

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



PROTEÍNAS RECONOCIDAS POR UN FRAGMENTO
VARIABLE DE CADENA SENCILLA (scFv) DE GALLINA
DIRIGIDO EN CONTRA DE *Xylella fastidiosa*

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGO

presenta:

Paulo César Álvarez Delgado

Ensenada, Baja California, 31 de Julio de 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

PROTEÍNAS RECONOCIDAS POR UN FRAGMENTO VARIABLE DE CADENA SENCILLA

(scFv) DE GALLINA DIRIGIDO EN CONTRA DE *XYLELLA FASTIDIOSA*

TESIS PROFESIONAL

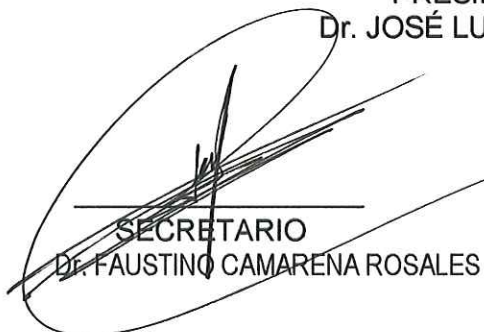
QUE PRESENTA

PAULO CÉSAR ÁLVAREZ DELGADO

APROBADO POR:



PRESIDENTE DEL JURADO
Dr. JOSÉ LUÍS STEPHANO HORNEDO



SECRETARIO
Dr. FAUSTINO CAMARENA ROSALES



ter. VOCA
M.C. MIGUEL HUMBERTO CARRILLO MENDÍVIL

DEDICATORIA

A Elma Yolanda y José Luís, mis Padres, que desde pequeño me inculcaron
el deseo de observación y la capacidad de asombro;
y a mi hermana, Carolina.
Pienso en ustedes. Siempre.

A mi abuelita Beatriz y a mi abuelito César;
nunca olvidaré la casa de mis abuelitos.

A los maestros, José Luís Stephano Hornedo y Meredith Gould Chambers.

AGRADECIMIENTOS:

A mis Papás, José Luís y Elma Yolanda.

Gracias Mamá por todo tu apoyo y todos tus consejos...

Gracias Papá por todo lo que me has enseñado...

Los quiero mucho y significan mucho para mí.

A los maestros Dr. José Luís Stephano Hornedo y Dra. Meredith Gould Chambers, por haberme enseñado a ser un científico, por ser maestros y buscadores de la verdad. Gracias por su ejemplo, su apoyo y por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

A Laura, por haberme acompañado en uno de los periodos mas turbulentos de mi vida. Gracias por haber estado conmigo en mis malos momentos, y mejor aun, por acompañarme en los buenos. Te quiero.

Al Dr. Stephano y a la fundación PRODUCE / SAGARPA por haberme otorgado beca de investigación para el proyecto "Enfermedad de Pierce: Propuesta para su identificación y control"

RESUMEN:

Resumen de la Tesis de Paulo César Álvarez Delgado presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología.
Ensenada, Baja California, México. 31 de Julio de 2006.

Proteínas Reconocidas por un Fragmento Variable de Cadena Sencilla (scFv) de Gallina Dirigido en Contra de *Xylella fastidiosa*

Resumen aprobado: _____

PRESIDENTE DEL JURADO
DR. JOSÉ LUÍS STEPHANO HORNEDO

El objetivo de este trabajo fue determinar el antígeno al cual se le une un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) de 33 kDa construido a partir de genes de Ig de una gallina inmunizada con células de PD *Xylella fastidiosa* STL. Se utilizaron dos estrategias para la detección del antígeno; una fue recuperar el antígeno por afinidad para epítopes conformacionales, y la otra estrategia fue para detectar antígenos con epítopes lineales por inmunotransferencia. La estrategia de afinidad se dividió en purificación del antígeno con anticuerpo libre y anticuerpo acoplado. Para la purificación del antígeno con anticuerpo acoplado se construyó una columna en la cual se unió covalentemente el grupo amino primario del scFv a un éster activado unido a una matriz de agarosa. La purificación por afinidad con anticuerpo libre consistió en la adición de scFv a una solución de *X. fastidiosa* STL obtenida por disrupción celular con ultrasonido y en la recuperación del inmunocomplejo formado por el scFv y su antígeno. Para las inmunotransferencias se prepararon soluciones de *X. fastidiosa* y se transfirieron a nitrocelulosa. Se utilizó el scFv como anticuerpo primario y anti 6 histidinas como anticuerpo secundario. Sorprendentemente, en todos los experimentos el anticuerpo monoclonal se unió a varias proteínas, por lo que se supone que: a) el epítipo consiste en una región conservada en estas proteínas; b) el hecho de que no se obtuvieron resultados iguales en réplicas de experimentos (pero siempre hubo antígenos recuperados), sugiere un problema metodológico; ó c) que sean proteínas oligoméricas desnaturalizadas. Las proteínas obtenidas con mayor frecuencia fueron de aproximadamente 139, 100, 65, 40, 38 (sólo en inmunoblots) y 19 kDa.

ABSTRACT

The objective of this investigation was to determine the antigen recognized by a 33 kDa single chain fragment variable constructed from Ig genes from a chicken immunized with PD *Xylella fastidiosa* STL. Two main strategies were used: an affinity purification strategy for conformational epitopes, and Immunoblots for linear epitopes. The affinity strategy was subdivided into free and bonded scFv. For the bonded scFv purification a column was constructed in which the primary amino group of the scFv was covalently linked to an active ester united to agarose. The free scFv affinity experiment was the addition of free scFv to a *X. fastidiosa* solution obtained by cell disruption by sonication, and the recovery of the immunocomplex by affinity competition with Imidazol. For the immunoblots, *X. fastidiosa* solution was transferred to nitrocellulose, and then marked with scFv as primary antibody and anti-6his as secondary antibody. In all the experiments the scFv recognized various antigens. This could be the result of: a) a conserved epitope recurring in all the antigens; b) a methodological error or c) oligomeric denatured proteins. The proteins that showed more frequency were 139.6, 100, 65.1, 40.1, 38 (only found in immunoblots) and 19 kDa.

ÍNDICE

Página de aprobación.....	I
Dedicatoria	II
Agradecimientos.....	III
Resumen.....	IV
Resumen traducido a inglés.....	V
Índice.....	VI
Índice de figuras	VIII
Índice de tablas	IX
Introducción.....	1
Antecedentes.....	7
Metodología.....	12
cultivos de <i>Xylella fastidiosa</i>	12
PCR de <i>X. fastidiosa</i> con RST31 Y RST33.....	13
PCR <i>Xf</i> con 27F y 139R.....	14
análisis de restricción de <i>Xf</i>	15
disrupción celular de <i>Xf</i> con ultrasonido.....	16, 48
expresión del scFv en <i>Pichia pastoris</i>	16
purificación y cuantificación del scFv.....	18
construcción de columna AffiGel®10 con scFv acoplado	18, 51
sonicación de <i>Xf</i> y recuperación del antígeno con AffiGel10.....	54

tinción de plata.....	56
inmunotransferencias.....	57
experimentos con scFv soluble y Ni-NTA™	19, 61
geles SDS-PAGE.....	54
Resultados.....	20
PCR.....	20
Expresión de scFv	22
recuperación del antígeno con columna de afinidad.....	24, 54
cantidad de scFv acoplado a AffiGel10.....	23
SDS-PAGE de muestras de AffiGel10.....	23
inmunotransferencias.....	26
experimentos con scFv libre y Ni-NTA.....	27
Discusión.....	32
Conclusiones.....	39
Literatura citada.....	41
Anexos.....	49
Técnicas utilizadas.....	49
Glosario.....	64
Abreviaciones.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: PCR con cebadores RST31 y RST33	20
Figura 2: Análisis de restricción con <i>EcoRI</i> y <i>KpnI</i> , de producto de PCR con cebadores 27F y 139R	21
Figura 3: Gel SDS-PAGE con scFv purificado	22
Figura 4: Gráfica de absorbancia de n-hidroxisuccinamida	23
Figura 5: Gel con Affigel™ 10 resuspendida en SB	25
Figura 6 y 7: Película de rayos X de inmunotransferencias	26
Figura 8: Tinción de plata de antígenos recuperados con scFv soluble	27
Figura 9, 10 y 11: Tinciones de plata de antígenos recuperados con scFv soluble	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I ^a y 1 ^b : Pesos moleculares hipotéticos de antígenos obtenidos con dioxano	24
Tabla II: Pesos moleculares hipotéticos de antígenos obtenidos con scFv soluble	27
Tabla III ^a , III ^b y III ^c : Pesos moleculares hipotéticos de antígenos obtenidos con scFv soluble	28
Tabla IV ^a , IV ^b y IV ^c : Pesos moleculares hipotéticos de antígenos obtenidos con scFv soluble	29
Tabla V ^a , V ^b y V ^c : Pesos moleculares hipotéticos de antígenos obtenidos con scFv soluble	30
Tabla VI ^a , VI ^b y VI ^c : Pesos moleculares hipotéticos de antígenos obtenidos con scFv soluble	31

INTRODUCCIÓN

Xylella fastidiosa (Wells et al. 1987) es una bacteria gram-negativa del grupo γ de las proteobacterias que coloniza al xilema de plantas angiospermas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Aunque puede multiplicarse en la mayoría de las plantas inoculadas, produce enfermedades de importancia económica en algunas de ellas; tales como la Clorosis Jaspeada en cítricos (CVC de "citrus variegated chlorosis"), la quemadura de hoja en el café y la Enfermedad de Pierce (EP) en la uva. *X. fastidiosa* es un fitopatógeno limitado al xilema (Purcell et al. 1996) y cuando ataca a la vid (*Vitis vinifera*) se desarrolla en la planta la EP de la cual eventualmente mueren (Van Sluys et al. 2003). En la mayoría de los casos cada enfermedad es producida por una cepa específica para un huésped; se conocen más de 46 cepas (Hendson et al. 2001). Los genomas de la cepa CVC *X. fastidiosa* 9a5c y PD *X. fastidiosa* Temecula, que son cepas que han causado fuertes epidemias, comparten un 98% de sus genes (Simpson et al. 2000), los cuales presentan un 95% de homología en la secuencia de aminoácidos dentro de sus marcos de lectura (Van Sluys et al. 2003).

Las diferencias genómicas entre PD *X. fastidiosa* Temecula y CVC *X. fastidiosa* 9a5c se limitan a reordenamientos cromosomales asociados a secuencias introducidas por bacteriófagos. La cepa CVC *X. fastidiosa* 9a5c

tiene secuencias típicas del grupo λ de los bacteriófagos (Bhattacharyya et al. 2002). El genoma de PD *X. fastidiosa* Temecula se compone de un cromosoma circular de 2,519,802 pb y de un plásmido pXFPD1.3 (1,345 pb). Otras desigualdades notables entre estas dos cepas son la ausencia del plásmido pXF51 en la cepa PD *X. fastidiosa* Temecula y una diferencia de 159,503 pb (Van Sluys et al. 2003). Ambas cepas tienen genes con marcos de lectura fuera de posición o con codones de alto dentro de un gen. Por ejemplo, el gen del precursor de la poligalacturonasa (enzima responsable de la biosíntesis de enzimas citolíticas) está interrumpido por un codón de alto en la cepa CVC *X. fastidiosa* 9a5c, mientras que en PD *X. fastidiosa* Temecula está intacto (Van Sluys et al. 2003); lo que podría explicar la naturaleza más agresiva de esta última cepa. Adicionalmente, cepas de *X. fastidiosa* aisladas de uvas enfermas e inoculadas en almendros sanos produjeron quemadura de hoja del almendro o ALSD, mientras que la cepa ALSD *X. fastidiosa* obtenida de almendros enfermos no ocasionó EP en la uva (Almeida et al. 2003).

X. fastidiosa sólo prolifera en superficies muertas (Chen et al. 2002), ya sea en los conductos de células muertas del xilema del huésped o sobre la cutícula de quitina del vector en el que se transporte. Esta bacteria es transmitida por varios insectos del orden Homóptera (Homóptera, Cicadellidae, subfamilia cicadellinae) y Cercópidae (Hill et al. 1995), transportándose en el intestino anterior, especialmente en el precibarium (canal alimenticio) y en el

cibarium (cámara de bombeo), en donde se adhiere por medio de proteínas y exopolisacáridos secretados en los polos de las células de *X. fastidiosa*. Estos insectos voladores, conocidos comúnmente como chicharritas, se alimentan succionando la savia de plantas creando un intercambio de líquidos entre el aparato succionador del insecto, el estilete y el xilema de la planta, permitiendo que la bacteria entre en el flujo del líquido xilemal. Dentro del insecto las células bacterianas se adhieren al intestino anterior adoptando una disposición polar (Newman et al. 2004), por medio de polímeros proteicos llamados pili y por secreciones de exopolisacáridos del tipo de la goma de xantano producido por bacterias del género *Xanthomonas* (Doorn et al. 1999). Con esta forma de agregación polar exponen una mayor área a la fuerza de las corrientes creadas por el flujo de la savia ingerida por el vector, promoviendo de esta manera que las células de *X. fastidiosa* se desprendan de la cutícula del vector y se disuelvan en la savia.

La eficiencia de transmisión de *X. fastidiosa* por un vector varía en relación a la combinación entre vector, huésped, y cepa de *X. fastidiosa*. Para una transmisión eficiente de vector a huésped se necesitan menos de 200 células de *X. fastidiosa* viables por insecto (Redak et al. 2004). La infección de las plantas puede darse una vez que haya transcurrido el periodo de latencia, que es el tiempo entre la adquisición de la bacteria por un vector y la transmisión a una planta; el cual puede ser un lapso relativamente corto. La

chicharrita de alas cristalinas *Graphocephala atropunctata*, que es un vector asociado con la EP y con la ALSD, tiene un periodo de latencia de 2 horas. Una vez infectados estos vectores pueden seguir transmitiendo a la bacteria por varios meses (Redak et al. 2004), hasta la siguiente ecdisis, ya que pierden a las bacterias unidas a las células de la cutícula vieja (Newman et al. 2004). El hecho de que raramente se observen otras bacterias dentro del intestino anterior de estos vectores sugiere que *X. fastidiosa* tiene adaptaciones especiales para adherirse y sobrevivir en estos tejidos.

Es probable que las cepas de *X. fastidiosa* PD y CVC hayan surgido recientemente ya que se ha cultivado *in vitro* en el sur de California desde 1770; y la primera epidemia fue hasta 1880, y en Asia no se ha reportado CVC a pesar de los miles de años que tienen de citricultura (Chen et al. 2002). Generalmente la eficiencia de adquisición de la bacteria por el vector está directamente relacionada con la concentración de células de *X. fastidiosa* dentro de una planta, con un límite inferior de 10^4 células bacterianas por gramo de tejido vegetal. Poblaciones de *X. fastidiosa* en una planta con números de individuos menores que este límite pueden no transmitirse a otras plantas. Para que un vector se infecte de *X. fastidiosa* al alimentarse de la uva, la concentración de las células bacterianas debe de ser mayor que 10^{6-7} por gramo de tejido vegetal (Redak et al. 2004). La habilidad de *X. fastidiosa* para poder colonizar el xilema de alguna planta en especial y llegar a dichos niveles poblacionales está

directamente relacionada con su expresión genética, en especial la que controla la composición de la membrana externa; por lo que es necesario el estudio de la composición de la superficie externa de la bacteria, particularmente el de carbohidratos y proteínas de membrana involucradas en la invasión de plantas.

Dentro de la planta *X. fastidiosa* se adhiere al xilema por medio de una película bacteriana (biofilm) secretada e interfiere con el flujo de la savia causando un estrés hídrico a la planta (Meng et al. 2005). La savia es baja en moléculas nutritivas. Consiste principalmente de agua, aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares; y contiene las concentraciones más diluidas de carbono y nitrógeno dietético que cualquier otro tejido en la planta (Redak et al. 2004). El biofilm de *X. fastidiosa* contiene un exopolisacárido llamado *fastidian* que secuestra cationes de la savia diluyéndola aun más (Osiro et al. 2004). Los vectores que transportan a *X. fastidiosa* se nutren exclusivamente de savia (Redak et al. 2004) y deben alimentarse constantemente volando de planta en planta para conseguir su requerimiento energético (Raven et al. 2002); por lo que se eleva la probabilidad de que se den epidemias causadas por esta bacteria.

La EP es una de las amenazas más fuertes a la vitivinicultura en el estado de Baja California, en donde actualmente hay más de 17,000 has. de vid y se produce un 90 % del vino elaborado en México al año. En 1995 la EP fue identificada en el Valle de Guadalupe por el INIFAP. En Ensenada ha destruido

más de 150 has., encontrándose hasta con un 20% de incidencia en plantas del Valle de Guadalupe (Guevara 2003); en donde pone en riesgo 3000 has. de vid con un valor potencial aproximado de 125 millones de pesos. *X. fastidiosa* ha sido identificada como la bacteria responsable de muchas pérdidas de cultivos de vid en el estado de California, y en Brasil ha provocado epidemias devastadoras en cítricos, encontrándose hasta en un 90% de los huertos de São Paulo (Lambais et al 2000).

En esta investigación se utilizó la cepa PD *X. fastidiosa* STL aislada del Valle de Napa, donde también se han sufrido fuertes pérdidas de cultivos a causa de esta bacteria. Es importante el estudio de PD *X. fastidiosa* STL por que es una de las cepas más agresivas (Van Sluys et al. 2003). Por medio de técnicas de Biología Molecular se han desarrollado anticuerpos recombinantes dirigidos en contra de *X. fastidiosa* que pueden ser utilizados para varios fines, como para la detección o control de la Enfermedad de Pierce (Stephano y col., datos no publicados). En esta investigación se proponen los pesos moleculares relativos de antígenos proteínicos que fueron reconocidos, de soluciones de proteínas totales solubles de *X. fastidiosa*, por un scFv de gallina dirigido en contra de PD *X. fastidiosa* STL.

ANTECEDENTES

Al igual que *Pseudomonas syzygii* y *Clavibacter xyli*, *X. fastidiosa* es un fitopatógeno limitado al xilema (Purcel et al. 1996). Dentro de los vectores en que se transporta, forma una monocapa polar de células por medio de interacciones electroestáticas entre proteínas de superficie (positivas) localizadas en los polos de los bacilos y la pared celular quitinizada (negativa) de las células del intestino anterior del vector (Lambais et al. 2000). Aunque también hay datos que indican que forma densos agregados celulares en la entrada del esófago (Hill et al. 1995). Dentro de sus huéspedes, *X. fastidiosa* se transporta por el xilema para colonizar regiones basales de la planta, donde obstruye el flujo de la savia al formar densos agregados de biofilm.

En el ciclo de vida de *X. fastidiosa* se pueden diferenciar tres tipos de interacciones celulares involucrados en la infección. Estas son las interacciones célula-célula, célula-vector y célula-huésped. En todas estas interacciones se emplea una batería de proteínas involucradas en eventos como quimiotaxis, movilidad, secreción o adhesión; algunas de ellas se sintetizan exclusivamente en un lugar o momento en especial y pueden ser imprescindibles para la bacteria (Newman et al. 2004). Como es de imaginarse, muchas de estas proteínas utilizadas en la interacción con el medio exterior están expuestas, por

lo que en el caso de presentar células de *X. fastidiosa* a un sistema inmune, estas moléculas probablemente funcionarían como inmunógenos (Simon et al. 1996).

Por medio de técnicas de biología molecular se han construido anticuerpos recombinantes dirigidos en contra de *X. fastidiosa*. En este trabajo se utilizó un fragmento variable de cadena sencilla (proporcionado por el laboratorio de biología celular y molecular A-9 de la Facultad de Ciencias) construido a partir de secuencias de inmunoglobulinas que resultó en un scFv (Single Chain Fragment Variable) de 33 kDa que contiene la secuencia de identificación universal Myc y una secuencia de polihistidinas (6 His) introducida para su purificación y localización. Este anticuerpo recombinante fue construido a partir de genes de anticuerpos obtenidos al inmunizar una gallina con células fijadas de PD *X. fastidiosa* STL, y seleccionados para especificidad con la técnica de Despliegue de Anticuerpos en Bacteriófagos (Phage Display) realizada en el laboratorio de biología celular y molecular A-9 de la Facultad de Ciencias por alumnos bajo la dirección del Dr. J. L. Stephano. La determinación del antígeno de *X. fastidiosa* reconocido por este scFv puede ayudarnos a entender más sobre la biología de membrana de la bacteria y en especial sobre su patogenicidad.

El uso de medios activados para acoplar proteínas ha sido utilizado para el estudio de antígenos. Caldwell y Kuo (Caldwell et al. 1977) utilizaron un medio activado (Affi-Gel[®]10) para unir un anticuerpo y purificar un antígeno de *Chlamydia trachomatis*. Así mismo se puede acoplar el scFv dirigido en contra de *X. fastidiosa* al Affi-Gel[®]10 para elaborar una columna de afinidad en donde se puedan circular soluciones de proteínas de *X. fastidiosa* para purificar al antígeno. El enlace formado entre el anticuerpo y el gel Affi-Gel[®]10 se da por un ataque nucleofílico al éster unido a agarosa por grupos amino primario (del anticuerpo), dando origen a un enlace amídico estable.

La hipótesis de la cual partió esta investigación es que el scFv reconoce a su antígeno, formando un inmunocomplejo, por medio de atracciones electrostáticas. La unión entre anticuerpo y antígeno se da por distintas interacciones no covalentes en donde moléculas individuales de agua, CDR y epítipo interactúan de una manera muy particular (Davies et al. 1996). El CDR del anticuerpo se encuentra distribuido en 6 regiones no contiguas de las cadenas pesada y ligera, por lo que si el anticuerpo presenta una conformación natural podrá reconocer a su antígeno. Por otra parte, el scFv dirigido en contra de PD *X. fastidiosa* STL utilizado en esta investigación contiene, en su cadena pesada, una secuencia de polihistidinas (6 histidinas continuas) que tienen afinidad por el níquel. Con esta secuencia de polihistidinas se puede purificar el

inmunocomplejo (scFv::antígeno de *Xf*) atraído por níquel unido a una matriz de agarosa (Ni-NTA™), lo cual permite analizar al antígeno, que es el objetivo de esta investigación. Existen varias técnicas de disrupción celular que permiten obtener proteínas totales solubles (Harlow et al. 1999), de donde se puede purificar el antígeno de *X. fastidiosa*.

Algunos vectores presentan periodos de latencia muy cortos o nulos, lo que podría significar que la bacteria no necesita reproducirse dentro del vector para que se dé la transmisión (Redak et al. 2004). La chicharrita *Draeculacephala minerva*, el vector que transmite tanto a la cepa PD como a la STL de *X. fastidiosa*, transmite menos eficientemente a uva que *Graphocephala acropunctata*, mientras que al alimentarse de alfalfa ocurre lo contrario (Redak et al. 2004). Esto sugiere que cada cepa tiene adaptaciones especiales para colonizar un huésped en específico, aunque el vector que la transporte es un factor importante en la eficiencia de transmisión.

Una vez dentro de la planta *X. fastidiosa* interactúa por medio de proteínas de membrana con las células muertas del xilema antes de adherirse y multiplicarse. Utilizando sistemas de control transcripcional como el de los homólogos *pilS* y *pilR*, y sistemas de quimiotaxis como el de los genes *pilG,H,I,J* y *chpA* (Simpson et al. 2000), *X. fastidiosa* produce las moléculas necesarias

para la infección cuando el medio exterior es el apropiado. Los genes *pilS* y *pilR* contienen la información genética necesaria para sintetizar proteínas que forman un sistema de censo y control de transducción de genes de subunidades de pili tipo IV (Simpson et al. 2000).

Los pili son organelos formados por polímeros filamentosos conformados de varios tipos de subunidades de una pequeña proteína llamada pilina, de aproximadamente 19 kDa. En *E. coli* se conocen 9 subunidades de pilina de secuencia similar. Esta proteína está presente en muchas bacterias gram-negativas (Pugsley, 1993) y ha exhibido propiedades antigénicas al utilizarse como inmunógeno para desarrollar anticuerpos monoclonales de alta especificidad (Doorn et al. 1999). Ahora se sabe que los pili ayudan en la formación del biofilm que *X. fastidiosa* utiliza para adherirse, y recientemente se ha publicado que los pili les confieren movilidad por vibraciones a las células de *X. fastidiosa* dentro del xilema (Meng et al. 2005); en donde se desplaza con una velocidad aproximada de 5 μm por min., en contra del flujo de la savia, o sea, con una dirección basipétala. Todos estos tipos de proteínas de membrana, además de ser posibles antígenos, podrían ser utilizados para interferir con el ciclo de vida de este fitopatógeno.

METODOLOGÍA

1. Preparación de medio de cultivo PD2 para *Xylella fastidiosa*.

Para los cultivos líquidos y sólidos de *X. fastidiosa* se utilizó medio PD2 (Davis et al. 1980^b): Para 1 L de agua se agregaron 4 g tryptona, 2 g soytona, 1 g citrato de sodio, 1 g de succinato de sodio, 0.01 g de cloruro de hemina (se preparara una solución madre de 0.1% de cloruro de hemina en 0.05 N de hidróxido de sodio), 1 g sulfato de magnesio heptahidratado, 1.5 g fosfato de potasio dibásico, 1 g fosfato de potasio monobásico; para medio sólido se agregaron 15 g de Gelrite™ de Invitrogen™. Se esterilizó en autoclave por 15 minutos.

2. Cultivo de *X. fastidiosa* en cajas petri.

Se inocularon 50 µL de *X. fastidiosa* STL en placas de PD2/Gelrite™ y se dejaron crecer por 4 a 7 días a 28°C. *X. fastidiosa* generalmente presenta un crecimiento lento ya que tiene una fase de latencia mayor de 4 días (Campanharo et al. 2002), las placas que presentaron crecimiento en 2 días o menos se descartaron.

3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de PD *X. fastidiosa* STL.

Se realizaron 2 tipos de PCR: uno con los cebadores RST31 (5'-GTGTAAGTTTGAACACCGTCGTGG-3') y RST33 (5'-CACCATTCGTATCC -

GGTG-3') específicos para *X. fastidiosa* (Minsavage et al. 1994), para verificar su presencia; y otro PCR en el cuál se amplificó una secuencia conservada de ADNr 16S y se le realizó un análisis de restricción con *EcoRI* y *KpnI*, para comparar entre las cepas Baja, Temecula y STL de *X. fastidiosa* y *Escherichia coli*.

PCR con RST31 Y RST33 (protocolo basado en la descripción por Minsavage 1994). La amplificación de PCR se realizó en un termociclador de ADN (modelo Perkin-Elmer Thermocycler) con *Taq* ADN polimerasa (Qiagen PCR core Kit). Se prepararon reacciones individuales (50 μ L) que contenían amortiguador de amplificación 1X (Qiagen PCR core Kit), 100 μ M de cada nucleótido (dNTP), 50 μ M de cada oligonucleótido, 1.25 U *Taq* ADN polimerasa y una colonia de *X. fastidiosa* resuspendida en 1 μ L de agua libre de endonucleasas. El amortiguador de amplificación contenía el cloruro de magnesio. Los cebadores (primers), nucleótidos (dNTP), el amortiguador de amplificación y *Taq* ADN polimerasa se diluyeron en agua libre de endonucleasas, en hielo, dentro de tubos para PCR y se cubrieron con aproximadamente 50 μ L de aceite mineral. Para la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa con los cebadores RST31/RST33, primero se desnaturalizó el ADN a 94°C en el termociclador por 3 min., seguido por 40 ciclos de PCR de desnaturalización a 95°C por 30 seg., alineamiento de cebadores a 55°C por 30 seg., y extensión a 72°C por 1 min., y finalmente, enfriamiento a 4°C por tiempo indefinido. Las reacciones de PCR se mezclaron

10:1 con amortiguador de carga (sample buffer) y se cargaron en geles de agarosa NuSieve™ al 2% (50 mL TAE, 1 g de agarosa y 5µL de bromuro de etidio) con 5µL de marcador de peso molecular Mass Ruler™ DNA (Fermentas™). Los geles se corrieron en una cámara para electroforesis a 80 V por 1hr. Se fotografiaron en una cámara de rayos ultravioleta con película (Polaroid™). Ver resultados en página 20.

PCR y análisis de restricción de secuencia 16S amplificada con cebadores “universales” 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 139R (5'-GACGGGCGGTGTGTAC-3'). La extracción de ADN se realizó con “MoBio Ultraclean™ Microbial DNA Isolation Kit”, a excepción del ADN de la cepa STL el cual fue obtenido agregando una colonia aislada a la reacción de PCR. Para la amplificación de PCR se utilizó el kit de Qiagen™ HotStart®. En un tubo de microcentrífuga se mezcló una solución con 25 µL de HotStart® master mix (contiene la *Taq* ADN polimerasa y magnesio divalente), 0.5 µL de cada cebador (27F y 139R, quedaron a una concentración final de 0.2 µM cada uno) y 23 µL de agua libre de endonucleasas. Se agregó una colonia de bacteria, se centrifugó para bajar la muestra y se colocó en un Termociclador de ADN (Perkin-Elmer Thermocycler) con el siguiente programa: 95°C por 15 min 95°C por 30 seg, 55°C por 45 seg y 72°C por 105 seg, por 25 ciclos, 72°C por 10 min y 4°C por tiempo indefinido. Se tomó una muestra de 6 µL y se analizó en un gel al 2% de agarosa NuSieve™ con Bromuro de etidio (50 mL TAE, 1 g de

agarosa y 5 μ L de bromuro de etidio) a 100 V por aproximadamente 1 hr, para verificar que el control negativo no presentara ninguna banda en la cámara de UV.

Análisis de restricción de los genes amplificados. Se realizó la digestión del producto de PCR con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI*. Se prepararon reacciones de digestión de la siguiente manera: 8 μ L de producto de PCR, 2 μ L de amortiguador para digestión (TAE), 0.2 μ L de BSA, 1 μ L de *EcoRI*, 1 μ L de *KpnI*, 8 μ L de agua; y se incubaron a 37°C por 1 hr. Las muestras de digestión se analizaron en un gel de agarosa NuSieve™ al 1% con bromuro de etidio (50 mL TAE, 0.5 g de agarosa y 5 μ L de bromuro de etidio) con 5 μ L de marcador de peso molecular Mass Ruler™ DNA (Fermentas™) a 80 V por aproximadamente 1 hr. y se fotografió en una cámara de rayos UV con película (Polaroid™). Ver resultados en página 21.

4. Cultivo de *X. fastidiosa* en medio líquido PD2.

Las cajas PD2/Gelrite® con *X. fastidiosa* cepa PD STL (comprobadas por PCR, y por observación de patrón de crecimiento y morfología de colonia) se utilizaron para realizar un preinoculo tomando una colonia de la caja con asa o palillos estériles y se transfirieron, en esterilidad, a medio PD2 líquido a 28°C y se mantuvo con agitación esporádica (cada 72 horas) manual.

5. Disrupción celular con ultrasonido (sonicación).

Los cultivos de *X. fastidiosa* en PD2 se utilizaron para obtener el antígeno por medio de acción mecánica con ultrasonido. La recolección de células se realizó con centrifugación a 4°C en una ultracentrífuga sorval RC 5B PLUS a 5500 rpm. El paquete celular fue resuspendido en 1 mL de PBS 1X (el PBS 10X es 137mM de cloruro de sodio, 2.7 mM de cloruro de potasio, 4.3 mM de fosfato de sodio dibásico heptahidratado y 1.4 mM de fosfato de potasio monobásico) pH 7.4 a 4°C y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Se resuspendió el paquete celular (diluyéndolo ~ 1:10) en amortiguador de lisis RIPA (150 mM cloruro de sodio, 1% NP-40, 0.5% Deoxicolato de sodio, 0.1% duodecil sulfato de sodio, 50 mM TRIS; pH 8). La disrupción celular se realizó con 4 ciclos de 30" ultrasonido / 30" hielo en un sonicador "Probe Cut Sonicator Microson™ XL2500" a máxima potencia. Después de remover las células intactas y proteínas insolubles, la muestra se ajustó a pH ~7 y se utilizó para los análisis del antígeno.

6. Expresión del scFv.

El scFv se expresó con el paquete comercial Pichia Easy Select Expression Kit, y se siguieron las indicaciones descritas por la casa comercial Invitrogen. Para el preinoculo, se cultivó *Pichia pastoris* en placas de YPD/Zeocine™ a 50 µg/µL (1% Extracto de levadura, 2% Peptona, 2% Dextrosa, 2% Agar y 100µL/mL de Zeocine™ en 1 L de agua) a 28°C en ausencia de luz por 3 a 6 días. Se tomó

una colonia obtenida por selección con Zeocine™ y se resuspendió en 25 mL de medio BMGY (10g de extracto de levadura, 20g de Peptona, 100mL 1M amortiguador de fosfato de potasio pH 6, 100 mL 10x YNB [34g base nitrogenada de levadura, 100g de sulfato de amonio], 2 mL de biotina a 0.02%, 100 mL de glicerol al 10% aforado a 1 L agua) se cultivó a 30°C por aproximadamente 12 a 24 hrs., hasta una densidad óptica de 4 a 6 a 600 nm. Se concentraron las células por centrifugación en una centrífuga (Sorval RC 5B PLUS) a 4500 rpm, 4°C por 20 min. y se pasó a un frasco con un volumen de BMMY (sustituir el glicerol del BMGY por metanol, 100 mL de metanol al 5%) de tal manera que quedó a una densidad óptica de aproximadamente 1. Se incubó a 30°C con agitación por 5 a 7 días con inducciones cada 24 hrs de metanol al 100%, de tal manera que la concentración final fuera del 0.6%.

Para recuperar el scFv soluble, se descartaron las células y se utilizó el paquete comercial de recuperación de polihistidinas de Ni-NTA™ (Invitrogen™) y se siguieron las indicaciones de la casa comercial. El paquete de Ni-NTA con scFv acoplado se transfirió a una columna de exclusión por afinidad de Bio-Rad. Se lavó con 10 mL de amortiguador de lavado (50 mM fosfato de sodio monobásico, 300 mM de cloruro de sodio, 20 mM Imidazol; pH 8.0) 4°C, y se separó el níquel de las seis histidinas con 200 µL de amortiguador de elusión (50 mM fosfato de sodio monobásico, 300 mM cloruro de sodio, 500 mM Imidazol; pH 8.0) 4°C. Cada elusión se dejó 10 min. antes de recolectarse. Las

muestras se dializaron con amortiguador salino PBS y se confirmó la presencia del scFv en geles de SDS-PAGE 10% teñidos con azul de coomasie. La cuantificación del scFv se realizó midiendo su absorbancia con un espectrofotómetro Spectronic™ 21 a 280 nm de longitud de onda. El scFv se guardó a – 20°C ó se utilizó directamente en experimentos de análisis del antígeno. Ver resultados en página 22.

7. Acoplamiento del scFv a AffiGel®10: Acoplamiento del grupo amino primario del scFv a AffiGel®10 (“AffiGel®10 and 15 Activated Affinity Media” de BioRad™)

El scFv purificado se utilizó para construir una columna para recuperar al antígeno con el scFv inmóvil. Con esta técnica se separó al antígeno circulando soluciones de proteínas de *X. fastidiosa* en una columna con el scFv unido covalentemente a agarosa por un enlace amídico. Para la separación del inmunocomplejo se utilizó dioxano y amortiguador de muestra. Los resultados se analizaron en geles de poliacrilamida. La descripción detallada del experimento se encuentra en los anexos, bajo la sección de técnicas. Ver resultados en páginas 23, 24 y 25.

8. Inmunotransferencias.

Se obtuvo una muestra de proteínas totales de *X. fastidiosa* STL por disrupción celular con ultrasonido. Las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida

al 10% con duodecil sulfato de sodio, el marcador de peso molecular utilizado fue Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas™). El gel se transfirió a nitrocelulosa en presencia de amortiguador de transferencia, que contiene Tris Base 0.025 M, glicina 0.192 M, duodecil sulfato de sodio 0.0013 M y metanol al 20%, pH 8.3. Para bloquear sitios inespecíficos se utilizó amortiguador de bloqueo TBST 5% con leche en polvo. El TBST es Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Tween 0.1% V/V. Como primer anticuerpo se agregó scFv 1:1000 en TBST 5% Leche y anti 6His-peroxidasa (Invitrogen™) 1:2000 en TBST como anticuerpo secundario. La descripción detallada del experimento se encuentra en la sección de técnicas, en anexos. Ver resultados en página 26.

9. Experimentos de recuperación de antígeno con scFv soluble y Ni-NTA™

Se obtuvieron proteínas totales solubles de *X. fastidiosa* por disrupción celular con ultrasonido y se mezclaron con scFv soluble. Los inmunocomplejos se recuperaron por afinidad entre secuencias de polihistidinas y Ni-NTA™ (Invitrogen™) y se disociaron con SB, que contiene un detergente aniónico y el agente reductor β-mercaptoetanol. Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida. El procedimiento detallado se describe en la sección de técnicas, en anexos. Se realizaron 13 experimentos con scFv soluble. Ver resultados en páginas 27-31.

RESULTADOS

1. Identificación de *Xylella fastidiosa*.

Para la identificación de *X. fastidiosa*, se observó constantemente el tipo de colonia que formaba y el tiempo en que crecía; y se confirmó mediante dos tipos de PCR, uno con cebadores específicos para *X. fastidiosa*, y otro con cebadores que amplifican una región conservada de ADN ribosomal 16S, la cual se analizó con enzimas de restricción. Todos los PCR amplificaron una región de aproximadamente 733 pb. La cepa de Temecula difirió de las otras dos cepas y de *E. coli*, al no amplificar la región esperada 16S de 1365 pb en el análisis de restricción.

Identificación por amplificación con PCR de colonia.

A continuación se muestra un gel (fig. 1) donde se separó el producto de PCR de *X. fastidiosa* amplificado en un termociclador de ADN con los cebadores RST31 y RST33. Se puede observar en el carril 3 la región esperada para *X. fastidiosa* de aproximadamente 730 pb. El control negativo, sin ADN, no presentó amplificación. El carril 2 es una muestra de un microorganismo que creció en un día.

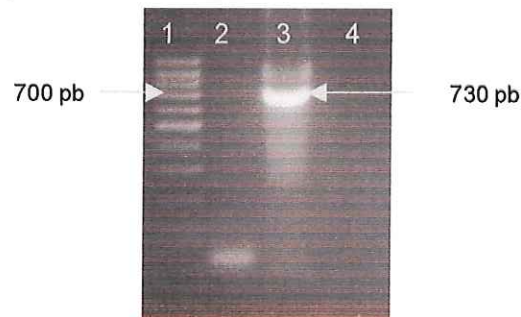


Figura 1. Gel de agarosa 2% con bromuro de etidio de producto de PCR con los cebadores RST31 y RST33. Carril 1: marcador de peso molecular Mass Ruler™ DNA (Fermentas™); carril 2: microorganismo que creció en 1 día; carril 3: *X. fastidiosa* STL y carril 4 sin ADN. Se puede observar en el carril 3 la región esperada de aproximadamente 730 pb señalada por una flecha. El control negativo, sin ADN (carril 4) no presentó amplificación.

Análisis de restricción.

A continuación se muestra un gel (fig. 2) en donde se separaron las muestras de una digestión de *X. fastidiosa* con *EcoRI* y *KpnI*. Para la amplificación, se extrajo ADN de *X. fastidiosa* con el paquete comercial "MoBio Ultraclean™ Microbial DNA Isolation Kit" y se amplificó con los cebadores universales 27F y 139R para genes de ADNr 16S. La amplificación de la digestión de ADN de la cepa Temecula (no utilizada en esta investigación) difirió de Baja (no utilizada en esta investigación) y STL (utilizada en esta investigación). En la figura 2 se puede observar la ausencia de amplificación de una región de aproximadamente 1365 pb en la cepa Temecula (carril 2). El control negativo (sin ADN) no presentó amplificación (carril 5).

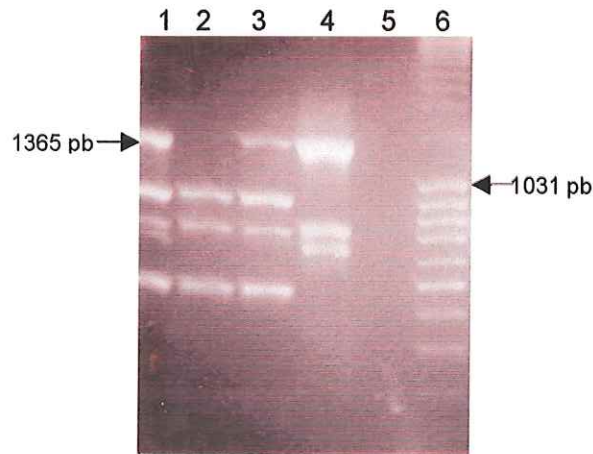


Figura 2. Gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio de digestión con *EcoRI* y *KpnI* de producto de PCR amplificado con los cebadores "universales" 27F y 139R para genes de ADNr 16S. Carril 1: ADN de cepa Baja de *X. fastidiosa*; carril 2: ADN de cepa de Temecula de *X. fastidiosa*; carril 3: ADN de cepa STL de *X. fastidiosa*; carril 4: ADN de *E. coli* (control positivo); carril 5: sin ADN (control negativo) y carril 6: marcador de peso molecular.

2. Expresión del scFv.

El scFv expresado por *P. pastoris* se analizó en geles de poliacrilamida. En la Figura 3 se pueden observar bandas de una sola proteína purificada. Como ya se mencionó, el scFv tiene una secuencia de polihistidinas, lo que nos permitió purificarlo por el sistema de afinidad entre polihistidinas y Ni-NTA.

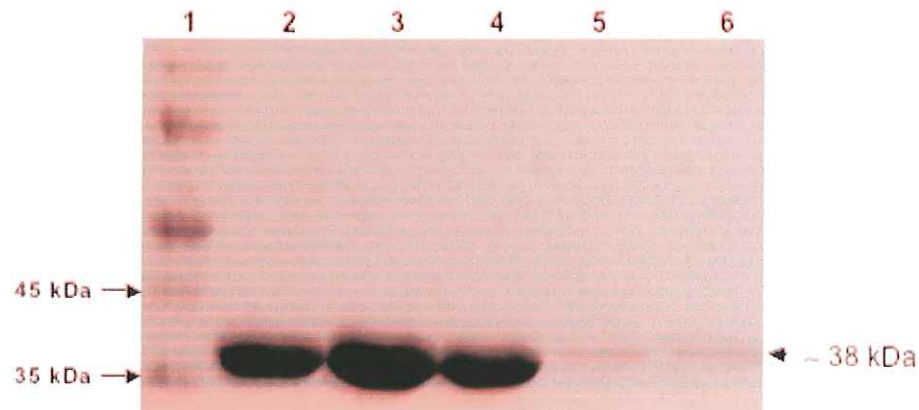


Figura 3. Gel SDS-PAGE al 10% teñido con azul coomasie. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: primera elusión con 500 mM de imidazol; carril 3: segunda elusión; carril 4: tercera elusión; carril 5: cuarta elusión y carril 6: quinta elusión. Se utilizó medio BMMY estéril como control negativo y no presentó banda. La banda de aproximadamente 38 kDa corresponde al peso del scFv.

3. Cantidad de scFv acoplado al Affigel®10.

Se construyó una columna de AffiGel®10 a la cual se le acopló covalentemente el scFv. La columna fue utilizada para circular soluciones de *X. fastidiosa* y recuperar al antígeno por afinidad. En la Figura 4, presentada a continuación se puede apreciar como el desplazamiento de la hidroxisuccinamida fue gradual. Para medir la cantidad de scFv que entró a la columna de AffiGel®10 y la cantidad estimada que salió en las lavadas con MES pH 4.8, se tomó la primera gota que salió después de agregar la solución de ligando y se cuantificó a 280 nm. La concentración inicial de 2.16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de scFv y la concentración final de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ indicaron un 76% de porcentaje de acoplamiento.

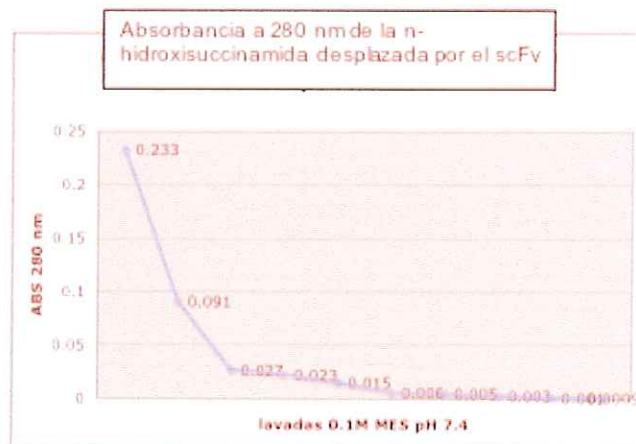


Figura 4. Gráfica que muestra las 10 lavadas con 0.1M MES (10 mL) pH 7.4 después de haber agregado una solución de scFv. Aquí se puede observar un desplazamiento gradual de la hidroxisuccinamida desplazada por la formación de enlaces amídicos.

4. Recuperación del antígeno con scFv acoplado.

Con la técnica de scFv acoplado a Affigel®10 se recuperaron varias proteínas de *X. fastidiosa*. A continuación se muestran Tablas con los pesos moleculares hipotéticos de proteínas identificadas con este método.

Tabla I ^a					
dioxano 10%		Proteínas totales de <i>X. fastidiosa</i>		scFv	
kDa	visibilidad	kDa	visibilidad	kDa	visibilidad
67.6 58.8	++++++	112.2	++++++	38.9	++++++
	++++++	102.3	++++++		
	++++++	77.6	++++++		
	++++++	43.6	++++++		
	++++++				

Tabla I ^b			
dioxano 10%		Lavadas con PBS	
kDa	visibilidad	kDa	visibilidad
91.2	+		
74.1	+++++		
61.6	++++++	61.6	+
20	+++++	53.7	++++++

En la tabla I^a se presentan las bandas y su grado de visibilidad, de un gel teñido con plata de muestras obtenidas con el Affigel®10::scFv y recuperadas con dioxano 10%; y tabla I^b bandas de un gel teñido con azul de coomasie de muestras de un cultivo que presentaba una agregación celular parecida a biofilm. En ambos experimentos se separó el antígeno del scFv acoplado al gel, agregando dioxano al 10% a la columna.

Resuspensión del AffiGel™ 10 en SB.

Después de utilizar la columna con el scFv acoplado para recuperar proteínas de soluciones de *X. fastidiosa* se utilizó para resuspenderlo en SB para ver si aun había proteínas unidas que no se hubieran separado con dioxano. Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida. Varios de los cultivos utilizados en esta columna presentaban una agregación celular parecido a un biofilm. A continuación se presenta un gel (fig. 5) teñido con azul de coomasie con las muestras del AffiGel™ 10 resuspendido. En el carril 4 y 2 se puede observar una banda principal de aproximadamente 19 kDa.

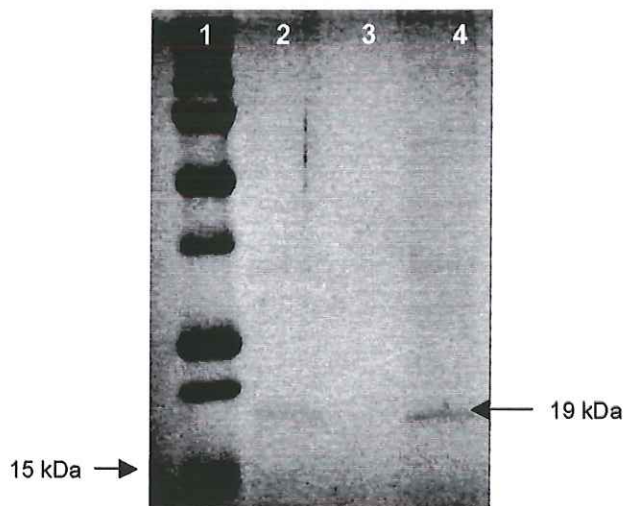


Figura 5. Gel SDS-PAGE 10% Azul coomasie. Carril 1: 10 μ L marcador de peso molecular; carril 2: 10 μ L de AffiGel10; carril 3: control negativo (AffiGel10 sin *X. fastidiosa*) y carril 4: 20 μ L Affigel10. En esta fotografía se puede observar una banda principal de 19 kDa.

5. Inmunotransferencias.

Se realizaron dos transferencias de soluciones de *X. fastidiosa* a nitrocelulosa en donde se detectaron 3 antígenos principales con el scFv como anticuerpo primario y anti seis histidinas acoplado a peroxidasa como anticuerpo secundario. En las Figuras 6 y 7 se pueden observar las bandas en película de rayos X marcadas por la peroxidasa. Las Tablas muestran los pesos moleculares hipotéticos obtenidos.

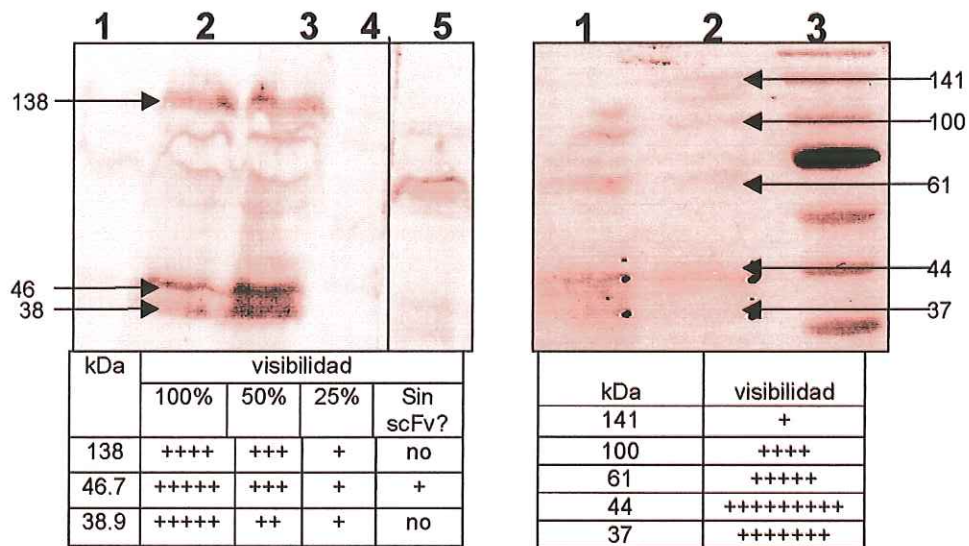
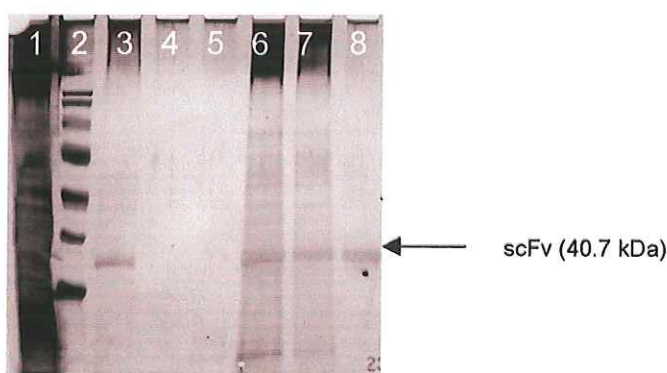


Figura 6 (izquierda). Carril 1: 5 μ L *Xf*, carril 2: 10 μ L de *Xf*, carril 3: 15 μ L de *Xf*, carril 4: marcador de peso molecular. . Solución de primer anticuerpo: scFv 1:1000. Solución de segundo anticuerpo anti 6His-peroxidasa 1:2000. Carril 1-4: control positivo. Carril 5: control negativo (sin 1^{er} anticuerpo). Figura 7 (derecha). Carril 1: 15 μ L de *Xf*, carril 2: 10 μ L de *Xf* y carril 3: marcador de PM. Los antígenos se señalan con flechas. Solución de primer anticuerpo: scFv 1:1000. Solución de segundo anticuerpo anti 6His-peroxidasa 1:2000.

6. Experimentos con scFv soluble I.

Se mezclaron soluciones de proteínas totales de *X. fastidiosa* con scFv. Las soluciones de bacteria se obtuvieron por disrupción celular con ultrasonido y se ajustaron a un pH neutro. El scFv soluble se agregó y se mezcló con *X. fastidiosa* a 4°C con agitación. Los inmunocomplejos se recuperaron por afinidad con Ni-NTA™, y se separaron con amortiguador de elusión que contiene 500 mM de Imidazol (compite con el níquel del Ni-NTA™) y con SB. En estos experimentos se recuperó 11 veces una proteína de aproximadamente 66 kDa. En las siguientes páginas se muestran geles de estos experimentos y tablas que resumen las bandas identificadas.



500 mM		SB		Ni-NTA		scFv		Lavadas	
kDa	visibilidad	kDa	visibilidad	kDa	visibilidad	kDa	visibilidad	kDa	visibilidad
64.5	++	85.1	++++	72.4	++	40.7	+++++		no
60.2	++	72.4	++	67.6	+++				no
46.7	++	67.6	+++	64.5	+++				no
40.7	+++++	63	+++	40.7	+++++				no
		60.2	+++	28.8	++				no
		52.4	+++	27.2*	+++				no
		40.7	+++++						no
		29	+						no
		27*	+++					~27*	**

Figura 8. Gel tefido con AgNO₃. Carril 1: proteínas totales de *Xf.*; carril 2: marcador de PM; carril 3: elusión con 500 mM imidazol; carril 4: lavada con PBS; carril 5: lavada con 20 mM de imidazol; carril 6: elusión con 200 μL de SB; carril 7: resuspensión de Ni-NTA en SB y carril 8: scFv puro. La tabla II resume los resultados obtenidos. Este experimento se realizó con 50 mL de *Xf* en 500 μL de RIPA, recuperados con 200 μL de Ni-NTA. Se tituló a pH 7 con 4 μL de 1N de ácido clorhídrico. *No se pudo determinar con exactitud. ** sólo en lavada con 20 mM de imidazol.

Experimentos con scFv soluble II.

Los siguientes resultados muestran las proteínas recuperadas de 50 mL de *X. fastidiosa* con 260 µg scFv libre y 200 µL Ni-NTA. En la Fig. 9 se puede apreciar un solo antígeno, de aproximadamente 66 kDa y el scFv.

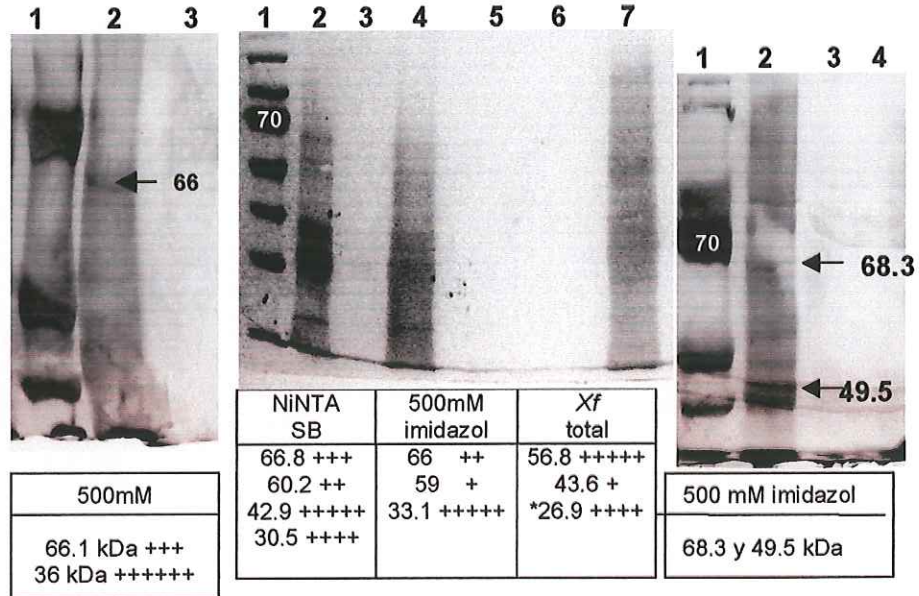


Figura 9 (izquierda). Gel SDS-PAGE 7.5% AgNO₃. Carril 1: Marcador de PM; carril 2: 500mM imidazol y carril 3: lavada con 20mM imidazol. Fig. 10 (centro). Gel SDS-PAGE 10% AgNO₃. Carril 1: marcador de PM; carril 2: resuspensión de Ni-NTA en SB; carril 3: amortiguador de elusión (control negativo); carril 4: elusión con 500mM Imidazol; carril 5: lavada con PBS; carril 6: lavada con 20mM de imidazol y carril 7: solución total de Xf sin ser seleccionada por el scFv. Fig. 11 (derecha). Gel SDS-PAGE 7.5% AgNO₃. Carril 1: marcador de PM; carril 2: elusión con 500mM de imidazol; carril 3: lavada con 20mM de imidazol; carril 4: lavada con PBS. Tabla III^a (izquierda) Tabla III^b (centro) y Tabla III^c (derecha) muestran los pesos moleculares hipotéticos calculados de estos experimentos. Nótese que las lavadas con 20 mM de imidazol (para remover proteínas con secuencias de polihistidinas naturales) y PBS no presentan bandas. *No se pudo determinar con exactitud.

Experimentos con scFv soluble III.

Tablas que resumen los resultados obtenidos en réplicas con scFv soluble de 50 mL de *X. fastidiosa* con 250 µg de scFv y 300 µL de Ni-NTA™.

Tabla IV ^a					
Elusión con SB		Resuspensión de Ni-NTA en SB		Xf total	
kDa	visibilidad	kDa	visibilidad	kDa	visibilidad
66	+++++++	66.8	+++++	51.8	+++++
59	+++++	60.2	++++	43.6	++++
				26.9	+++++

Tabla IV ^b			
Ni-NTA		500mM imidazol	
kDa	visibilidad	kDa	visibilidad
125.8	+++++++	>180*	+++++++
93.3	+++++++	177	++
67.6	+++++++		

Tabla IV ^c									
1 ^ª elusión 500mM Imidazol		2 ^ª elusión 500mM Imidazol		3 ^ª elusión 500mM Imidazol		Ni-NTA en SB		lavada PBS	
kDa	visibilidad	kDa	visibilidad	kDa	visible	kDa	visibilidad	kDa	visibilidad
136.4	+++++	79.4	++++	77.6	++++	85.1	+	>180	+
83	+++++	70.7	++	70	+	79.4	+	110.9	+
77.6	++	67.6	++	67.6	+	70.7	+	85.1	++++
70.7	++							66.8	+

Tabla IV^a. SDS-PAGE 7.5% AgNO₃. Recuperación de antígeno con scFv libre (soluble) y Ni-NTA; tabla IV^b. SDS-PAGE 7.5% AgNO₃. Recuperación de antígeno con scFv soluble y Ni-NTA; y tabla IV^c. SDS-PAGE 7.5% AgNO₃, recuperación de antígeno con scFv soluble y Ni-NTA. En la tabla IV^a se puede apreciar un enriquecimiento de la proteína de 66 kDa. *No se pudo determinar con exactitud. Las muestras se obtuvieron eluyendo con SB e Imidazol; o resuspendiendo el Ni-NTA en SB. Xf total, son las proteínas totales de *X. fastidiosa* sin ser seleccionadas por el scFv.

Experimentos con scFv soluble IV.

Tablas que resumen los resultados obtenidos en réplicas de experimentos con scFv soluble de 100 mL de *X. fastidiosa* con 300 µg de scFv y 300 µL de Ni-NTA™.

Tabla V ^a									
1 ^a elusión 500mM Imidazol		2 ^a elusión 500mM Imidazol		3 ^a elusión 500mM Imidazol		scFv			
kDa	visible	kDa	visible	kDa	visible	kDa	visible		
*~190	+++++	*~190	+++	*~190	+++				
87	+	50.1	++	50.1	++				
50.1	+++++								
40.2	+++					40.7	+++		
36.3	+++					36.3	+++++		
28.1	+++++								

Tabla V ^b			
500mM Imidazol		Ni-NTA en SB	
kDa	visible	kDa	visible
125	++++	180	+++++
93	++++	177	++
67	++++		

Tabla V ^c									
1 ^a elusión 500mM Imidazol		2 ^a elusión 500mM Imidazol		NiNTA en SB		Lavada PBS		scFv	
kDa	visibilidad	kDa	visible	kDa	visible	kDa	visibilidad	kDa	visibilidad
116.1	+	114.8	+	56.2	+++	117	++	34	++++
112.1	++	112.2	+	34.6	+++	114	+++		
83.1	+++++	81.2	+++++			89	+		
78.5	++++	75.8	+						
72.4	++	70.7	+						
60.2	+++++	61.6	+++++						
56.2	+++								
47.3	+++								
34.6	++								

Tabla X. SDS-PAGE 10% AgNO₃. Recuperación de antígeno con scFv libre y Ni-NTA, Tabla XI. SDS-PAGE AgNO₃ recuperación con scFv libre y Ni-NTA y Tabla XII. SDS-PAGE 7.5% AgNO₃ Recuperación del antígeno con scFv libre y Ni-NTA . *No se pudo determinar con exactitud por que excedía al marcador de PM mas alto.

Experimentos con scFv soluble V.

Tablas que resumen los resultados obtenidos en réplicas con scFv soluble de 100 mL de *X. fastidiosa* con 260 µg de scFv y 200 µL de Ni-NTA.

Tabla VI ^a						Tabla VI ^b			
500mM imidazol		Xf total		scFv		500mM imidazol		scFv	
kDa	visible	kDa	visible	kDa	Visible	kDa	visible	kDa	visible
66	+++	*>180	++++++	39.8	+++++	140	+	36	++++
57	+++	109.6	++			66	++		
39.8	++++++	103.5	++			48	+++		
37.1	++++++	74.9	++			36	+++		
		70.7	++			*28	++++		

Tabla VI ^c									
1 ^a elusión 500mM Imidazol		2 ^a elusión 500mM Imidazol		3 ^a elusión 500mM Imidazol		Ni-NTA en SB		lavada PBS	
kDa	visible	kDa	visible	kDa	visible	kDa	visible	kDa	visible
95.4	+++	91.2	++	93.3	+	95.4	+++	93	+++++
83.1	++++++	83.1	++++++	83.3	+++++	87	++++	58	+++
79.5	+++++	79.4	++++++	79.4	++++	79.4	++++		
49.5	+	50.1	+	50.1	+	50.1	++		

Tabla VI^a. SDS-PAGE AgNO₃ recuperación con scFv libre y Ni-NTA, Tabla VI^b. SDS-PAGE 10% recuperación del antígeno con scFv libre y Ni-NTA y Tabla VI^c. SDS-PAGE 7.5% AgNO₃ recuperación de antígeno con scFv libre (soluble) y Ni-NTA. *No se pudo determinar con exactitud por que esta fuera del rango del marcador de PM. En la tabla VI^a se puede apreciar un enriquecimiento de la banda de 66 kDa.

DISCUSIÓN

Al contrario de lo que se esperaba, el scFv monoclonal de gallina dirigido en contra de PD *X. fastidiosa* STL no reconoció específicamente a un sólo antígeno, probablemente por que el epítipo se repite en varias proteínas. La composición de membrana de *X. fastidiosa* en especial la de los polisacáridos extracelulares, los pili tipo IV y las proteínas de membrana varía entre las distintas cepas de *X. fastidiosa* (Lambais et al. 2000); y entre los distintos ambientes en que se encuentre (Osiro et al. 2004). Esto también es cierto para otras bacterias, por ejemplo, exclusivamente en colonias rugosas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* se sintetizan dos proteínas de 43 y 20 kDa asociadas a la producción de pili (Haase et al. 1999). Si la síntesis del antígeno reconocido por el scFv es parecida a la de estas proteínas, se podría explicar por qué hubo variaciones en réplicas de experimentos.

Este mismo fenómeno fue observado en esta investigación; mientras unos cultivos de *X. fastidiosa* en medio líquido PD2 presentaban agregaciones de lo que podría ser un biofilm, otros se mantenían totalmente solubles. Los análisis de los experimentos realizados en la columna AffiGel®10, resuspendiéndola en SB (Fig. 5) revelaron una banda de 19 kDa (de la cual había más de 100 ng, ya que se visualizó con azul coomasie) que podría corresponder a una pilina utilizada para la formación del biofilm. El experimento

resumido en la tabla I^b, de un cultivo con agregación celular, se identificó una proteína de 20 kDa. En otros laboratorios se ha observado que células de *X. fastidiosa* con mutaciones en genes responsables de la biosíntesis de pili presentan colonias lisas y solubles, mientras que las cepas silvestres producen agregaciones en cultivos puros líquidos (Meng et al. 2005). Si el antígeno reconocido por el scFv es alguna de estas proteínas podríamos no recuperarlo en algunas ocasiones en las que no se haya sintetizado la cantidad necesaria de esta molécula para visualizarse en los geles (la cantidad mínima visible con tinción de plata es 1 ng de proteína).

Estas fluctuaciones en la composición externa de las bacterias podrían ayudar a explicar la inconsistencia de los resultados, pero no explica la reacción cruzada entre el anticuerpo, que es monoclonal, y por lo menos 22 proteínas de peso molecular distinto. Esto podría significar que el epítipo esté conservado en varias proteínas (Azzazy et al. 2002) y que no se obtengan las mismas proteínas en todos los experimentos por que no siempre es la misma composición molecular en *X. fastidiosa*. El hecho de que en los inmunoblots se hayan identificado proteínas de 141, 138, 100, 61, 46, 44, 39 y 37 kDa podría indicar que el anticuerpo también reconoce a un epítipo lineal (no conformacional) y conservado (Azzazy et al. 2002), o que la secuencia reconocida por el scFv se encuentra expuesta tanto en la conformación nativa

como en la relajada de la proteína (en el caso de las proteínas de 140, 61, 46 y 37 kDa).

Por otro lado, existen proteínas involucradas en la adhesión y virulencia en bacterias gram negativas que son muy estables en relación a la desnaturalización y ocupan tratamientos extremos para depolimerizarlas. Los Curlis, que son oligómeros formados por subunidades de un tipo de pilina necesitan ácido fórmico al 90% para depolimerizarlas en sus subunidades de 19 kDa (Simon et al. 1996). Si el epítipo se encuentra en estas moléculas, podría explicarse la reacción cruzada en cuanto a que son organelos formados por subunidades de una misma proteína, por lo que se podría repetir el epítipo (Azzazy et al. 2002), y como son muy estables ante la depolimerización, podrían presentarse fragmentos oligoméricos de distintos pesos moleculares.

Adicionalmente, varias de las proteínas identificadas con mayor consistencia en este trabajo tienen pesos moleculares cercanos a múltiplos de 20 (20, 40, 60, 100, 140kDa, aproximadamente), lo que apoya la hipótesis de que el epítipo se encuentre en una proteína oligomérica muy estable con distintos grados de depolimerización. La reacción cruzada entre anticuerpos monoclonales y varios antígenos ha sido reportada en estudios de antígenos contenidos en proteínas de membrana de bacterias gram negativas (Doherty et al. 1986). También se han reportado anticuerpos monoclonales con reacciones

cruzadas con lipopolisacáridos (Brade et al. 1993), comúnmente encontrados en proteínas de membrana.

Cuando *X. fastidiosa* se encuentra dentro de la vid, o en un vector, presenta estructuras polares extracelulares parecidos a pili, mientras que en cultivos puros estas estructuras raramente se observan (Lambais et al. 2000) lo que sugiere que la interacción entre células de *X. fastidiosa* y células del vector o del huésped es favorable para la producción del biofilm. Los pili y en especial los conformados por pilinas tipo IV (sintetizados por el gen *fimA*) son indispensables para la formación del biofilm (Meng et al. 2005). La secreción de biofilm es esencial para la supervivencia de *X. fastidiosa* dentro de la planta (Newman et al. 2004). Células de *X. fastidiosa* con mutaciones en el gen *fimA* no producen biofilm. Tomando en cuenta la biología de adhesión-infección de *X. fastidiosa*, una estrategia que se podría aplicar para tratar de inhibir la colonización de sus huéspedes es el uso de anticuerpos monoclonales para interferir con el sistema de formación de biofilm de esta bacteria (Meng et al. 2005).

Generalmente, los eventos iniciales de una infección bacteriana son las interacciones que se dan entre los grupos químicos expuestos de polisacáridos y proteínas de membrana de las células bacterianas con la superficie celular del huésped, y usualmente están mediadas por adhesinas (Soto et al. 1999).

Estas moléculas expuestas pueden actuar como inmunógeno si la bacteria es presentada a un sistema inmunológico (Simon et al 1996). En *Staphylococcus epidermidis* se ha reportado el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos en contra de una proteína de membrana de 140 kDa obtenidos al inmunizar ratones con una preparación de membrana celular (Sun et al. 2004). Muchas bacterias como los gonococos y *E. coli* presentan antígenos de superficie contenidos en los pili. Los genes de la pilina en algunas bacterias del género gonococos presentan conversiones génicas que pueden producir progenies con variaciones de hasta 10^6 moléculas de pilina antigénicamente distintas (Abbas et al. 2000). En proteínas de membrana, los determinantes antigénicos de especificidad más comunes son los lipopolisacáridos (Simon et al. 1996).

X. fastidiosa utiliza un factor de señalamiento involucrado en la formación de biofilm sintetizado por el gen *rpfF*. Células de *X. fastidiosa* con mutaciones en *rpfF* no forman biofilm en la cutícula del vector; sin embargo sí producen biofilm *in planta* y, sorprendentemente, son hipervirulentas al inocularlas mecánicamente en plantas sanas (Newman et al. 2004). Las proteínas sintetizadas por los genes del operón *rpfF* de *X. fastidiosa* son 66% iguales a las de *Xanthomonas campestris*. En *X. campestris* estas proteínas son similares a la enoyl-CoA hidratasa, y son responsables de la biogénesis de un α - β -ácido graso insaturado que sirve como factor de señalamiento para la formación de biofilm (Newman et al. 2004). En *X. fastidiosa* la producción de

biofilm es un mecanismo activo dirigido por la expresión genética de la bacteria en respuesta directa al medio. En otras bacterias gram-negativas se ha visto que la habilidad para colonizar huéspedes está directamente ligada con la habilidad de producir biofilm y puede estar relacionada a un gen en específico.

Células de *E. coli* con mutaciones en el gen *IrgA* que codifica para una adhesina produjeron poblaciones no patogénicas (Johnson et al. 2005). Adicionalmente, el uso de anticuerpos monoclonales para controlar patógenos bacterianos ha sido ampliamente utilizado y en *S. epidermidis* se ha logrado inhibir la formación de biofilm con una mezcla de anticuerpos monoclonales (Sun et al. 2004).

En esta investigación no se pudo determinar con exactitud el antígeno de *X. fastidiosa* reconocido por el scFv ya que no se obtuvieron las mismas moléculas en todos los experimentos realizados; esto pudo haberse debido a que el epítipo sea una región conservada, o muy común y que esté presente en varias proteínas, y que estas sólo se sinteticen en momentos específicos. La necesidad de que prosigan investigaciones (determinación y clonación del antígeno) en este tema es evidente, ya que la determinación del antígeno al cual se le une este scFv podría brindarnos información sobre la biología de *X. fastidiosa*.

Aunado a la necesidad de conocer las proteínas de esta bacteria, está la importancia de los resultados de experimentos que se han realizado recientemente en el laboratorio de biología celular y molecular A-9 de la Facultad de Ciencias por alumnos del Dr. Stephano, que involucran al scFv como un acarreador para moléculas líticas; en los cuales se ha logrado inhibir al crecimiento de la bacteria con bacteriófagos que expresen un híbrido del scFv con una molécula desestabilizadora de membrana. Además, el scFv puro también ha logrado inhibir el crecimiento de *X. fastidiosa* (Stephano *com. pers.*), por lo que se puede suponer que las proteínas reconocidas por este scFv son importantes para algún mecanismo biológico en esta bacteria. Si analizamos el marco actual de conocimiento acerca de este fragmento de anticuerpo monoclonal podemos suponer qué tan útil podría ser en el combate a la EP y lo importante que es que siga su estudio en relación a su modo de acción y a las moléculas que reconoce.

CONCLUSIONES

- 1) En esta investigación se partió de la hipótesis de que el scFv dirigido en contra de *Xylella fastidiosa* STL se uniría a un sólo antígeno. Inesperadamente, el scFv se unió a varias proteínas, las cuales no fueron las mismas en diferentes experimentos ni en réplicas de un mismo experimento.
- 2) En los experimentos de recuperación del antígeno con scFv libre (en donde se supone que hay más probabilidades para una conformación nativa del scFv) se recuperó 11 veces una proteína de aproximadamente 60 kDa. Se propone que esta proteína representa un antígeno generalmente reconocido por el scFv.
- 3) En los experimentos realizados con cultivos de *X. fastidiosa* en los cuales se observó una agregación celular (película bacteriana) se recuperó una proteína de aproximadamente 19 kDa; la cual fue identificada incluso con azul de coomasie. En estos experimentos también se identificó al antígeno de aproximadamente 60 kDa.
- 4) Por medio de la amplificación y análisis de restricción de una secuencia 16S de 3 cepas de *X. fastidiosa* pudimos diferenciar el ADN de la cepa de Temecula al compararlo con el de las cepas STL y Baja. La cepa Temecula no amplificó una región de 1365 pb.

5) El objetivo principal de este trabajo fue determinar el antígeno al cual se le unía un anticuerpo monoclonal. Como los resultados obtenidos fueron tan diferentes entre las diferentes técnicas utilizadas, no se puede concluir con exactitud el antígeno reconocido por el scFv utilizado. Sin embargo, ahora sabemos que este anticuerpo se le une a varias proteínas de *Xylella fastidiosa*.

LITERATURA CITADA

1. Abbas, A. K, Lichman A. H. y Pober S. J. 2000. Inmunología Celular y Molecular 4ta ed. Mc Graw-Hill. Madrid. pp. 43-65, 539-545.
2. Almeida, R. P. y Purcell, A. H. 2003. Biological Traits of *Xylella fastidiosa* Strains from Grapes and Almonds. *App. Env. Microbiol.* **69(12):7447-7452**
3. Azzazy, M. E. y Highsmith, E. W. 2002. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin. Biochem.* **35:425-445**
4. Bhattacharyya, A., Stilwagen, S., Reznik, G., Feil, H., Feil, W. S., Anderson, I., Bernal, A., D'Souza, M., Ivanova, N., Kapatral, V., Larsen, N., Los, T., Lykidis, A., Selov, E., Walunas, T. L., Purcell, A., Edwards, R. A., Hawkins, T., Haselkorn, R., Overbeek, R., Kyrpides, N. y Predki, P. F. 2002. Draft Sequencing and Comparative Genomics of *Xylella fastidiosa* Strains Reveal Novel Biological Insights. *Co. Spri. Harb. Lab. Pre.* **12: 1556-1563.**
5. Bohinski, R. C. 1991. Bioquímica. 5ta. Ed. Addison Wesley Longman. México. 117-152 pp
6. Brade, L., Holst, O. y Brade, H. 1993. An Artificial Glycoconjugate Containing the Bisphosphorylated Glucosamine Disaccharide Backbone

- of Lipid A binds Lipid A Monoclonal Antibodies. *Infec. Inmun.* **61:4514-4517.**
7. Caldwell, H. y Kuo, C. 1977. Purification of a Chlamydia trachomatis-specific antigen by immunoadsorption with monospecific antibody. *J. Immunol.* **118:237-441**
 8. Campanharo, J. C., Lemos, M. V. y Lemos, E. G. 2002. Growth Optimization Procedures for the Phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Curr. Microbiol.* **46:99-102.**
 9. Chen, J., Hartung, J. S., Chang, C. y Vidaver, A. K. 2002. An Evolutionary Perspective of Pierce's Disease of Grapevine, Citrus Variegated Chlorosis, and Mulberry Leaf Scorch Diseases. *Curr. Microbiol.* **45: 423-428**
 10. Davies, D. y Cohen, G. 1996. Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93: 7-12**
 11. Davis, M. J., Purcell, A.H. y Thomson, S.V. 1980^b. Isolation media for the Pierce's Disease. *Bacterium. Phytopathol.* **70: 425-429**
 12. Della Coletta-Filho, Takita, M.C., Alves de Souza, A., Aguilar-Vildoso, C.I. y Machado, M.A. 2001. Differentiation of Strains of *Xylella fastidiosa* by a Variable Number of Tandem Repeat Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67(9): 4091-4095.**
 13. Doherty, H., Yamada, H., Cafrey, P. y Owen. P. 1986. Identification, Immunochemical Characterization, and Purification of a Major Lipoprotein

Antigen Associated with the Inner (Cytoplasmic) Membrane of *Escherichia coli*. Jour. Bacteriol. **166[3]:1072-1082.**

14. Doorn, J. V., Ojanen-Reuhs, T., Hollinger, T. C., Reuhs, B. L., Schots, A., Boonekamp, P. M. y Oudega, B. 1999. Development and Application of Pathovar-Specific Monoclonal Antibodies That Recognize the Lipopolisaccharide O Antigen and the Type IV Fimbriae of *Xanthomonas hyacinthi*. App. Environ. Microbiol. **65[9]:4171-4180.**
15. Guevara-Lugo, J. 2003 Importancia y situación actual de la enfermedad de Pierce. Reporte Técnico, 1er Seminario Internacional de Vitivinicultura; Ensenada, Baja California, México. 18-25
16. Haase, E. M., Zamuda, J. L. y Scannapieco, F. A. 1999. Identification and Molecular Analysis of Rouge-Colony-Specific Outer Membrane Proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infec. Immun. Amer. Soc. Microbiol. **67[6]:2901-2908.**
17. Harlow, E. y D. Lane. 1999. Using Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. pp. 234-235, 241-243.
18. Hendson, M., Purcel, A.H., Chen, D., Smart C., Guilhabert M. y Kirkpatrick, B. 2001. Genetic Diversity of Pierce's Disease Strains and Other Pathotypes of *Xylella fastidiosa*. Appl. Environ. Microbiol. **67 (2): 895-903.**

19. Hill, B.L. y Purcell, A.H. 1995. Acquisition and Retention of *Xylella fastidiosa* by an Efficient Vector, *Graphocephala atropunctata*. American Phytopathological society **85 (2): 209-212.**
20. Johnson, J. R., Jelacic, S., Schoening, L. M., Clabots, C., Shaikh, N., Mobley, H. L. y Tarr, P. I. 2005. The IrgA Holomolgue Adhesin Iha Is an *Escherichia coli* Virulence Factor in Murin Urinary Tract Infection. *Inmun.* **73[2]:965-971.**
21. Lambais, M. R., Goldman, M. H. S., Camargo, L. y Goldman, G.H. 2000. A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. *Curr. Opin. Microbio.* **3: 459-462.**
22. Meng, Y., Li, Y., Galvani, C. D., Hao, G., Turner, J. N., Burr, T. J., y Hoch, H. C. 2005. Upstream Migration of *Xylella fastidiosa* via Pilus-Driven Twitching Motility. *Jour. Bact.* **187(7): 5560-5567.**
23. Michael, N., Accavitti, M., Masteller, E. y Thompson, C. 1998. The antigen-binding characteristics of mAbs derived from *in vivo* priming of avian B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95: 1666-1171**
24. Minsavage, G.V., Thompson, C.M., Hopkins, D.L., Leite, R.M. y Stall, R.E. 1994. Development of a Polymerase Chain Reaction Protocol for Detection of *Xylella fastidiosa* in Plant Tissue. *Amer. Phytopath. Soc.* **84(5) 456-461.**
25. Morrison, R. T. y Boyd, R. N. 1990. *Química Orgánica* 5ta ed. Addison-Wesley Iberoamericana. Delaware pp. 27-32, 226.

26. Nelson, D. L. y Cox, M. M. 2000. Lehninger Principles of Biochemistry 3ra ed. Worth Publishers, New York. pp. 91, 230
27. Newman, K. L., Almedia, R. P., Purcell, A. H. y Lindow, S. E. 2004. Cell-cell signaling control *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Nat. Acad. Sci.* **101(6):1737-1742.**
28. Osiro, D., Colnago, L. A., Machado, A. M., Macedo, E. G., Alves de Souza, A., Coletta-Filho, H. y Machado, M. A. A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. 2004. *Microbiol. Lett.* **236:313-318.**
29. Prescott, L. M., Harley, J. P. y Klein, D. A. 1999. *Microbiologia* 4 ed. McGraw-Hill. Madrid. pp. 487-496.
30. Pugsley, A. P. The Complete General Secretory Pathway in Gram-Negative Bacteria. 1993. *Microbiol. Rev.* **57[1]:50-108**
31. Purcell, A. H. y Hopkins, D. L. Fastidious Xylem-Limited Bacterial Plant Pathogens. 1996. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34:131-155.**
32. Raven, H. P. y Johnson, G. B. 2002. *Biology* 6th Ed. McGraw-Hill. New York. pp. 929, 756
33. Redak, R. A., Purcel, A. H., Lopes, J. R. S., Blua, M. J., Mizel III, R. F. y Andersen, P. C. 2004. The Biology of Xylem-Feeding Insect Vectors of *Xylella fastidiosa* and Their Relation to Disease Epidemiology. *Annu. Rev. Entomol.* **49: 243-270**

34. Simón, M., Mathes, A., Blanch, A. y Engelhardt, H. 1996. Characterization of a Porin form the Outer Membrane of *Vibrio anguillarum*. Jour. Bacteriol. **178**[14]:4182-4188
35. Simpson A .J. G., F. C. Reinach, P. Arruda, F. A. Abreu, M. Acencio, R. Alvarenga, L. M. C. Alves, J. E. Araya, G. S. Baia, C. S. Baptista, M. H. Barros, E. D. Bonaccorsi, S. Bordin, J. M. Bové, M. R. S. Briones, M. R. P. Bueno, A. A. Camargo, L. E. A. Camargo, D. M. Carrazo, H. Carrer, N. B. Colauto, C. Colombo, F. F. Costa, M. C. R. Costa, C. M. Costa-Neto, L. L. Coutinho, M. Cristofani, E. Dias-Neto, C. Docena, H. El-Dorry, A. P. Facincani, A. J. S. Ferreira, V. C, A. Ferreira, J. A. ferro, J. S. Fraga, S. C. Franca, M. C. Franco, M. Frohme, L. R. Burlan, M. Garnier, G. H. Goldman, M. H. S. Goldman, S. L. Gomes, A. Gruber, P. L. Ho, J. D. Hoheisel, M. L. Junqueira, E. L. Kemper, J. P. Kitajima, J. E. Kreiger, E. E. Kuramae, F. Laigret, M. R. Lambais, L. C. C. Leite, E. G. M. Lemos, M. V. F. Lemos, S. A. Lopes, C. R. Lopes, J. A. Machado, M. A. Machado, A. M. B. N. Madeira, H. Madeira, C. Marino, M. Marques, E. Martins, E. M. Martins, A. Matsukuma, C. Menck, E. Miracca, C. Miyaki, C. Monteiro-Vitorello, D. Moon, M. Nagai, A. Nascimento, L. Netto, A. Nahani Jr., F. G. Nobrega, L. Nunes, M. Oliveira, J. F. Da Silveira, Z. Silvestre, W. Siquiera, A. De Souza, A. P. De Souza, M. Terenzi, D. Truffi, S. Tsai, M. Tshako, M. Zatz, J. Meidanis y J. C. Setubal. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. Nature. **406**:151-157.

36. Soto, G. E. y Hultgren, S. J. 1999. Bacterial Adhesins: Common Themes and Variations in Architecture and Assembly. *Jour. Bacteriol.* **181(4): 1059-1071**
37. Sun, D., Accavitti, M. A. y Bryers, J. D. 2004. Inhibition of Biofilm Formation by Monoclonal Antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A Accumulation Associated Protein. *Amer. Soc. Microbiol.* **12[1]:93-100**
38. Van Sluys, M. A., M. Oliveira, C. Monteiro-Vitorello, C. Miyaki, L. Burlan, L. Camargo, A. da Silva, M. Goldman, G. H. Goldman, M. Lemos, H. El-Dorry, S. M. Tsai, H. Carrer, D. Carrazo, R. De Oliveira, L. Nunes, W. Siquiera, L. Coutinho, E. Kimura, e. Ferro, R. Harakava, E. Kuramae, C. Marino, E. Giglioti, I. Abreu, L. Alves, A. do Amaral, G. Baia, S. Blanco, M. Brito, F. Cannavan, A. Celestino, A. da Cunha, R. Fenille, J. Ferro, El Formighieri, L. Kishi, S. Leoni, A. Oliveira, V. E. Rosa Jr., F. T. Sasaki, J. A. D. Sena, A. A. de Souza, D. Truffi, F. Tsukomo, G. Yanai, L. Zaros, E. Civerolo, A. J. G. Simpson, N. F. Almeida Jr., J. C. Setúbal, y J. P. Kitajima. 2003. Comparative Analysis of the Complete Genome Sequences of Pierce's Disease and Citrus Variegated Chlorosis Strains of *Xylella fastidiosa*. *Jour. Bacteriol.* **185 (3):1018-1026**.
39. Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H-Y., Weisburg, W. G., Mandelco-Paul, L., y Brenner, D. J. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. Nov., sp. Nov, gram

negative, xylem limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. Int. J. Syst. Bacteriol. **37:136-143.**

40. Yoshida, T., Furuya, N., Ishikura, M. y Isobe, T. 1998. Purification and Characterization of Thin Pili of Inc11 Plasmids Collb-P9 and R64: Formation of PilV-Specific Cell Aggregates by Type IV Pili. Jour. Bacteriol. **180[11]: 2842-2848**

ANEXOS

TÉCNICAS UTILIZADAS

Disrupción celular de *Xylella fastidiosa* con ultrasonido. Experimento modificado del protocolo descrito por Ed Harlow (Harlow 1999).

1. Se recolectaron células de *X. fastidiosa* de muestras de >50 mL en medio PD2 por centrifugación (sorval RC 5B PLUS) a 5650 rpm a 4°C por 30 min.
2. El paquete celular se resuspendió en 1 mL de PBS 1X (el PBS 10X es 137mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 4.3 mM de Na₂HPO₄-7H₂O y 1.4 mM de KH₂PO₄) pH 7.4 a 4°C y se centrifugó de nuevo a 14000 rpm a 4°C por 10 min en una microcentrífuga Eppendorff™ .
3. Se resuspendió el paquete celular (diluyéndolo ~ 1:10) en amortiguador de lisis RIPA (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 50 mM TRIS; pH 8).
4. Se destruyeron las células con 4 ciclos de 30" ultrasonido / 30" hielo en un probe cut sonicator Microson™ XL2500 a máxima potencia. Nota: Es muy importante no calentar la muestra para no desnaturalizar las proteínas.
5. Se centrifugó para remover células intactas a 14000 rpm por 10' a 4°C (se puede centrifugar una vez más para remover proteínas agregadas a 14000 a 4°C por 30').

6. Se tituló a pH ~ 7 con HCl o NaOH comparando con rojo fenol.
7. La muestra obtenida se utilizó para los ensayos de análisis de antígeno.
Las muestras utilizadas para los experimentos de inmunotransferencia y con AffiGel®10 no se les modificó el pH. Generalmente la solución de proteínas totales de *X. fastidiosa* tenía un pH básico (~9).

Expresión del scFv: Protocolo “Pichia Easy Select Expression Kit” de Invitrogen™

1. Para el preinoculo, se cultivó *Pichia pastoris* en placas de YPD/Zeocine™ a 50 µg/µL (1% Extracto de levadura, 2% Peptona, 2% Dextrosa, 2% Agar y 100µL/mL de Zeocine™ en 1 L de agua) a 28°C en ausencia de luz (cubrir caja de petri con papel aluminio) por 3-6 días (hasta que se observaran colonias con un diámetro aproximado de 3 mm).
2. Se tomó una colonia obtenida por selección con Zeocine™ y se resuspendió en 25 mL de medio BMGY (10g de Extracto de levadura, 20g de Peptona, 100mL 1M amortiguador de fosfato de potasio pH 6, 100 mL 10x YNB [34g Base Nitrogenada de Levadura, 100g de (NH₄)SO₄], 2 mL de Biotina a 0.02%, 100 mL de Glicerol al 10% aforado a 1 L H₂O) se cultivó a 30°C por ~ 12-24 hrs., hasta una densidad óptica de 4-6 a 600 nm.
3. Se concentraron las células por centrifugación en una centrífuga (Sorval RC 5B PLUS) a 4575 rpm, 4°C por 20 min. y se pasó a un frasco con un

- volumen de BMMY (sustituir el glicerol del BMGY por metanol, 100 mL de metanol al 5%) de tal manera que quedó a una densidad óptica de ~ 1.
4. Se incubó a 30°C con agitación por 5-7 días con inducciones cada 24 hrs de metanol al 100% (el metanol debe quedar a una concentración final de 0.6%.)
 5. Se descartaron las células por centrifugación y el scFv soluble fue recuperado del sobrenadante.

Recuperación, Purificación y Cuantificación del scFv:

1. Se agregaron 200 μ L de Ni-NTA[™] (invitrogen[™]) por cada 50 mL de sobrenadante de *P. pastoris*
2. Se dejó agitando a 4°C por 2-4 horas.
3. Se centrifugó a 4500 rpm a 4°C por 2 min.
4. Se descartó el sobrenadante (se dejó ~ 1 mL para resuspender el paquete de Ni-NTA[™] acoplado al scFv)
5. Se resuspendió el paquete y se pasó a una columna de exclusión por afinidad BioRad[™]
6. Se lavó con 10 mL de amortiguador de lavado (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl, 20 mM Imidazol; pH 8.0) 4°C.
7. Se eluyó 3 veces con 200 μ L c/u de amortiguador de elusión (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol; pH 8.0) 4°C. Cada elusión se dejó 10 min. antes de recolectarse.

8. Las muestras de 200 μL se dializaron y se cuantificaron como se describe:
9. La diálisis se realizó en membranas de celulosa M.W. 4000-6000 (MiliPore™) en 1 L de PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.4 mM KH_2PO_4 ; pH 7.3) a 4°C con agitación por 2 horas, con un cambio de amortiguador y se volvió a dejar en agitación con una barra magnética ~ 6 horas a 4°C.
10. Se confirmó la presencia del scFv en geles de SDS-PAGE 10% teñidos con azul de coomasie.
11. Una vez comprobada la presencia del scFv, se realizó la cuantificación en un espectrofotómetro Spectronic 21™ a 280 nm de absorbancia con PBS 1X pH 7.4 como blanco y se utilizó la siguiente fórmula para determinar la concentración:

$$1000 \times \left(\frac{\text{abs}(280\text{nm}) \cdot n^{-1}}{\xi} \right) = \text{mg} / \text{mL}$$

en donde $\text{abs}(280\text{nm})$ es la absorbancia a 280 nm, n es la cantidad en μL de muestra diluida en PBS y ξ es el coeficiente de extinción molar del scFv (ξ del scFv = 1.2). Para las cuantificaciones se tomaron 5 μL de scFv dializado en PBS y se diluyeron en 995 μL de PBS. Una vez cuantificado el scFv se guardó a -20°C ó se utilizó directamente para los experimentos de análisis del antígeno.

Construcción de la columna AffiGel®10: Acoplamiento del grupo amino primario del scFv a AffiGel®10 (protocolo modificado de manual de AffiGel®10 and 15 Activated Affinity Media de BioRad™)

1. Se homogenizó el AffiGel®10 y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se recomienda 5-10 mg de proteína (ligando) por cada mL de AffiGel®10.
2. Se centrifugó 1 min. a 14,000 rpm 4°C para remover el isopropanol.
3. Se lavó con 3 volúmenes de ddH₂O a 4°C por cada volumen de AffiGel®10. Se centrifugó por 1 min. a 14,000 rpm 4°C entre cada lavada y se descartó el sobrenadante. Este paso no debe de exceder 20 min.
4. Se transfirió el AffiGel®10 a una jeringa de 1 mL sin aguja, con fibra de vidrio en la punta (para detener al gel). Sin dejar que se deshidratara el AffiGel®10 se agregó la solución de ligando (a 354 µL de AffiGel®10 se le agregaron 1.5 mL de solución de scFv a [2.16 µg/µL]) a 4°C.
5. Acoplamiento espontáneo (formación del enlace amídico):
Se puso en agitación la solución de AffiGel®10/ligando por 4 hrs. a 4°C. Se lavó circulando ddH₂O a 4°C y se tomaron muestras para determinar porcentaje de acoplamiento. Nota: si se desea cuantificar indirectamente el porcentaje acoplamiento del ligando por la estimación de la cantidad de n-hidroxisuccinamida desplazada, se debe de utilizar un amortiguador con un pH básico, p.e. PBS pH 7.4.

6. Se bloquearon los ésteres activos con 100 μ L de 1M Glicina Etil Éster pH 8 por 1 hr. a 4°C.
7. Se lavó con ddH₂O y se cuantificó en el espectrofotómetro a 280 nm hasta que no hubiera ésteres activos.
8. Se equilibró la columna con amortiguador MES (P.M. = 213.25) 0.1M pH 4.8. Nota: el amortiguador utilizado debe de ser el mismo en el que se haya dializado la solución de ligando; si se utiliza un pH ácido la n-hidroxisuccinamida no interfiere en las cuantificaciones a 280 nm.
9. La determinación de la cantidad de scFv acoplado se realizó una vez que se equilibró la columna con un amortiguador de pH ácido (0.1M MES pH 4.8) y se realizó como se describe: Después de agregar la solución de ligando se lavó 15 veces con 1 mL de MES cada una. De cada lavada se tomó una muestra de 5 μ L y se cuantificó como se describió previamente en un espectrofotómetro Spectronic 21™ a 280 nm con MES como blanco.
10. Se guardó la columna a 4°C con amortiguador para realizar los experimentos de purificación del antígeno de soluciones de proteínas totales de la bacteria.

Sonicación de *X. fastidiosa* y recuperación del antígeno en columna AffiGel[®]10 con scFv acoplado.

1. Se destruyeron células de *X. fastidiosa* como se describió previamente, excepto que no se modificó el pH.
2. Se circuló la solución de *X. fastidiosa* a 4°C en la columna 3 veces.
3. Se lavó con 60 mL de PBS 1X pH 7.3 a 4°C
4. Se disoció el inmunocomplejo con 100 µL de Dioxano 4°C al 10%.
Previamente se analizaron muestras de Dioxano 10% en geles para comprobar que no tuviera proteínas.
5. Las muestras obtenidas se analizaron en geles de poliacrilamida al 10% y se tiñeron con azul de coomasie y con AgNO₃.

Geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Se utilizaron geles de poliacrilamida con SDS. Gel de corrido (para minigeles mezclar 625 µL de ddH₂O, 1.875 mL amortiguador de corrido: Trizma Base 0.75 M, SDS 0.2% pH 8.8; 1.25 mL de poliacrilamida, 12.5 µL de TEMED diluido 1:10 y 37.5 µL de Persulfato de amonio) al 10%, gel de separación (mezclar 625 µL ddH₂O, 937µL de amortiguador de separación: Trizma Base 0.25 M, SDS 0.2%, pH 6.8; 312 µL de poliacrilamida, 6.25 µL de TEMED 1:10 y 18.75 µL de persulfato de amonio) al 5%; el amortiguador de cámara 10X se preparó con 0.25 M de Trizma base, 1.92 M Glicina y 1% de SDS, pH 8.3; se tiñeron con AgNO₃ y azul coomasie para proteínas y con azul alician para teñir

carbohidratos (polisacáridos). Las muestras se diluyeron 1:1 en amortiguador de muestra (2.9 mL de amortiguador de separación, 4 mL de ddH₂O, 2 mL de glicerol, 10% de SDS, 0.5 mL de β -mercaptoetanol y ~0.001% de azul de Bromofenol). Los geles chicos corrieron por 1 hr a 120V, los geles grandes corrieron por 4-6 horas a 120V. Para la tinción con azul de coomasie se colocaron los geles en la solución de tinción por más de ocho horas y se lavaron con solución de lavado. Para las tinciones con azul alician se dejaron los geles en solución de teñido y se lavaron con agua corriente. Los pesos moleculares hipotéticos de las proteínas se determinaron como se describe:

1. Se separó el gel de separación y se midió la distancia total (inicio a fin) del gel de corrido
2. Se midió la distancia de movimiento (en relación al origen) de cada uno de las proteínas del marcador de peso molecular
3. Se midió la distancia de las proteínas desconocidas
4. Se calculó (para cada proteína) la movilidad relativa, que es la distancia de movimiento entre la distancia total
5. Se calculó el logaritmo base 10 de los pesos moleculares (PM) de cada proteína del marcador de peso molecular
6. Se realizó una gráfica de los Log PM contra la movilidad relativa de las proteínas del marcador de PM

7. Con la movilidad relativa de las proteínas desconocidas se extrapoló hacia los Log PM (de los marcadores de PM) y se calculó el antilogaritmo para obtener los PM hipotéticos de las muestras analizadas.

Tinción de gel SDS-PAGE con nitrato de plata.

La tinción de plata es muy sensible, detecta hasta 1 ng de proteína, por lo tanto se debe de usar agua bidestilada para todas las soluciones.

1. Se corrió un gel SDS-PAGE con las muestras obtenidas a 120V por 1hr. (geles chicos), 4-6 hrs. (geles grandes). Se retiró el gel de separación.
2. Para precipitar las proteínas en el gel se colocó el gel en 50% metanol 5% ac. acético por 20 min.
3. Para remover el acido acético se lavó con 50% metanol, en agitación lenta por 10 min.
4. Para remover el metanol se lavó 2 veces con ddH₂O con agitación lenta por 10 min. cada una.
5. Se enjuagó por 1 min. con 0.02% de Na₂S₂O₃ para precipitar al sulfido de plata sobre las proteínas.
6. Se enjuagó 2 veces con ddH₂O 1 min. cada una; para remover el exceso de tiosulfato de sodio.

7. Se incubó por 20 min. en 0.1% de AgNO_3 a 4 °C. Nota: La plata es un agente oxidante potente por lo que se debe de enfriar la solución antes de usarla.
8. Se mezclaron 108 μL de HCHO por cada 100 mL de 2% Na_2CO_3 (solución reveladora)
9. Se enjuagó 2 veces en ddH_2O por 30 seg. cada una. Nota: no exceder el tiempo de lavado para no remover la plata unida)
10. Se agregó un poco de la solución reveladora y se agitó hasta que tornara amarillenta la solución.
11. Se descartó la solución reveladora y se agregó más solución reveladora fresca y se agitó de nuevo hasta que se vieran bandas (color amarillo oscuro) definidas.
12. Se descartó rápidamente la solución reveladora y se detuvo la reacción con ácido acético al 5%.

INMUNOTRANSFERENCIAS

Se obtuvo una muestra de proteínas totales de *X. fastidiosa* STL por sonicación como se describió previamente. Las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida al 10% con SDS, el marcador de peso molecular utilizado fue Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (#SM0671) de Fermentas™. El amortiguador de transferencia utilizado fue Tris Base 0.025 M, Glicina 0.192 M,

SDS 0.0013 M y metanol al 20%, pH 8.3 El amortiguador de bloqueo TBST 5% Leche en polvo. El TBST es Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Tween 0.1 % V/V. Solución de primer anticuerpo: scFv 1:1000 en TBST 5% Leche. Solución de segundo anticuerpo anti 6His-peroxidasa (Invitrogen™) 1:2000 en TBST. El gel se transfirió a nitrocelulosa como se describe:

1. Se colocaron las muestras de proteínas totales de *X. fastidiosa* y el marcador de peso molecular un gel por 1 hr a 120 V en una cámara para minigeles Bio-Rad™.
2. Se removió el gel de condensación y se midió el área del gel de corrido.
3. Se colocó el gel en una charola con amortiguador de transferencia
4. En otra charola con amortiguador de transferencia se sumergieron los soportes de plástico. El soporte negro (-) para transferencia en minicámara Bio-Rad™ debe de ir abajo y estar cubierto por 1 cm. de amortiguador de transferencia.
5. Se sumergieron las dos esponjas en la charola y se mantuvieron sumergidas hasta que se eliminaron las burbujas de aire. Se colocó una de las esponjas en el soporte negro y se mantuvo sumergida.
6. Se cortaron 6 piezas de papel filtro Whatman™ 3M del tamaño del gel. Se cortó un filtro de nitrocelulosa del mismo tamaño. Nota: La membrana debe de ser manejada con pinzas.
7. Se humedecieron 3 papeles filtro en la charola con los soportes y se colocaron uno por uno sin aire encima del soporte negro (el soporte

negro es el que va en el lado del ánodo, de manera que las proteínas migren hacia el polo positivo ayudadas por el SDS).

8. Se colocó el gel encima del paquete
9. Con unas pinzas se sumergió la membrana en el amortiguador de transferencia evitando que quedaran burbujas de aire atrapadas y se colocó la membrana de nitrocelulosa sobre el gel de poliacrilamida.
10. Se colocaron los 3 filtros previamente humedecidos en amortiguador de transferencia y sobre estos la otra esponja. Se mantuvo sumergido el paquete, mientras se removían las burbujas de aire.
11. Se bajó el soporte blanco y se cerró el broche sin que entrara aire.
12. Rápidamente se colocó el paquete en la cámara de electroforesis con las bisagras hacia arriba y el soporte negro (inferior) hacia el ánodo. Se puso una charola con hielo dentro de la cámara para evitar sobrecalentamiento. Se ajustó el nivel de amortiguador, se depositó una barra magnética y se colocó la cámara sobre un agitador magnético.
13. El gel se mantuvo a 120 V por ~1 hora.
14. Se apagó la fuente, se abrieron los soportes, se removió la membrana y se colocó con el lado de las proteínas arriba en otra charola con 20 mL de TBST 5% Leche (leche descremada Carnation®). Se dejó incubando por 8 horas a 4°C. Nota: La solución de TBST 5% leche se centrifugó para remover impurezas.

15. Se tiró la solución de bloqueo y se agregó la solución de 1^{er} Anticuerpo (>20 µg de scFv en 20 mL TBST 5% Leche. [1:1000])
16. Se incubó a 4°C con agitación moderada ~ 8 horas
17. Se descartó la solución de 1^{er} anticuerpo y se lavó con 25 mL TBST por 5 minutos a temperatura de ambiente. Se colocó la nitrocelulosa con las proteínas hacia arriba en la charola en agitación y se repitió 2 veces.
18. Antes de la tercera lavada con TBST tener al alcance la solución de segundo anticuerpo 1:2000 en TBST (anti-6His) acoplado a peroxidasa.
19. Se desechó la tercera lavada y se agregó la solución de 2^o anticuerpo. Se incubó con el lado de las proteínas hacia abajo por 1.5 horas a temperatura ambiente con agitación suave.
20. Se lavó 3 veces en 15 mL de TBST 10 minutos cada una, con las proteínas hacia arriba.
21. Para la visualización del segundo anticuerpo se utilizaron los reactivos de ECL[®] Western Blotting de Amersham Biosciences[™] y se siguió el protocolo de quimioluminiscencia descrito en manual ECL[®] Western Blotting Detection Reagents and Analysis System, de Amersham Biosciences[™] como se describe:
22. Se mezclaron los reactivos A y B 1:1. Por cada membrana de un minigel se mezcla 1mL de A y 1mL de B inmediatamente antes de utilizarlos.
23. Se removió la membrana, se escurrió y se colocó con el lado de las proteínas hacia arriba sobre una tira de plástico tipo SaranWrap[™]

evitando que se formaran burbujas de aire o dobleces. Se envolvió completamente la membrana y se colocó con las proteínas hacia arriba en una cámara para películas de rayos X.

24. En un cuarto oscuro equipado con luz roja se colocó una película (se recomienda Kodak Biomax™ ML scientific imaging film de 13 x 18 cm) encima de la membrana. Se incubó por 2 minutos.
25. Se removió la película y se reveló por 1.5 min en revelador de película de rayos X (se recomienda Kodak X-Omat™ Developer and replenisher), y se lavó por 30 seg. en agua corriente y 10 min en fijador (se recomienda Kodak X-Omat™ fixer and replenisher). (Después de 1 min se puede encender la luz). Finalmente, se lavó con agua por 30 min y se secó al aire. (Si no hay bandas visibles se puede exponer otra película por mas tiempo). Nota: es importante guardar la membrana de nitrocelulosa con los marcadores de peso molecular para poder sacar los PM de las muestras.

Experimentos de recuperación de antígeno con scFv soluble y Ni-NTA™

1. A la solución obtenida del protocolo de disrupción celular por sonicación (pH ~ 7) se le agregaron ~ 300 µg de scFv y se dejó en agitación a 4°C por 2-4 hrs.
2. Se agregó 300 µL de Ni-NTA™ (Invitrogen™) y se dejó en agitación a 4°C por 2-4 hrs.

3. Se pasó la solución (~ 900 μ L) a una columna de exclusión por afinidad de BioRad™
4. Se lavó con 50 mL PBS 1X pH 7.4 4°C.
5. Se lavó con 10 mL de amortiguador de lavado (20 mM de imidazol)
6. Se disoció el inmunocomplejo con 100 μ L de amortiguador de elusión (500 mM de imidazol)
7. Se dejó circular una vez ~ 170 μ L de amortiguador de muestra (SB)
8. Se resuspendió el AffiGel®10 en SB.
9. De los pasos 6-8 se tomaron muestras etiquetadas como posible antígeno.
10. Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida a varias concentraciones (10,7.5 y 15%) y se tiñeron con AgNO₃.

Glosario

- Biofilm.** Película bacteriana; generalmente compuesta por exopolisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos.
- Cebadores.** Fragmentos pequeños (~20 nucleótidos) de nucleótidos. También se llaman oligonucleótidos o primers.
- Eluir.** Separar o purificar una molécula, generalmente unida químicamente a una superficie (p.e. una matriz de agarosa con un grupo químico activado), por la acción química de otra molécula.
- Inmunocomplejo.** Complejo químico formado por atracciones electrostáticas entre el CDR de un anticuerpo y su antígeno.
- Sonicar.** Aplicar fuerza mecánica por medio de ondas de ultrasonido (Disrupción celular por medio de sonicación).

Abreviaciones

ADNr	ADN ribosomal
ALSD	Allmond Leaf Scorch Disease (quemadura de hoja del almendro)
CDR	Complementarity Determining Region (región determinante de complementariedad)
CLS	Coffee Leaf Scorch (quemadura de hoja en el café)
CVC	Citrus Variegated Chlorosis (clorosis jaspeada en cítricos)
ddH₂O	agua bidestilada
has.	hectáreas
Ig	Inmunoglobulina
kDa	kilodaltones (también se utiliza kD)
μ	micro
m	mili
M	molar
n	nano
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PD	Pierce's Disease (Enfermedad de Pierce)

pH	potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
RGB	running gel buffer (amortiguador de corrido)
SB	sample buffer (amortiguador de muestra). Contiene SDS y el agente reductor β -mercaptoetanol.
scFv	Single Chain Fragment Variable (fragmento variable de cadena sencilla)
SDS	Duodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con SDS
SGB	Stacking gel buffer (amortiguador de condensado)
Xf	<i>Xylella fastidiosa</i>