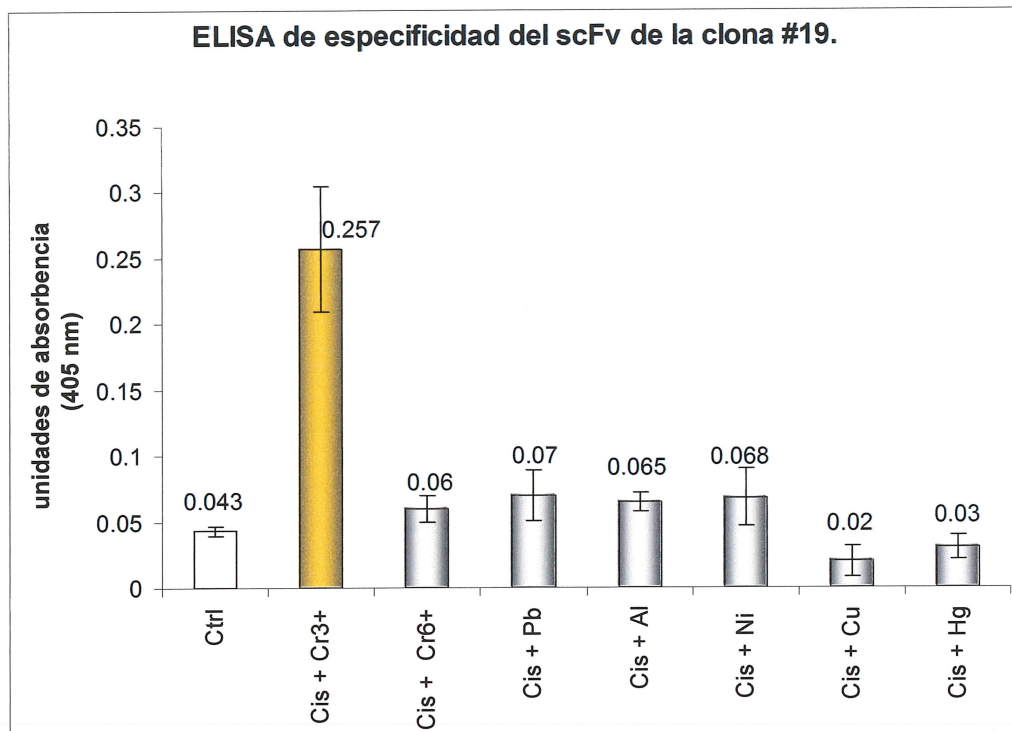


Figura 32: ELISA de especificidad del scFv de la clona #19, probando distintos metales y utilizando PBS de lavado a pH 6.0. Como control se utilizó cisteína (ctrl. eje X), como antígeno se utilizó cisteína 0.01 M, unida con Cr^{3+} , Cr^{6+} , Pb^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , y Hg^{2+} a 0.001 M.

El scFv de la clona #20 (barra amarilla) no muestra especificidad hacia Cr^{3+} , ya que se une a diversos metales. No se seleccionó el scFv de la clona #20 para posteriores análisis.

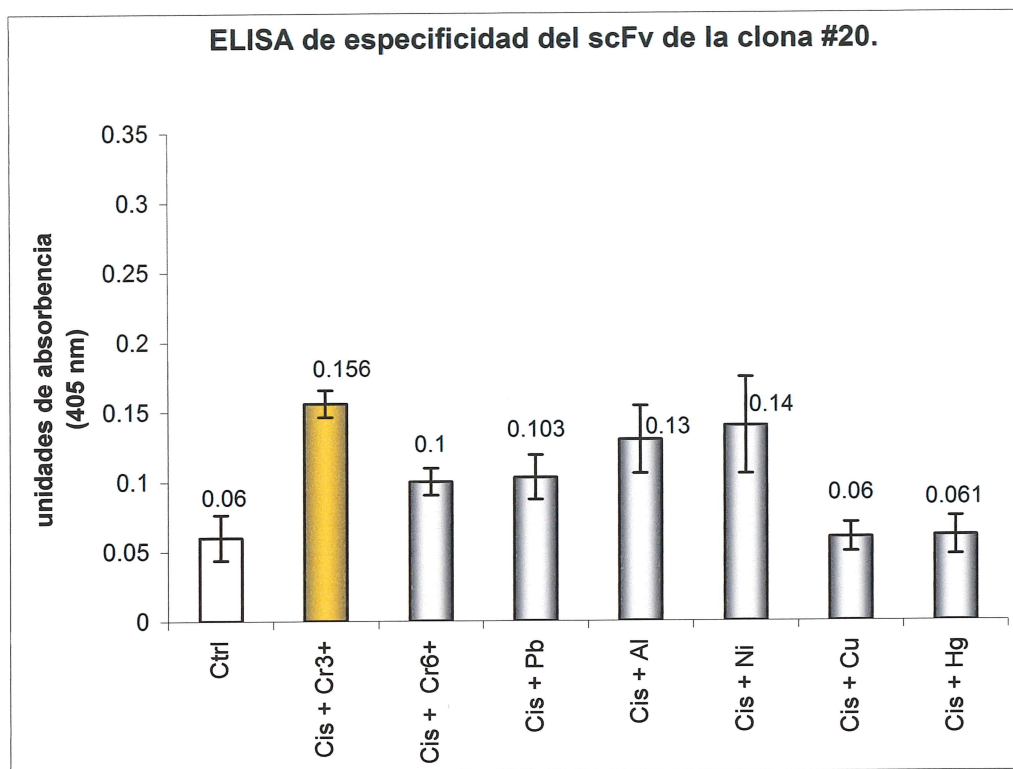


Figura 33: ELISA de especificidad con distintos metales del scFv de la clona #20 utilizando PBS de lavado a pH 6.0. Como control se utilizó cisteína (ctrl. eje X), como antígeno se utilizó cisteína 0.01 M unida con Cr^{3+} , Cr^{6+} , Pb^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , y Hg^{2+} a 0.001 M.

14. Determinación de sensibilidad del scFv monoclonal.

14.1 ELISA de sensibilidad del scFv monoclonal.

Los resultados del ELISA de sensibilidad (fig. 34), muestran que las unidades de absorbencia del ELISA se correlacionan con la cantidad de Cr^{3+} presente en la solución. La concentración más baja que detecta el scFv es de 0.005 mg/L de Cr^{3+} .

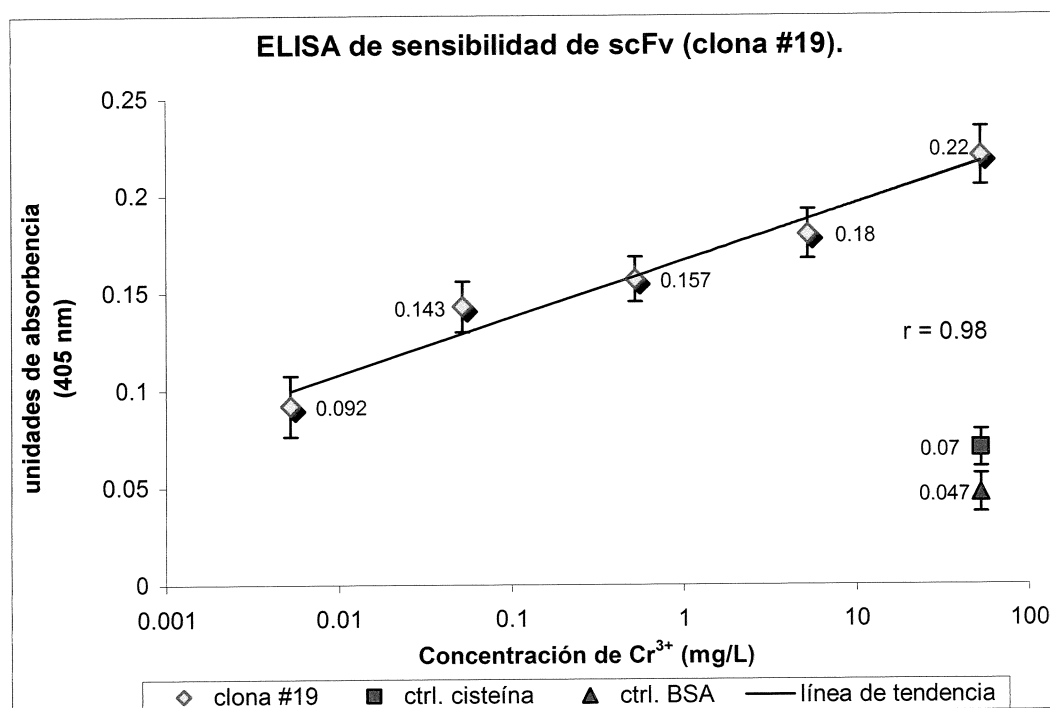


Figura 34: Análisis de sensibilidad por ELISA del scFv monoclonal de la clona #19. Como control se utilizó cisteína (rojo) y BSA (azul). Como antígeno se utilizó $\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$ a distintas concentraciones: 52, 5.2, 0.52, 0.052 y 0.005 mg/L de Cr^{3+} (naranja).

Tabla V: Valores obtenidos del ELISA de sensibilidad con distintas concentraciones de Cr^{3+} .

Cis+ Cr^{3+} mg/L	Media	Desviación estándar
52	0.22	0.0156
5.2	0.18	0.0131
0.52	0.157	0.0116
0.052	0.143	0.0126
0.0052	0.092	0.0146

14.2 Control positivo de sensibilidad por espectrofotometría de absorción atómica.

El control positivo (fig. 35) muestra que la cantidad de cromo que se une al scFv se relaciona con las unidades de absorbencia de cada dilución de Cr^{3+} obtenidos en el ELISA de sensibilidad. El scFv detecta con precisión 0.052 mg/L, similar a la cantidad máxima permisible de cromo total en agua potable y residual en México de 0.05 mg/L (NOM-127-SSA1-1994). El Cr^{6+} puede reducirse a Cr^{3+} , para poder determinar el cromo total (Ellis *et al.*, 2002; Erdem *et al.*, 2001).

El ensayo indica que a una concentración de 1.2 gramos de scFv se capturan hasta 2.94 mg/L de Cr^{3+} soluble, o bien específicamente para el ensayo: en 50 μL de scFv (60 μg) se capturan 0.147 μg de Cr^{3+} .

El coeficiente de correlación indica que el grado de asociación de la concentración de Cr^{3+} detectada por espectrofotometría de absorción atómica (control positivo), se relaciona con los valores del ELISA de sensibilidad, demostrando que el scFv bajo estas condiciones, puede detectar con precisión Cr^{3+} soluble a distintas concentraciones utilizando como presentador del metal a la cisteína.

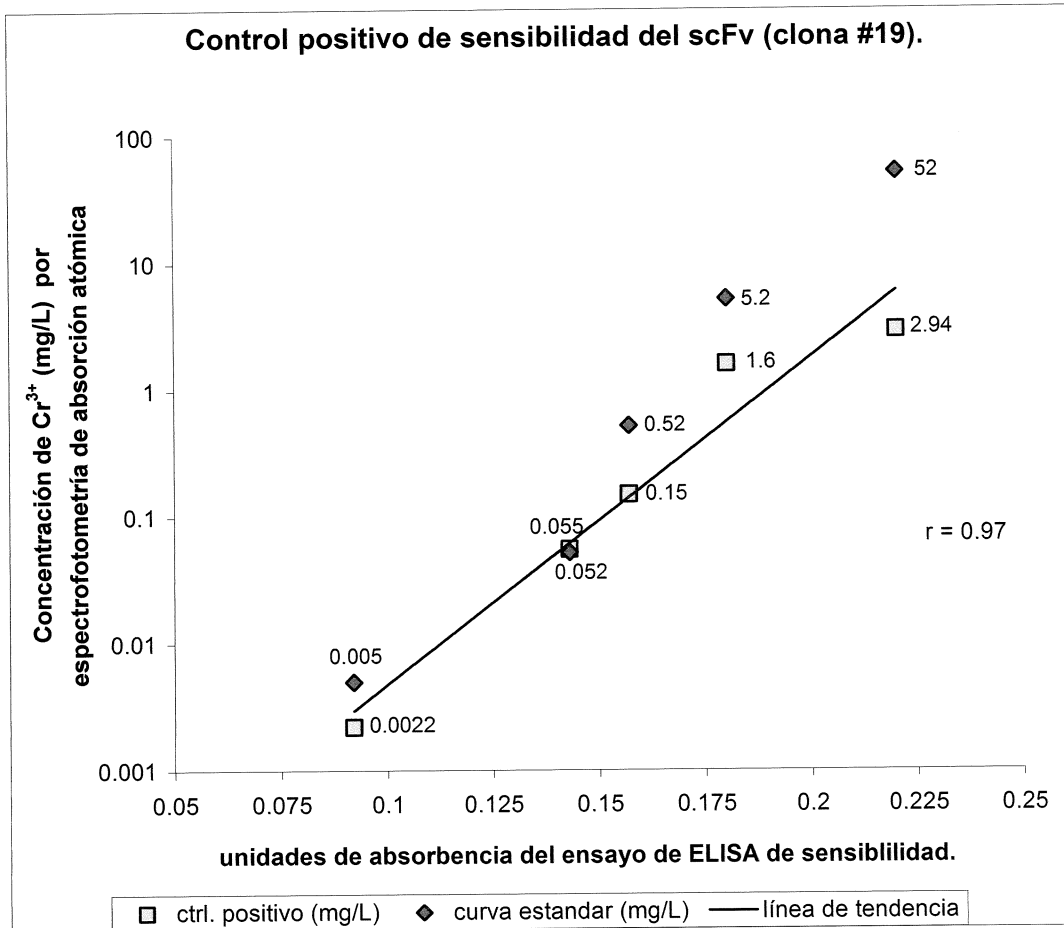


Figura 35: Determinación de la cantidad de cromo a distintas concentraciones unido al scFv monoclonal de la clona #19 por espectrofotometría de absorción atómica. La curva estándar (azul) se utiliza para determinar la cantidad de Cr^{3+} total presente en las muestras, para compararla con la cantidad de Cr^{3+} que se unió al scFv (control positivo). El control positivo (naranja), muestra la concentración de cromo detectada por espectrofotometría de absorción atómica que fue capturada por el scFv. El eje X son los valores en unidades de absorbancia del ensayo de ELISA (fig. 34) de sensibilidad, que relacionan la cantidad de Cr^{3+} detectado por espectrofotometría de absorción atómica (eje X; control positivo).

DISCUSIÓN:

A partir de una biblioteca de fragmentos variables de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) expresados en fagémidos con la técnica de despliegue de anticuerpos en fagos filamentosos, se seleccionó un scFv afín a Cr^{3+} utilizando a la cisteína como presentador del metal. El propósito principal del presente trabajo, fue el de producir una molécula capaz de detectar Cr^{3+} , que además funcionara para captar el metal de muestras contaminadas.

Los anticuerpos que detectan metales son escasos y se encuentran pocas citas de trabajos similares en la literatura, los disponibles han utilizado al ratón como sistema generador de anticuerpos y como método de selección de anticuerpos monoclonales, la técnica del hibridoma (Kohler *et al.*, 1975). No hay referencias sobre trabajos relacionados con la producción de anticuerpos contra metales en gallina, además de no haber reportes sobre el uso de la técnica de despliegue de anticuerpos en fagos filamentosos para la generación de anticuerpos contra metales; aunque, Lee y colaboradores (2002), informan sobre la generación de un fago filamentoso que se une a cristales de ZnS, la unión no es mediada por anticuerpos, en vez utilizan un péptido afín a este metal. La escasa variedad

de anticuerpos que reconocen metales, sugiere un campo disponible para el desarrollo de nuevas moléculas capaces de recuperar y detectar metales.

Se utilizó a la gallina como sistema productor de anticuerpos por la simplicidad en la construcción de bibliotecas de cadenas variables. El hecho que sólo se utilicen en la gallina seis juegos de cebadores para amplificar el fragmento scFv, es una gran ventaja si se compara con la construcción de bibliotecas de anticuerpos de humanos, de ratón y de conejo en los que se requiere del uso de más juegos de cebadores y más rondas de PCR para la obtención de bibliotecas completas (Andris-Widhopf *et al.*, 2000).

No obstante la disponibilidad de protocolos para la obtención de anticuerpos contra haptenos (Andris-Widhopf *et al.*, 2000; Harlow *et al.*, 1999), la generación y selección de anticuerpos afines al Cr^{3+} requirió de la estandarización de diversos protocolos para llevar a cabo un análisis eficiente y sensible de las muestras. Darwish y colaboradores (2002) hacen referencia al problema del uso de anticuerpos que reconocen metales, indicando que el metal a analizar, en principio, debe estar en forma soluble, además de encontrarse expuesto para que los anticuerpos lo reconozcan. No obstante si el metal de interés se encontrase acoplado a alguna matriz, se libera con un tratamiento ácido. Los análisis del cromo realizados en este trabajo fueron con concentraciones conocidas y con formas solubles.

La determinación de metales cuenta actualmente con técnicas muy eficientes, pero costosas. El ensayo por ELISA para detección de Cr^{3+} , se propone como un método alternativo, útil para detectar el metal arriba de su concentración permitida ($50 \mu\text{g/L}$) en México (NOM-127-SSA1-1994); el anticuerpo generado en este trabajo detecta hasta $5 \mu\text{g/L}$ de Cr^{3+} . Aunque el límite máximo permitido se refiere al cromo total que corresponde a las dos formas más comunes del cromo (Cr^{3+} y Cr^{6+}), el anticuerpo en teoría puede detectar ambas formas, ya que bajo condiciones reductoras el Cr^{6+} se reduce a Cr^{3+} (Ellis *et al.*, 2002; Erdem *et al.*, 2001), haciéndose disponible para que el scFv lo detecte.

Si comparamos los límites de sensibilidad de anticuerpos contra metales reportados, tenemos en los extremos a Blake y colaboradores (1998), informando sobre un anticuerpo de ratón con capacidad de detectar 2 mg/L de Pb^{2+} soluble, siendo poco sensible si se compara con el reportado por Wylie y colaboradores (1992), quienes informan sobre un anticuerpo de ratón que detecta hasta $0.2 \mu\text{g/L}$ de Hg^{2+} soluble. Los anticuerpos de ratón contra metales, generados con la técnica del hibridoma tienen distintas afinidades (Blake *et al.*, 1998; Blake *et al.*, 2001; Carlson *et al.*, 1996; Darwish *et al.*, 2002; Khosraviani *et al.*, 1998; Wylie *et al.*, 1992). El scFv generado con la técnica de despliegue de anticuerpos en fagos filamentosos, a pesar de no ser tan sensible como el publicado por Wylie y

colaboradores (1992), es lo suficientemente eficaz para detectar el metal en bajas concentraciones.

Paso 1. Preparación del antígeno.

Para la generación de anticuerpos contra Cr^{3+} y el Cr^{6+} se requirió de un acarreador que transportara al metal y lo expusiera al sistema inmune; el elegido fue el glutatión (Glu-Cys-Gly), tripéptido que en presencia de cromo se une en la cisteína (Wylie *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1994). Como segundo transportador se eligió a la hemocianina, importante en la generación de una respuesta inmunológica. En la literatura se sugiere la utilización de BSA en lugar de KLH (Wylie *et al.*, 1992). En este trabajo se utilizó KLH para evitar posibles falsos-positivos ya que el BSA se utiliza para bloquear sitios inespecíficos en placas de ELISA, en tubos eppendorff y en geles de poliacrilamida, además de su uso en la solución donde se diluyen los anticuerpos anti-IgG de gallina, anti-M13 y anti-HA.

El glutaraldehído unió en exceso el KLH con el glutatión produciendo la formación de pequeños grumos, a causa probable de la modificación en el tiempo de reacción que fue de 45 minutos en lugar de 30 minutos como se sugiere en el protocolo de Harlow *et al.*, (1999).

La cantidad de cromo que se analizó por espectrofotometría de absorción atómica fue importante para obtener la relación de la cantidad de moléculas de glutatión unidas a KLH. La relación muestra que el complejo con KLH-glutatión-Cr³⁺ tiene más glutatión que el complejo con Cr⁶⁺. Sin embargo, la cantidad de glutatión en ambos es la misma, pues la muestra partió de una misma fuente antes de unirse al cromo. Por lo tanto, el Cr³⁺ se une con mayor fuerza al glutatión que el Cr⁶⁺.

Paso 2. Inmunizaciones

En las primeras tres inmunizaciones, la presencia de pequeños grumos en el complejo KLH-glutatión-Cr causaron que la concentración inyectada del antígeno no fuera la deseada. Se procuró que en cada inmunización se inyectaran cantidades iguales al resuspender completamente la solución. La variación en la concentración no fue un problema en la producción de anticuerpos afines a Cr³⁺, sin embargo, para Cr⁶⁺ pudo ser una causa en la ausencia de anticuerpos.

En las últimas dos inmunizaciones, se redujo el complejo proteico para obtener una mayor afinidad por la molécula de cromo. Según Wylie *et al.* (1992), es posible la difusión rápida entre los tejidos de la gallina por la inyección de moléculas de bajo peso molecular. No obstante se probó en la 4ta inmunización al glutatión+Cr y en la 5ta inmunización a la cisteína+Cr en

ambas gallinas. No se determinó la cantidad de cromo que se unió a la cisteína o al glutatión, por la dificultad que representaba separar al cromo de una molécula con tan bajo peso molecular. La coloración que presentaba la cisteína y el glutatión después de añadirles cromo fue una referencia indirecta de la unión, además de lo descrito en la literatura acerca de la unión entre estas dos moléculas (Wylie *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1994).

Paso 3. Detección de anticuerpos en suero por ELISA.

Los resultados de cada inmunización se hicieron en placas de ELISA separadas; por esto, se observaron variaciones entre las absorbancias de cada una. Lo óptimo hubiera sido que al final de las cinco inmunizaciones se realizara un último ensayo con todas las muestras en una sola placa, sin embargo, no hubo suficiente suero para la realización de una placa final. A pesar de esto, los resultados mantienen una absorbencia similar entre sí, siendo de alta importancia los controles utilizados, debido a que fueron la referencia principal para la determinación de la afinidad hacia cromo.

Los análisis de los resultados fueron interpretados conforme a las absorbancias de controles. Como se indicó en los resultados, se hicieron dos controles en los ELISA, donde la cisteína fue un indicador importante para la determinación de la presencia de anticuerpos afines al cromo, debido a que fue el presentador del metal hacia los anticuerpos, además de

ser utilizado para indicar las poblaciones existentes de anticuerpos que reconocen a la cisteína y los que reconocen a la cis+Cr. Los resultados del suero preinmune fueron también un control muy importante, e igualmente, hay relación entre las absorbancias de cis+Cr y cisteína, donde se observa que el suero preinmune no reacciona con cisteína ni con cis+Cr, como se hubiera inferido sin la utilización de la cisteína sin cromo como control. Aunque la posibilidad de la reacción entre los anticuerpos del suero preinmune con el cromo es poco probable, se puede dar el caso, sin embargo, las diferencias nos muestran que no hubo reacción.

3.2.1 ELISA del suero de gallina para detección de anticuerpos contra Cr³⁺.

En la figura 13 se observa que en la 4ta y 5ta inmunización la afinidad hacia cis+Cr³⁺ aumenta y la afinidad hacia glutatión+Cr³⁺ decrece, estos resultados reflejan el acierto en la reducción del complejo en las inmunizaciones. El glutatión formó parte del antígeno de las primeras cuatro inmunizaciones y existió una alta afinidad por parte de los anticuerpos hacia esta molécula. Sin embargo, con la inyección de cis+Cr³⁺ en la 5ta inmunización aumentó la población de anticuerpos que reconocen a Cr³⁺.

A pesar de que la concentración de anticuerpos afines al Cr³⁺ no varió entre las inmunizaciones, se observó un aumento gradual en la presencia de anticuerpos entre cada ELISA. Del análisis de los resultados

obtenidos se determinó la existencia de anticuerpos anti+Cr³⁺ en el suero de las gallinas.

La interpretación de los resultados se hizo con base en la relación de las unidades de absorbencia del control contra el antígeno; aunque no hay un estándar para determinar cual es el valor de la absorbencia adecuado para determinar la cantidad de anticuerpos afines al antígeno de interés, generalmente, las unidades de absorbencia del control deben de ser de cinco a diez veces menores que las del antígeno (Barbas *et al.*, 2001; Harlow *et al.*, 1999; Diamandis *et al.*, 1996). Las gráficas de este ensayo muestran un aumento gradual en la población de anticuerpos que reconocen a la cis+Cr³⁺. Aunque se sabe que los anticuerpos reconocen tanto a cisteína como a cis+Cr³⁺, el suero preinmune, que es el control principal (fig. 12), se encuentra muy por debajo del valor del suero inmune.

3.2.2 ELISA del suero de gallina para detección de anticuerpos contra Cr⁶⁺.

Las absorbencias del suero inmune hacia cis+Cr⁶⁺ de cada inmunización, fueron constantes a partir de la 2da inmunización (fig. 14); sin embargo, si se comparan esas absorbencias contra el control se observa una tendencia errática en la diferencia de cada inmunización.

Al igual que el ELISA de Cr³⁺ (paso 3.2.1) los valores del suero inmune y preinmune de cada ensayo inmunoenzimático variaron. A pesar

de observarse absorbancias constantes de cis+Cr⁶⁺ en la figura 14, los anticuerpos también se unían a la cisteína. Sin la diferencia, se hubiera inferido la presencia de anticuerpos afines a la cis+Cr⁶⁺.

Las diferencias del suero inmune contra el suero preinmune (fig. 15), muestran que no hubo afinidad por parte de los anticuerpos hacia la cis+Cr⁶⁺. Las absorbancias de la 3er inmunización con suero inmune, muestran anticuerpos que están reconociendo a la cis+Cr⁶⁺, siendo la causa probable la presencia de anticuerpos que reconocían al Cr⁶⁺ en ese lapso de las inmunizaciones, o bien, un error en la realización del ELISA.

La interpretación de los resultados se hizo con base en la relación de las unidades de absorbencia del control contra el antígeno (Barbas *et al.*, 2001; Harlow *et al.*, 1999; Diamandis *et al.*, 1996), como se discutió en el paso (3.2.1).

Paso 4. Purificación de RNA total y síntesis de mRNA a cDNA.

4.1 Purificación de RNA total a partir de bazo de gallina.

Se obtuvo de la primera purificación de RNA total de bazo una pureza de 0.79, baja a lo esperado, ya que un RNA puro tiene valor de 2.0. Por esto, se repitió el protocolo de extracción con la misma muestra a partir de la adición de RNA stat (reactivo utilizado en la purificación del RNA, Tel-Test). Se obtuvo de la segunda purificación 1.36 mg de RNA total con una pureza de 1.69, que comparado con las cantidades de 6-7 mg de una extracción óptima según Barbas *et al.*, (2001), fue baja a lo esperado, pero suficiente para las cantidades que se ocupan para generar la biblioteca de cadenas variables.

4.2 Reacción RT-PCR.

El cDNA no se cuantificó, ya que la calidad de éste se verificó en la amplificación de cadenas variables ligeras y pesadas, basados según el protocolo descrito por Barbas *et al.*, 2001, donde una eficiente amplificación de las cadenas demuestra que el molde cDNA no se encontraba degradado.

Paso 5. Construcción de la biblioteca de DNA de scFv.

5.1 PCR de las cadenas variables ligeras (V_L) y pesadas (V_H).

Las cadenas variables ligeras y pesadas en el gel de agarosa (fig. 17), corresponden al tamaño descrito según Barbas *et al.*, (2001). Con la amplificación de las cadenas se determinó que la extracción de RNA y posterior síntesis a cDNA se hizo eficientemente. Se realizaron diversos PCR, debido a que el método de extracción de DNA del gel de agarosa no era muy eficiente. En la cámara de electroforesis se detectó que grandes cantidades de DNA permanecen en el filtro (Ultrafree-MC) y no en la solución.

5.2 PCR de traslape (DNA de scFv).

La unión de las cadenas variables ligeras y pesadas en el gel de agarosa (fig. 18) corresponden con el tamaño descrito según Barbas *et al.*, (2001). Al igual que el PCR de las cadenas variables, la extracción del DNA del gel de agarosa no fue muy eficiente, por lo que se realizaron diversos PCR, hasta obtener la concentración óptima de 5 µg (Barbas *et al.*, 2001).

Paso 6. Digestión y purificación del DNA de scFv y del vector pComb3X.

El vector digerido debe correr suficiente tiempo en el gel de agarosa para separar las bandas digeridas y poderlas extraer del gel. En las figuras 19 y 20 se observan las muestras de DNA digerido en una posición superior al control (DNA no digerido). Este fenómeno se puede explicar al entender las distintas formas en que se presenta el DNA: relajado, enrollado y superenrollado (Sambrook *et al.*, 2001). Como se observa en la figura 20 el control se encuentra en forma enrollada (~4800 pb) y en su forma superenrollada (arriba de la forma enrollada). Después del corte con *Sfi* I la banda enrollada se encuentra en forma relajada ya que la enzima de restricción abre el DNA y lo hace lineal, por lo tanto encuentra más resistencia en el corrido a través de los poros de la agarosa, esta banda es la que se tiene que recuperar del gel y no la superenrollada. Este caso se aplica igualmente en la digestión del DNA del scFv (figura 19) donde el DNA del scFv digerido se encuentra arriba del control.

6.1 Digestión y purificación del DNA de scFv.

La digestión del DNA de scFv con *Sfi* I se modificó del protocolo descrito por Barbas *et al.*, (2001). La incubación que se hizo fue de 12 horas en vez de 5 horas. La modificación se basó en la interpretación de muestras de DNA corridas en geles de agarosa (no mostrados), donde se observó

que la mayor parte del DNA digerido se encontraba en la misma posición que el control (DNA de scFv sin digerir), cuando se esperaba en una posición superior. La digestión se confirmó con una prueba de ligación (paso 7).

6.2 Digestión y purificación de pComb3X.

La digestión del DNA de pComb3X con *Sfi* I, se modificó del protocolo descrito por Barbas *et al.*, (2001), donde se utilizaron 12 U por μg de DNA, en vez de 6 U por μg y se dejó la reacción 12 horas en vez de 5 horas. Se determinó que el tiempo y la concentración de la enzima no cortaba en su totalidad el vector, ya que en gel de agarosa se observaron bandas de DNA muy tenues del fragmento despojado de 1650 pb, además de observarse gran parte del vector digerido en la misma posición que el control (pComb3X sin digerir). La digestión se confirmó con una prueba de ligación (paso 7).

Paso 7. Ligación del DNA de scFv en el vector de expresión pComb3X.

En la ligación se utilizó el protocolo descrito por Ausbel *et al.*, (1997), donde se recomiendan 10 U por cada μg de DNA, aunque en el protocolo de la casa comercial (Gibco) recomiendan 6 U por μg de DNA, los experimentos realizados en el laboratorio sugieren que la concentración descrita por Ausbel *et al.*, (1997), es la adecuada.

Paso 8. Producción de fagémidos expresando el fragmento de anticuerpo de cadena sencilla (scFv).

Los fagos producidos hasta esta etapa se les conoce como fagémidos sin selección, ya que representan toda la biblioteca de fragmentos de anticuerpos, que aún no han sido expuestos al antígeno de interés para su selección.

9. Rondas de selección con la biblioteca de scFv policlonales transportados en fagémidos.

Los fagos producidos en esta etapa representan solo una parte de la biblioteca de scFv's, al haber sido expuestos a selección con cis+Cr^{3+} . De esta manera, los fagémidos después de cada ronda de selección transportan una biblioteca de scFv's cada vez mas reducida que al final de las rondas, solo transporta scFv's afines al antígeno de interés. Barbas *et al.*, (2001), recomiendan hacer de cuatro a cinco rondas de selección antes de probar la afinidad de los fagémidos hacia el antígeno. Andris-Widhopf *et al.*, (2000), sugieren probar la afinidad de los fagémidos después de tres rondas de selección para acreditar la efectividad de las selecciones.

Paso 10. Detección del fagémido de interés con anticuerpos anti-M13 por ELISA y en resina cargada con Cr^{3+} .

10.1 Detección del fagémido de interés por ELISA.

10.1.1 ELISA de la primer biblioteca de fagémidos.

Los resultados de la primer biblioteca (fig. 21) muestran fagémidos que se unen a la cisteína, indicándonos la presencia de scFv's que reconocen específicamente al aminoácido. Los resultados de esta ELISA, fueron importantes para confirmar la presencia de la unión del Cr^{3+} con la cisteína, ya que los fagémidos que fueron seleccionados dejan de unirse a la cisteína cuando esta acoplada con el Cr^{3+} . Los fagémidos seleccionados de esta primer biblioteca no transportaban un scFv afín a la $\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$, en consecuencia no se realizaron más experimentos con estos fagémidos, pues no cumplieron con los objetivos de este trabajo.

10.1.2 ELISA de la segunda biblioteca de fagémidos.

Los resultados de la segunda biblioteca (fig. 22) muestran fagémidos afines a la $\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$, indicándonos la presencia de scFv's que reconocen específicamente al Cr^{3+} cuando está expuesto por la cisteína. Se puede observar que a pesar de haber más fagémidos afines hacia la $\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$, existen también afines hacia la cisteína, aunque en menor cantidad. En las primeras dos rondas de selección se observa un ligero aumento en la afinidad hacia $\text{cis}+\text{Cr}^{3+}$ que hacia cisteína, el dato concluyente se observa

hasta la tercer ronda de selección donde se muestra la alta afinidad del fagémido. Después de realizado el ELISA, se hizo una cuarta y quinta ronda de selección a partir de los fagémidos de la tercer ronda, sin embargo, la afinidad hacia Cr^{3+} se mantuvo constante y los valores de la cisteína aumentaron, debido a esto, se desecharon los fagémidos de estas selecciones y sólo se utilizaron los fagémidos de la tercer ronda de selección.

10.2 Detección del fagémido de interés de la segunda biblioteca en resina cargada con Cr^{3+} .

Corroborando lo descrito en el ELISA de los fagémidos de la segunda biblioteca (paso 10.1), se observa una afinidad muy intensa hacia el Cr^{3+} por parte de los fagémidos de la tercer ronda de selección, que fueron los elegidos para utilizarse en experimentos posteriores.

La detección con fagémidos afines al Cr^{3+} utilizando resina afin a metales, fue un método que requirió de estandarización. Se modificó el protocolo indicado por el proveedor para ajustarse al experimento de la siguiente manera: la resina que se encuentra en las columnas para cromatografía se cargó con Cr^{3+} y se utilizó inicialmente para seleccionar fagémidos en las rondas de selección, los resultados mostraron que los fagémidos seleccionados en la columna tenían baja afinidad por el Cr^{3+} . Posteriormente, se extrajo la resina de la columna y se utilizó para detectar

fagémidos afines al Cr^{3+} en tubos eppendorff. Los resultados obtenidos como método de detección fueron positivos y corroboraron lo observado en los ELISA; sin embargo, como se discute en el paso 11.2, esta técnica generó falsos-positivos en los ensayos de especificidad, siendo la causa la presencia de 6 histidinas expresadas junto con el scFv.

Paso 11. Determinación de especificidad de fagémidos de la tercer ronda de selección en presencia de distintos metales.

11.1 ELISA de especificidad de fagémidos.

En los resultados del ensayo inmunoenzimático de especificidad de los fagémidos de la tercer ronda de selección (fig. 24 y 25), se observan distintas afinidades hacia otros metales. Los resultados no fueron los deseados, ya que el objetivo de este trabajo es el de obtener anticuerpos que detecten cromo de muestras donde este presente. La interacción con otros metales sugiere que hay fagémidos que transportan scFv's que no son afines al cromo. Considerando que los fagémidos transportan scFv's policlonales, es posible la existencia de fagémidos inespecíficos y específicos a otras moléculas como Pb^{2+} , Hg^{2+} y Ni^{2+} .

11.2 Especificidad de fagémidos utilizando resina unida a distintos metales.

La utilización de la resina afín a metales en la determinación de especificidad (fig. 25), muestra indirectamente la unión inespecífica de alguna proteína del fagémido hacia el metal Pb^{2+} y hacia el Al^{3+} . La utilización de los fagémidos de la primer biblioteca como control, se introdujo al ensayo debido a que se sospechaba la unión inespecífica de alguna proteína del fagémido con el Pb^{2+} ; el fagémido control no se une al Cr^{3+} como se muestra en los resultados (10.1.1). Los datos muestran que la inespecificidad se da por la interacción de alguna proteína que no es el scFv.

Paso 12. Expresión de scFv monoclonales en *E. coli* TOP10F'.

La eficiencia de transformación de la electroporación del vector pComb3X de la tercer ronda de selección en *E. coli* TOP10F', no se determinó por no ser necesario, únicamente se seleccionó la placa que presentaba colonias separadas que pudieran extraerse para posterior expresión de scFv monoclonales (Andris-Widhopf *et al.*, 2000; Barbas *et al.*, 2001).

Fue muy importante que en el crecimiento de los cultivos existiera suficiente espació para el intercambio de oxígeno con las bacterias, pues se observó con otros cultivos que el dejar menos del 75% de aire en los tubos o matraces producía una baja expresión del scFv.

Los scFv purificados de cada clona se igualaron en concentración a 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, con el fin de comparar eficientemente los scFv afines a cis+Cr³⁺ en el ELISA de afinidad. Dado que los valores de las absorbencias se relacionan directamente con la concentración del scFv, como con la unión hacia el antígeno, entre más anticuerpos estén presentes mayor va a ser la absorbencia (Hudson *et al.*, 1980). Aunque no se sabía cual es la concentración óptima a utilizar, se probó esta dilución.

Paso 13. Determinación de afinidad y especificidad de scFv's monoclonales.

13.1 ELISA de afinidad de scFv's monoclonales.

Los resultados de la fig. 28 muestran scFv's con distintos tipos de afinidad tanto a cis+Cr^{3+} , como a cisteína, tal y como se esperaba por lo observado en los resultados de la segunda biblioteca de fagémidos (fig. 22). Se hace referencia a esta biblioteca ya que los scFv's monoclonales son los de la tercer ronda de selección, esto significa que esta presente la misma población de scFv's de esa ronda de selección, solo que ahora se está probando cada scFv por separado (monoclonal), cuando con los experimentos con fagémidos se analizaban scFv policlonales.

13.2 Detección de scFv's monoclonales por medio de Western blot.

El tamaño aproximado de los scFv's es de ~25 kDa. Se esperaba un tamaño de aproximadamente 32 kDa, valor obtenido de la suma de los aminoácidos expresados del gen. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que la región *ompA* se degrada en su viaje al periplasma (Barbas *et al.* 2001), dando como resultado una proteína de menor masa al tamaño esperado.

13.3 ELISA de especificidad de scFv monoclonales.

Se determinó indirectamente la interacción de las 6 histidinas, utilizando distintos pH en los amortiguadores de lavado (fig. 30 y 31). El pH determina en gran medida la interacción de las histidinas con el Ni^{2+} (principal metal utilizado para la unión de las histidinas para la purificación de proteínas recombinantes), cuando éste se encuentra acoplado a agentes quelantes (Gu *et al.*, 1994; Schmitt *et al.*, 1993). El principal metal que interaccionaba con el scFv después del Cr^{3+} fue el Pb^{2+} ; por esto, se probó inicialmente la interacción con Pb^{2+} a distintos pH. Los resultados muestran que la presencia del pH no disminuyó la interacción del Pb^{2+} de los scFv de las clonas #15 y 18, pero sí de los scFv de las clonas #19 y #20, esto nos indica indirectamente que la unión inespecífica de las clonas #15 y #18 se debe a la baja afinidad del scFv hacia el Cr^{3+} ; en cambio, las clonas #19 y 20 bajaron su interacción con el Pb^{2+} , indicio de que el pH inhibe la interacción inespecífica, pero mantiene constante la alta afinidad hacia Cr^{3+} .

La afinidad del scFv hacia el Cr^{3+} decrece en más de un 50% cuando se lava con amortiguador de fosfatos a pH 6.0, corroborando lo descrito por Wylie *et al.*, (1992). El manual de métodos para resina afín a metales de Amersham Pharmacia Biotech #17-0408-01, describe que el pH disminuye la unión de metales con las histidinas hasta que a pH 3.5 el metal se separa de la matriz que lo expone. La disminución en la afinidad de las histidinas

hacia los metales a pH 6.0 se da probablemente por el $pK_R = 6.0$ del grupo imidazol de la histidina, que a pesar de estar presente en forma dipolar no tiene carga neta (Nelson *et al.*, 2000).

Para corroborar lo observado se probó la especificidad de las clonas #19 y 20 con otros metales. La fig. 32 muestra que el scFv monoclonal de la clona #19 es muy afin hacia el Cr^{3+} , ya que todos los demás metales se mantienen en un intervalo muy similar al control. Aunque a pH 6.0 se determinó indirectamente la causa de la interacción del scFv con los metales, los resultados muestran que la inespecificidad disminuye para el caso del scFv de la clona #19, pero no para el scFv de la clona #20, indicando que este scFv es inespecífico.

Paso 14. Determinación de sensibilidad del scFv monoclonal.

Los resultados del ELISA de sensibilidad, junto con el control positivo determinado por espectrofotometría de absorción atómica, muestran que las unidades de absorbencia del ELISA se correlacionan con la cantidad de Cr^{3+} presente en la solución (fig. 35). La cantidad mínima que detecta el scFv es de 5 μg de Cr^{3+} soluble, corroborando con el control positivo, donde a esta concentración, solo 2.2 $\mu g/L$ de Cr^{3+} se unen al scFv. Más de la mitad del Cr^{3+} no se une al scFv, este comportamiento se observó en 4 de 5 muestras, debido a que el PBS de lavado a pH 6.0 esta inhibiendo la unión

del Cr^{3+} en más de un 50% (fig. 30 y 31), corroborando lo descrito por Wylie *et al.*, (1992). Los valores se mantienen en un intervalo mas o menos constante y aunque para detectar con precisión una cantidad determinada se requiere estandarizar el método, los resultados demuestran que el anticuerpo es muy sensible y que puede utilizarse para recuperar el Cr^{3+} de muestras donde este presente.

CONCLUSIONES

1. Se logró inducir la respuesta humoral en gallina Leghorn blanca para la producción de anticuerpos afines a cisteína+Cr³⁺ después de cinco inmunizaciones.
2. Los fagémidos que transportaron la primer biblioteca de scFv fueron afines hacia cisteína.
3. Los fagémidos que transportaron la segunda biblioteca de scFv fueron afines hacia Cr³⁺.
4. Se purificaron scFv monoclonales de 20 clonas, donde siete fueron afines a cisteína y trece fueron afines a Cr³⁺.
5. Se seleccionó un scFv monoclonal de alta afinidad y especificidad hacia Cr³⁺. La sensibilidad del scFv fue de hasta 5 µg/L en ensayo de ELISA.
6. Por cada 1.2 gramos de scFv monoclonal se capturan hasta 2.94 mg/L de Cr³⁺ soluble.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Abbas A., Lichtman A., Pober J. 1997. Cellular and Molecular Immunology. 3rd Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia. pp 494.
2. Anderson R., Cheng N., Bryden N., Polansky M., Chi J., Feng J. 1997. Elevated intakes of supplemental chromium improve glucose and insulin variables in individuals with type 2 diabetes. Diabetes. 46: 1786-1791.
3. Anderson R., Bryden N., Polansky M. 1997. Lack of toxicity of chromium chloride and chromium picolinate in rats. Journal of the American College of Nutrition. 16(3): 273-279.
4. Andris-Widhopf J., Rader C., Steinberger P., Fuller R., Barbas III. 2000. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. Journal of Immunological Methods. 242: 159-181.
5. Ausbel F., Brent R., Kingston R., Moore D., Seidman J., Smith J., Struhl K. 1997. Short Protocols in Molecular Biology. 3rd Ed. John Wiley & Sons. New York pp. 569.
6. Barbas III C., Burton D., Scott J., Silverman G. 2001. Phage Display a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. pp. 710.

7. Barbas III C., Kang A., Lerner R., Benkovic S. 1991. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *National Academic Science*. 88: 7978.
8. Beyersmann D. 2001. Chromium (III) and DNA damage. *Environmental Health Perspective*. 109(6): 250-257.
9. Blake D., Blade R., Khosraviani M., Pavlov A. 1998. Immunoassays for metal ions. *Analytica Chimica Acta*. 376: 13-19.
10. Blake D., Pavlov R., Yu H., Kohoraviani M., Ensley H., Blake R. 2001. Antibodies and antibody-based assays for hexavalent uranium. *Analytica Chimica Acta*. 444 (1): 3-11.
11. Blowes D. 2002. Tracking hexavalent Cr in groundwater. *Science*. 295: 2024-2025.
12. Campbell A., Smith M. A., Sayre L. M., Bondy S.C., Perry G. 2001. Mechanisms by which metals promote events connected to neurodegenerative diseases. *Brain Research Bulletin*. 55: 125-132.
13. Carlson L., Holmquist B., Ladd R., Riddell M., Wagner F., Wylie D. 1996. Immunoassay for mercury in seafood and animal tissues. In: *ACS Symposium Series. Immunoassay for Residue Analysis: Anaheim, CA*. 621: 388-394.

14. Cerulli J., Grabe D., Gauthier I., Malone M., McGoldrick M. 1998. Chromium picolinate toxicity. *The Annals of Pharmacotherapy*. 32: 428-431.
15. Cotton F.A., Wilkinson G., 1981. *Química Inorgánica Avanzada*. John Wiley & Sons. New York. pp. 559-560, 851-865.
16. D'Agostini F., Izzotti A., Bennicelli C., Camoirano A., Tampa E., De Flora S. 2002. Induction of apoptosis in the lung but not in the liver of rats receiving intratracheal instillations of chromium (VI). *Carcinogenesis*. 23(4): 587-593.
17. Darwish I., Blake D. 2002. Development and validation of a one-step immunoassay for determination of cadmium in human serum. *Analytica Chimica Acta*. 74 (1): 52-58.
18. Diamandis E., Christopoulos T. 1996. *Immunoassay*. Academic Press. London. pp. 51-82.
19. Eaton A., Clesceri L., Greenberg A. 1995. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association. pp 750.
20. Ellis A., Johnson T., Bullen T. 2002. Chromium isotopes and the fate of hexavalent chromium in waste water. *Science*. 295: 2060-2062.

21. Erdem M., Altundogan H., Ozer A., Tumen F. 2001. Cr (VI) reduction in aqueous solutions by using synthetic iron sulphide. *Environmental Technology*. 22(10): 1213-1222.
22. Gu J., Stephenson C., Ladarola M. 1994. Recombinant proteins attached to a Ni-NTA column: use in affinity purification of antibodies. *Biotechniques*. 17: 257-262.
23. Harlow E., Lane D. 1999. *Using Antibodies, a Laboratory Manual*. 3rd Ed. Cold Spring Harbor. New York. pp. 495.
24. Hudson L., Hay F. 1980. *Practical Immunology*. 2nd Ed. Blackwell Scientific Publication. New York. pp. 187.
25. Huse W.D., Sastry L., Iverson S.A., Kang A.S., Alting-Mees M., Burton D.R., Benkovic S.J., Lerner R.A. 1989. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science*. 246:1275-1281.
26. Jakubke Hans-Dieter, Jeschkeit H. 1994. *Concise Encyclopedia of Chemistry*. Walter de Gruyeter. London. pp. 222-226.
27. Khosraviani M., Paulov A., Flowers R., Blake D. 1998. Detection of heavy metals by immunoassays: optimization and validation of a rapid, portable assay for ionic cadmium. *Environmental Science and Technology*. 32 (1):137-142.

28. Khosraviani M., Blake R., Paulov A., Lorbach S., Yu H., Delehanty T., Briechbiel M., Blake D. 2000. Binding properties of a monoclonal antibody directed toward lead-chelate complexes. *Bioconjugate Chemistry*. 2: 267-277.
29. Kohler G., Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256: 495-497.
30. Lee S., Mao C., Flynn C., Belcher A. 2002. Ordering of Quantum Dots Using Genetically Engineered Viruses. *Science*. 296: 892-895.
31. Madeiros M., Rodrigues A., Batoreu M., Laires A., Rueff J. 2003. Elevated levels of DNA-protein crosslinks and micronuclei in peripheral lymphocytes of tannery workers exposed to trivalent chromium. *Mutagenesis*. 18(1): 19-24.
32. Marth E., Jelovcan S., Kleinhappl B., Gutschi A., Barth S. 2000. The effect of heavy metals on the immune system at low concentrations. *International Journal Occupational Medical Environmental Health*. 14 (4): 375-386.
33. McCormack W., Tjoelker L., Thompson C. 1993. Immunoglobulin gene diversification by gene conversion. *Nucleic Acids Research*. 45: 27-33.
34. Mertz W. 1993. Chromium in human nutrition: A review. *Journal of Nutrition*. 123: 626-633.

35. Nelson D., Cox M. 2000. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd Ed. Worth Publishers. New York. pp. 116-119.
36. NOM-127-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana, "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-limites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Secretaria de Salud.
37. Rader C., Barbas III, C. 1997. Phage display of combinatorial antibody libraries. *Current opinions in Biotechnology*. 8: 503-505.
38. Reynaud C., Anquez V., Grimal H., Weill J. 1987. A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell*. 48: 397.
39. Ruegger M. 1995. Lung diseases due to metals. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*. 125: 467-474.
40. Sambrook J., Russell D. 2001. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
41. Schmitt J., Hess H., Stunneberg C. 1993. Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Molecular Biology Reports*. 18: 223-230.
42. Schweitzer C., Carlos L., Holmquist B., Ridell M., Wylie D., 1994. Enzyme-Linked immunoassay (ELISA) for the detection of mercury in environmental matrices. In: *The Tenth Annual Waste Testing and Quality Assurance Symposium*, Arlington, VA. pp. 275-292.

43. Smith G.P. 1985. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228: 1315-1317.
44. Speetjens J., Collins R., Vincent J., Woski S. 1999. The nutritional supplement chromium (III) tris (picolinate) cleaves DNA. *Chemical Research Toxicology*. 12(6): 483-487.
45. Telisman Spomenka. 1995. Interactions for essential and/or toxic metals and metalloids regarding interindividual differences in susceptibility to various toxicants and chronic diseases in man. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*. 46: 459-476.
46. Wasser W., Feldman N., D'Agati V. 1997. Chronic renal failure after ingestion of over-the-counter chromium picolinate. *The Annals of Pharmacotherapy*. 126(5): 410-415.
47. Westhoff C., Lopez O., Goebel P., Carlson L., Carlson R., Wagner F., Schuster S., Wylie D. 1999. Unusual Amino Acid Usage in the Variable Regions of Mercury-Binding Antibodies. *Proteins* 37: 429-440.
48. Wiley D., Lu D., Carlson L., Carlson R., Babacan K., Schuster S., Wagner F., 1992. Monoclonal antibodies specific for mercuric ions. *Immunology*. 89: 4104 – 4108.

49. Yang J., Merritt K., 1994. Detection of antibodies against corrosion products in patients after Co-Cr total joint replacements. *Journal of Biomedical Materials Research*. 28: 1249-1258.

APÉNDICE:

- **Acetato de sodio:** Disolver acetato de sodio 3 M en H₂O_d y ajustar a pH 5.2 con ácido acético glacial. Autoclavar y almacenar a T° ambiente.
- **Agarosa:** Disolver agarosa al % requerido en buffer TAE y calentar en microondas hasta que solución este transparente. Dejar enfriar hasta ~50°C, agregar 2 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL) y transferir a molde de la cámara de electroforesis donde se deja solidificar.
- **Amortiguador de electroforesis para geles de poliacrilamida 10X:** Disolver tris base 0.25 M pH 8.3, glicina 1.92 M y SDS al 1%, en H₂O_d. Diluir 1:10 en H₂O_d antes de usarse. Almacenar a 4°C.
- **Amortiguador de elusión para Ni-NTA:** Disolver Na₂HPO₄ 0.01 M, NaCl 0.5 M e imidazol 350 mM, en H₂O_d. Filtrar en membrana de 0.45 µm y almacenar a 4°C.
- **Amortiguador de lavado para Ni-NTA:** Disolver Na₂HPO₄ 0.01 M, NaCl 0.5 M e imidazol 20 mM, en H₂O_d. Filtrar en membrana de 0.45 µm y almacenar a 4°C.
- **Amortiguador de lavado para resina afin a metales:** Disolver Na₂HPO₄ 0.02 M y NaCl 0.5 M, en H₂O_d, ajustar a pH 7.2 con NaOH. Filtrar en membrana de 0.45 µm y almacenar a 4°C.

- **Amortiguador salino de fosfatos (PBS) 1X (0.01 M, pH 7.4):** Disolver NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 12 mM, KH₂PO₄ y 1.2 mM, en H₂O. Ajustar a pH 7.4 con HCl. Autoclavar y almacenar a 4°C.
- **Amortiguador salino de fosfatos con tween 20 (PBST):** Adicionar tween 20 al 0.05 % a PBS 1X, Almacenar a 4°C.
- **Amortiguador de transferencia (TB) para Western blot:** Disolver tris base 25 mM y glicina 192 mM, en H₂O con metanol al 20%. Prepararlo fresco (día de uso) y utilizarlo a 4°C.
- **Amortiguador TAE 10X:** Disolver tris base 40 mM en H₂O, con 11.4 mL de ácido acético y 10 mL de EDTA 0.5 M (pH 8.0). Almacenar a 4°C.
- **Amortiguador tris salino (TBS):** Disolver 50 mM de Tris – HCl pH 7.5, NaCl 150mM, en H₂O. Autoclavar y almacenar a 4°C.
- **Ampicilina:** Solución stock 50 mg/mL en agua desionizada. Esterilizar con filtros de 0.22 µm y almacenar a -20°C.
- **Bromuro de etidio:** Solución stock 10 mg/mL, disolver en agitación, tapar con aluminio y almacenar a T° ambiente.
- **BSA en PBS:** Disolver el BSA al % requerido en amortiguador de fosfatos (PBS). Esterilizar con filtros de 0.22 µm. Almacenar a -20°C.

- **Cloruro de Calcio (CaCl_2):** Disolver $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 1 M en H_2O d. Esterilizar con filtros de $0.22 \mu\text{m}$ y almacenar a -20°C .
- **Cloruro de Cromo (CrCl_3):** Solución stock CrCl_3 0.1 M en H_2O d. Almacenar a 4°C .
- **Dietanolamina al 10%:** Disolver dietanolamina al 10% en H_2O d, con 0.02% de azida de sodio y $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ $0.5 \mu\text{M}$.
- **Ditiotreitol (DTT):** Disolver ditiotreitol 0.1 M en acetato de Na 0.01 M (pH 5.2). Esterilizar con filtros de $0.22 \mu\text{m}$ y almacenar a 4°C .
- **Etanol:** Disolver etanol grado molecular en H_2O libre de nucleasas a consideración del % requerido. Almacenar a -20°C .
- **Gel de poliacrilamida al 10%:**
 - Gel de corrido 10% (running gel): 2.5 mL H_2O d; 3.75 mL de amortiguador de corrido (RGB; tris base 0.75 M pH 8.8; SDS 0.2%); 5 mL de A/MBA; 25 μL de Temed 1:10 y 75 μL de persulfato de amonio.
 - Gel de separación 5% (stacking gel): 2.5 mL H_2O d; 3.75 mL de amortiguador de separación (SGB; tris base 0.25 M pH 6.8; SDS 0.2%); 1.25 mL de A/MBA; 25 μL de Temed 1:10 y 75 μL de persulfato de amonio.
- **Glicerol:** Solución stock al 100%. Autoclavar y almacenar a 4°C .

- **Hidróxido de sodio (NaOH):** Solución stock NaOH 10 M en H₂O_d. Almacenar a T° ambiente.
- **Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG):** Solución stock IPTG 0.5 M en H₂O_d. Esterilizar con filtros de 0.22 μm y almacenar a -20°C.
- **Kanamicina:** Solución stock 50 mg/mL en agua desionizada. Esterilizar con filtros de 0.22 μm y almacenar a -20°C.
- **LB (Luria Bertani) medio:** Disolver 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, y 5 g de NaCl en 1 L de H₂O_d. Autoclavar y almacenar a 4°C.
- **LB agar:** Disolver 11 g de bacto agar en 1 L de LB. Calentar en el microondas hasta que el agar disuelva y posteriormente autoclavar. Mientras la mezcla aún se encuentra a ~50°C adicionar antibiótico (opcional) y dispensar en cajas petri para que solidifique.
- **Oxido de Cromo (CrO₃):** Solución stock CrO₃ 0.1 M en H₂O_d. Almacenar a 4°C.
- **Persulfato de amonio:** Disolver 40 mg en 0.25 mL de H₂O_d. Preparar fresco para geles de poliacrilamida.
- **Poliacrilamida A/MBA (acrilamida / metilenbisacrilamida):** Disolver en H₂O_d 30% de acrilamida y 0.86% de MBA. Almacenar a T° ambiente.
- **Polietilenglicol 8000 (PEG):** Disolver NaCl 2.5 M en H₂O_d con PEG 8000 al 20%. Agitar solución en termoplato hasta disolver. Autoclavar y almacenar a 4°C.

- **Sample Buffer 2X SDS-PAGE:** Disolver en 10 mL de H₂O, 2 mL de SDS al 10%, 6 mL de glicerol, 1 mL de 1M Tris-HCl pH 6.8, y 1.2 mg de azul de bromofenol. Opcional: 0.4 mL de 2-Mercaptoetanol ó 620 mg de DTT. Almacenar a -20°C.
- **SB (super broth) medio:** Disolver 32 g de triptona, 20 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, y 5 mL de NaOH 1N en 950 mL de H₂O. Mezclar solución hasta disolver en microondas, ajustar a pH 7.0 con NaOH 10 M, y aforar a 1 L con H₂O. Autoclavar y almacenar a 4°C. Opcional: Agregar 10 g de MOPS (3 [N-Morfolino] ácido propanosulfónico) en vez de NaCl y NaOH.
- **SOC medio:** Disolver 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl, 186 mg de KCl en 950 mL de H₂O. Mezclar solución hasta disolver en microondas, ajustar a pH 7.0 con NaOH 10 M, y aforar hasta 990 mL. Autoclavar, y cuando haya enfriado añadir 10 mL de MgCl₂ 1M (esterilizado por filtración). Por cada 50 mL de SOC añadir 1 mL de glucosa 1 M (esterilizado por filtración) y almacenar a 4°C.
- **Solución de elusión:** Disolver en H₂O glicina 0.2 M, ajustar a pH 2.2 con HCl concentrado. Esterilizar con filtros de 0.22 µm y almacenar a 4°C.
- **Substrato para la fosfatasa:** Adicionar al amortiguador de dietanolamina al 10% pH 9.8, 1 mg/mL de p-nitrofenil fosfato (Sigma). Preparar antes de adicionar a la reacción.

- **Substrato para la peroxidasa:** En 450 mL ácido cítrico 0.05 M pH 4.0, disolver 100 mg de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico] sal diamónica) y esterilizar con filtros de 0.22 μm . Tapar frasco con aluminio y almacenar a 4°C. Añadir 12 μL de H_2O_2 al 30% poco antes de la reacción.
- **TEMED (tetrametiletilendiamina) 1:10 :** Adicionar 1 mL de TEMED en 9 mL de H_2O . Almacenar a T° ambiente.
- **Tetraciclina:** Solución stock 10 mg/mL, disolver en etanol grado molecular. Esterilizar con filtros de 0.22 μm y almacenar a -20°C.