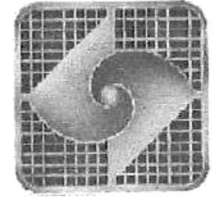


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS



**DESPLIEGUE DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS EN FAGOS
CONTRA OVOCITOS DE *Urechis caupo***



Tesis Profesional

Que para obtener el Título de:

BÍOLOGO

presenta:

Paola Gabriela Batta Lona.

Ensenada, B. C.

Abril 2003

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

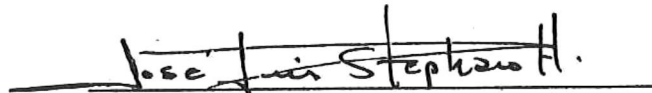
**DESPLIEGUE DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS EN FAGOS
CONTRA OVOCITOS DE *Urechis caupo***

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA:

PAOLA GABRIELA BATTALONA

APROBADO POR:



**DR. JOSE LUIS STEPHANO HORNEDO
PRESIDENTE**



**DR. FAUSTINO CAMARENA ROSALES
SECRETARIO**



**DRA. MEREDITH GOULD CHAMBERS
PRIMER VOCAL**

DEDICATORIA

A **mi familia** por su cariño, su comprensión, por dejarme decidir y aprender de mis decisiones. **Gracias..**

A **mi madre** por tu ejemplo, tu fortaleza y tus opiniones.

A **mi padre** por escuchar y apoyarme de manera incondicional.

A **mi hermano** a pesar de la ausencia, por mantener nuestra comunicación.

AGRADECIMIENTOS

A los sinodales (Dr. Faustino Camarena Rosales, Dr. Alexei Licea Navarro y M.C. Bernardino Ortiz Barron) por su tiempo y correcciones, en especial al Dr. Jose Luis Stephano y la Dra. Meredith Gould, por su paciencia y todo el conocimiento proporcionado en el laboratorio, por ser las personas que son.

A Damian por coincidir en este espacio y tiempo, por tu apoyo y palabras alentadoras, por tu cariño.

A la familia Martínez (Sylvia, Salvador, Samuel) gracias por acogerme, hacerme sentir en casa, por su respaldo y cariño. Por ser el patrocinador de transporte entre otros patrocinios.

A la Beba por tu punto de vista, los consejos y la compañía

A Liz por su participación en el inicio de este proyecto y obviamente al TEAM (Sharon, Guille, Diana y Carmen) que no se acaben los buenos tiempos.

A mi compañeros de estudio, Aurora y Osiris por todo lo que vivimos y compartimos, además del apoyo brindado desde el inicio de la licenciatura. A las manis (Adriana y Ale), por nuestras pláticas motivantes. A Arquí y Lalo por su amistad.

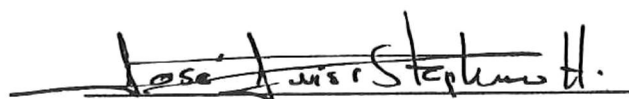
A los estudiantes de física (Minerva, Paco, Jesús C., Hector, Julio y Rafael) por ser parte de esta última etapa, en especial a Axel y Pepe por haberme respaldado en eventos importantes.

Al equipo del laboratorio que me acompañó en la elaboración de esta tesis, Citlali Harris, Amelia Portillo, Manuel Ornelas, Oscar Zavala y Bernardo Cortina.

Resumen de la tesis de Paola Gabriela Batta Lona presentada como requisito parcial para la obtención de la licenciatura en Biología. Ensenada Baja California, Mexico. Abril del 2003.

Despliegue de anticuerpos en fagos, contra ovocitos de *Urechis caupo*.

Resumen aprobado :



JOSE LUIS STEPHANO HORNEDO

RESUMEN

El despliegue de anticuerpos es un método para producir una gran variedad de anticuerpos expresados en la superficie de bacteriófagos. Las secuencias que codifican para cadenas pesadas y ligeras son combinadas al azar y son insertadas en un vector (fagémido) que es introducido en la bacteria, misma que es infectada por un fago ayudador. Los dos fagos se complementan para producir y ensamblar fagos, cada uno expresando un anticuerpo diferente. En este trabajo se inmunizó una gallina con ovocitos fijados en gluteraldehído, y después a partir del RNAm del bazo se sintetizó cDNA. Utilizando la técnica de PCR y cebadores complementarios a sitios que flanquean las regiones conservadas del anticuerpo, a partir del cDNA se produjeron secuencias de fragmentos variables de cadena sencilla (fvcs) del anticuerpo contra las moléculas de la superficie del ovocito. Estas fueron incorporadas al genoma de un fago para su expresión en la superficie del mismo. Los fagos que desplegaron fvcs contra la superficie del ovocito, fueron seleccionados y se probó su capacidad para bloquear la fertilización por el espermatozoide. La fertilización se redujó en un 80% en presencia de los fagos, indicando que los fvcs están bloqueando las moléculas de la superficie del ovocito, mismas que son importantes en la interacción ovocito-espermatozoide. Este trabajo representa la primera aplicación del despliegue de anticuerpos en invertebrados y muestra que este método será útil para abrir nuevas áreas de investigación.

ABSTRACT

Phage display is a method for producing a large variety of antibodies expressed on the surface of bacteriophages. Sequences that code for heavy and light chains are randomly recombined and inserted into a vector (phagemid) that is introduced into bacteria which are also infected with helper phage. The two phages complement each other to produce a large library of phages, each expressing a different antibody. In this study, a chicken was immunized with glutaraldehyde-fixed oocytes, then cDNA was produced from spleen mRNA. Sequences coding for heavy and light chains were amplified by PCR using primers complementary to conserved flanking regions. Phages expressing antibodies (Single chain variable fragment, scfv) against the oocyte surface were selected by pannings then tested for their ability to block fertilization by sperm. Fertilization succes was reduced by 80% in the presence of the phages, indicating that the antibodies were blocking molecules on the egg surface that are important for the sperm-egg interaction. This work represents the first application of phage displayed antibodies in invertebrates and shows that this method will be useful for opening new areas of investigation.

ÍNDICE

Aprobación del trabajo	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
INTRODUCCIÓN	11
ANTECEDENTES	16
OBJETIVOS	18
MATERIAL Y MÉTODOS	19
Preparación del antígeno	19
a)Obtención y preparación de ovocitos	
b)Extracto de capas del ovocito	
Inmunizaciones	25
Obtención de suero	27
Determinación de la producción de anticuerpos en la gallina por ensayo inmuno enzimático (ELISA)	28
Obtención de ARN total de bazo de gallina inmunizada	32
Síntesis de cDNA de hebra sencilla a partir del RNAm	36
Amplificación de cadena pesada y ligera del anticuerpo, y su traslape - extensión por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	38

Método para la purificación de producto de PCR (traslape, amplificación cadena pesada y ligera) y productos de digestión.	48
a) Precipitación de los productos de PCR (cadena pesada y ligera y su traslape) y los productos de la digestión	
b) Método de purificación: congelamiento y trituración (Freeze – Squeeze)	
Digestión del vector y del producto del PCR de traslape	51
Ligación de los productos de la digestión	53
Preparación de células competentes con CaCl₂ y su transformación (Introducción del producto de ligación	56
a) Preparación de células competentes	
b) Transformación con CaCl ₂	
Amplificación de las células transformadas	59
Rondas de selección y amplificación de los fagos que despliegan el fragmento variable de cadena sencilla (fvcs) contra las moléculas superficiales del ovocito de <i>U. caupo</i>.	62
a) Selección de los fagos que se unen a los ovocitos.	
b) Amplificación de los fagos seleccionados	
Determinación de la presencia de fagos con fvcs contra moléculas de la superficie del ovocito por ELISA	68
a) Ovocitos	
b) Extracto de capas de ovocito	
Experimento biológico con los fagos seleccionados	73

RESULTADOS	
Determinación de la producción de anticuerpos en la gallina por inmuno ensayo enzimático	75
Obtención de RNA total de bazo de gallina inmunizada	77
Síntesis de cDNA de hebra sencilla a partir del RNAm	77
Amplificación de cadena pesada y ligera por PCR	78
Vinculación y extensión de las cadenas por PCR	80
Digestión del vector y del producto del PCR de traslape	81
Ligación y Transformación	82
Rondas de selección de los fagos que despliegan fvcs	83
Determinación de la presencia de fagos con fvcs contra moléculas de la superficie del ovocito por ELISA	84
Experimento biológico con los fagos seleccionados	87
DISCUSIONES	90
CONCLUSIONES	94
BIBLIOGRAFÍA	97
ANEXOS	
Anexo 1. Esquema del método de transformación con CaCl_2	99
Anexo 2. Producción de fago ayudador VCSM13	100
Anexo 3. Esquema general de las rondas de selección	101
Anexo 4. Recetas	102
Anexo 5. Reactivos y su función	106
Anexo 6. Reactivos y sus marcas	113

INDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
I	Cambios morfológicos después de la fertilización en <i>Urechis caupo</i> a 16°C	12
II	Diseño del ensayo inmuno enzimático (ELISA) para la determinación de la producción de anticuerpos de gallina.	30
III	Resultados esperados en la ligación y recomendaciones.	55
IV	Diseño de la ELISA para la determinación de la presencia de fagos con fucs utilizando como antígeno ovocitos.	70
V	Esquema de la ELISA para la determinación de la presencia de fagos que desplieguen fucs contra moléculas en la superficie del ovocito, utilizando como antígeno extracto de capas.	72
VI	Diseño de la placa para la determinación de la producción de anticuerpos en la gallina por inmuno ensayo enzimático.	75
VII	Esquema de la placa para la determinación de la presencia de fagos con fucs por ELISA utilizando como antígeno extracto de capas.	84
VIII	Valores de absorbancia a diferentes tiempos, obtenidos de la ELISA en donde se utilizo como antígeno ovocitos fijados con gluteraldeido.	86
IX	Ovocitos activados y no activados con fagos y sin fagos en diferentes tiempos.	87

INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Ubicación de los orificios donde se encuentran los gametos de <i>Urechis caupo</i> .	19
2	Diagrama de flujo para la preparación del extracto de capas de ovocito.	21
3	Preparación de la emulsión para inmunizar a una gallina	26
4	Zona donde se inmuniza a la gallina	26
5	Diagrama de flujo para la determinación de la producción de anticuerpos en la gallina por ELISA.	28
6	Reacción de la fosfatasa alcalina sobre el sustrato en el ELISA.	29
7	Diagrama de flujo para la obtención de RNA total del bazo de una gallina inmunizada.	32
8	Ubicación anatómica del bazo en la gallina.	34
9	Diagrama de flujo para la síntesis de cDNA de una sola hebra.	36
10	Estructura típica del anticuerpo IgY.	39
11	Ubicación de los cebadores en las regiones hipervariables de la cadena pesada y ligera en el anticuerpo.	40
12	Diagrama que ubica la posición de los cebadores en el anticuerpo.	41
13	Secuencias de los cebadores y su unión durante la reacción de PCR de traslape.	47
14	Diagrama de flujo para el método de purificación por congelación – trituración.	48
15	Diagrama de flujo para la digestión del producto de PCR de traslape y el vector.	51

16	Diagrama de flujo para la ligación de los productos de la digestión.	53
17	Diagrama de flujo para la preparación de células competentes con CaCl_2 y su transformación.	56
18	Diagrama de flujo para la amplificación de células transformadas con CaCl_2 .	59 - 60
19	Diagrama de flujo para la placa de selección.	62
20	Diagrama de flujo para la amplificación de los fagos seleccionados.	64 - 65
21	Determinación de la presencia de fagos con fvc's contra las moléculas de la superficie del ovocito por ELISA.	68
22	Reacción de la peroxidasa sobre el sustrato en el ELISA.	69
23	Resultados de el ELISA para la determinación de la producción de anticuerpos en la gallina.	76
24	Electroforesis de la amplificación de la cadena pesada y ligera por PCR.	79
25	Electroforesis del producto de PCR de traslape.	80
26	Electroforesis del producto de PCR de traslape purificado.	80
27	Electroforesis del vector sin digerir.	81
28	Electroforesis del vector digerido, purificado y sin purificar.	81
29	Placa de LB con antibiotico, presenta colonias de células transformadas.	82
30	Resultados de la determinación de la presencia de fagos con fvc's contra las moléculas de la superficie del ovocito por ELISA utilizando como antígeno extracto de capas.	85
31	Fotografía de ovocitos de <i>Urechis caupo</i> .	87
32	Gráfica de los resultados del experimento biológico.	88

INTRODUCCIÓN

Durante la fecundación el espermatozoide se une a las moléculas de la superficie del ovocito. Aunque las interacciones de los gametos han sido estudiadas de manera extensa, muchos detalles moleculares de los mecanismos implicados aún se desconocen. Por ejemplo, en el gusano marino *Urechis caupo*, se ha identificado en el espermatozoide una proteína que se adhiere a la capa externa del ovocito e interacciona con la membrana plasmática para activar al ovocito (Gould y Stephano, 1989, 1996), pero aún no se han caracterizado los receptores en la superficie del ovocito, intentando identificarlas, se utilizó la técnica de despliegue de anticuerpos (o fragmento variable de cadena sencilla, fvcs) en bacteriófagos, para la producción de los mismos contra las moléculas de la superficie del ovocito.

En este trabajo se utilizó el gusano marino *Urechis caupo* por su amplia disponibilidad de gametos todo el año, esta especie contiene 6 sacos para almacenar ovocitos o espermatozoides maduros. Los espermatozoides inmaduros se encuentran en agrupaciones en el líquido celómico, al alcanzar la madurez se separan y cada espermatozoide es almacenado en los sacos para posteriormente ser liberado. La espermatogénesis se lleva a cabo aproximadamente en 10 días a temperaturas de 12 - 14°C. Por otro lado el último paso en

la ovogénesis es la adquisición de una edentación que al parecer facilita el transporte selectivo de los ovocitos maduros del celoma hacia los sacos donde son almacenados. Los ovocitos maduros de *U. caupo* presentan una cubierta superficial o capa vitelina donde se lleva a cabo la primera interacción con el espermatozoide.

En experimentos de fecundación al agregar los espermatozoides a los ovocitos, se observan los siguientes eventos:

Tabla I
Cambios morfológicos después de la fertilización
en *Urechis caupo* a 16°C¹

Evento	Tiempo (minutos)
Adición de los espermas	0
Cono de entrada del espermatozoide	Durante el 1
Redondeo completo del ovocito	4
Comienzo de la elevación de la capa vitelina	4
Rompimiento completo de la vesícula germinal	15
Desaparición completa del nucleólo	20 - 22
Primer cuerpo polar	35
Segundo cuerpo polar	45
Fusión pronuclear	70 -80
Primera división	90
Segunda división	120

¹Información de Gould, 1975.

Se observarán estos eventos para determinar si los fucs de los fagos seleccionados contra las moléculas de la superficie del ovocito bloquean el proceso de fecundación en *U. caupo*.

Recientemente el despliegue de anticuerpos en fagos se ha convertido en una tecnología muy poderosa. Los fagos filamentosos pueden presentar en su superficie péptidos, proteínas o fragmentos de anticuerpo, esta técnica se ha utilizado para identificar y/o bloquear moléculas en la superficie de diferentes células (Souriau, 1998), con esta herramienta se pueden caracterizar sitios de interacción, como los receptores involucrados en el proceso de la fecundación.

El anticuerpo o inmunoglobulina está basado en una estructura de 4 cadenas organizadas en 3 unidades funcionales, dos de las unidades son idénticas y con la capacidad de unirse a un antígeno, estas unidades se denominan brazos Fab (fragmento de unión al antígeno). La tercera unidad, Fc, esta generalmente involucrada como complemento del sistema efector.

Las dos cadenas pesadas son iguales y atraviesan las regiones Fab y Fc, mientras que las dos cadenas ligeras solo están asociadas con la región Fab. Los fragmentos Fab se dividen en 2 regiones, la constante y la variable. La región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera forman el fragmento variable (fv). (ver fig. 10)

El rompimiento de la inmunoglobulina (IgG) con papaina produce fragmentos Fab y Fc. Estos fragmentos son pequeñas entidades moleculares estables que exhiben la mayoría de las propiedades que presentan cuando forman parte de una partícula completa de anticuerpo. El fragmento fv es difícil de producir y purificar por digestión enzimática y también se considera mucho menos estable. Sin embargo utilizando la técnica de despliegue de anticuerpos se pueden producir fragmentos variables de cadena sencilla (fvcs) al introducir un péptido de unión entre los dominios V_H y V_L , lo cual ofrece las siguientes ventajas; primero, la construcción de la biblioteca se puede simplificar haciendo una reacción de traslape y extensión por PCR, lo cual reduce de manera efectiva el número de pasos, segundo, la capacidad de fvcs para multimerizar puede mejorar la avidéz por el antígeno y facilitar su selección, especialmente contra ciertos antígenos como moléculas en la superficie celular, y, por último, el rendimiento, la pureza y la estabilidad de las moléculas fvcs en E.coli tiende a ser mayor que con el Fab (Burton, 2001).

El fragmento variable de cadena sencilla, por su tamaño, presenta un menor impedimento alostérico, por lo que varios fragmentos se pueden unir a diferentes regiones del antígeno. Además la gran diversidad generada por la unión de cadenas pesadas y ligeras aumenta la posibilidad de identificar las moléculas de interés.

Dadas estas ventajas, en este trabajo se pretende expresar fvcs (en la superficie de bacteriófagos) contra las moléculas de la superficie del ovocito y se reportaran los resultados de los efectos de estos fvcs en la fecundación de los ovocitos de *U. caupo*.

Este trabajo ofrece protocolos claros que pueden ser consultados y aplicados en el laboratorio. La metodología de este trabajo esta estructurada de tal manera que sirva como un manual de laboratorio y que los experimentos puedan ser fácilmente reproducibles.

ANTECEDENTES

Procesos importantes como la fecundación se están estudiando de manera más detallada con la ayuda de la caracterización molecular (Kay et al. 1996), lo cual nos ayuda a entender y conocer las interacciones moleculares involucradas en estos procesos. Se han utilizado anticuerpos para identificar moléculas involucradas en la interacción espermatozoide – ovocito, por ejemplo:

Gache et al. (1983) a partir de hibridomas en ratón llevó a cabo la producción de 31 anticuerpos monoclonales contra la capa vitelina del ovocito de erizo. Sólo 8 de los 31 anticuerpos monoclonales lograron inhibir la fertilización evitando la unión del espermatozoide con la capa vitelina de los ovocitos.

Saling et al. (1985), logró la producción de 6 anticuerpos monoclonales contra diferentes partes del espermatozoide de ratón, probó su efecto en la fertilización *in vitro* y sólo dos anticuerpos monoclonales mostraron una inhibición significativa. La inhibición fue independiente de la presencia o ausencia de la zona pelúcida que rodea al ovocito. Con esto, Saling concluye que los lugares específicos de inhibición para los dos anticuerpos monoclonales contra espermatozoide, estaban en la membrana plasmática del ovocito. Sus resultados muestran que el uso de los anticuerpos monoclonales es una herramienta importante para interrumpir la fecundación, y posteriormente, identificar los componentes de los gametos que participan de manera individual en los eventos que ocurren durante el proceso de fertilización.

Por otro lado en materia de despliegue de anticuerpos George Smith (1988), mostró que la relación entre el fenotipo y el genotipo podía ser establecida en bacteriófagos filamentosos. Esto dio lugar al surgimiento de la nueva tecnología de despliegue de anticuerpos en bacteriófagos (Smothers et al. 2002). Smith mostró que un fragmento de DNA extraño podía ser insertado en el gen III del fago filamentosos, el cual codifica para la proteína pIII que conforma la cápside del fago, creando una fusión protéica en el dominio amino terminal. La fusión protéica es incorporada al fago, el cual mantiene su capacidad de infección y despliega el péptido extraño en su superficie (Barbas et al, 1999).

Lerner y sus colegas (1992), reportaron que bibliotecas con recombinaciones al azar de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos podían ser expresadas en la superficie de fagos y convertirse en una ruta alternativa para la selección de los anticuerpos monoclonales de especificidad conocida.

Esta técnica no ha sido utilizada en experimentos que involucren invertebrados marinos (comunicación personal, Gould y Stephano). Debido a los atributos mencionados, en este trabajo se propone su utilización.

OBJETIVO GENERAL:

Expresar en la superficie de bacteriófagos, fragmentos variables de cadena sencilla del anticuerpo contra las moléculas de la superficie del ovocito de *Urechis caupo* y determinar su efecto en el proceso de fecundación.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Inducir en una gallina la producción de anticuerpos contra moléculas de la superficie de los ovocitos de *Urechis caupo*.
- Por medio de técnicas de biología celular y molecular producir fragmentos variables de cadena sencilla (fvcs) de los anticuerpos contra la superficie de los ovocitos de *Urechis caupo*.
- Expresar los fragmentos variables de cadena sencilla en bacteriófagos.
- Seleccionar a aquellos bacteriófagos que desplieguen fvcs con mejor unión al ovocito.
- Determinar si los fvcs de los fagos seleccionados contra las moléculas de la superficie del ovocito de *Urechis caupo* bloquean el proceso de fecundación.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO

a1) Obtención de gametos del gusano marino *Urechis caupo* mantenido en acuarios a 18°C.

El gusano marino *U. caupo* presenta tres pares de orificios cerca de la proboscis que se conectan a unos sacos que contienen los gametos (Gould, 1975), (Fig. 1).

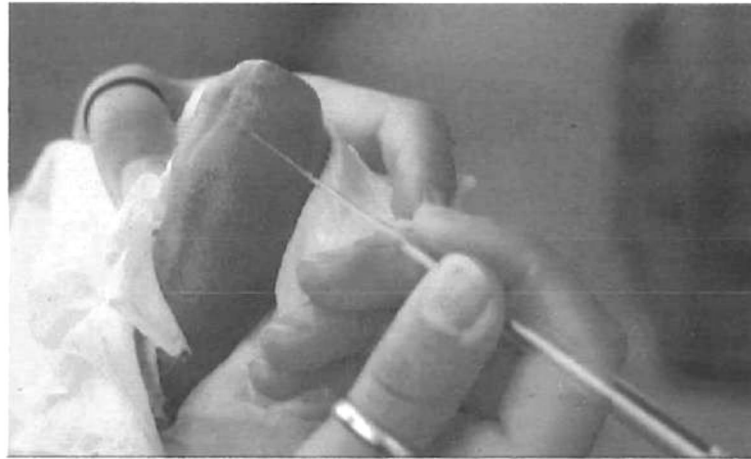


Figura 1. La punta de la pipeta indica la ubicación de los orificios de donde se extrajeron los gametos de *Urechis caupo*.

- Para obtener los ovocitos se fabricó una pipeta con punta roma, se dilataron los orificios y con la punta de la pipeta adentro se exprimió con la mano todo el organismo, los gametos fluyen en forma líquida, siendo de color café claro si son hembras y blanco si son machos. Los ovocitos se depositaron en un vaso de precipitado que contiene agua de mar pasada por un filtro de 0.45 μm . Todo el proceso se repitió hasta obtener 1 ml de ovocitos o espermatozoides.

aII) Lavado y fijación de ovocitos

- Para lavar los ovocitos, se dejaron sedimentar por gravedad y se retiró el sobrenadante con una bomba de vacío. Se agregaron 10 ml de agua de mar al sedimento y se filtró por una malla de nylon de 125 μm para retirar basuras. Se transfirió a un tubo y se centrifugó manualmente hasta obtener un paquete de 1 ml de ovocitos.
- Para fijar los ovocitos, se hirvió la bolsa de diálisis (límite de exclusión 3000 Daltons) en agua destilada para eliminar el glicerol y los nitritos.
- Se dejó enfriar la bolsa, se hizo un nudo en uno de los extremos, y se probó que no tuviera perforaciones. Se colocó 1 ml de ovocitos (previamente lavados) en la bolsa y se cerró haciendo un nudo en el otro extremo, evitando dejar aire adentro.
- Se colocó dentro de una probeta que contenía 100 ml de gluteraldehído al 2% en agua de mar, para que se difunda y fije lentamente durante 3 horas. Se mantuvo en agitación constante. Debido a la utilización del gluteraldehído, este procedimiento se llevó a cabo bajo la campana de extracción.
- Para eliminar el exceso de gluteraldehído, la bolsa de diálisis se transfirió a una probeta con 250 ml de amortiguador de fosfatos (PBS, ver Anexo 4) pH 7.4, el proceso se llevó a cabo durante 24 horas con agitación a 4°C, cambiando la solución cada 6 hrs (Boer et al. 1990).

b) Extracto de capas de ovocitos

Para obtener el extracto de capas de ovocitos de *U. caupo* se utilizó el siguiente protocolo:

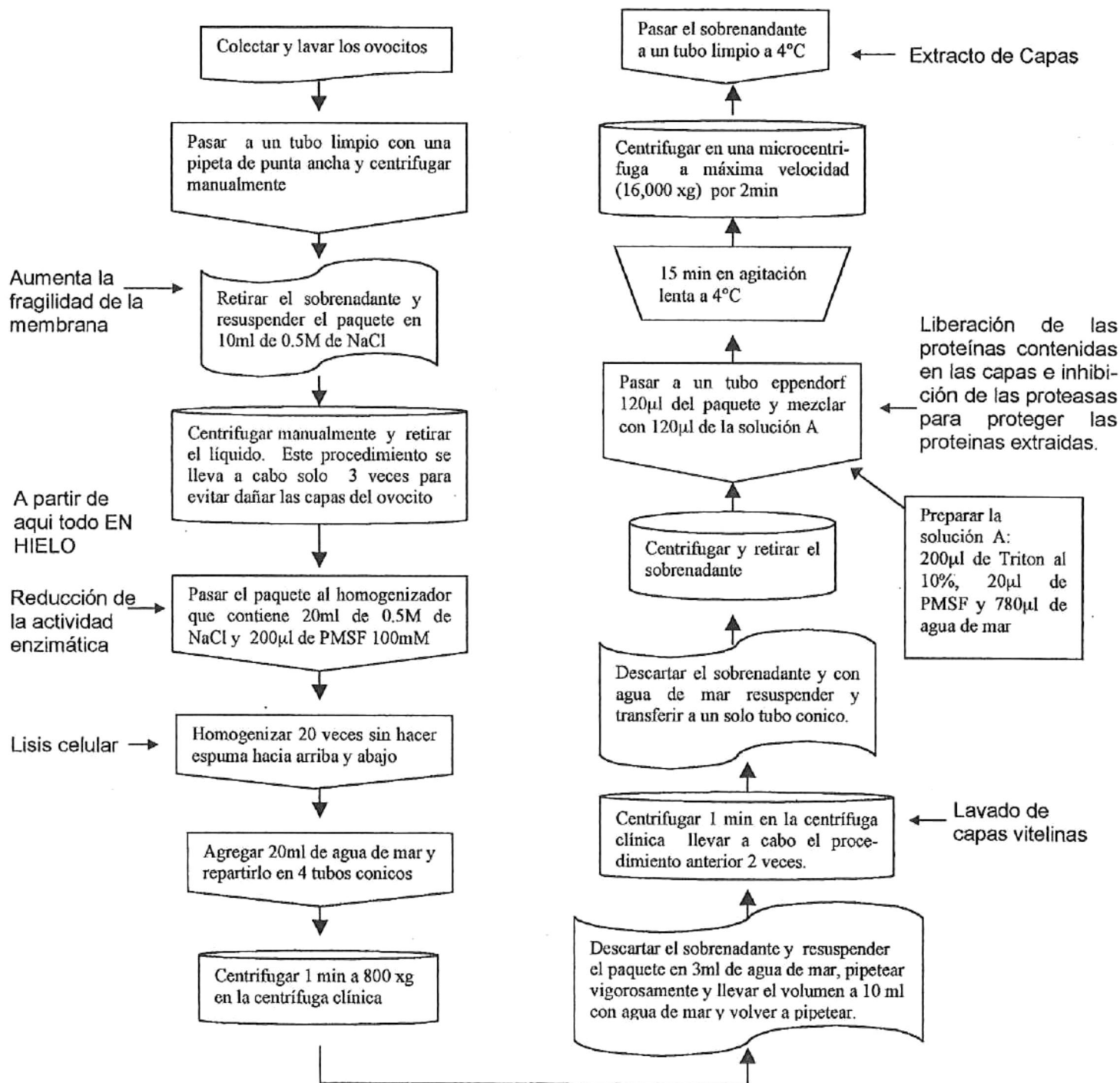


Figura 2.- Diagrama de flujo para la preparación del extracto de capas de ovocitos.

Condiciones del experimento

- Se colectaron y lavaron los ovocitos como se menciona en el método referente a la preparación de los mismos.
- Con pipetas de plástico de punta ancha, se puso todo en un tubo de vidrio limpio.
- Se centrifugó manualmente.
 - Se obtuvieron 0.8 ml de paquete.
- El líquido fue retirado utilizando una bomba de vacío.
- Para lavar el paquete se agregaron 10 ml de 0.5 M de NaCl, se resuspendió, se centrifugó y se retiró el líquido con una bomba de vacío.
- Este procedimiento se realizó únicamente tres veces para evitar que se dañara la capa de los ovocitos, ya que es muy frágil en ausencia de calcio, sin embargo es suficiente para poder obtener el extracto de capas.

EN HIELO

En el homogenizador se pusieron:

- 20 ml de 0.5 M NaCl.
- El paquete resultante del último lavado con 0.5 M de NaCl.
- 200 μ l de PMSF* 100 mM (stock) Es un inhibidor para proteasas la presentación en polvo se disuelve en etanol.

En este protocolo se requiere a una concentración de 1 mM.

*Las casas comerciales de los reactivos se encuentran en el Anexo 6

- El paquete se homogenizó empujando el émbolo contra el homogenizador 20 veces con movimientos ascendentes y descendentes, sin producir espuma.
- Inmediatamente se agregó el mismo volumen (~20 ml) de agua de mar y el homogenizado se repartió en cuatro tubos de vidrio limpios.
- Se centrifugó 1 min. a máxima velocidad (800 xg) en la centrífuga clínica.
- Se retiró el sobrenadante con vacío.
- El paquete (en donde se encuentran las capas) se resuspendió en 10 ml de agua de mar fría (para reducir la actividad enzimática)
- Se centrifugó 1 min. Se lavó con agua de mar (para remover basura del citoplasma).
- Se retiró el sobrenadante con vacío.
- El contenido de los cuatro tubos se transfirió a un tubo, agregando agua de mar para resuspender.
- Se centrifugó y se retiró el sobrenadante (el paquete puede presentar pigmentos, no es necesario removerlos ya que no interfieren en la preparación del extracto de capas).
- Se preparó lo siguiente:
 - 200µl de Tritón X-100 (detergente para disolver la membrana plasmática al 10% asociada con las capas aislando y liberando las proteínas).
 - 20µl de PMSF (Inhibidor de proteasas, evitando así la degradación de las proteínas contenidas en las capas del ovocito).
 - 780µl de agua de mar

- Se tomaron 120 μ l del paquete (capas del ovocito) y se mezclaron con 120 μ l de la solución preparada en un tubo Eppendorf limpio.
- Se mantuvo en refrigeración por 15 minutos en movimiento para que se llevara a cabo la extracción de capas.
- Se centrifugó en la microcentrífuga por 2 min a velocidad máxima (16,000 xg).
- El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se almacenó a 4°C. (ver fig. 2)

2. INMUNIZACIONES

Se utilizó una gallina ponedora Leghorn de un año de edad, ya que en la yema del huevo hay una alta concentración de anticuerpos (IgY) y esto permite obtenerlos fácilmente.

Las inmunizaciones se efectuaron de la siguiente manera:

- Para la primera aplicación se preparó una emulsión con 150 μ l de ovocitos previamente fijados y 150 μ l de adyuvante completo de Freund's (fig. 3). Se inyectó la mitad del volumen final en cada músculo pectoral (fig. 4).
- La segunda inmunización se realizó 15 días después de la primera, mezclando 150 μ l de ovocitos previamente fijados y 150 μ l de adyuvante incompleto de Freund's. A los 8 días de la segunda inmunización se colectó el suero de la gallina y se disectó el bazo.

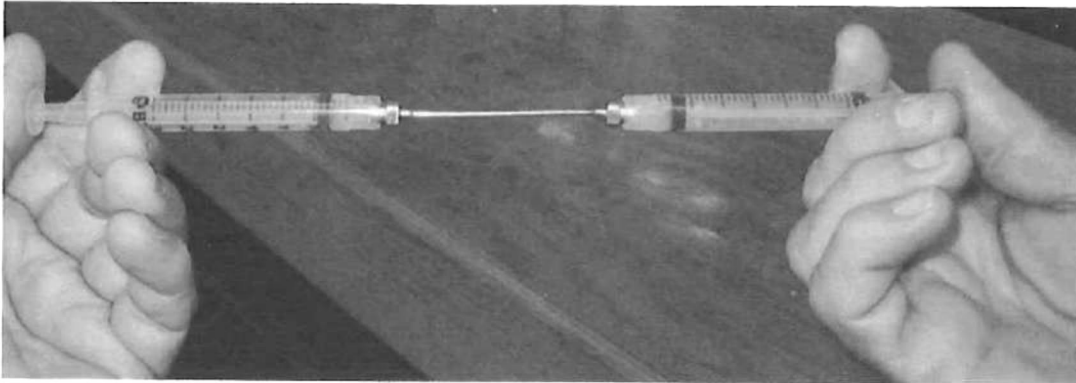


Figura 3.- Procedimiento de emulsificación (mezclado) preparando 150 μ l del antígeno en 0.01M de PBS pH7.4 y 150 μ l del adyuvante (completo e incompleto) utilizando una aguja de dos vías previo a la inmunización.



Figura 4.- Zona en donde se lleva a cabo la inmunización, músculos pectorales (pechugas), vea que el dedo índice de la mano izquierda toca la quilla que se encuentra en la parte media, dividiendo las dos pechugas, a un lado se ve la aguja. Inmunizar en varios sitios de la pechuga introduciendo la mitad de una aguja de 21 g x 32 mm.

3. OBTENCIÓN DE SUERO

Para determinar si la gallina inmunizada produjo anticuerpos contra el antígeno, se obtuvo sangre del organismo y se depositó en tubos de 15 ml. Se dejó reposando a 37°C para que la sangre coagulase. Se despegó el coágulo con un palillo y se incubó a 4°C para retraer el coágulo, después se centrifugó durante 10 min a 1,900 xg a 4°C, se obtuvo el suero recobrando el sobrenadante y se utilizó en el ensayo inmuno – enzimático, ELISA (pág. 28).

4. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS EN LA GALLINA POR ENSAYO INMUNO ENZIMÁTICO (ELISA).

Se realizó un ensayo inmuno enzimático para determinar la presencia de anticuerpos en el suero, como respuesta contra el antígeno aplicado en las inmunizaciones. Se siguió el siguiente protocolo:

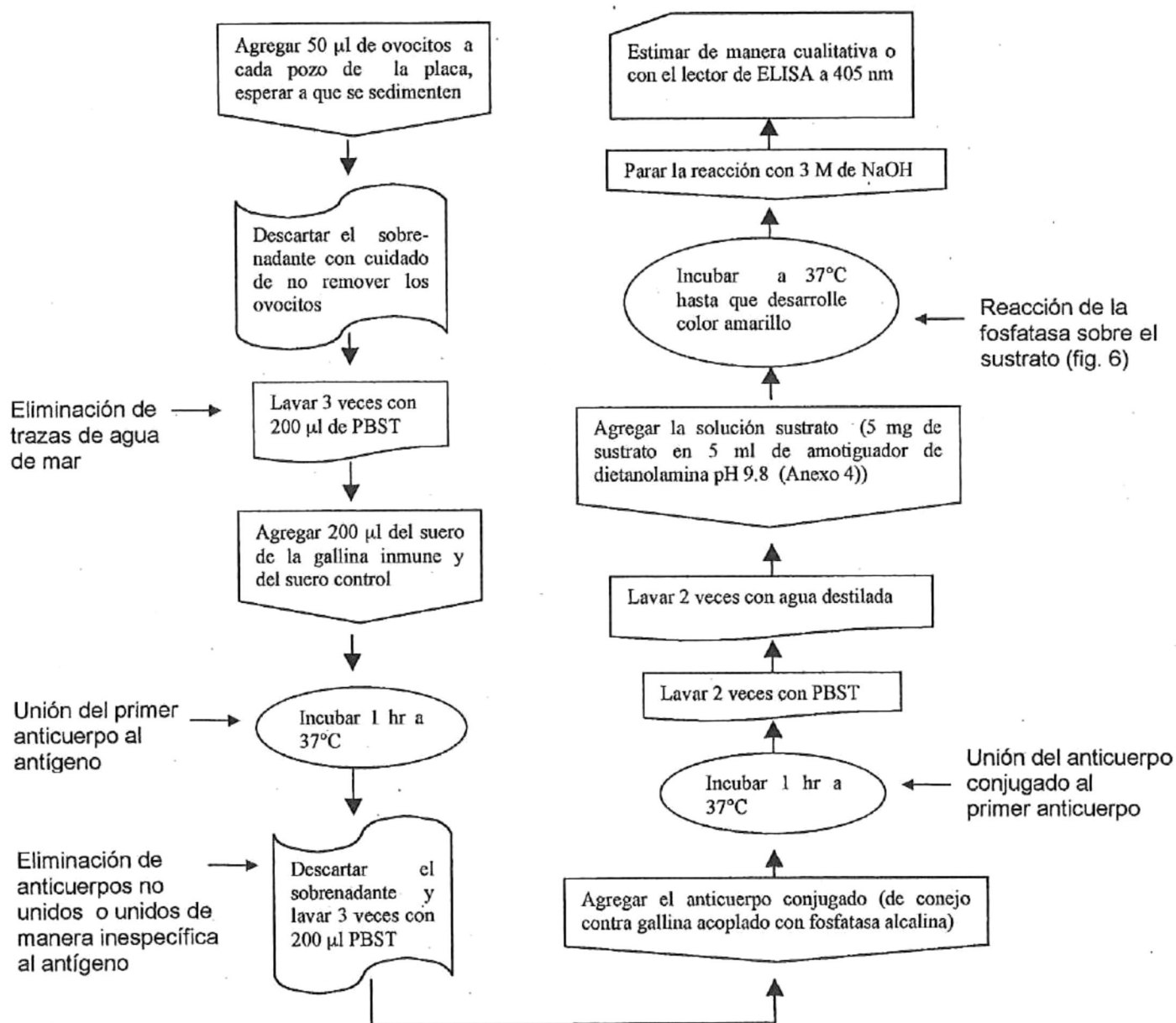


Figura 5.- Diagrama de flujo de la metodología para la determinación de la producción de anticuerpos en la gallina por ensayo inmuno enzimático (ELISA).

Reacción de la fosfatasa alcalina sobre el sustrato en el inmunoensayo enzimático (ELISA).

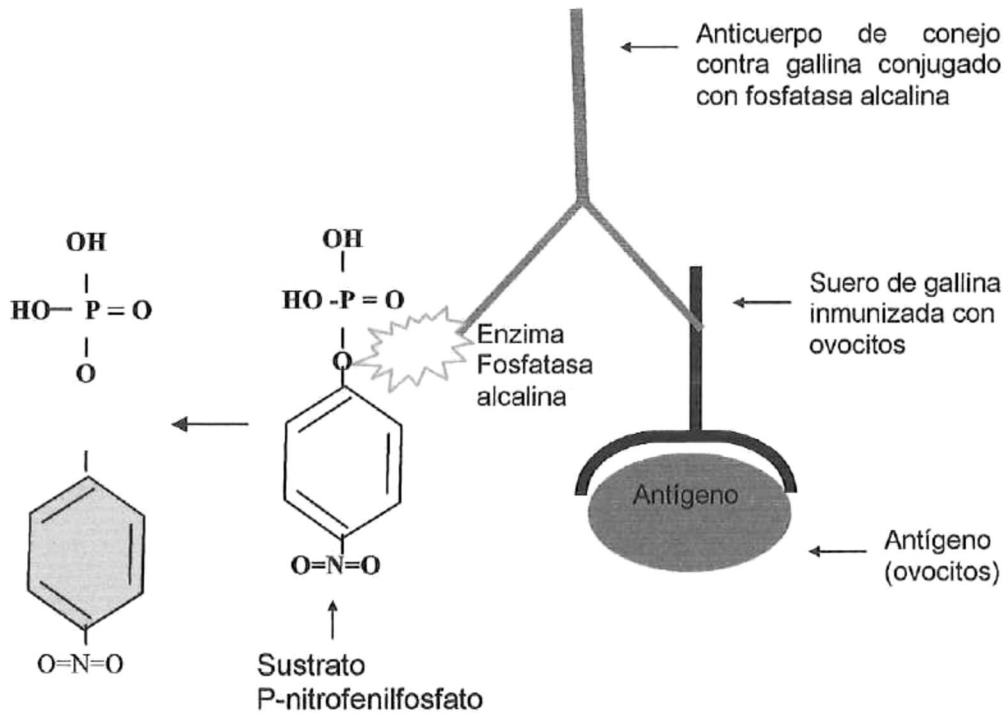


Figura 6- Reacción de la fosfatasa alcalina sobre el sustrato en el ensayo inmuno enzimático (ELISA)

Condiciones del experimento

- En placas Limbro de 96 pozos con una capacidad de 300 μ l, se colocaron 50 μ l de ovocitos (fijados y diluidos en PBS pH 7.4) y se esperó a que sedimentaran.
- Con una micropipeta se descartó el sobrenadante, con cuidado de no retirar los ovocitos.
- Se lavaron 3 veces con 200 μ l de PBS- Tween al 0.05%.
- Se realizó el siguiente diseño de la placa por triplicado (Tabla II)

Tabla II.- Diseño utilizado en la placa del inmuno ensayo enzimático para determinar la producción de anticuerpos de gallina. El signo + significa que se agregó el reactivo marcado y - significa que no se agregó.

Grupo de pozos	Antígeno	Suero	Anticuerpo conjugado	Sustrato	Control
A	+	+	+	+	-
B	+	+	-	+	-
C	+	-	+	+	-
D	+	-	+	+	+
E	-	+	+	+	-
F	+	-	-	+	-

- Se agregaron 200 μ l de suero de la gallina inmune. Para el control, se agregaron 200 μ l del suero de una gallina inmunizada con toxina de alacrán. Cuando, debido al diseño de la placa, se omitió algún componente, en su lugar se agregó PBS- Tween 0.05%.

- La placa se incubó 1 hora a 37°C.
- Se retiró el sobrenadante, con cuidado de no remover los ovocitos, y los pozos de la placa se lavaron 3 veces con PBS- Tween (200 µl).
- Se agregaron 50 µl del anticuerpo conjugado (anticuerpo de conejo contra gallina acoplado con fosfatasa) diluido 1:1,000 en PBST y se incubó 1 hr a 37°C.
- Se lavó 2 veces con 200 µl de PBST.
- Se lavó dos veces con agua destilada, teniendo cuidado de no retirar el antígeno (ovocitos).
- Se agregaron 50 µl de la solución de sustrato preparada de la siguiente manera: 5 mg de p-nitrofenilfosfato (sustrato) en 5 ml de amortiguador de dietanolamina pH 9.8 (10% de dietanolamina, 0.02% de azida de sodio (NaN_3) y 0.5µM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)
- Se incubó a 37°C hasta que se desarrolló el color amarillo. En este caso se paró la reacción a los 50 min con 3M de NaOH.
- Se estimó de manera cualitativa la producción de anticuerpos en la gallina, observando la intensidad y el color del sobrenadante en los pozos.

5. OBTENCIÓN DE ARN TOTAL DE BAZO DE GALLINA INMUNIZADA

Al observar en el inmuno ensayo enzimático que la gallina había generado anticuerpos contra el antígeno inyectado en las inmunizaciones, se prosiguió a la disección del bazo, en este órgano se producen los anticuerpos, por eso es tan importante obtener el RNA que los codifica. La extracción de RNA se llevó a cabo de acuerdo al siguiente protocolo de RNA- STAT:

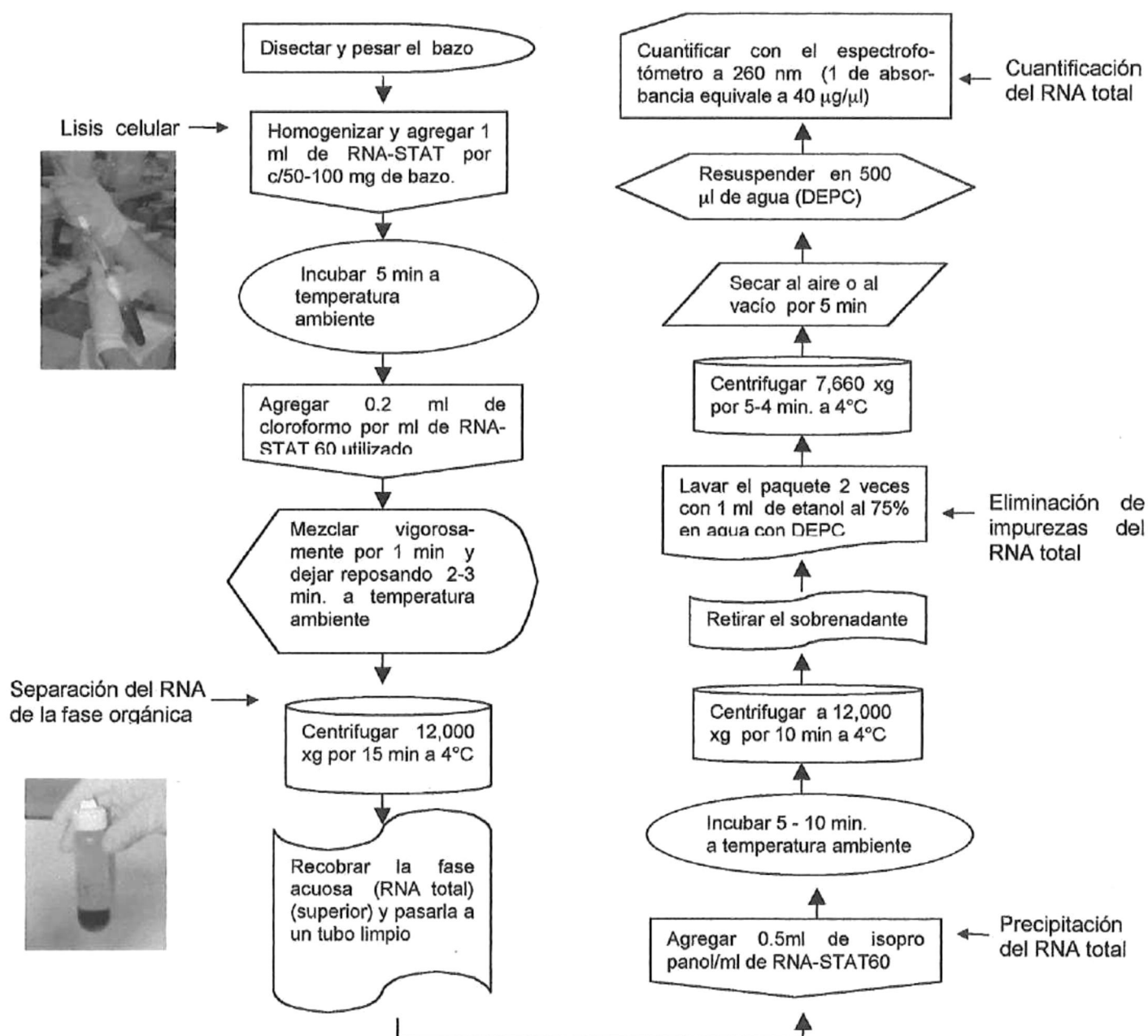


Figura 7.- Diagrama de flujo para la obtención del RNA total a partir del bazo de una gallina inmunizada

Condiciones del experimento

- Para eliminar las RNAsas del material de vidrio, se dejaron sumergidos en cloroformo durante 15 minutos: el homogenizador de 100 ml y las pipetas de vidrio de 5, 10 y 25 ml. Posteriormente las pipetas se esterilizaron en el horno a 160°C durante 8 horas. También se utilizaron puntas para micropipeta de 200 y 1,000 μ l y tubos Eppendorf de 1.5 ml, libres de RNAsas.
- Al observar que en la gallina hubo respuesta inmune contra el antígeno se prosiguió con la disección del bazo, se retiró el pellejo de la zona pectoral y la quilla (cartílago), se abrió la cavidad pectoral y se retiró la grasa que se encuentra inmediatamente debajo de el epitelio (Fig. 8). En la parte superior de la cavidad abdominal entre los lóbulos del hígado se encontró el bazo, un órgano con forma ovoide (Fig. 8) de color obscuro, que presentó una longitud de 2.3 cm y 1.5 cm de diámetro. Una vez localizado el bazo, se lavó la zona con agua estéril tratada con DEPC (dietilpirocarbonato) al 0.1% y después con tijeras y pinzas finas estériles se retiró el órgano y se lavó con agua tratada con DEPC.

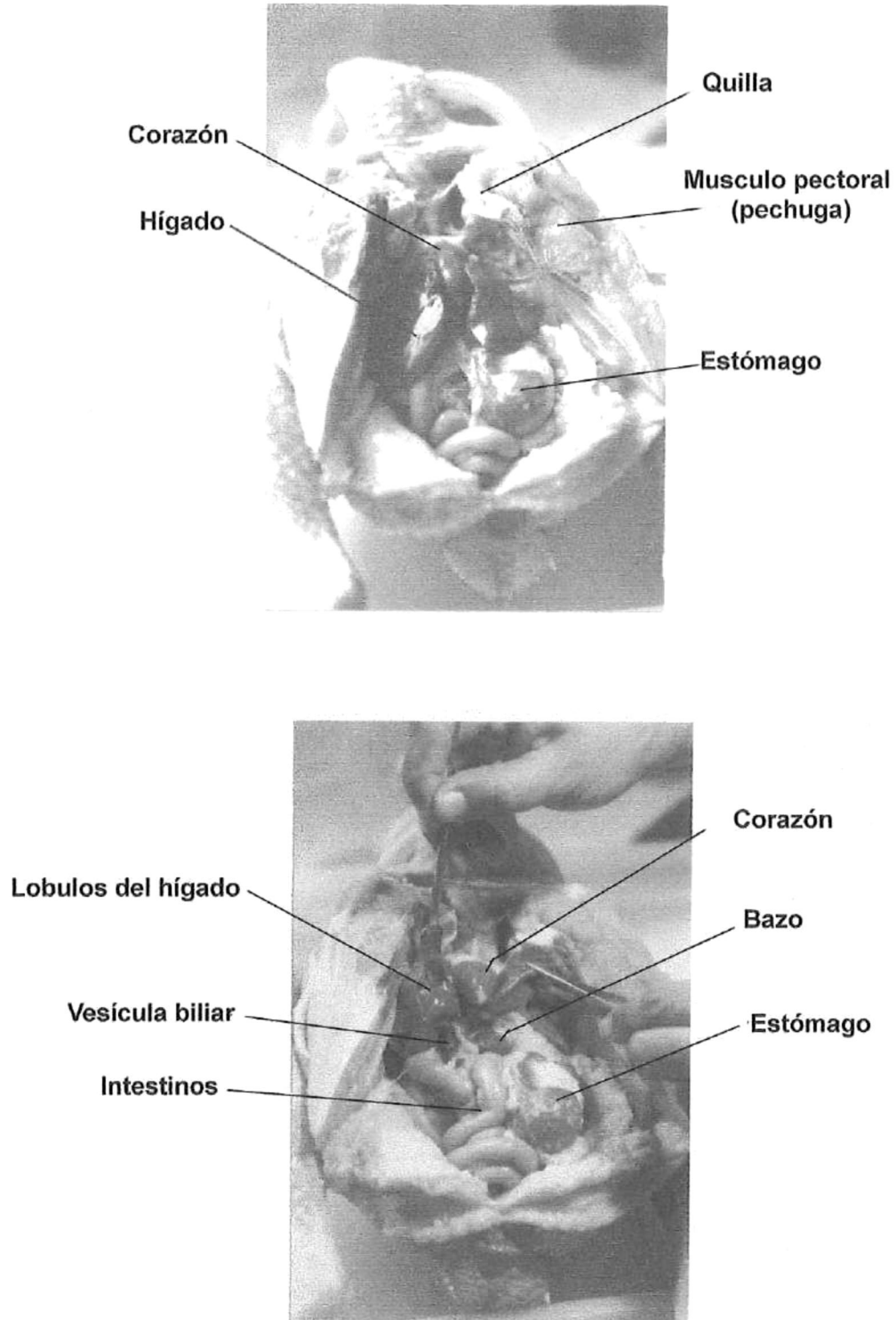


Figura 8.- Ubicación anatómica del bazo en la gallina.

- Para obtener el RNA total se extrajo el bazo, se pesó y se homogenizó suavemente, siguiendo el protocolo de RNA – STAT- 60tm en el cual se menciona que por cada 50 – 100 mg de tejido se agrega 1 ml de reactivo y se deja 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 0.2 ml de cloroformo por ml de RNA-STAT- 60 utilizado. Se agitó vigorosamente por 1 min y se dejó reposar 3 minutos a temperatura ambiente.
- El homogenizado se centrifugó a 12,000 xg por 15 minutos a 4°C en una centrifuga Sorvall SS34.
- Se recobró la fase acuosa (Fig. 7) y se agregaron 0.5 ml de isopropanol por ml de RNA-STAT- 60 adicionado al principio. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó a 12,000 xg por 10 minutos a 4°C.
- Se retiró el sobrenadante y el paquete se lavó 2 veces con 75% de etanol en agua DEPC (1ml por ml de RNA STAT – 60), el paquete resuspendido se agitó vigorosamente y después se centrifugó a 7,500 xg por 5 minutos.
- El paquete resultante se secó al aire o al vacío durante 5 minutos y posteriormente se disolvió en agua. (Las soluciones se prepararon con agua con dietilpirocarbonato (DEPC), para inhibir la actividad de las RNAsas).
- El RNA total se cuantificó en el espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 260 nm, tomando en cuenta que 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de RNA equivale a 1 de absorbancia. Además, se verificó la pureza utilizando la lectura de 260nm/280nm.

6. SÍNTESIS DE cDNA DE HEBRA SENCILLA A PARTIR DEL RNAm

Una vez obtenido el RNA se prosiguió a la síntesis de cDNA utilizando el siguiente protocolo:

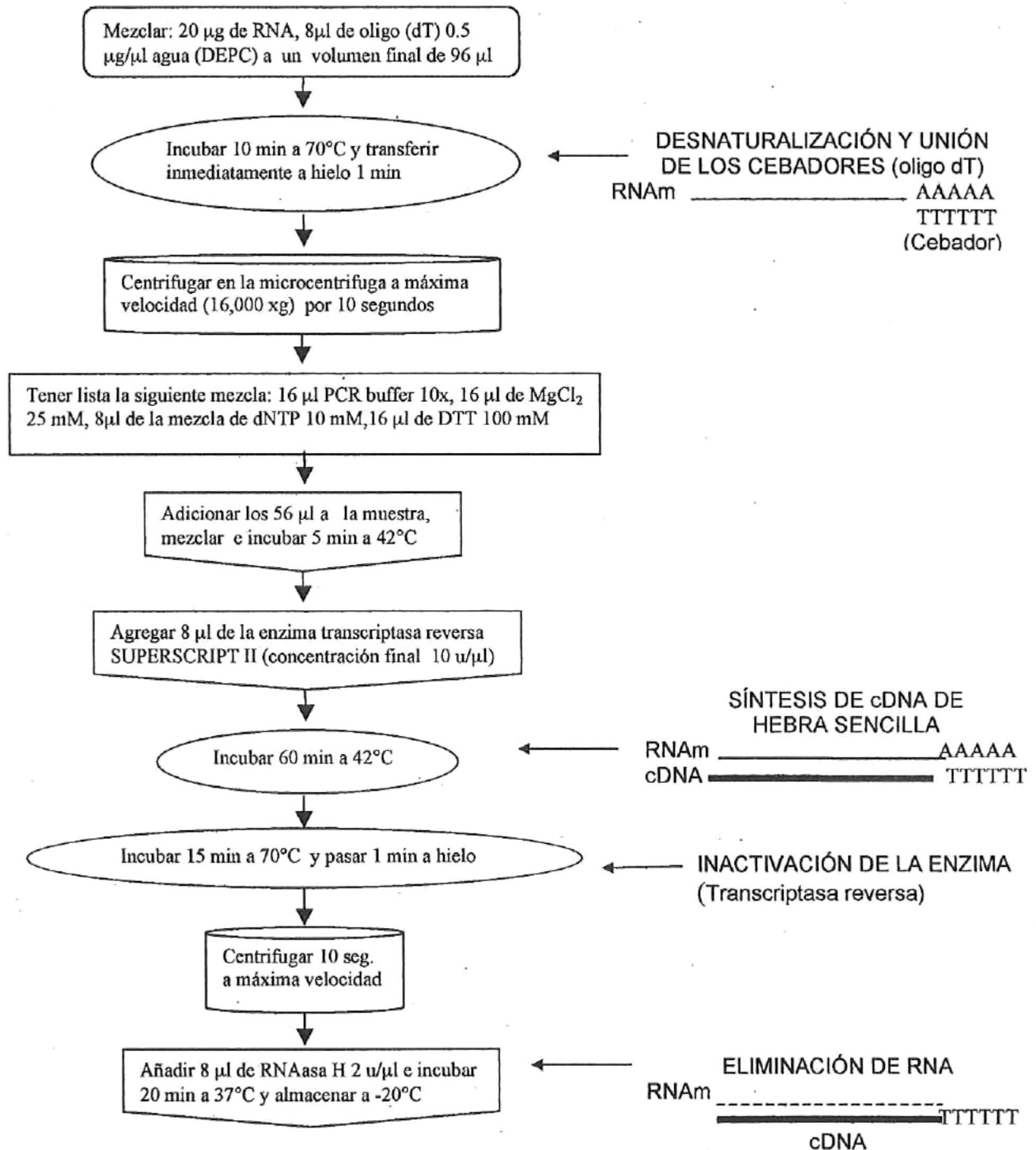


Figura 9.- Diagrama de flujo para la síntesis de cDNA de una sola hebra.

Condiciones del experimento:

- Se mezclaron 20 μg de RNA aislado con 8 μl de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ácido desoxitimidílico (oligo dT) y se agregó agua (DEPC) hasta un volumen final de 96 μl .
- Se incubó durante 10 min a 70°C y se incubó inmediatamente a hielo por 1 min. Esto se hizo para que el oligo (dT) se uniese a la cola poliA de los RNA mensajeros de cadenas pesadas y ligeras. Después se centrifugó a máxima velocidad en la microcentrifuga (16,000 xg) durante 10 segundos.
- Se preparó la siguiente mezcla:
 - 16 μl amortiguador para PCR 10x (Tris HCl 200 mM, pH 8.4, KCl 500 mM)
 - 16 μl de MgCl 25 mM
 - 8 μl de la mezcla dNTP (de dATP, dCTP, dGTP, dTTP todas a 10 mM)
 - 16 μl de DTT 100 mM
- Se agregaron 56 μl de la mezcla a los 96 μl de muestra, se mezcló y se incubó durante 5 min a 42°C.
- Se añadieron 8 μl de la enzima transcriptasa reversa SUPERSCRIPT II 200 u/ μl para que la enzima sintetizara el cDNA a partir del RNA mensajero.
- Se incubó durante 1 hr a 42°C y después por 15 minutos a 70°C, esto fue para inactivar a la transcriptasa reversa.
- Se colocó en hielo durante 1 min y se centrifugó durante 1 min.
- Se añadieron 8 μl de RNAasa H (2 u/ μl) *E.coli* para eliminar el RNA y obtener el cDNA de una hebra.
- Se incubó por 20 minutos a 37°C y se almacenó a -20°C.

7. AMPLIFICACIÓN DE CADENA PESADA Y LIGERA DEL ANTICUERPO Y SU TRASLAPE - EXTENSIÓN POR MEDIO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

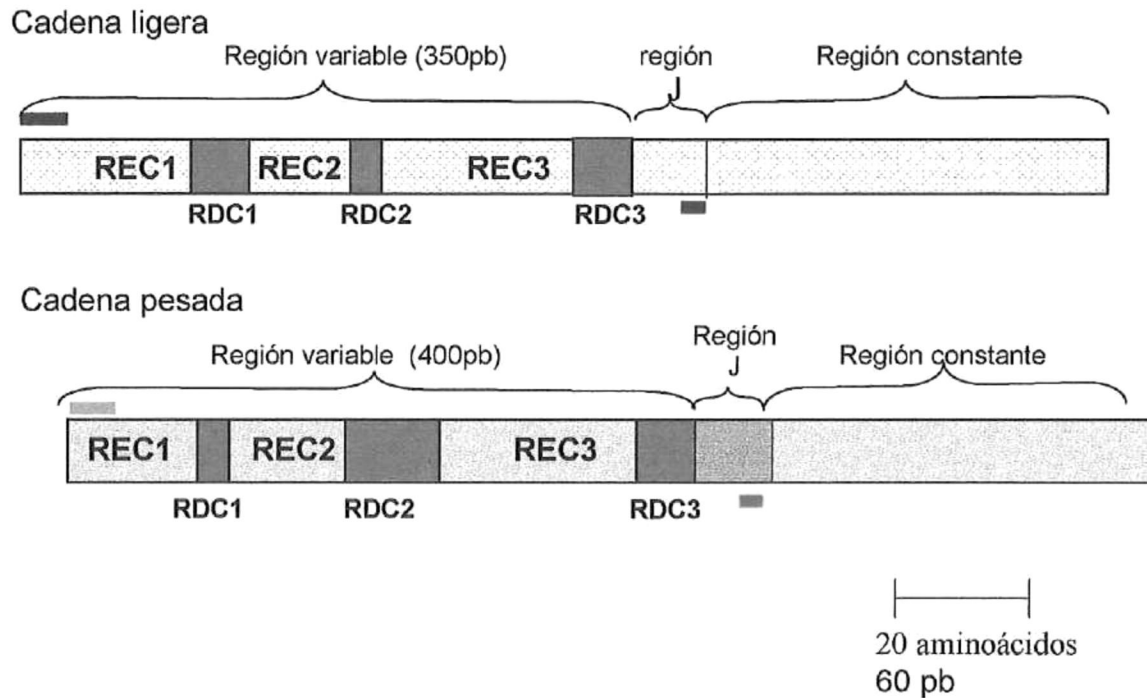
Para amplificar los genes del cDNA que codifican la región variable del anticuerpo (Fig. 10), se hicieron tres reacciones de PCR por separado, una para la amplificación de la cadena ligera, otra para la cadena pesada, y una tercera reacción de PCR para traslapar (vincular) y extender la cadena pesada y ligera (Fig. 12). Para tener suficiente cantidad del producto de las 3 reacciones se hicieron 8 juegos de cada una.

*Las secuencias que flanquean las regiones hipervariables en los anticuerpos de gallina son altamente conservadas (Fig. 11), por lo que con un solo juego de cebadores para cada cadena se pueden amplificar todos los posibles anticuerpos.

Se utilizaron los cebadores CSCVHo – F y CSCG- B para la cadena pesada, y para la cadena ligera CSCVK y CKJo – B (Operon Technology INC). (ver detalles en la página 43)

El procedimiento se llevó a cabo bajo la campana de flujo laminar para evitar cualquier tipo de contaminación. La campana y los pipeteadores se limpiaron con cloro y etanol. Este procedimiento se realizó cada vez que se preparó una mezcla de reacción para el PCR.

*Para una explicación del proceso de traslape y extensión consultar Fig. 12 y 13.



Cebador CKJo- B ■■■■

Cebador CSCVK ■

Cebador CSCG-B ■

Cebador CSCVHo-F ■■■■

Región determinante de complementariedad **RDC (CDR)**

Región estructural conservada **REC (FR)**

*Tomado de Harlow, E. y Lane David. 1988.

Figura 11.- Ubicación de los cebadores en las regiones hipervariables de la cadena pesada y ligera en el anticuerpo.

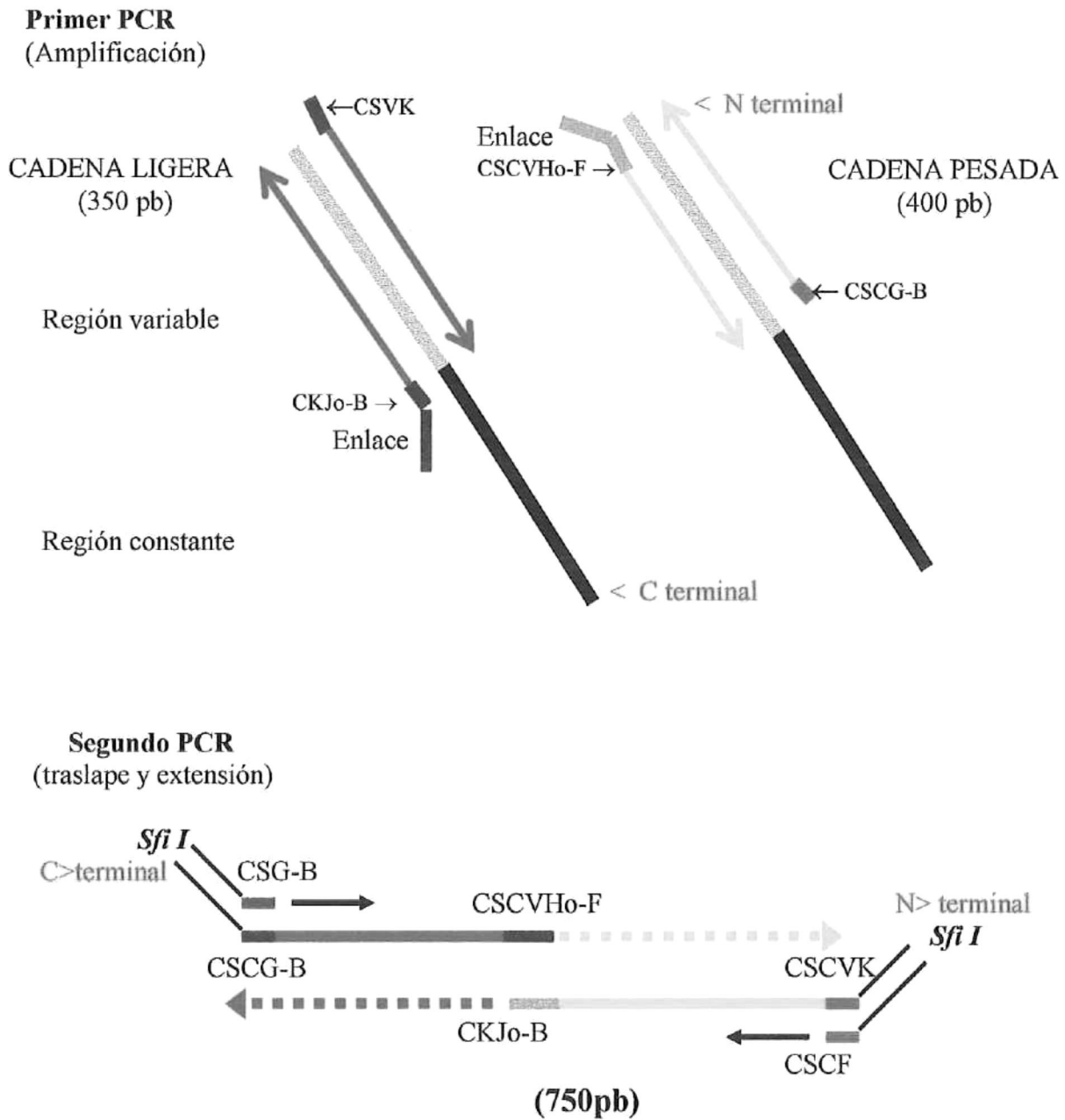


Figura 12.-Diagrama que ubica la posición de los cebadores en el anticuerpo y representa la generación de fragmentos variables de cadena sencilla de anticuerpos por medio de reacciones de PCR.

Las condiciones para las 3 reacciones de PCR (cebadores, mezcla de reacción y el programa de la termocicladora) son las siguientes (Silverman et al,1999):

PCR para cadena pesada

Cebadores para cadena pesada de anticuerpos de gallina

CSCVHo- F (sentido)

5' GGT CAG TCC TCT AGA TCT TCC GCC GTG ACG TTG GAC GAG 3'

CSCG –B (antisentido)

5' CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GGA GAC GAT GAC TTC GGT
CC 3'

PCR para cadena ligera

Cebadores para cadena ligera

CSVK (sentido)

5' GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG CCG TCC TCG GTG TC 3'

CKJo – B (antisentido)

5' GGA AGA TCT AGA GGA CTG ACC TAG GAC GGT CAG G 3'

PCR de traslape y extensión de las cadenas pesadas y ligeras

CSC – F (sentido)

5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG
3'

CSG – B (antisentido)

5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT
GGA GG 3'

a) Amplificación de cadena pesada o ligera.

- Se mezclaron los siguientes reactivos

Reactivo	Cantidad para 1 reacción	Cantidad para 8 reacciones
Cebador CSCVHo-F(CP) ó CSVK (CL)	3 μ l (20 pmoles/ μ l)	24 μ l
Cebador CSCG –B(CP) ó CKJo-B(CL)	3 μ l (20 pmoles/ μ l)	24 μ l
Amortiguador para PCR 10x	10 μ l	80 μ l
DNTPs 2.5mM	8 μ l	64 μ l
Taq ADN polimerasa	0.5 μ l	4 μ l
CDNA	1 μ l	
Se agregó agua hasta un volumen final de 100 μ l		1000 μ l

(CP) = cadena pesada

(CL) = cadena ligera

*Nota: no olvidar que las reacciones para la cadena pesada y la ligera se hacen en tubos separados utilizando cebadores específicos para cada cadena.

- Para las 8 reacciones, todos los reactivos a excepción del cDNA se pusieron en un solo tubo.
- Se agitó vigorosamente (vortex) por 1 min.
- Se centrifugó en la microcentrifuga por 1 min a 16,000 xg.
- Se pusieron 99 μ l de mezcla de reacción en cada uno de los 8 tubos.
- Se agregó 1 μ l de cDNA a cada tubo, y se agregaron 100 μ l de aceite mineral.
- Se hizo lo mismo para las dos cadenas utilizando los cebadores correspondientes.

- Para amplificar ambas cadenas se utilizó un termociclador Perkin - Elmer 480 con el siguiente programa:

5 minutos a 94°C

30 ciclos {
15 segundos a 94°C
15 segundos a 56°C
90 segundos a 72°C

Seguidos por 10 minutos a 72°C

- Una vez obtenido el producto de PCR se separó del aceite mineral. Se evaluó la reacción corriendo 5 ó 10 μ l de producto más 2 μ l de solución de carga (loading buffer) en un gel de agarosa al 2% en amortiguador TAE (0.04 M de Tris -acetato, 0.01 M de EDTA) pH8.
- Al obtener buenos resultados, después de la separación en geles de agarosa se purificó por el método de congelamiento - trituración y se cuantificó utilizando un marcador de peso molecular (ver protocolo 8b y Fig.14).

b)Traslape y extensión de las cadenas pesadas y ligeras por medio de PCR

Una vez purificado y cuantificado el producto del primer PCR, se prosiguió al PCR de traslape, en donde se utilizaron los cebadores CSC – F y CSC-B (ver página 40 y 41).

Mezcla de reacción para la vinculación y extensión de las cadenas pesadas y ligeras

Reactivo	Cantidad para 1 reacción	Cantidad para 8 reacciones
Cadena pesada	100ng	800 ng
Cadena ligera	100 ng	800 ng
Cebador CSC-F	60 pmoles	480 pmoles
Cebador CSC-B	60 pmoles	480 pmoles
Amortiguador para PCR 10x	10 μ l	80 μ l
DNTPs 2.5 mM	8 μ l	64 μ l
<i>Taq</i> ADN polimerasa	0.5 μ l	4 μ l
Se agregó agua hasta un volumen final de 100 μ l		

- Se procedió de la misma manera que en el primer PCR, sin embargo, se agregó el DNA de ambas cadenas en la mezcla de reacción para facilitar el traslape .
- Para la vinculación y extensión, el termociclador se programó con las siguientes condiciones :

5 minutos a 94°C

25 ciclos {

- 15 segundos a 94°C
- 15 segundos a 56°C
- 2 minutos a 72°C

Seguidos por 10 minutos a 72°C

- Una vez obtenido el producto de PCR, se separó del aceite mineral. Se evaluó la reacción corriendo 5 o 10 μ l de producto más 2 μ l de solución de carga (loading buffer) en un gel de agarosa al 2% en amortiguador TAE pH8.
- Al obtener una buena amplificación, el producto se separó en geles de agarosa, se obtuvieron bandas de cadena pesada y ligera mismas que se purificaron y concentraron por el método de congelamiento – trituración (protocolo 8a y 8b), posteriormente se cuantificó utilizando un marcador de peso molecular (Fig.24).

* Para la preparación de los geles consultar Anexo 4.

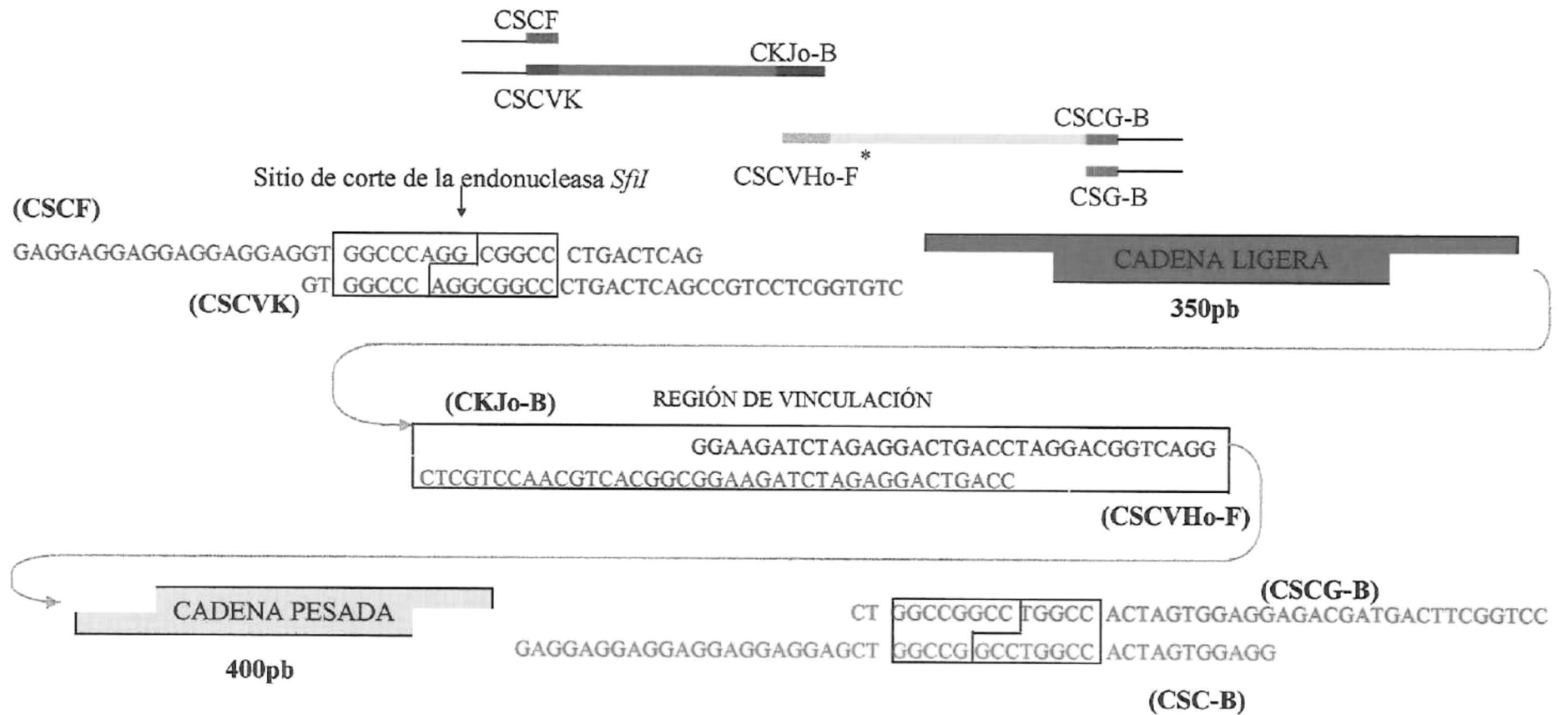


Figura 13.- Secuencias de los cebadores y su unión durante la reacción de PCR para el traslape y extensión.

* Si se utiliza el cebador CSCVHo-FL la región que separa las cadenas pesadas y ligeras será de mayor tamaño. El cebador CSCVHo-F es un ligador corto que tiende a formar dímeros.

8. MÉTODO PARA LA PURIFICACIÓN DE PRODUCTO DE PCR (Amplificación y traslape de cadena pesada y ligera) Y PRODUCTOS DE LA DIGESTIÓN (vector y traslape).

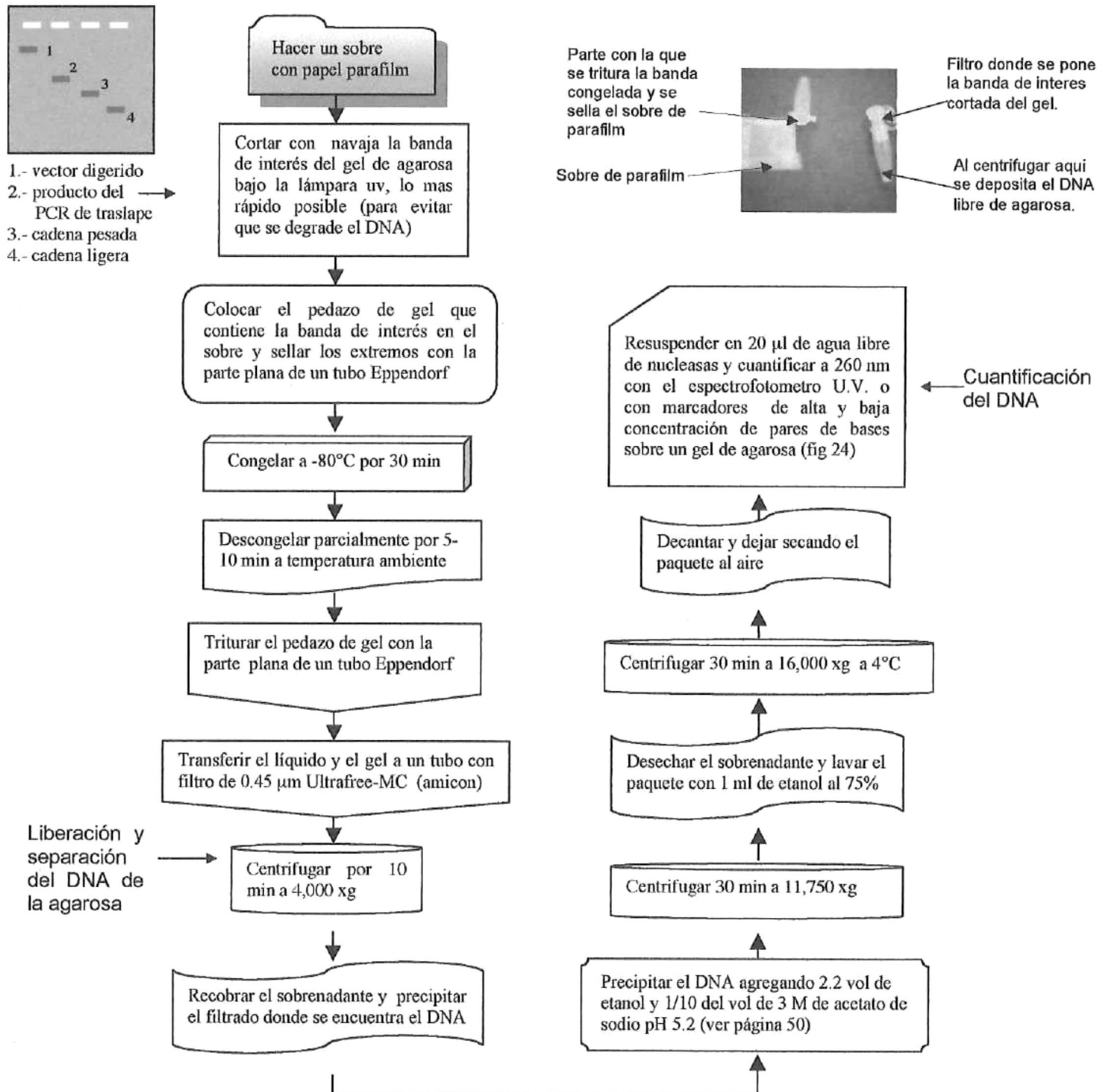


Figura 14.- Diagrama de flujo del método de purificación por congelamiento– trituration

Condiciones del experimento:

La razón de purificar y precipitar las muestras de DNA (producto de 8 o más reacciones de los PCR o vector) y resuspender en un volumen pequeño es para, poner la mayor concentración posible en cada pozo de los geles de agarosa, optimizando así su purificación.

a) Método de purificación: Congelamiento y trituración (Freeze - Squeeze)

- Con un pedazo de papel parafilm se hizo un sobre, aplicando presión con la parte cónica de un tubo eppendorf se sellaron 3 de las orillas del sobre.
- Bajo la lámpara U.V. con una navaja, se cortó la banda de interés del gel de agarosa. Se hizo rápidamente (para evitar que se degrade el DNA), procurando no llevar exceso de agarosa.
- El pedazo de gel que contiene la banda de interés se introdujo en el sobre y se selló la orilla restante. Se congeló a -20°C por 30 min. (de manera alternativa se puede poner a -80°C para un congelado más rápido).
- Cuando el trozo de gel estuvo completamente congelado, se descongeló parcialmente. Con el extremo plano de un tubo Eppendorf se trituró el pedazo de gel. En general, se obtienen mejores resultados cuando el pedazo de gel está lo más triturado posible.
- El líquido y el gel se transfirieron a un tubo eppendorf con filtro de $0.45\ \mu\text{m}$ y se centrifugó en una microcentrífuga a 3000 - 4000 xg por 10 minutos.

- Se desechó la parte superior de la unidad de filtrado, y el líquido filtrado se precipitó (inciso b).
- Se cuantificó a 260 nm con el espectrofotómetro U.V. o con marcador de alta y baja concentración de pares de bases en gel de agarosa, (Fig. 24).

b) Precipitación de los productos de PCR y de la digestión

- Se agregó 1/10 del volumen total de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2.2 volúmenes de etanol absoluto.
- Se dejó a -20°C toda la noche o una hora a -80°C.
- Se centrifugó 30 minutos a 11,750 xg en una microcentrífuga.
- El sobrenadante se descartó y el paquete se lavó con 1 ml de etanol al 75%.
- Se centrifugó por 30 minutos a 11,750 xg a 4°C.
- Se decantó y el paquete se secó a temperatura ambiente.
- Se resuspendió en 20 µl de agua destilada y estéril.
- A la muestra se le agregó solución de carga (loading buffer) 10x, se mezcló y se depositó en la menor cantidad posible de pozos en un gel de agarosa. En un pozo diferente se agregó un marcador de peso molecular de 100 pb y en otro de 1 kilobase (para el vector digerido).
- La muestra y los marcadores se corrieron en un gel de agarosa al 2% en TAE para los productos de PCR y al 1% para el vector y se purificó con el método de congelamiento – trituración.

9. DIGESTIÓN DEL VECTOR Y PRODUCTO DE PCR DE TRASLAPE

Una vez purificados los productos de PCR y el vector pComb3X, se concentraron y cuantificaron para ser digeridos con la enzima de restricción *Sfi*I utilizando el siguiente protocolo:

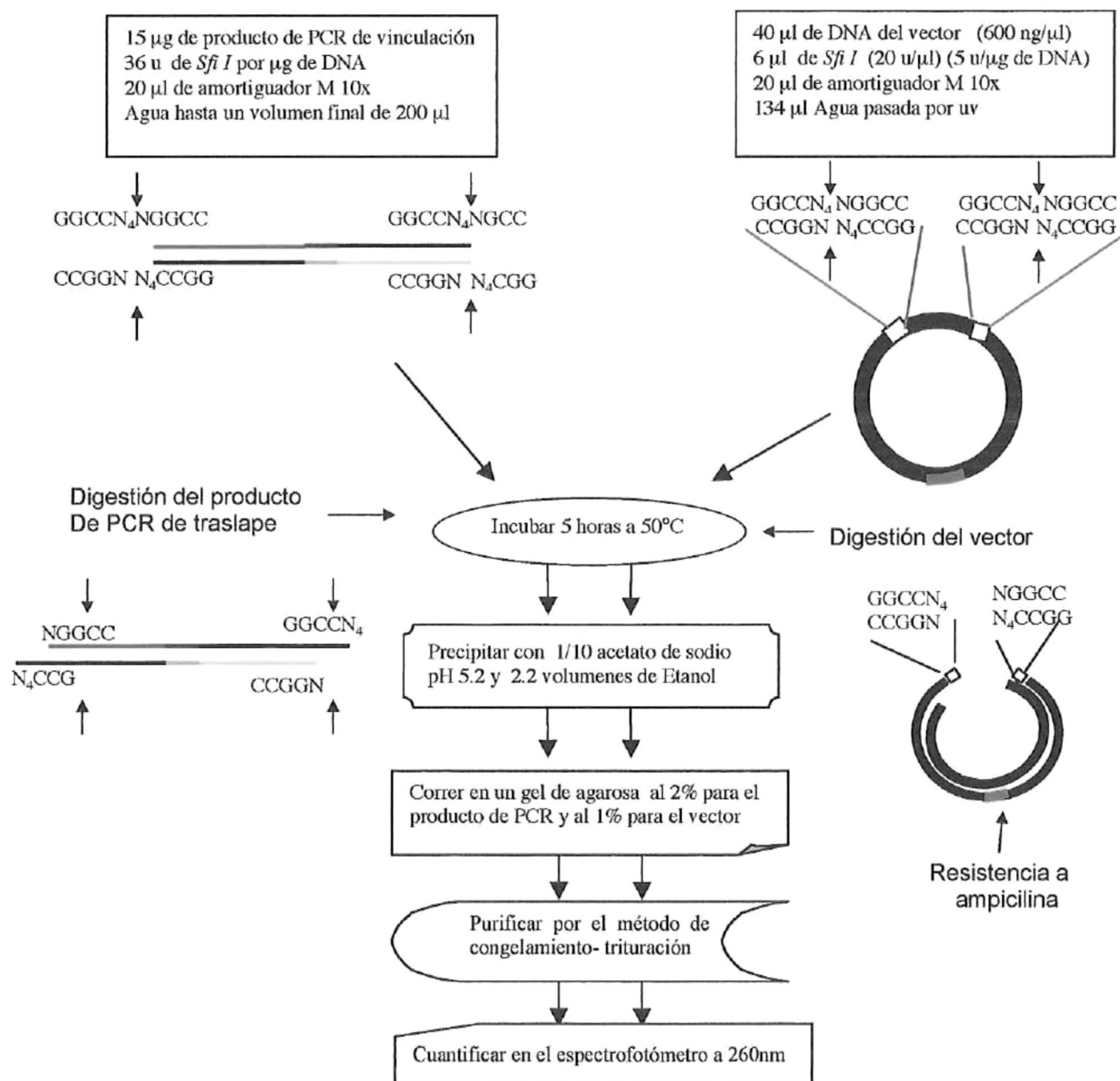


Figura 15.- Diagrama de flujo para la digestión del producto de PCR y el vector.

Condiciones del experimento:**A. Para la digestión del producto del PCR de vinculación de cadenas pesadas y ligeras se preparó la siguiente mezcla:**

43 μ l (15 μ g) de producto de PCR de traslape

17 μ l (540u) de *Sfil* (36 u/ μ g de DNA)

20 μ l buffer M 10x

- Se agregó agua destilada y pasada por luz U.V. a un volumen final de 200 μ l.
- Se incubó 5 horas, a 50°C (Fig. 15)
- Se precipitó con 2.2 vol. de etanol y 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 y se corrió en un gel de agarosa al 2% en TAE
- El producto de PCR de traslape se purificó y concentró por congelamiento y trituración.
- Posteriormente se cuantificó en un gel de agarosa.

B. Para la digestión del vector pComb3X se ponen:

6 μ l (120 u) de *Sfil* (5 u/ μ g de DNA)

20 μ l de buffer M 10x

40 μ l (24 μ g) de DNA plasmidico (600 ng / μ l)

134 μ l de H₂O_{uv}

200 μ l volumen final

- La digestión se llevó a cabo a 50°C por 5 horas.
- El vector digerido se precipitó con 2.2 vol. de etanol y 1/10 del acetato de sodio 3M pH 5.2.
- Se corrió en un gel de agarosa al 1%, se purificó y se concentró por congelamiento – trituración.
- Posteriormente se cuantificó en el gel (protocolo 8, Fig. 14).

10. LIGACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA DIGESTIÓN (Producto de PCR de traslape + vector).

Una vez purificados los productos de la digestión se concentraron y cuantificaron (protocolo 8a y 8b) para ser ligados y posteriormente introducidos en células. La ligación se llevó a cabo de acuerdo al siguiente protocolo:

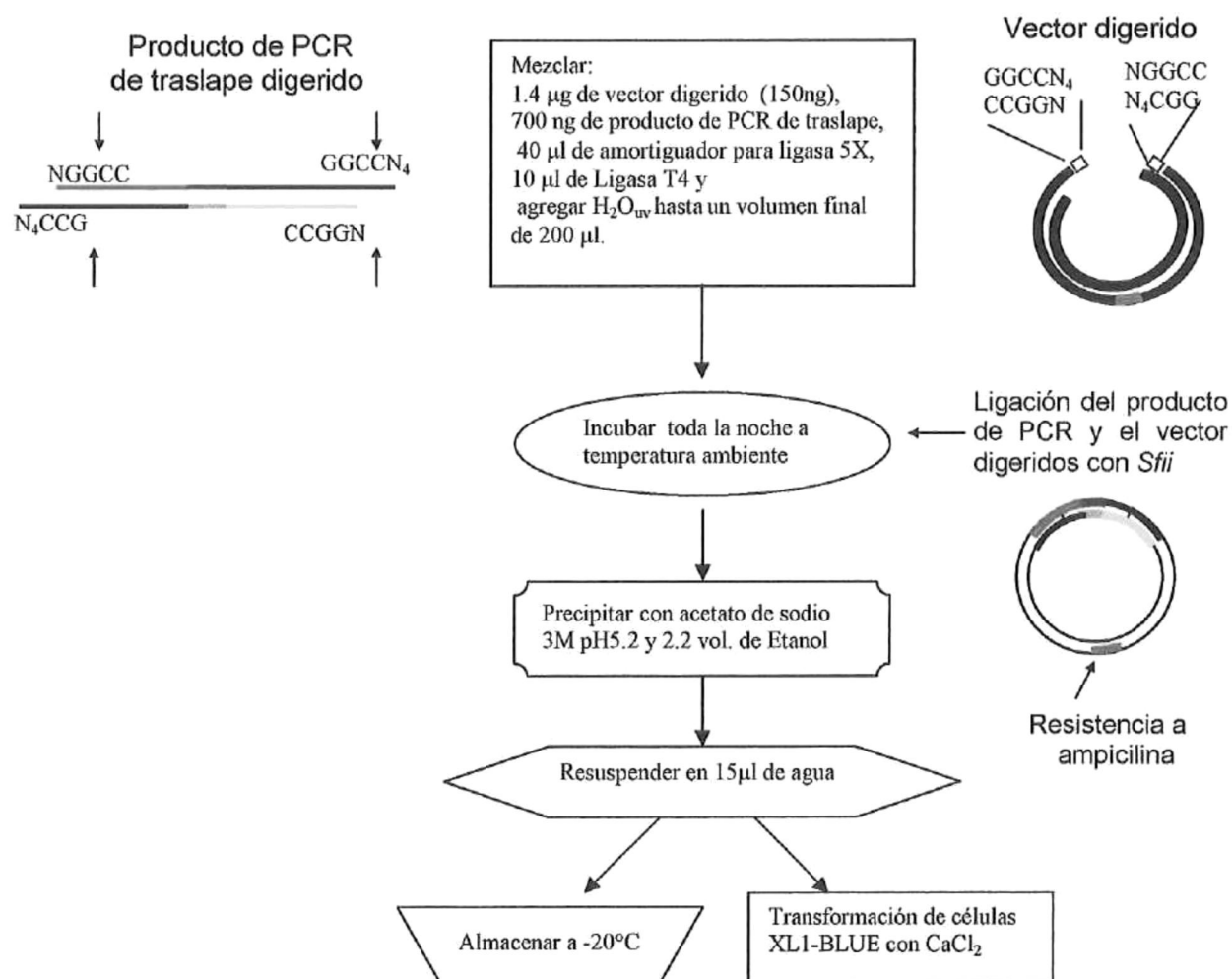


Figura 16.- Diagrama de flujo para la ligación de los productos de la digestión.

Condiciones del experimento

El hecho de agregar pequeñas cantidades de producto de PCR y vector es para probar los reactivos de la reacción de ligación (Tabla III), antes de llevar a cabo una ligación a gran escala. Los productos de las ligaciones de prueba son transformados y se observan los rendimientos en placas de medio de cultivo LB agar con antibiótico (carbencilina).

Las reacciones de prueba son las siguientes:

1. Ligación a baja escala

Vector pComb3X digerido por <i>Sfil</i> y purificado	140 ng
Producto del PCR de traslape digerido por <i>Sfil</i> y purificado	70 ng
Amortiguador para la ligasa 5X	4 μ l
Ligasa T4	1 μ l
Agregar H ₂ O _{uv} a un volumen final de	20 μ l

2. Ligación control 1

Vector pComb3X digerido por <i>Sfil</i> y purificado	140 ng
Fragmento digerido del vector (stuffer)	140 ng
Amortiguador para la ligasa 5X	4 μ l
Ligasa T4	1 μ l
Agregar H ₂ O _{uv} a un volumen final de	20 μ l

3. Ligación control 2

Vector pComb3X digerido por <i>Sfil</i> y purificado	140 ng
Amortiguador para la ligasa 5X	4 μ l
Ligasa T4	1 μ l
Agregar H ₂ O _{uv} a un volumen final de	20 μ l



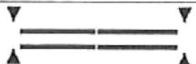




4.Ligación a gran escala

Una vez probados los reactivos para la ligación se hizo a gran escala con las siguientes cantidades:

Vector pComb3X digerido por <i>Sfi</i> I y purificado	1.4 µg
Producto del PCR de traslape digerido por <i>Sfi</i> I y purificado	700 ng
Amortiguador para la ligasa 5X	40 µl
Ligasa T4	10 µl
Agregar H ₂ O _{uv} a un volumen final de	200 µl

Se ligó toda la noche a temperatura ambiente.

Tabla III.- Resultados esperados en la ligación y recomendaciones.

Productos digeridos y purificados	Ligación a baja escala	Ligación control 1	Ligación control 2	Ligación a gran escala
Fvcs				
Stuffer				
PComb 3X				
Observaciones	Si el número de ufc/ µg de DNA de vector excede 1×10^7 proceda con la ligación a gran escala.	Debe obtenerse 10^8 ufc/µg de DNA de vector. Esto nos indica que tenemos un vector y reactivos de calidad para una ligación eficiente.	Si son mayores al 10% no proceda con la ligación a gran escala y digiera nuevos productos	Idealmente se deben obtener varias veces 1×10^8 ufc/µg de DNA de vector. De manera alternativa se pueden hacer varias ligaciones a baja escala obteniendo una gran biblioteca.

*Silverman, 1999

11. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES CON CaCl_2 Y SU TRANSFORMACIÓN (Introducción del producto de ligación)

El plásmido resultante de la ligación es introducido en la bacteria para generar fagos que expresen en su superficie el fvc3 contra las moléculas de la superficie del ovocito de *U. caupo*.

Para la transformación se utilizó el siguiente protocolo:

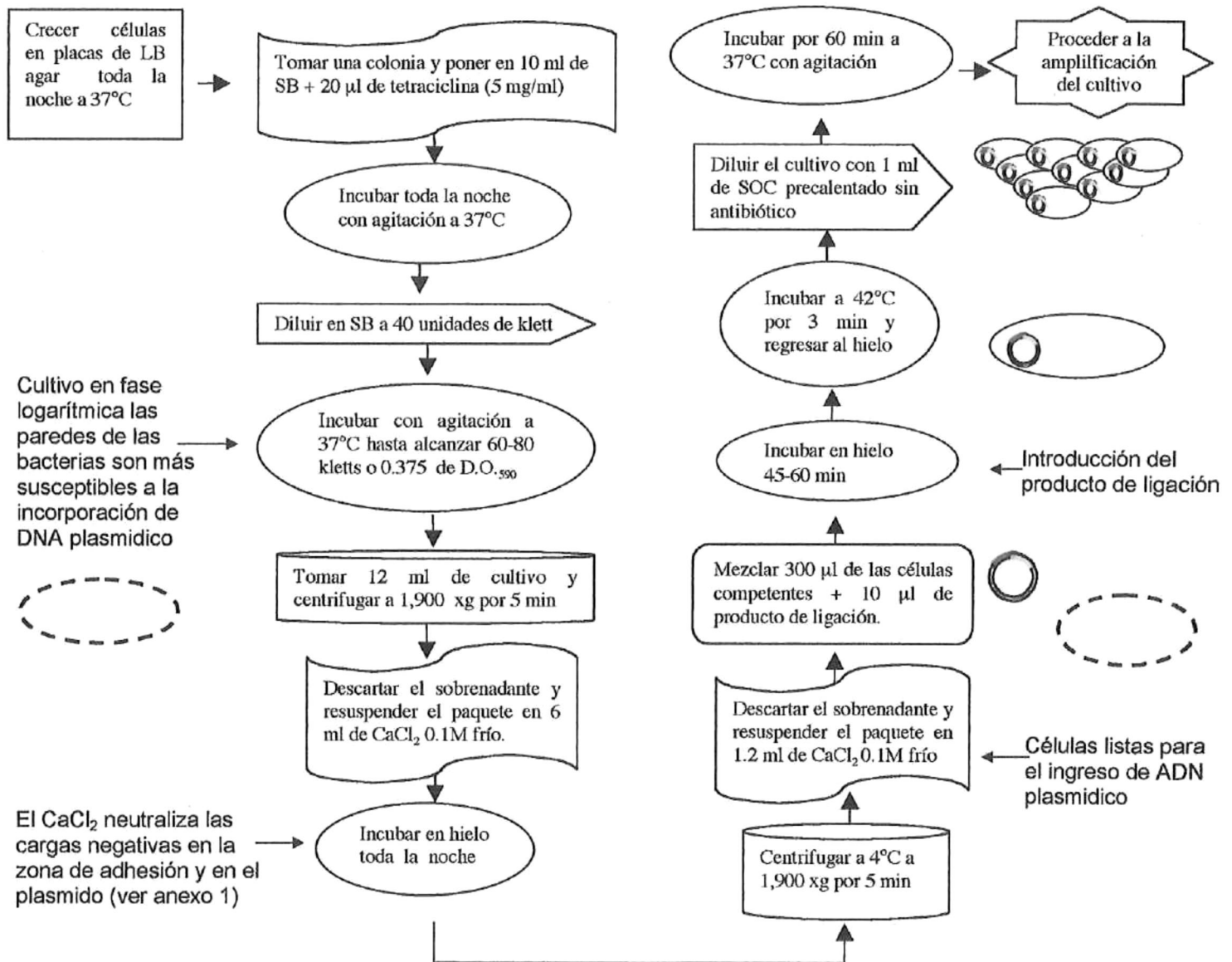


Figura 17.- Diagrama de flujo para la preparación de células competentes y su transformación.

Condiciones del experimento:**a) Preparación de células competentes con CaCl_2 para recibir el producto ligado (vector + producto de PCR de traslape)**

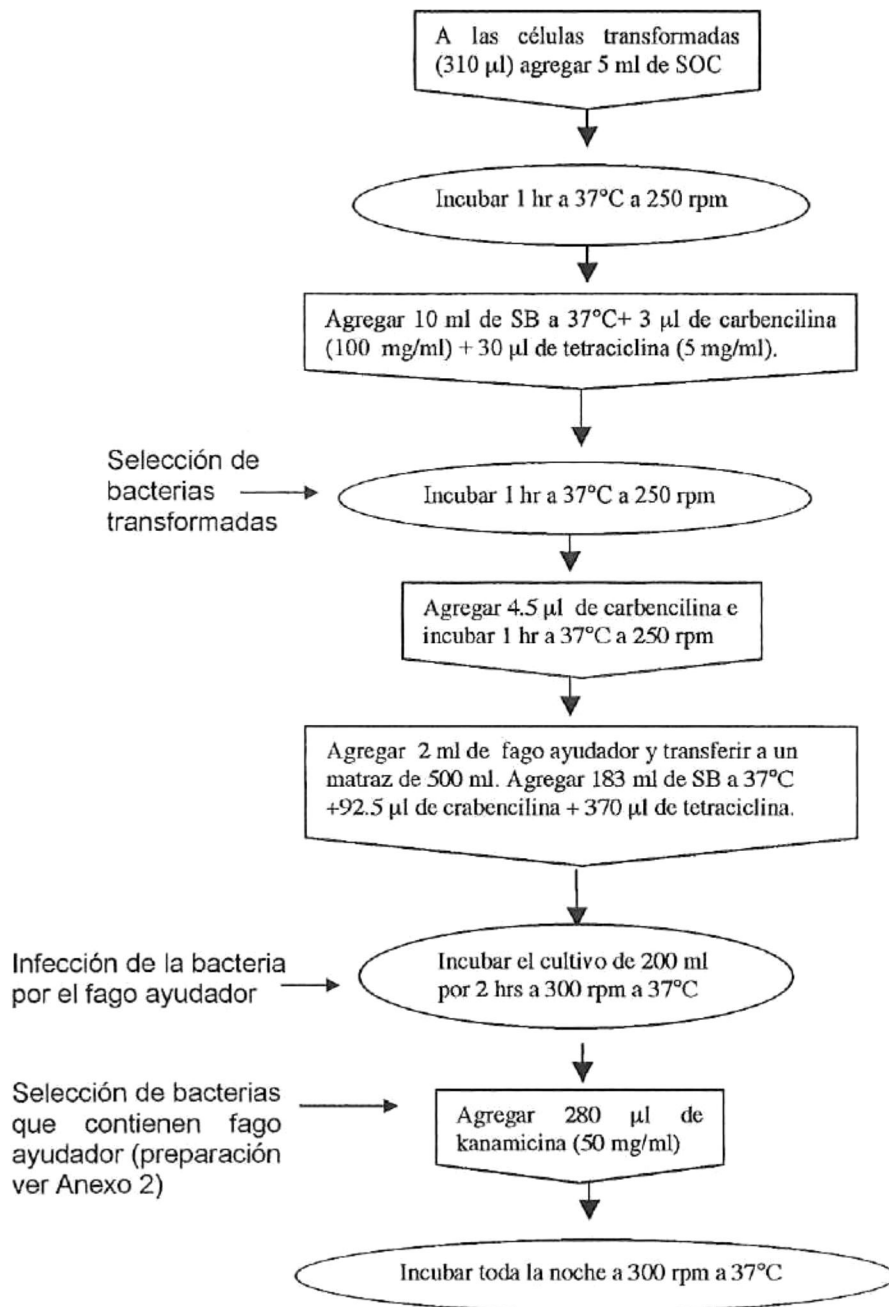
- Para la preparación de células competentes se trabajó en lugares donde nunca se habían utilizado fagos, bajo condiciones estériles.
- Se creció un cultivo de células XL1-Blue (con resistencia a tetraciclina) en placas de LB agar con tetraciclina durante toda la noche a 37°C.
- Al siguiente día se tomó una colonia para cultivarla en 10 ml de medio líquido SB, se agregaron 20 μl de tetraciclina (5 mg/ml en etanol) y se incubó con agitación a 37°C toda la noche.
- Al siguiente día el cultivo se diluyó con medio líquido SB a una concentración de 40 unidades de klett en un frasco erlenmeyer. Se incubó con agitación a 37°C hasta alcanzar 60 –80 kletts o 0.375 de D.O.₅₉₀ (fase logarítmica).
- Se colocaron 12 ml del cultivo en un tubo estéril con capacidad para 15 ml y se centrifugaron a 1,900 xg por 5 minutos.
- El sobrenadante se descartó y se resuspendió el paquete en medio volumen (6 ml) de CaCl_2 0.1 M estéril y frío. Se dejó en hielo toda la noche.
- Al siguiente día se centrifugó a 1,900 xg por 5 min a 4°C, y se eliminó el sobrenadante.
- El paquete se resuspendió en 1.2 ml de 0.1 M de CaCl_2 frío. (Fig. 17)

b) Transformación del producto de ligación (vector + Producto del PCR de traslape) con CaCl_2

- Se trabajó en condiciones de esterilidad
- Se mezclaron 300 μl de células XL1-Blue competentes más todo el producto de ligación ($\sim 10 \mu\text{l}$) (biblioteca de anticuerpos).
- Se incubó en hielo 40- 60 min
- Se incubó a 42°C por 3 minutos.
- Se regresó al baño en hielo y el cultivo se diluyó con 1 ml de SOC precalentado a 37°C sin antibiótico.
- Se incubó a 37°C por 60 minutos en agitación constante (ver fig. 17).
- Este cultivo se amplificó (ver protocolo 12) y después se sometió a rondas de selección (ver figuras 19 y 20 y protocolo 13).

12. AMPLIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS TRANSFORMADAS

Después de una transformación exitosa, las bacterias que contienen el vector se ponen a crecer en un volumen grande de medio líquido con antibiótico, de esta manera las bacterias se multiplicarán, pero sólo crecerán aquellas bacterias transformadas que presentan resistencia a tetraciclina, carbencilina y kanamicina.



Al siguiente día

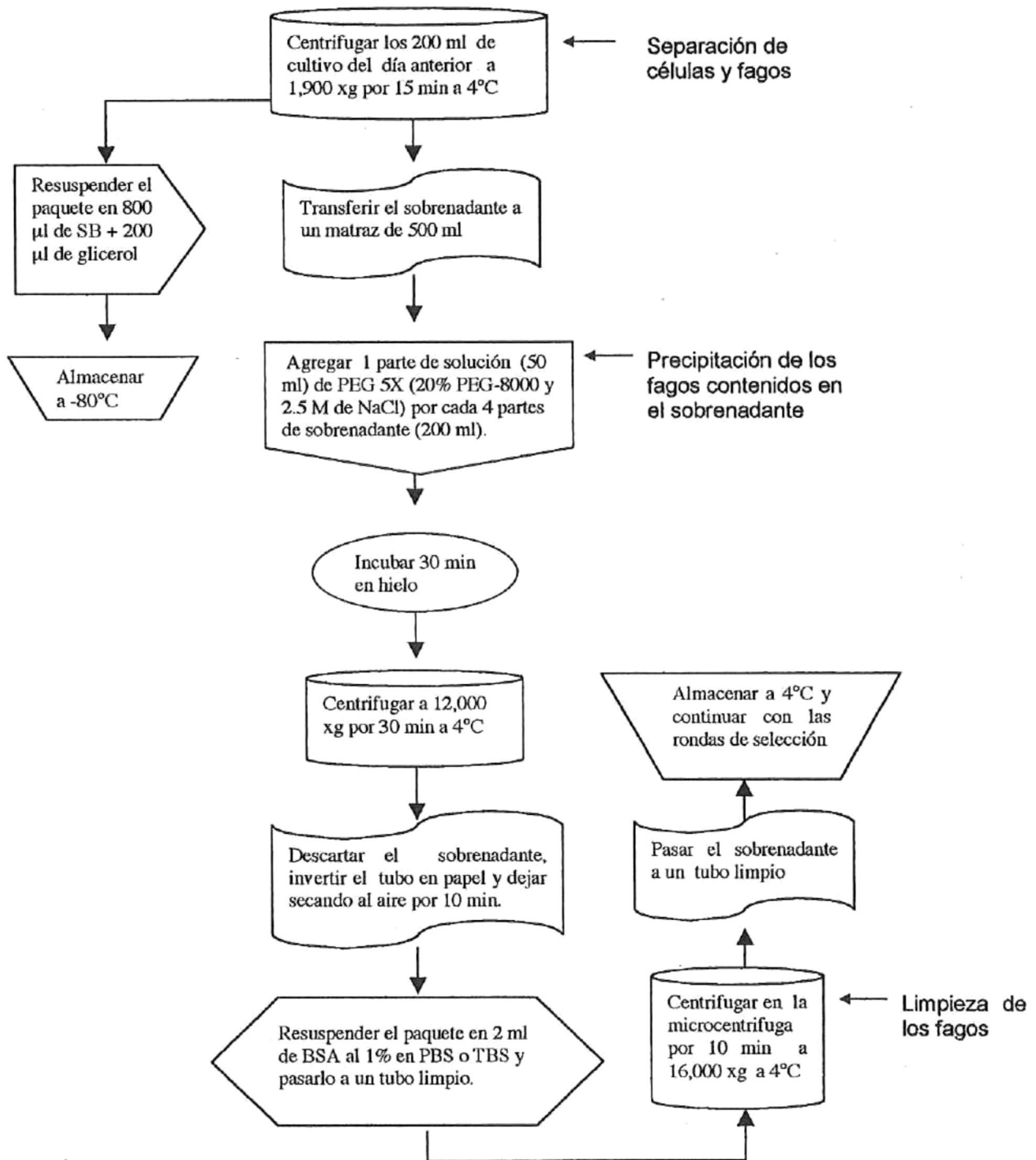


Figura 18.-Diagrama de flujo para la amplificación de células transformadas con CaCl_2 .

Condiciones del experimento:

- A las células transformadas (310 μ l) se les agregó 5ml de SOC.
- Se incubó 1 hr. a 37°C a 250 rpm.
- Se agregaron 10 ml de SB a 37°C, 3 μ l de ampicilina (100mg/ml) y 30 μ l de tetraciclina (5 mg/ml). Se incubó 1 hr a 37°C a 250 rpm. Se hizo una dilución 1:100 y se tomaron 10 y 100 μ l, se crecieron en placas de LB agar + ampicilina toda la noche a 37°C.
- Se agregaron 4.5 μ l de ampicilina y se incubó 1 hr a 37°C a 250 rpm.
- Se adicionaron 2 ml de fago ayudador y se transfirió a un matraz de 500 ml, después se agregaron 183 ml de SB a 37°C, 92.5 μ l de ampicilina y 370 μ l de tetraciclina.
- El cultivo de 200 ml se incubó por 2 hrs a 300 rpm a 37°C.
- Se agregaron 280 μ l de kanamicina (50 mg/ml) y se incubó toda la noche a 300 rpm a 37°C.
- Al siguiente día, los 200 ml de cultivo del día anterior se centrifugaron a 1,900 xg por 15 min a 4°C.
- El sobrenadante se transfirió a un matraz de 500 ml, el paquete se resuspendió en 800 μ l de SB y 200 μ l de glicerol, posteriormente se almacenó a -80°C.
- Al matraz se le agregó 1 parte (50 ml) de solución de PEG 5X (20% PEG-8000 y 2.5 M de NaCl) por cada 4 partes de sobrenadante (200 ml).
- Se incubó 30 min en hielo y se pasó a tubos para centrifuga. Se centrifugó a 12,000 xg por 30 min a 4°C.
- El sobrenadante se descartó, y los tubos se dejaron invertidos en papel secante por 10 min.
- El paquete se resuspendió en 2 ml de BSA al 1% en PBS y se pasó a un tubo limpio, se centrifugó en la microcentrífuga por 10 min a 16,000 xg a 4°C.
- El sobrenadante se pasó a un tubo limpio, se almacenó a 4°C y se continuó con las rondas de selección.

13. RONDAS DE SELECCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE LOS FAGOS QUE DESPLIEGAN EL FRAGMENTO VARIABLE DE CADENA SENCILLA (fvcs) CONTRA LAS MOLÉCULAS DE SUPERFICIE DE LOS OVOCITOS de *U. caupo*.

Durante la amplificación de las células transformadas se produjeron bacteriofagos, se seleccionaron aquellos que expresaban en su superficie el fvcs con mejor unión al antígeno, esto se hizo en placas LIMBRO con el siguiente protocolo:

PLACA DE SELECCIÓN

Utilizando como antígeno:

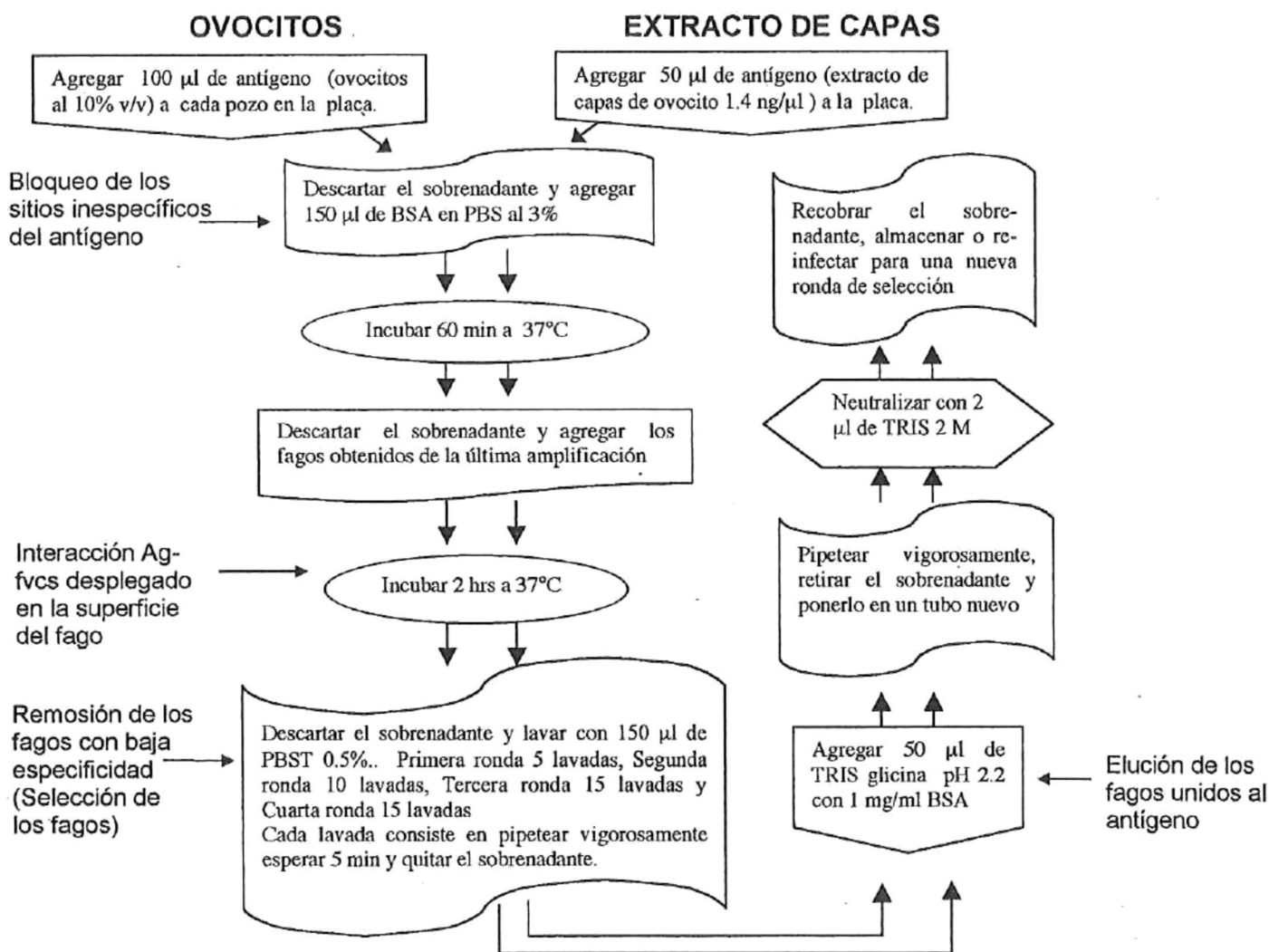


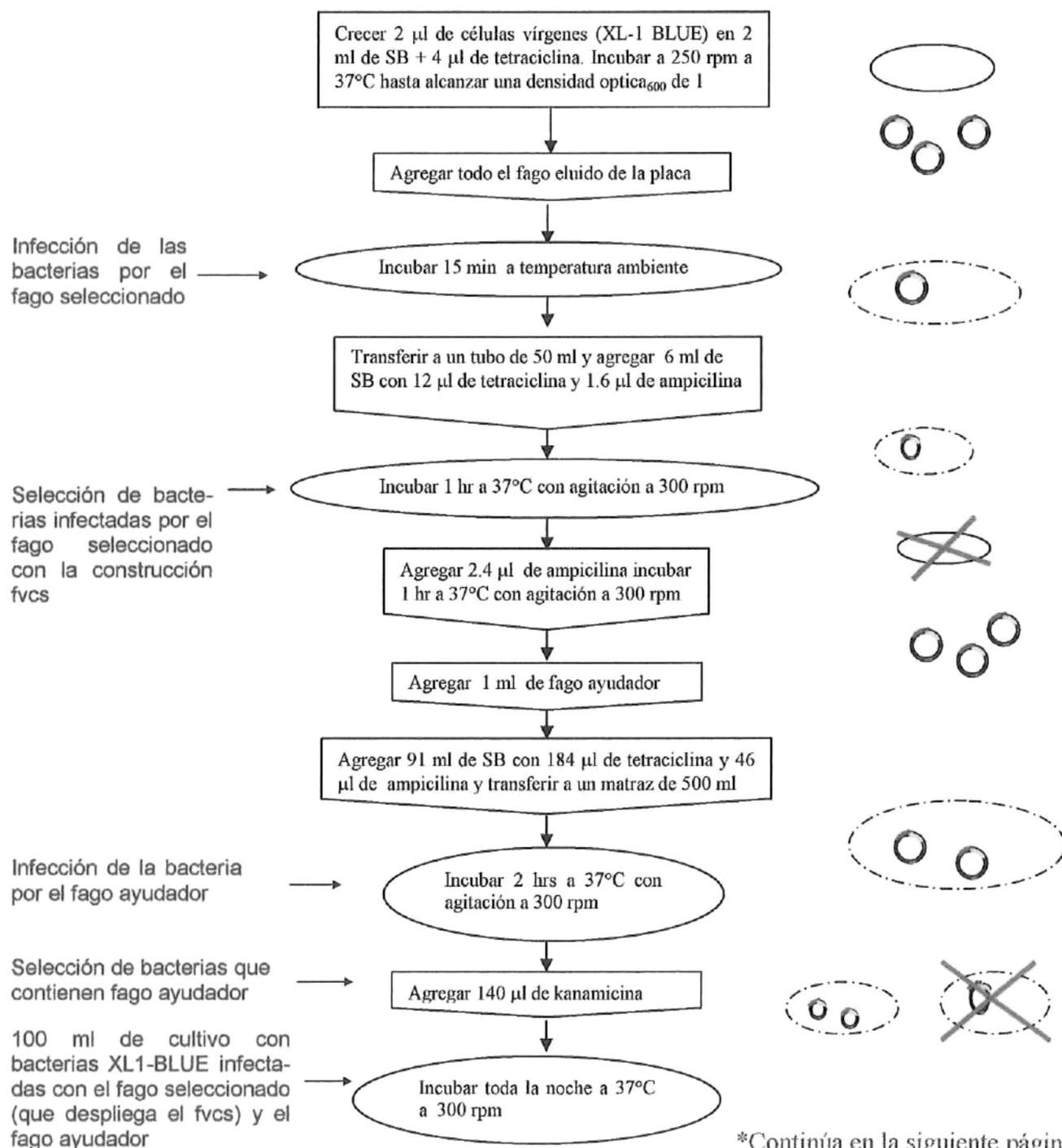
Figura 19- Diagrama de flujo para la placa de selección.

Condiciones del experimento:**a) Selección de los fagos que se unen a las moléculas de la superficie del ovocito (Placa de selección).**

- A cada uno de los cuatro pozos de la placa de poliestireno (LIMBRO o Costar) se le agregó el antígeno (ovocitos o extracto de capas).
- Se descartó el sobrenadante y se bloqueó con 150 μ l de BSA en PBS al 3%. Se incubó 60 minutos a 37°C.
- El sobrenadante se removió y se agregaron 50 μ l de los fagos de la biblioteca construida, los cuales ya tienen insertado el producto de ligación (vector + fvecs). La placa se incubó 2 hrs a 37°C.
- Se retiró el sobrenadante y se lavó con 150 μ l PBST (0.05% Tween). Cada lavada consistió en pipetear vigorosamente, esperar 5 minutos y quitar el sobrenadante. Para la primera ronda se lavaron 5 veces, para la segunda 10 y para la tercera y cuarta 15 veces (evitando retirar los ovocitos).
- Los fagos seleccionados se eluyeron con 50 μ l de solución de elución (TRIS glicina pH 2.2 con 1 mg/ml de BSA). Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se pipeteó vigorosamente y se retiró el sobrenadante que contiene los fagos seleccionados. Se pasó a un tubo limpio y se neutralizó con 2 μ l de Tris - HCl 2 M (para 200 μ l de producto recuperado). (Fig. 19)
- El sobrenadante se recobró y se utilizó para infectar una nueva ronda de selección.

b) Amplificación de los fagos seleccionados

Los fagos obtenidos después de la placa de selección se utilizaron para infectar células vírgenes, estas fueron crecidas en un volumen grande de medio líquido para producir mayor cantidad de fagos que despliegan fucs que se unen a las moléculas de la superficie del ovocito. La amplificación se llevó a cabo de la siguiente manera:



*Continúa en la siguiente página

Al siguiente día

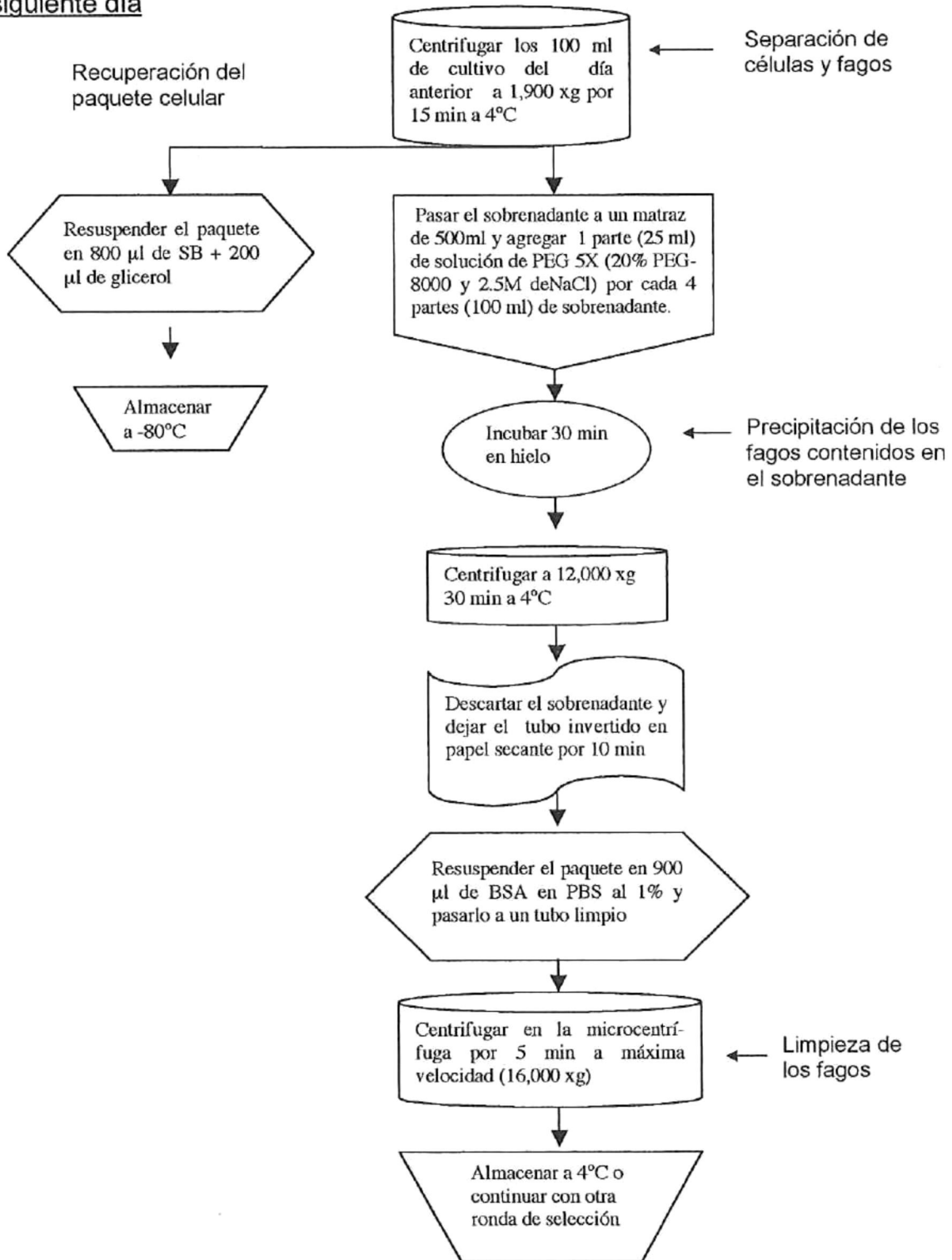


Figura 20.-Diagrama de flujo para la amplificación de los fagos seleccionados.

Condiciones del experimento:

- Para la amplificación de los fagos seleccionados, se crecieron 2 μl de células vírgenes (XL-1BLUE con resistencia a tetraciclina) en 2 ml de SB + 4 μl de tetraciclina. Se incubaron a 37°C en baño con agitación hasta que alcanzaron una densidad óptica₆₀₀ de 1.
- Se agregó todo el fago eluido de la placa de selección y se dejó 15 minutos a temperatura ambiente, para que se infectarán las células con la construcción (vector+ fvcs) que presentó mayor afinidad por el antígeno.
- Al terminar el período de infección, se transfirió a un tubo de 50 ml y se agregaron 6 ml de SB con 12 μl de tetraciclina y 1.6 μl de ampicilina a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$. El uso de antibióticos es muy importante para seleccionar a las bacterias infectadas por el fago, ya que éste les confiere la resistencia a ampicilina.
- Se dejó creciendo a 37°C por 60 minutos con agitación a 300 rpm.
- Se agregaron 2.4 μl de ampicilina y se incubó 1 hr a 37°C con agitación a 300 rpm para eliminar completamente las bacterias no infectadas por los fagos.
- Se agregó 1 ml de fago ayudador (10^{12}). A este fago se le llama así por que colabora en la síntesis de las partículas del fago con la construcción de fvcs dentro de la bacteria.
- Al mismo tiempo, se prepararon 91 ml de SB + 46 μl de ampicilina+ 184 μl de tetraciclina en un matraz de 50 ml.

- El cultivo se transfirió al matraz preparado y se incubó a 37°C por 2 horas con agitación a 300 rpm.
- Se adicionaron 140 µl de kanamicina (a una concentración final de 70 µg/ml) y se dejó crecer toda la noche a 37°C con agitación a 300 rpm, esto es para eliminar a las bacterias que no fueron infectadas por el fago ayudador.

Al siguiente día :

- Los 100 ml del cultivo se centrifugaron a 1,900 xg por 15 minutos a 4°C.
- El paquete celular obtenido en la centrifugación se resuspendió en 800 µl de SB + 200 µl de glicerol y se almacenó en viales a - 80°C.
- Por otro lado el sobrenadante se pasó a un nuevo matraz y se agregó 1 parte (25 ml) de solución de PEG 5X (20% PEG-8000 y NaCl 2.5M) por cada 4 partes (100 ml) de sobrenadante. Se dejó en hielo 30 minutos.
- El sobrenadante se centrifugó a 12,000 xg a 4°C por 30 minutos.
- El sobrenadante se descartó y los tubos se dejaron invertidos en papel secante por 10 min.
- Se resuspendió el paquete (aquí se encuentran los fagos) en 900 µl de BSA/PBS 1%, y se pasó a tubos ependorf.
- Para limpiar los fagos, es decir, eliminar algún tipo de precipitado, se centrifugó 5 minutos en la microcentrífuga a 16,000 xg.
- Estos fagos se almacenaron a 4°C y están listos para ser usados en la siguiente ronda de selección, empezando por la placa de selección (Fig 20).

* Se hicieron 3 rondas de selección utilizando como antígeno ovocitos de *Urechis caupo*, después se hicieron 2 rondas de selección utilizando el extracto de capas de ovocitos como antígeno.

14. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE FAGOS CON fvcS CONTRA LAS MOLÉCULAS DE LA SUPERFICIE DEL OVOCITO POR LA TÉCNICA DE ELISA.

Se llevaron a cabo dos pruebas para determinar cuál es la ronda de selección en donde hubo mayor cantidad de fagos y una mejor respuesta contra el antígeno. En una se utilizó como antígeno ovocitos y en la otra el extracto de capas.

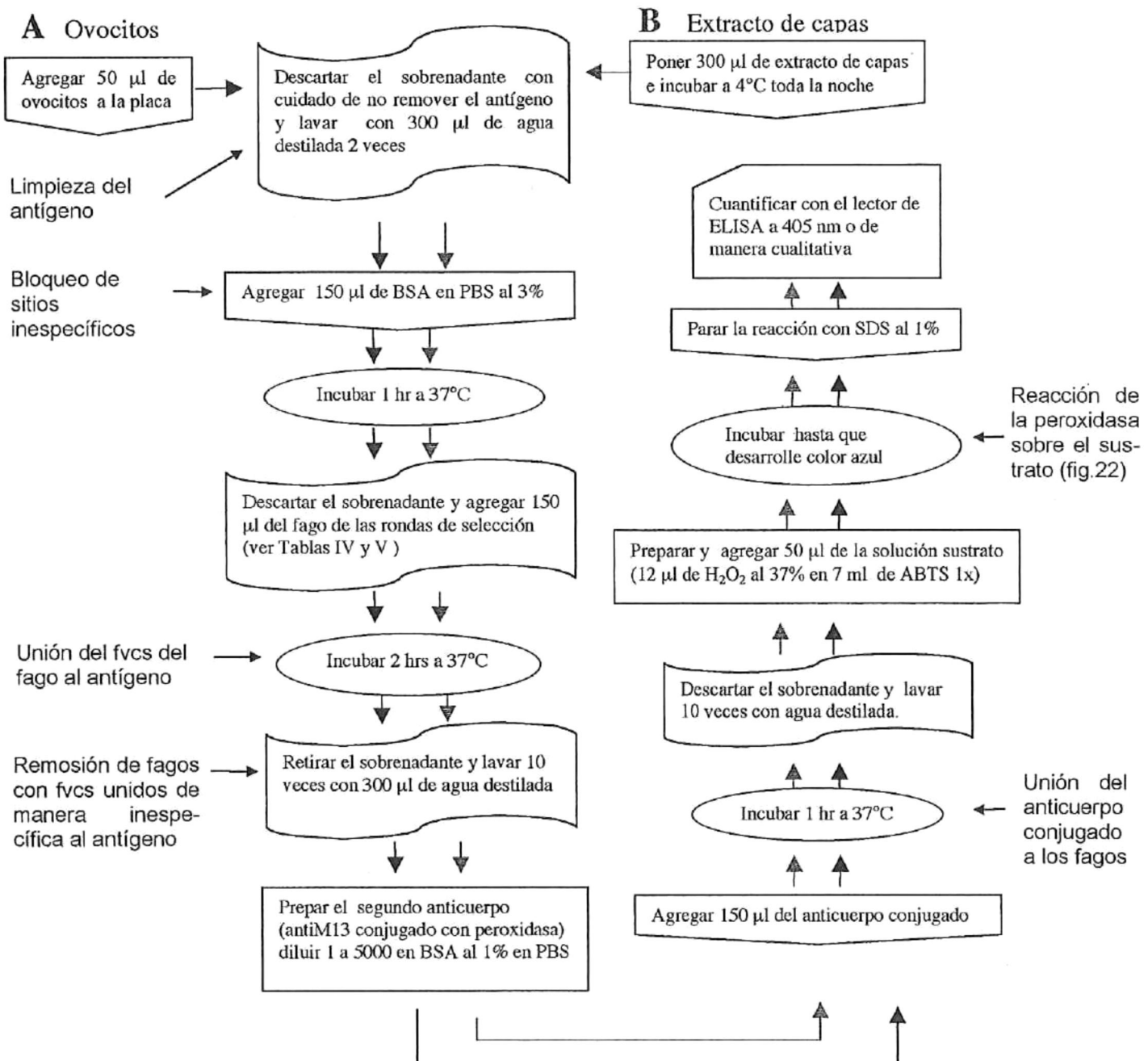


Figura 21- Determinación de la presencia de fagos con fvcS contra las moléculas de la superficie del ovocito por ELISA.

Reacción de la peroxidasa sobre el sustrato en el ensayo inmuno enzimático (ELISA)

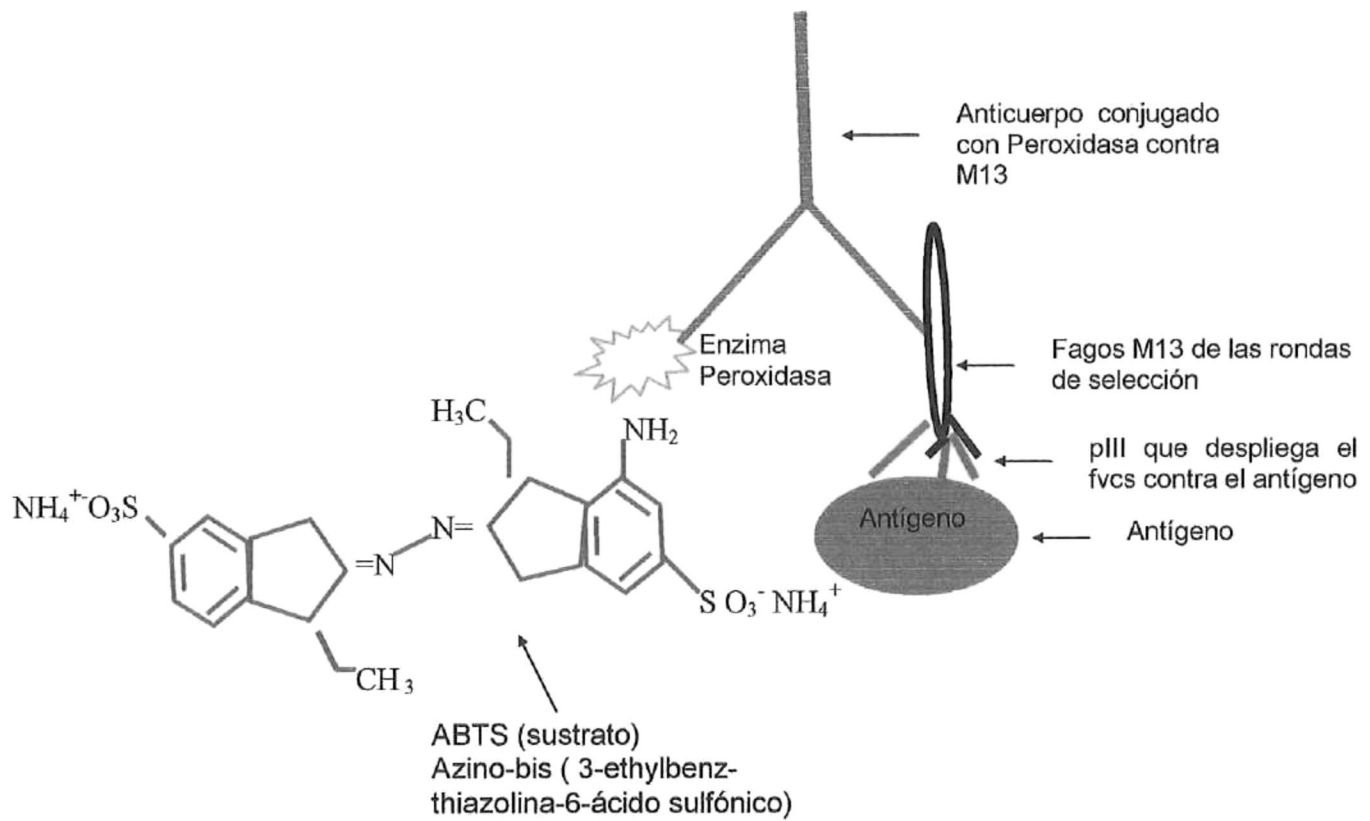


Figura 22- Reacción de la peroxidasa sobre el sustrato en el ensayo inmuno enzimático (ELISA)

Condiciones del experimento:

Para estos análisis se utilizaron dos antígenos diferentes, los métodos se modificaron de la siguiente manera:

a) Ovocitos

- Se colocaron 50 μl de antígeno (10% p/v) (ovocitos de *Urechis caupo*) en cada pozo de la placa LIMBRO, se dejó que sedimentaran y se retiró el sobrenadante.
- Los pozos se lavaron suavemente 2 veces con 300 μl de agua destilada. Para bloquear los sitios inespecíficos se agregaron 200 μl de BSA al 3% en PBS (se cubrió con parafilm para evitar pérdida por evaporación) y se incubó 1 hora a 37°C.
- Se descartó el sobrenadante y se agregaron 150 μl del fago obtenido de la tercera, cuarta y quinta ronda de selección (ver Tabla IV).

Tabla IV.- Diseño de la placa para la determinación de la presencia de fagos con fvc's contra moléculas de la superficie del ovocito utilizando como antígeno el ovocito.

Pozos	Primer anticuerpo
C5	SB (control)
C6	SB (control)
C7	Fago de la tercera ronda de selección
C8	Fago de la tercera ronda de selección
C9	Fago de la cuarta ronda de selección
C10	Fago de la cuarta ronda de selección
C11	Fago de la quinta ronda de selección
C12	Fago de la quinta ronda de selección

- Se incubó a 37°C por 2 hrs, se retiró el sobrenadante y se lavó 10 veces con 300 μl de agua destilada.

- Se preparó el anticuerpo antiM13 conjugado con peroxidasa, diluyendolo 1 a 5000 en BSA al 1% en PBS. Se agregaron 150 μ l a cada pozo.
- Se incubó 1 hora a 37°C, se descartó el sobrenadante y los pozos se lavaron 10 veces con agua destilada.
- Para la solución sustrato de la peroxidasa se prepararon 450 ml de 0.05 M de ácido cítrico el pH se ajustó a 4.0 con NaOH concentrado, después se agregaron 100 mg de ABTS (2,2' -Azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6 sulfonic acid))). Se mezclaron 12 μ l de H₂O₂ al 37% en 7 ml de la solución de ABTS 1x, a cada pozo se agregaron 50 μ l de la solución sustrato.
- Se incubó a temperatura ambiente hasta que desarrolló el color azul, dado que los ovocitos interfieren por su color con la lectura, el sobrenadante se pasó a nuevos pozos. Se cuantificó a 405 nm en un lector de ELISA y se paró la reacción con SDS al 1%. (tabla VIII)

b) Extracto de capas

- Se pusieron 300 μ l de antígeno* (extracto de capas de ovocitos de *Urechis caupo*) en cada pozo de la placa LIMBRO.
- Se incubó toda la noche a 4°C.
- Se retiró el sobrenadante y los pozos se lavaron 2 veces suavemente con 300 μ l de agua destilada. Cada pozo se bloqueó con 300 μ l de BSA/PBS al 3%, (la placa se cubrió con parafilm para evitar pérdida por evaporación) y se incubó durante 1 hora a 37°C.

*El extracto de capas de ovocito que se utilizó como antígeno se diluyó para bajar la concentración del Tritón hasta 0.03% para que no interfiera en la adhesión del antígeno a la placa.

- El sobrenadante se descartó y se agregaron 150 μ l del fago eluido de la placa de selección (Tabla V).

Tabla V Diseño de la ELISA para la determinación de la presencia de fagos que despliegan fucs, utilizando como antígeno extracto de capas. En los pozos control (A1 y A2) se puso medio SB. En el pozo A3 y A4 se puso el fago eluido de la tercera ronda de selección (fagos contra ovocitos) y en A5 – A8 se puso el fago de la cuarta y quinta ronda de selección (fagos contra extracto de capas de ovocitos).

Pozos	Primer Anticuerpo
A1	SB (control)
A2	SB (control)
A3	Fago de la cuarta ronda de selección
A4	Fago de la cuarta ronda de selección
A5	Fago de la cuarta ronda de selección
A6	Fago de la cuarta ronda de selección
A7	Fago de la quinta ronda de selección
A8	Fago de la quinta ronda de selección

- La placa se incubó a 37°C por 2 hrs, se retiró el sobrenadante y se lavó 10 veces con agua destilada.
- Se preparó el anticuerpo antiM13 conjugado con peroxidasa, diluyendo 1 a 5000 en BSA al 1% en PBS. Se agregaron 150 μ l a cada pozo.
- La placa se incubó 1 hora a 37°C, se descartó el sobrenadante y se lavó 10 veces con agua destilada.
- Para la solución sustrato de la peroxidasa se prepararon 450 ml de 0.05 M de ácido cítrico el pH se ajustó a 4.0 con NaOH concentrado, después se agregaron 100 mg de ABTS, para 7 ml de la solución con ABTS se adicionaron 12 μ l de H₂O₂ al 37%, de esta mezcla se agregaron 50 μ l a cada pozo.
- Se incubó a temperatura ambiente hasta que desarrolló el color azul, se estimó de manera cualitativa y se paró la reacción con SDS al 1% (fig. 30).

15. EXPERIMENTO BIOLÓGICO CON LOS FAGOS SELECCIONADOS

Experimento biológico con el fago de la 4ta ronda de selección

- Para llevar a acabo los experimentos biológicos con los fagos en PBS de la cuarta ronda de selección se procedió a sustituir el PBS por agua de mar, para lo cual se utilizó centricon con tamaño de poro para retener proteínas de 30,000 daltones.
- En un tubo centricon se colocaron 1070 μ l de fagos en PBS 1% de albúmina y en otro tubo centricon se agregó el mismo volumen pero sólo de albúmina al 1% en PBS.
- Los tubos de centricon fueron centrifugados durante 20 min a 4,500 xg (este procedimiento se repitió 3 veces).
- Para sustituir de manera pasiva, el PBS se lavó con 1 ml de 0.5 M de NaCl, se centrifugó 20 min a 4,500 xg (se repitió 2 veces) se cambió la solución por que los fosfatos se precipitan en agua de mar.
- Posteriormente, se lavó con 1 ml de agua de mar y se centrifugó 2 veces bajo las condiciones ya mencionadas.
- Se colectó el concentrado (fagos en agua de mar) y la albúmina al 1% en agua de mar (control), invirtiendo el filtro y centrifugando a 800 xg durante 2 min.
- Los experimentos biológicos se llevaron a cabo a 16°C. Primero se extrajeron gametos del gusano *Urechis caupo*, los ovocitos se lavaron, y se

resuspendieron en 20 ml de agua de mar filtrada. Se agregó Tris 1M (pH 8), a una concentración final de 10 mM.

- Los espermatozoides se mantuvieron concentrados a 4°C. Para las pruebas biológicas se realizaron las siguientes diluciones de espermatozoides 1:10,000, 1:50,000 y 1: 100,000. Con la primera dilución se observó un 100% de fecundación en los ovocitos. Con la segunda se observó un 50%, por lo que se hizo una cuarta prueba con una dilución de 1 : 25,000 y en esta se observó un 75% de fecundación. Por lo tanto la dilución 1:25,000 se utilizó en el experimento.
- Los ovocitos, antes de ser fecundados, fueron previamente incubados por un periodo de hasta 1 hr con fagos o BSA, tomando muestras durante este tiempo para revisar si estaban activados. Las pruebas realizadas con BSA se hicieron dado que la albúmina permanece aún después de sustituir el PBS por agua de mar.
- En un tubo se colocaron 250 μ l de ovocitos, se esperó a que se sedimentaran y después se extrajeron 100 μ l del sobrenadante y se agregaron 100 μ l de fago. Al tubo control se le hizo lo mismo pero se le agregó BSA. Después de 10 min se les agregó 1 μ l de espermatozoides 1:25,000 a ambos tubos.
- Después se tomaron muestras a diferentes tiempos y se realizaron conteos de los ovocitos activados, no activados y muertos (tabla IX).

RESULTADOS

DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA LOS OVOCITOS EN EL SUERO DE LA GALLINA.

Dado que la gallina murió, fue imposible determinar el momento en el que se produjo la mayor cantidad de anticuerpos para obtener una biblioteca. Sin embargo, el ensayo inmuno enzimático (ELISA) realizado con el suero de la gallina se determinó que; si hubo producción de anticuerpos (Fig. 23, tabla VI).

Tabla VI.- Diseño de la placa para la determinación de la producción de anticuerpos en la gallina por inmuno ensayo enzimático.

Grupo de pozos	Antígeno (ovocitos de <i>Urequis caupo</i>)	Primer anticuerpo	Segundo anticuerpo	Sustrato	Preimmune
A1 – A3	+	+	+	+	-
B1 – B3	+	+	-	+	-
C1 – C3	+	-	+	+	-
D1 – D3	+	-	+	+	+
E1 – E3	-	+	+	+	-
F1 – F3	+	-	-	+	-

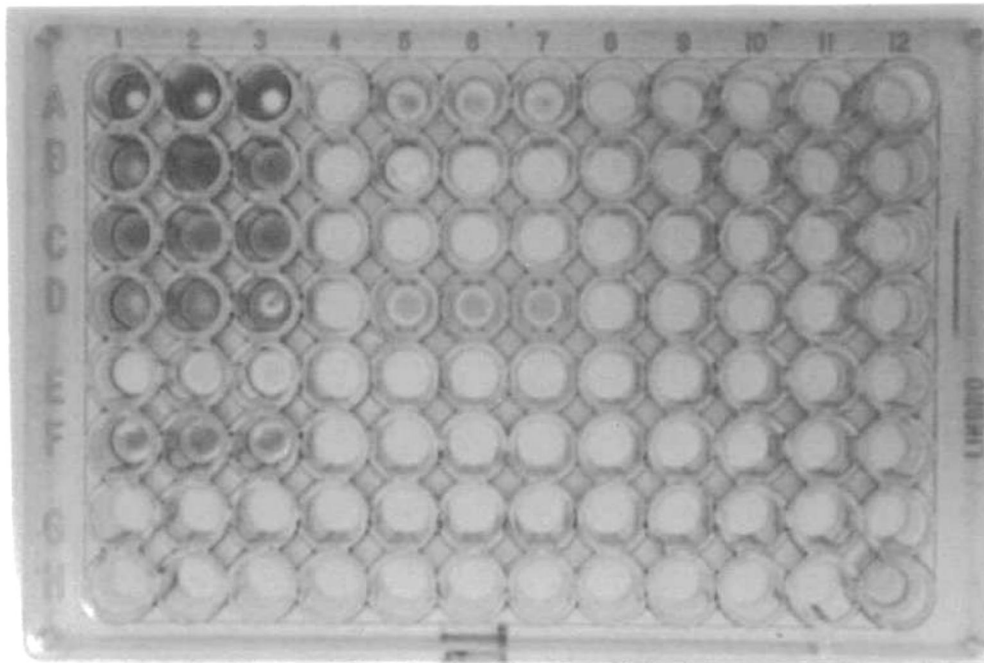


Fig 23.-Resultado de la ELISA para la determinación de la producción de anticuerpos en la gallina. El color café en el fondo del pozo corresponde al antígeno (ovocitos de *Urechis caupo*), el cual está ausente sólo en la línea de pozos E (incolore). El tipo de antígeno y su color café ofrece una dificultad para apreciar si hay o no producción de anticuerpos, por lo que el sobrenadante de los pozos en donde se observó respuesta se transfirió a nuevos pozos.

En los grupos de pozos A y D se observó que había intensidad en el color del sobrenadante por lo que se transfirió a nuevos pozos, para poder compararlos sin la interferencia del antígeno. El sobrenadante de los pozos A fue el más intenso, indicando que en el suero de gallina se encuentran los anticuerpos producidos contra las moléculas de la superficie del ovocito de *Urechis caupo*, como respuesta a las inmunizaciones. Se carecía de un lector de ELISA, sin embargo a partir de la evidencia mostrada por la intensidad del color, se prosiguió a la extracción de RNA total.

OBTENCIÓN DE RNA TOTAL DE BAZO DE GALLINA INMUNIZADA

Debido a que murió el organismo, y con los resultados positivos mostrados en el ensayo inmuno enzimático, se prosiguió inmediatamente a la extracción del RNA total del bazo utilizando el protocolo RNA- STAT. Una vez obtenido el RNA, se cuantificó por medio de espectrofotometría utilizando una longitud de onda de 260 nm, obteniendo una lectura de 0.166 de absorbancia con 2 μ l de la muestra, lo cual equivale a 3.32 μ g/ μ l de RNA en un volumen total de 50 μ l. La pureza (260 nm/280 nm) fue de 1.08.

SÍNTESIS DE cDNA DE HEBRA SENCILLA A PARTIR DEL RNAm

A partir del RNA obtenido se sintetizó el cDNA, se utilizaron 20 μ g de RNA total y el kit de superscript II de (GIBCO). El cDNA se cuantificó en el espectrofotómetro, dando una lectura de 0.082 de absorbancia en 2 μ l a 260 nm lo cual equivale a 2.05 μ g/ μ l de cDNA. El valor de la relación 260 nm/280 nm fue de 3. Lo cual indica ser altamente puro (Barbas, 2001).

AMPLIFICACIÓN DE CADENA PESADA Y LIGERA POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para asegurarnos que la amplificación de las dos cadenas se realizó, las ocho reacciones para cada cadena se corrieron en un gel de agarosa al 2% y se purificaron. La razón de purificarlas del gel es para eliminar las bandas accesorias (ver asteriscos Fig. 24), debido a que estas bandas interfieren con el proceso de vinculación entre cadena pesada y ligera.

El DNA de ambas cadenas fue purificado por el método de congelado y triturado y se cuantificó en el espectrofotómetro utilizando una absorbancia de 260 nm. La cadena pesada tenía una concentración de 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con una pureza de 1.18. Por otro lado se obtuvo 1.125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de cadena ligera con una pureza de 2.04.

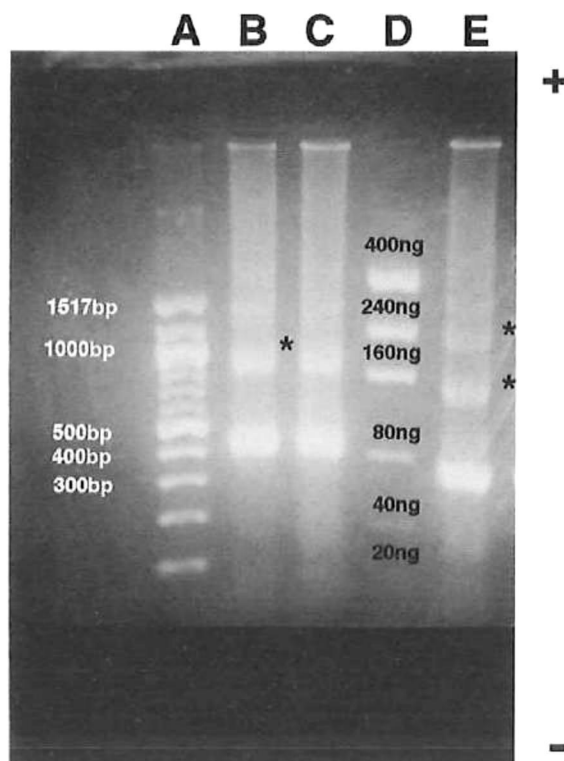


Figura 24.- Electroforesis de la amplificación de cadena pesada y ligera por PCR. Gel de agarosa al 2% en TAE. Se puede apreciar una banda de 400 pb en los carriles B y C que corresponde a la cadena pesada y otra de 350 pb que pertenece a la cadena ligera en el carril E. En el carril A se encuentra el marcador de 100 pb y en el carril D se encuentra otro marcador con el cual se puede calcular la concentración de DNA.

Cálculo de la concentración con marcadores:

Se pusieron 8 μ l del marcador de masa (D) y 8 μ l de cada producto de PCR (B-C y E), de acuerdo a la intensidad observada en las bandas correspondientes se calculó que tiene una cantidad de 400 ng.

Los cebadores utilizados en la amplificación de cadenas pesadas y ligeras, se unen a las regiones que flanquean las regiones constantes del anticuerpo (fig. 11). Por lo tanto las bandas mostradas en este gel son producto de la amplificación de cadenas pesadas (400 pb) y cadenas ligeras (350 pb) del anticuerpo, a partir del cDNA obtenido de la gallina inmune.

Por medio de esta reacción se obtuvieron copias de diferentes tipos de cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos generados en la gallina como respuesta a las inmunizaciones.

VINCULACIÓN Y EXTENSIÓN DE LAS CADENAS PESADAS Y LIGERAS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para la vinculación de las cadenas pesadas y ligeras se hicieron 8 reacciones. Se corrieron en un gel de agarosa al 2% (Fig. 25) en el cuál se observaron bandas de 750pb que corresponden al número de pares de bases de la unión de las cadenas pesadas (400pb) y ligeras (350pb). Estas bandas se se purificaron (Fig. 26) y posteriormente se cuantificó por espectrofotometría y se obtuvieron 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

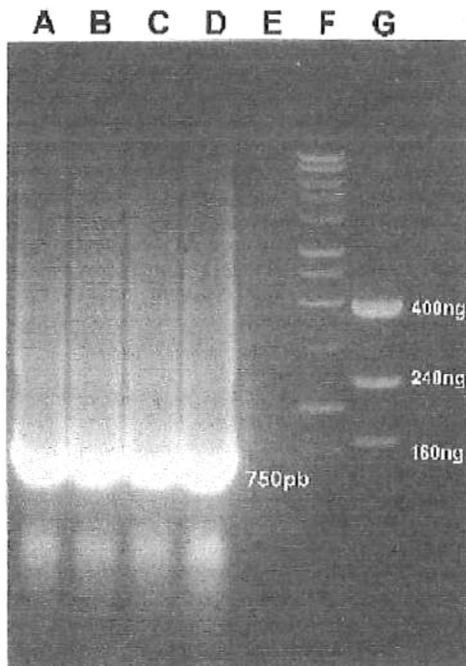


Fig. 25. Electroforesis del producto de PCR de traslape. Gel de agarosa al 2%. En los carriles A-D se observan 4 bandas de las 8 reacciones que corresponden a la unión de la cadena pesada y ligera. En el carril F esta el marcador de 1kb, y en el G esta el marcador de masa y tamaño (400ng = 2000pb, 240ng=1200pb y 160ng = 800pb). Dada la intensidad de la banda no se puede cuantificar con el marcador.

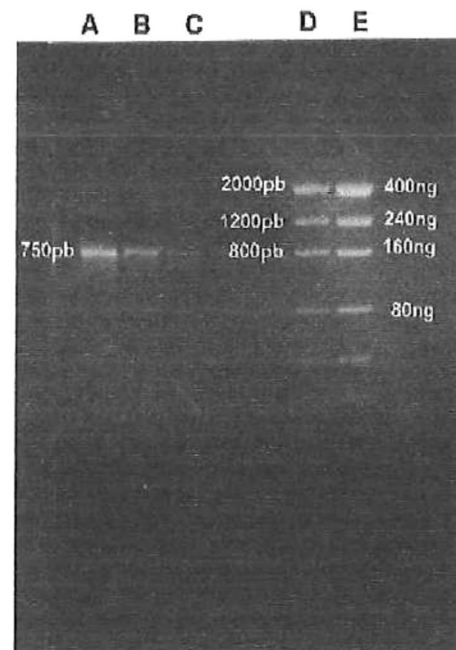


Fig 26. Electroforesis del producto de PCR de traslape purificado. Gel de agarosa al 2% en TAE. En el carril A, B y C se puede observar una banda muy definida que corresponde al producto de PCR de vinculación ya purificado, observe que no hay bandas accesorias. Presenta alta pureza. En el carril D y E se encuentran las bandas del marcador de peso molecular de 2kb.

DIGESTIÓN DEL VECTOR Y DEL PRODUCTO DEL PCR DE TRASLAPE

Se prosiguió a la digestión con *Sfi*I del producto de vinculación purificado y el vector. El producto de vinculación digerido, se corrió en un gel de agarosa, se purificó y se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm, obteniendo 0.83 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. El vector sin digerir se corrió en un gel (Fig. 27) después se digirió y se purificó del gel (Fig.28). El vector digerido se cuantificó en el espectrofotómetro y se obtuvieron 75 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

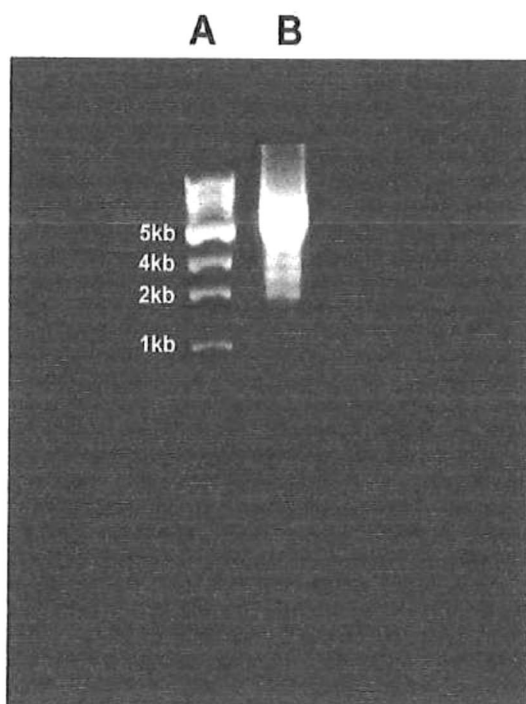


Fig 27. Electroforesis del vector sin digerir. Gel de agarosa al 1% en TAE. Las bandas del carril A corresponden al marcador molecular y el carril B es el DNA del vector superenrollado (sin purificar).



Fig 28. Electroforesis del vector digerido purificado y sin purificar. Gel al 1% teñido con bromuro de Etidio a una concentración final de 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En los carriles A-C se encuentra el vector purificado digerido y en los carriles D-F se encuentra el vector digerido sin purificar la banda inferior corresponde al inserto (1300 pb) y la superior al vector digerido (3270 pb). No se muestra ningún marcador.

LIGACIÓN Y TRANSFORMACIÓN

Una vez ligados la biblioteca (fvcs) y el vector, se llevó a cabo la transformación con células competentes (Fig. 29) (protocolo 11). Posteriormente se amplificó y se infectó con fago ayudador para que se favoreciera la producción de fagos que despliegan el fragmento de anticuerpo. El hecho de que las bacterias crecieron en medios que contenían antibióticos como tetraciclina, ampicilina y kanamicina, es evidencia de la exitosa transformación e infección de fago ayudador y su consecuente liberación de fagos expresando fvcs, los cuales fueron observados por la presencia de un paquete después de las precipitaciones con polietilenglicol.

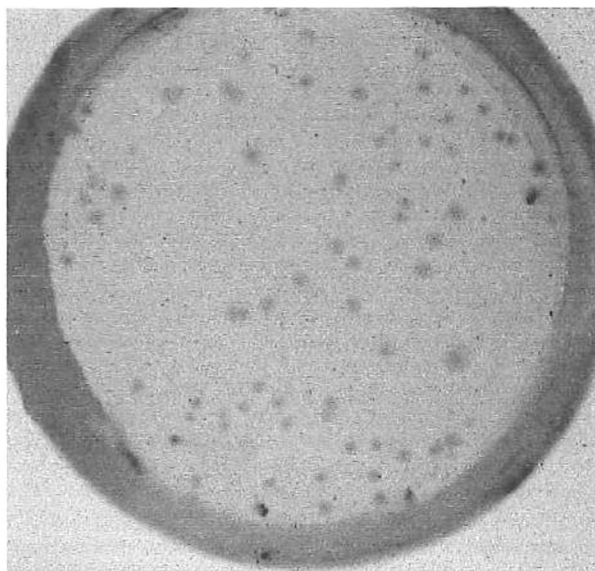
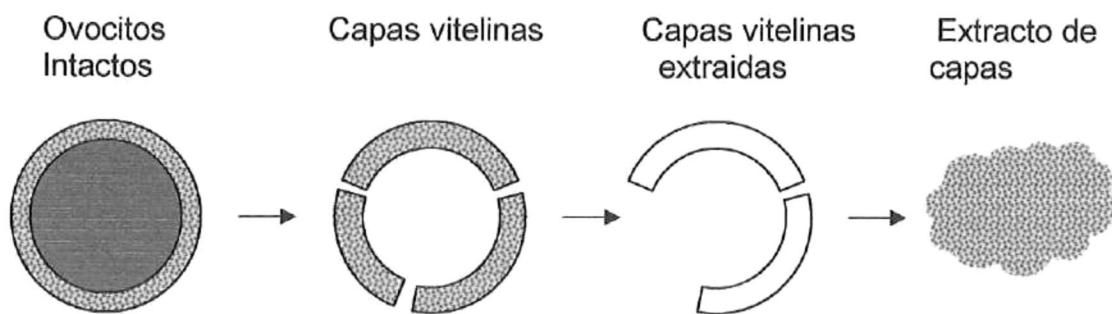


Fig. 29.- Placas de LB con tetraciclina (50 $\mu\text{g/ml}$) y ampicilina (50 $\mu\text{g/ml}$). Se sembraron 100 μl de una dilución 1 a 500 (de células transformadas) en la placa. Se pueden observar colonias después de la transformación, cada colonia tiene un solo tipo de fvcs (anticuerpo monoclonal).

RONDAS DE SELECCIÓN DE LOS FAGOS QUE DESPLIEGAN FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS CONTRA MOLÉCULAS DE LA SUPERFICIE DE LOS OVOCITOS.

Primera ronda de selección	Antígeno: Ovocitos
Segunda ronda de selección	Antígeno: Ovocitos
Tercera ronda de selección	Antígeno: Ovocitos
Cuarta ronda de selección	Antígeno: Extracto de capas de ovocito
Quinta ronda de selección	Antígeno: Extracto de capas de ovocito



Primero se hicieron 3 rondas de selección utilizando como antígeno ovocitos intactos fijados en gluteraldehído. Después se realizaron 2 rondas de selección utilizando como antígeno extracto de capas de ovocitos diluido en agua. Al final de cada ronda de selección después de la centrifugación se observó un abundante paquete, indicando que se produjo una gran cantidad de fagos seleccionados.

Los fagos obtenidos de las últimas dos rondas de selección (cuarta y quinta) fueron probados en un ensayo inmuno enzimático para determinar si existen fagos que desplieguen fragmentos de anticuerpos (fvcs) contra el extracto de capas (Fig. 30).

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE FAGOS CON fvcs CONTRA MOLÉCULAS DE LA SUPERFICIE DEL OVOCITO POR ELISA

Una vez obtenidos los fagos de las rondas de selección se amplificaron y se hicieron pruebas para determinar cual es la ronda en donde hubo mayor cantidad de fagos y una mejor respuesta contra el antígeno.

Primero se muestran los resultados de la ELISA donde se utilizó como antígeno el extracto de capas y se probaron los fagos de la cuarta y quinta ronda de selección.

Tabla VII.- Diseño de la placa para la determinación de la presencia de fagos con fvcs por inmuno ensayo enzimático utilizando como antígeno extracto de capas de ovocito. *(entre paréntesis se especifica el antígeno utilizado en la ronda de selección)

	SB (control)	Fago de la 4ta ronda de selección *(extracto de capas)	Fago de la 4ta ronda de selección (extracto de capas)	Fago de la 5ta ronda de selección (extracto de capas)
Pozos	A1-A2	A3-A4	A5-A6	A7-A8

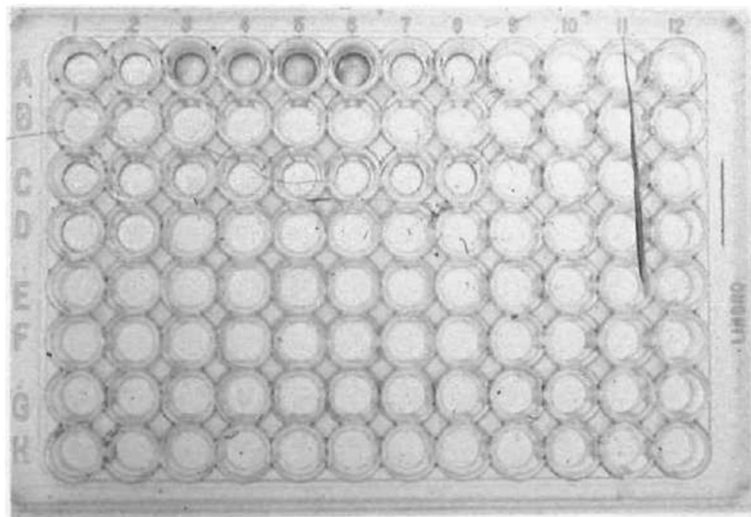


Fig 30. Resultado de la determinación de la presencia de fagos con fucs por ensayo inmuno enzimático utilizando como antígeno extracto de capas y AntiM13 acoplado con peroxidasa y como sustrato ABTS.

Como se puede observar, si se comparan los pozos A1 y A2 con el resto de los pozos (A3 – A8) la mayor intensidad está presente en los pozos donde se utilizaron los fagos de la cuarta ronda de selección (tabla VII), los fagos de la quinta ronda de selección, aunque siguen estando más intensos que en los controles al compararlos con los fagos de la cuarta ronda de selección, muestran menor intensidad, la razón de esto se desconoce.

Dada la intensidad del color obtenida se puede concluir que existen fagos en la cuarta y quinta ronda de selección que despliegan anticuerpos que se unen de manera específica a moléculas presentes en el extracto de capas superficiales del ovocito.

En un nuevo ensayo (ELISA) se volvieron a probar los fagos obtenidos de las últimas 3 rondas de selección, pero ahora se utilizó como antígeno los ovocitos intactos fijados en gluteraldehído.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla VIII. Valores de absorbancia a diferentes tiempos, obtenidos de la ELISA en donde se utilizó como antígeno ovocitos. Se midió la intensidad de color como producto de la reacción del inmuno ensayo con los fagos obtenidos de las ultimas tres rondas de selección.

Anticuerpo	10 min	15 min	25 min
Control	0.000	0.000	0.000
Fago de la 3era ronda de selección (ovocitos)	0.004	0.007	0.003
Fago de la 4ta ronda de selección (extracto de capas)	-0.001	0.004	0.018
Fago de la 5ta ronda de selección (extracto de capas)	-0.005	0.007	0.020

Se puede observar que a los 10 y 15 minutos no hubo una diferencia significativa entre los fagos utilizados debido a que comienza a reaccionar la enzima sobre el sustrato. A partir de los 25 minutos, se observa un aumento en los valores de absorbancia correspondientes a los fagos de la cuarta y quinta ronda de selección, lo cual muestra que hay una selección positiva contra el antígeno (ovocitos de *Urechis caupo*).

Aunque se utilizaron ovocitos como antígeno, la mayor lectura se obtuvo en los pozos donde se utilizó fago de la cuarta y quinta ronda de selección (en donde se utilizó como antígeno el extracto de capas), en conclusión: los fragmentos de anticuerpos desplegados en la superficie de los fagos seleccionados con extracto de capas, son específicos contra las moléculas de la superficie del ovocito, que están presentes en el extracto de capas y no contra los productos internos del ovocito.

EXPERIMENTO BIOLÓGICO CON LOS FAGOS SELECCIONADOS

Los fagos resultantes de la cuarta ronda de selección se utilizaron para hacer experimentos biológicos y observar de que manera interfiere la interacción antígeno – fvc_s en la fecundación del gusano marino *Urechis caupo*. (ver tabla IX y Fig. 32)

Tabla IX. Tabla que muestra los ovocitos activados y no activados con fagos y sin fagos en diferentes tiempos.

Tiempo 0	Tiempo 10 min	Tiempo (min)	Ovocitos Activados	Ovocitos No activados	Ovocitos Muertos	Total
100 µl de Fagos de la cuarta ronda de selección	1 µl de espermatozoides diluidos 1:25,000	45	8	25	5	38
		55	3	48	17	68
		59	19	242	0	261
100 µl de BSA en PBS al 1%	1 µl de espermatozoides diluidos 1:25,000	38	70	113	26	209
		47	5	29	26	60
		61	146	10	42	198

*El BSA en PBS al 1% se utiliza como control debido a que los fagos se encuentran suspendidos en esta solución, para saber si la albúmina interfiere de alguna manera en el proceso de fecundación.

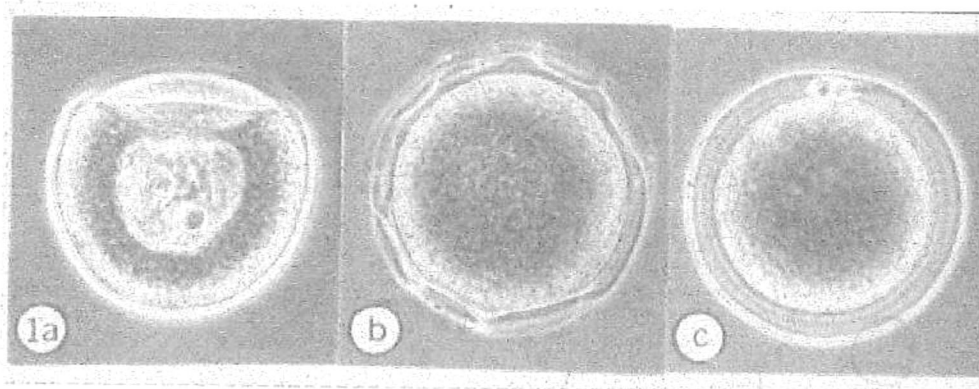


Fig. 31. Fotografía de ovocitos de *Urechis caupo*. La activación del ovocito se evaluó con el rompimiento de la vesícula germinal. Normalmente el ovocito no fecundado está en profase I de la meiosis (1a) (vesícula germinal) y cuando se fecunda (se activa) rompe la vesícula germinal (b) y aparecen los cuerpos polares (c).

Porcentaje de ovocitos activados

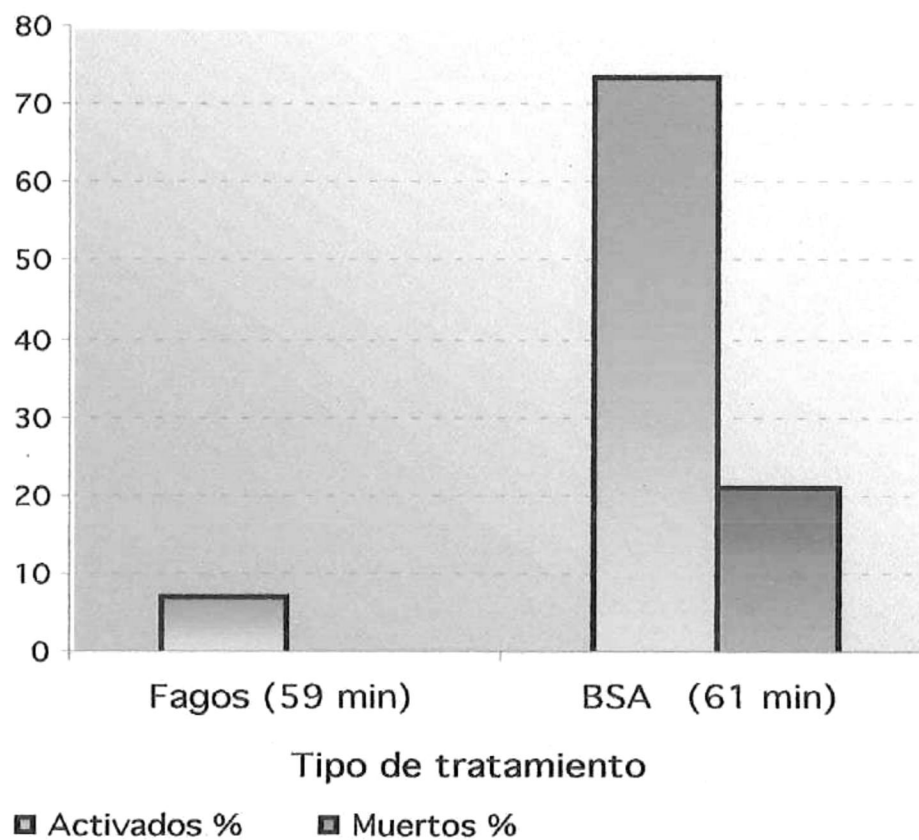


Fig 32. Gráfica de los resultados del experimento biológico. Se muestra la porción de ovocitos de *Urechis caupo* activados por sus espermatozoides a los 59 y 61 minutos, en presencia o ausencia de fagos.

En la figura 32 se observa que el porcentaje de ovocitos activados por los espermatozoides es menor en la columna que corresponde al tratamiento con fagos comparado con el efecto que tiene el BSA, esto indica que los anticuerpos (fvcs) desplegados en la superficie del fago de la cuarta ronda de selección están interfiriendo en el proceso de fecundación al unirse a las moléculas de la superficie del ovocito impidiendo su activación por el espermatozoide.

La causa del aumento en la mortalidad de los ovocitos tratados con BSA se desconoce.

DISCUSIONES

En estudios anteriores se han producido anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas en ratón contra los espermatozoides del mismo organismo. Se observó que éstos impedían la fertilización y se demostró que interferían específicamente con la fusión de las membranas de los gametos (Saling, P. et al., 1985). Por otro lado, también se obtuvieron anticuerpos monoclonales contra los ovocitos del erizo y se demostró que sólo se unían al ovocito y que esto era especie-específico. Además, al unirse, impedían la unión del espermatozoide a la capa vitelina (Gache C., et al. ,1983).

Sin embargo, los anticuerpos monoclonales tienen un gran tamaño y esto provoca un impedimento alostérico. En cambio, los fragmentos de anticuerpos desplegados en bacteriófagos debido a la combinación de cadenas pesadas y ligeras presenta una gran diversidad de anticuerpos de menor tamaño que los monoclonales, dando la oportunidad a que varios anticuerpos se unan a las diferentes regiones de un antígeno. Con esta herramienta se pueden hacer caracterizaciones más finas de los receptores involucrados en el proceso de la fecundación, logrando así un mejor entendimiento de este proceso y un mejoramiento en los métodos anticonceptivos.

El protocolo de despliegue de anticuerpos contra ovocitos de *U. caupo* elaborado aquí, puede ser utilizado en otras especies y con otras finalidades. Modificando algunos aspectos inherentes al organismo con el cual se decida trabajar, se puede aplicar en forma adecuada.

En este trabajo para obtener el RNA que codifique a los anticuerpos contra el antígeno de interés, se inmunizó una gallina ponedora de raza White Leghorn (2 kilos). Al mantenerse con alimento para gallinas ponedoras y bajo ciclos regulares de luz y oscuridad, esta raza presenta una constante producción de huevos, además la yema contiene una alta concentración de anticuerpos IgY por lo que es óptima para este experimento.

A partir de la transformación se obtuvieron bacterias resistentes a tetraciclina y ampicilina, esto debido a que el fago con la construcción fvc3 también contiene la secuencia para la resistencia a ampicilina, la resistencia a tetraciclina es inherente a las células XL-BLUE. Una vez que el fago ayudador ingresa a la bacteria este le confiere resistencia a kanamicina. De esta manera al agregar los antibióticos se asegura la obtención de bacterias que contengan los dos fagos.

Después de la transformación, durante la amplificación y en las rondas de selección, se agregaron antibióticos a los medios para eliminar a las bacterias que no fueron transformadas.

En el inmuno ensayo enzimático, donde se probó a los fagos de la tercera ronda de selección, se obtuvieron resultados negativos sin embargo se prosiguió a retarlos contra las moléculas de la superficie del ovocito utilizando como antígeno un extracto de capas en la cuarta y quinta ronda de selección.

Se hicieron varias modificaciones en las rondas de selección y ELISAs en donde se utilizó el extracto de capas. Se cambiaron volúmenes dependiendo

de la concentración del antígeno utilizado. Cuando se utilizó extracto de capas, antes de agregarlo a la placa, se hicieron diluciones para disminuir la concentración del detergente Tritón presente en el extracto de capas, la concentración se bajó hasta un .03% de esta manera no interfiere en la adhesión del antígeno a la placa.

Al utilizar dos antígenos diferentes en las rondas de selección: ovocitos y extracto de capas del ovocito, tenemos que los fvcs desplegados en los fagos obtenidos de las rondas de selección donde se utilizó extracto de capas como antígeno (cuarta y quinta ronda de selección) presentaron una mayor respuesta en la ELISA. Esto sugiere que después de estas rondas de selección se obtuvo mayor cantidad de fagos que se unen solamente a las moléculas de la superficie, concentradas en el extracto de capas.

En los experimentos biológicos el bloqueo de la fecundación fue de un 80% en ovocitos tratados con fvcs desplegados en los fagos de la cuarta y quinta ronda de selección. Este es un buen porcentaje pero se puede mejorar teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

Es necesario repetir los experimentos biológicos y determinar cuál es la ronda de selección en donde se producen los fagos que bloquean de manera más efectiva el proceso de fecundación, y así pasar a la caracterización de las secuencias de fvcs que reconocen a uno o varios de los receptores en el ovocito, involucrados en el proceso de fecundación.

En los experimentos biológicos realizados en este trabajo se requiere repetir y utilizar anticuerpos solubles y monoclonales (que reconocen un solo epitopo), es decir que no se encuentren unidos al fago, así como incluir un control utilizando fagos que no expresen anticuerpos en su superficie para verificar que sean los anticuerpos los que están interfiriendo en la fecundación y no los fagos.

Sin embargo, se obtuvo un alto porcentaje de bloqueo de la fecundación en ovocitos tratados con fagos. Esto indica que obtuvimos a aquellos fagos que expresan fvc's que reconocen los receptores para el espermatozoide en la superficie del ovocito. El siguiente paso sería aislar y caracterizar a él(los) receptor(es) en el ovocito y, a través de estos anticuerpos previamente seleccionados y determinar el papel que desempeñan en el proceso de fecundación.

CONCLUSIONES

En el inmuno ensayo enzimático, en donde se utilizó el suero de la gallina inmunizada (Fig.23), se concluye que hubo producción de anticuerpos contra las moléculas de la superficie de los ovocitos de *U. caupo*.

Debido a la ubicación que presentan en los geles de agarosa las bandas del producto de la amplificación de cadena pesada y ligera del anticuerpo (fig. 24), así como la vinculación y extensión de las mismas por PCR (fig. 25 y 26) se concluye que hubo amplificación para la secuencias de cadena pesada, ligera y traslape, todas provenientes de las regiones variables de los anticuerpos de la gallina inmunizada con ovocitos de *U. caupo*.

El hecho de que las bacterias crecieron en medios que contenían antibióticos como tetraciclina, ampicilina y kanamicina (Fig. 29), es evidencia de la exitosa transformación e infección de fago ayudador y su consecuente liberación de fagos expresando fvcs, los cuales fueron observados por la presencia de un paquete después de las precipitaciones con polietilenglicol (PEG).

En los ensayos inmuno enzimáticos realizados con el sobrenadante de los cultivos de amplificación de las rondas de selección se utilizaron dos antígenos diferentes, y se llegaron a las siguientes conclusiones:

En base a las intensidades de color mostradas en el ensayo inmuno enzimático donde se utilizó como antígeno el extracto de capas (fig. 30), se concluye que los fagos de la cuarta y quinta ronda de selección despliegan en su superficie fucs que se unen a moléculas presentes en el extracto de capas del ovocito de *U. caupo*.

Por otro lado en el ensayo inmuno enzimático donde se utilizó como antígeno el ovocito intacto fijado en gluteraldehído se obtuvieron valores de absorbancia para la tercera, cuarta y quinta ronda de selección (tabla VIII), al comparar los valores a los 25 minutos se concluye que hay moléculas en la superficie del ovocito intacto que son reconocidas por los fucs desplegados en los fagos que pertenecen a la cuarta y quinta ronda de selección.

Los resultados de los experimentos biológicos mostrados en la gráfica de la fig. 32 indican que los ovocitos tratados con fagos presentan un 80% de inhibición en la fecundación, con estos datos se concluye que los fucs desplegados en la superficie del fago de la cuarta ronda de selección fueron un

obstáculo para que se llevara a cabo la fecundación y sugiere fuertemente que están interaccionando con los receptores en el ovocito.

En general, con base a las evidencias mostradas (ELISA, experimentos biológicos, entre otros), se concluye que se produjeron fagos que despliegan anticuerpos contra las moléculas en la superficie del ovocito y que estos interrumpen el proceso de fecundación en los gametos de *U. caupo*.

BIBLIOGRAFÍA

- Barbas C. F., Burton D.R., Scott J.K. y Silverman G.J. 1999. *Phage Display, A laboratory Manual*. Primera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY.
- Boer S.H. y N.W. Shoad. 1990. II.A.2. Preparations of Antigens, bacteria en *Serological Methods for detection and identification of viral and bacterial Plant Pathogens*. R. Hampton, E. Ball, S. de Boer (ed.). APS press. 1990.
- Burton D.R. 2001. Antibody Libraries In *Phage Display, A Laboratory Manual*. C. Barbas (ed.). Cold Spring Laboratory Press. New York. Pp 3.1 – 3.11.
- Gache, C., Niman, H. L., y Vacquier V. D. 1983. Monoclonal antibodies to the sea urchin egg vitelline layer inhibit fertilization by blocking sperm adhesion. *Experimental Cell Research*. **147**: 75 – 84.
- Gould M., 1975. *Echiura*. Reproduction of marine invertebrates. 3: 227 – 311.
- Gould, M. y Stephano, J.L. 1989 .How do sperm activate eggs in *Urechis?*, en *Mechanisms of egg activation*. Neccitelli R., cherr, G. y Clark W. Plenum press. E.U.A. pp 201 –211.
- Gould, M. y Stephano, J. L. 1996. Fertilization and parthenogenesis in *Urechis caupo* (Echiura). *Invert Rep Dev*. 30 (1-3), 17 –22.
- Harlow, E. y Lane David. 1988. *Antibodies, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, NY. Estados unidos. pp. 98.

- Kay, B., Winter, J. y McCafferty, J. 1996. *Phage display of peptides and proteins*. Academic press. pp 21 – 22.
- Lerner R.A. et al.1992. Antibodies without immunization. *Science*. 258: 1313-1314.
- Micklos A. D. y Freyer.1990. *DNA Science*. Primera edicion.Cold Spring Harbor Laboratory Press.NY. pp 57.
- Saling P., Irons G., y Waibel R. 1985. Mouse sperm antigens that participate in fertilization. I. Inhibition of sperm fusion with the egg plasma membrane using monoclonal antibodies. *Biology of Reproduction* **33**: 515 – 526.
- Silverman G. et al. 1999. Phage Display of Combinatorial Antibody Libraries. Cold Spring Harbor Laboratory, NY. pp 101 – 165.
- Smith, G. P. 1988. Filamentous phages as cloning vectors. *In Vectors: a Survey of molecular cloning vectors and their uses*. R. L Rodriguez y D. T. Denhart, eds. pp 61 – 84. Butter worth, Boston.
- Smothers, J.F., Henikoff, S y Carter, P (2002). Affinity selection from biological libraries. *Science* 298:621-622.
- Souriau C., Hua T.D., LeFranc M. y Weill, M. 1998. Phage display technology, a wide range of applications. *Medicine Sciences* 14 (3): 300- 309.

ANEXO 1

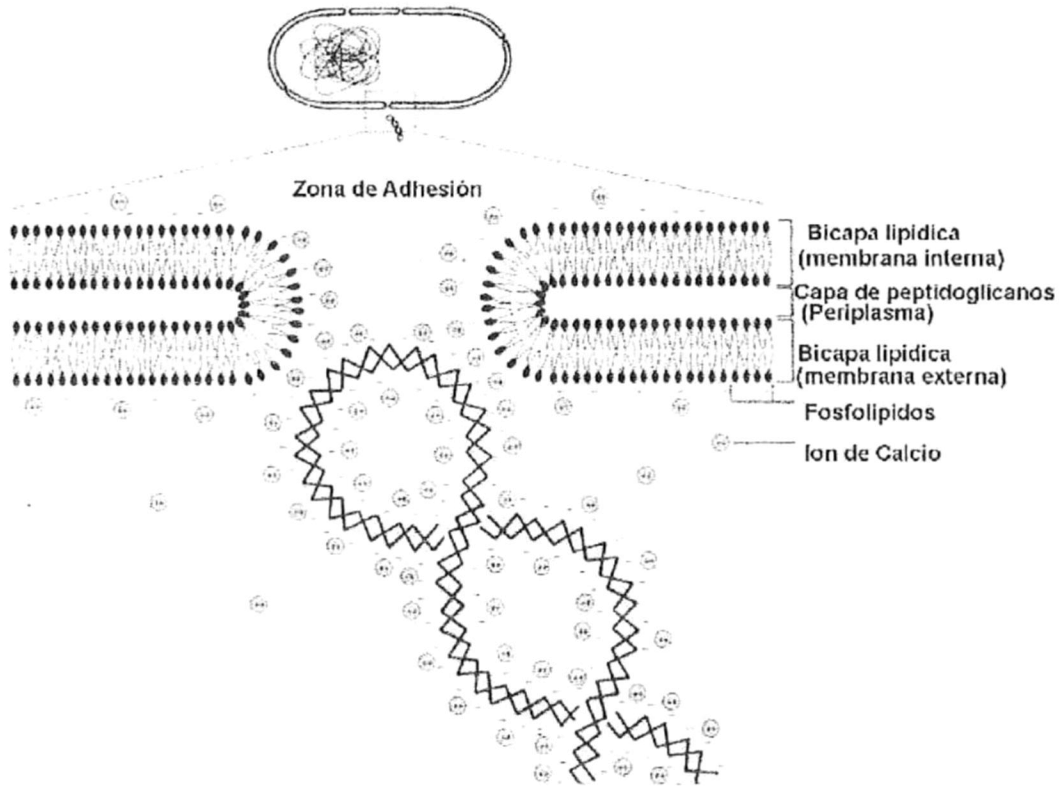
Transformación con CaCl_2 

Ilustración de Micklos 1990

ANEXO 2

Producción de fago ayudador VCSM 13

- Inocular 2 ml de medio SB con 2 μ l de células XL-1BLUE, incubar a 250 rpm por 1 hr a 37°C
- Preparar diluciones de 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} del fago ayudador VCSM13, utilizar 1 μ l de cada una de las diluciones para infectar 50 μ l del cultivo de XL-BLUE, incubar 15 min. a temperatura ambiente.
- Agregar 3 ml de LB agar líquido y vertir sobre una placa de LB agar. Dejar creciendo toda la noche a 37°C.
- Cultivar 10 μ l de XL-BLUE en 10 ml de medio SB (previamente calentado), incubar a 250 rpm por una hora, en 37°C.
- Agregar una colonia de las placas con el VCSM13 al tubo y dejar en agitación (250 rpm) por 2 hrs a 37°C
- Transferir los 10 ml a un matraz erlenmeyer con 500 ml de SB precalentado.
- Agregar 700 μ l de kanamicina 50 mg/ml para obtener una concentración final de 70 μ g/ml
- Incubar en agitación (250 rpm) a 37°C durante toda la noche.
- Centrifugar el cultivo a 4,000 rpm por 15 min.
- Incubarlo por 20 min a 70°C en baño maria.
- Centrifugar el sobrenadante a 4,000 rpm por 15 min.
- Almacenar a 4°C.

ANEXO 3

Esquema general de las rondas de selección

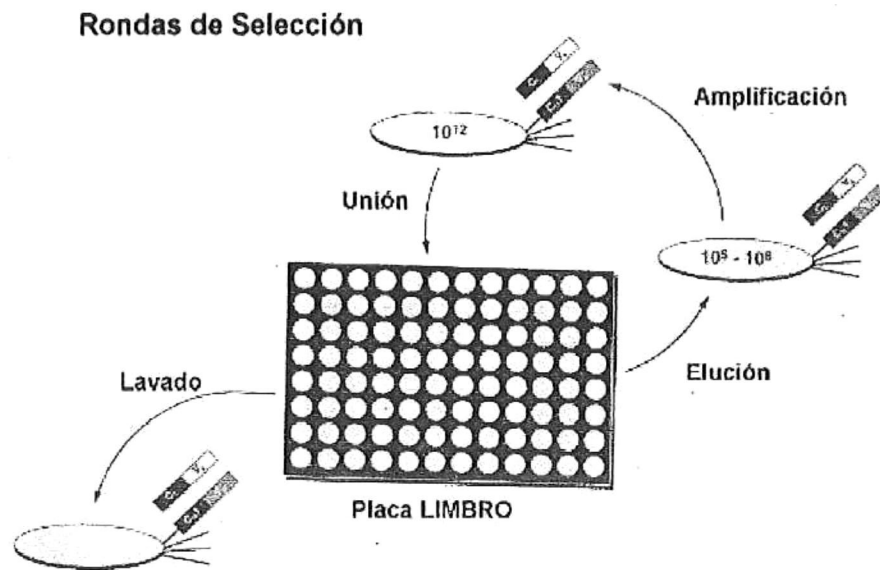


Ilustración de Barbas, 2001.

ANEXO 4

Recetas

Acetato de Sodio 3M

Disolver 408.1 grs. de acetato de sodio $3\text{H}_2\text{O}$ en 800 ml de H_2O .
Ajustar a pH 5.2 con ácido acético glacial .
Ajustar el volumen a 1 litro con H_2O .
Esterilizar por autoclave.

Ampicilina

Preparar la solución stock con 50 mg/ ml de agua desionizada.
Almacenar a -20°C .
Concentración final utilizada 50 $\mu\text{g/ml}$.

Antibióticos

Estas son las concentraciones que se requieren para la utilización de los antibióticos.

Antibiótico	Stock	Concentración final
Tetraciclina (en alcohol)	5mg/ml	10 $\mu\text{g/ml}$
Carbencilina	100mg/ml	50 $\mu\text{g/ml}$
Kanamicina	50mg/ml	70 $\mu\text{g/ml}$
Ampicilina	50mg/ml	50 $\mu\text{g/ml}$

Bromuro de Etidio

Agregar 1 gr de bromuro de etidio a 100 ml de H_2O . Agitar por varias horas para que se disuelva. Almacenar en un recipiente obscuro a temperatura ambiente.

BSA/ PBS 1%

Adicionar 0.100 g de BSA en 10ml de PBS. Para esterilizar utilizar un filtro de 0.22 μ .

BSA/ PBS 3%

Añadir 0.300g de BSA en 10ml de PBS.
Se esteriliza por medio de filtrado utilizando un filtro de 0.22 μ .

Amortiguador de Dietanolamina

10% de dietanolamina
0.02% de Azida de Sodio
0.5 μM de Cloruro de magnesio – 6 H_2O

Amortiguador de elución para las placas de selección

Disolver 1.5 g de glicina en 90 ml de agua, ajustar el pH a 2.2 con HCl concentrado, agregar 100 mg de BSA (albúmina de suero de bovino) y llevar a un volumen final de 100 ml. Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C.

Amortiguador salino de fosfatos (PBS)

PBS 1x (pH 7.4)

NaCl	0.137M
KCl	0.0027M
Na ₂ HPO ₄	0.01M
NaH ₂ PO ₄	0.01M

- Preparar 350 ml de la fórmula básica que consiste en:

NaCl	0.137M	-----	2.8 gr
KCl	0.002M	-----	0.070 gr
Na ₂ HPO ₄	0.01M	-----	0.497 gr

- Preparar 100 ml de la fórmula ácida

NaCl	0.137M	-----	0.8 gr
KCl	0.002M	-----	0.02 gr
NaH ₂ PO ₄	0.01M	-----	0.138 gr

- Con el potenciómetro se mide el pH de la fórmula básica y se le va agregando poco a poco la fórmula ácida hasta alcanzar el pH adecuado que en este caso es de 7.4
- Se esteriliza en el autoclave (no precipita).

** Este buffer sirve para que los anticuerpos estén de la manera más estable posible.

Amortiguador salino de fosfatos con Tween (PBST)

- Al PBS se le agrega tween a una concentración final de 0.5%.
- Y se esteriliza por filtrado.

Amortiguador TAE

Solución concentrada 50X

Para 1 litro:

- 242 g Tris base
- 57.1 ml de ácido acético glacial
- 100 ml de 0.5M EDTA (pH 8.0)

DEPC

Diluir en agua para obtener una concentración final de 0.1% se deja reposando mínimo 12 horas a 37°C y después se calienta a 100°C por 15 minutos o se esteriliza 15 minutos en el autoclave.

Gel de agarosa al 1%

- Mezclar 0.4 gr en 40 ml de amortiguador TAE
- Disolver en el microondas
- Dejar enfriar y agregar bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 $\mu\text{g/ml}$

Gel de agarosa al 2%

- Mezclar 0.8 gr en 40 ml de amortiguador TAE
- Disgregar en el microondas
- Dejar enfriar y agregar bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 $\mu\text{g/ml}$

Glicerol

Diluir al 20% en agua para congelar las células competentes.

kanamicina

La solución stock se prepara a una concentración de 50 mg/ml en agua desionizada. Almacenar a -20°C. Concentración final utilizada 70 $\mu\text{g/ml}$.

LB Agar

Agregar 32 gr. en un litro
Disolver calentando en el microondas
Esterilizar en el autoclave por 30 minutos

LB Top Agar

Agregar 0.35 g de Bacto agar y 1.25 g de medio LB a 50 ml de agua destilada. Esterilizar por autoclave y almacenar a 4°C. Calentar en el microondas antes de ser usado.

NaCl 0.5M

Disolver 29.2 gr de NaCl en 800 ml de H₂O. Ajustar a 1 litro con H₂O esterilizar por autoclave.

NaCl 0.5M

Disolver 29.2 gr de NaCl en 800 ml de H₂O. Ajustar a 1 litro con H₂O esterilizar por autoclave.

Polietilen glycol (PEG) 2.5 M NaCl

Agregar 146.1 grs. de NaCl para 1000 ml (2.5M)

Agregar 200 grs de PEG 8000 para 1000 ml (20%)

Para disolver dejar en agitación (termoplato) por dos horas

Esterilizar en autoclave

SB

Agregar :

30 gr de tryptona

20 gr de extracto de levadura

Llevar a 1 litro con H₂O. ajustar pH 7.0 con NaOH.

SDS al 1%

Disolver 10 gr de SDS en 900 ml de H₂O. Calentar a 68°C para que disuelva.

Ajustar pH 7.2 agregando HCl concentrado. Llevar a 1 litro con H₂O.

Solución sustrato para la fosfatasa alcalina

Adicionar 5 mg de p-nitrofenil fosfato a 5 ml de buffer de dietanolamina pH 9.8 (10% de dietanolamina, 0.02% de azida de sodio (NaN₃) y 0.5μM de MgCl₂ · 6 H₂O)

Solución sustrato para la peroxidasa

Preparar 450 ml de 0.05 M de ácido cítrico ajustar el pH a 4.0 con NaOH concentrado, después agregar 100mg de ABTS. Agregar 12 μl de H₂O₂ al 37% a 7 ml de ABTS (azino-bis (3-ethylbenz – thiazoline –6- sulfonic acid).

Tetraciclina

Diluir 5 mg/ml en etanol. Almacenar a -20°C. Concentración final utilizada 50 μg/ml.

Tris 2M

Disolver 242.2 gr de Tris base en 800 ml de H₂O.

ANEXO 5

Reactivos y su función

Acido Cítrico 0.05M (solución sustrato para la peroxidasa)

Preparar 450 ml de 0.05 M de ácido cítrico ajustar el pH a 4.0 con NaOH concentrado, después agregar 100mg de ABTS.

Adyuvante de freund's.- Este adyuvante es muy utilizado en la investigación, es una emulsión de agua y aceites no metabolizables. Si la mezcla contiene *M. tuberculosis* muerta se le llama adyuvante completo de Freund's, sin la bacteria se denomina adyuvante incompleto. El adyuvante de Freund's es uno de los mas utilizados por que estimula respuestas inmunes fuertes y prolongadas. Para evitar los efectos secundarios, se recomienda que solo la primera inyeccion sea con adyuvante completo y el resto se utilice el adyuvante incompleto.

Agarosa.- Sirve como matriz para la separación de fragmentos de DNA por su tamaño. La agarosa de bajo punto de fusión sirve como matriz inerte, facilitando la recuperación del DNA de la agarosa, evitando la pérdida de muestra.

Amortiguador TAE (tris, acetato) .- Es el amortiguador más utilizado y es el óptimo cuando se requieren hacer purificaciones del gel de agarosa. Además de dar muy buena resolución a las bandas de DNA.

Ampicilina.- Bactericida, sólo mata a bacterias *E. coli* en crecimiento, inhibiendo la síntesis de la pared celular evitando la formación de los enlaces entre peptidoglicanos.

Azida de sodio.- Se une con el Hierro de la enzima citocromo oxidasa de la mitocondria, inhibiendo la transferencia de electrones al oxígeno, impidiendo el crecimiento bacteriano.

Bromuro de etidio.- Es un colorante que fluoresce de un color rojo – anaranjado (560nm) cuando se ilumina con luz ultravioleta (260 a 360nm). Esto permite detectar pequeñas cantidades de DNA. Este colorante corre en dirección opuesta al DNA. El colorante se intercala entre los pares de bases que se encuentran en las moléculas lineares y circulares de DNA lo cual agrega rigidez a su estructura.

BSA.- Albúmina de suero de bovino, el antígeno no siempre se pega en toda la placa por lo que la albúmina bloquea los sitios disponibles en la placa de esta manera el fago no se adhiere a la placa lo cual evita obtener un resultado falso positivo.

CaCl₂ .- Los cationes (Ca⁺⁺, Mn⁺⁺, K⁺, Co⁺⁺⁺) en una solución para la transformación forman complejos con los grupos fosfatos, cubriendo las cargas negativas y permitiendo el desplazamiento de una molécula plasmídica a través de la zona de adhesión. Un choque con calor fundamenta el tratamiento químico, creando un desbalance termal en ambos lados de la membrana de *E. coli* que físicamente ayuda a impulsar al DNA a través de la zona de adhesión.

Carbencilina.- Inhibe la transpeptidación de las enzimas involucradas en la unión de los polisacáridos de la pared celular de las bacterias. Activa enzimas liticas de la pared celular.

Cloroformo.- Desnaturalizador de proteínas. Estabiliza la unión de la fase acuosa y la capa de fenol. La mezcla fenol- cloroformo reduce la cantidad de solución acuosa retenida por la fase orgánica. Inhibe las RNAsas

DEPC (dietilpirocarbonato).- Inhibe las RNAsas por modificación covalente. (para su preparación ver recetas).

DTT.- Se utiliza para evitar enlaces disulfuros, manteniendo reducida a la transcriptasa reversa facilitando la síntesis de cDNA.

Electroforesis.- Es una técnica utilizada para separar moléculas por su tamaño, en este caso se utiliza para separar moléculas de DNA. Esta técnica consiste en poner el DNA en una matriz (gel de agarosa) y aplicarle voltaje a los extremos del gel, las moléculas de DNA expuestas a este campo eléctrico migran hacia el ánodo debido a la carga negativa de los fosfatos que se encuentran en la estructura del DNA. La velocidad de migración se ve limitada por la fuerza de fricción que ejerce la matriz (gel de agarosa) sobre el fragmento de DNA.

Etanol .- Ayuda a concentrar el DNA y remueve los residuos del fenol y el cloroformo. En presencia de altas concentraciones (0.5 M) de cationes monovalentes el etanol induce una transición estructural en las moléculas de DNA, causando su agregación y precipitación.

Etanol al 70%.- Debido a que la mayoría de las sales y moléculas orgánicas pequeñas son solubles en etanol al 70%, ayuda a remover de manera efectiva las sales del DNA durante la precipitación y el lavado del paquete.

Fenol-guanidin thyocianato.- Es uno de los mejores desnaturalizantes proteínicos, la solubilidad del RNA en soluciones que contienen 4M de guanidina thyocianato, pH 4, permite su fácil separación en presencia de una fase orgánica fenol/cloroformo. La diferencia de densidad del RNA y el DNA facilita su separación.

Glicerol.- Evita la formación de cristales de hielo intra o extracelular que dañan a la bacteria durante el congelamiento. En la electroporación se utiliza al 10%, dado que sustituye a las sales del medio, evitando que la corriente dañe a las bacterias.

Glucógeno.- Este se adhiere a los enlaces covalentes del DNA y le confiere peso a la molécula de DNA y así facilita su precipitación.

Isopropanol.- Este reactivo forma un precipitado en muestras que contienen sales, RNA e isopropanol. La precipitación de ácidos nucleicos con isopropanol reduce el volumen total de la muestra. El inconveniente en su utilización se debe a su difícil evaporación y a que las sales presentes en la muestra tienden a precipitarse junto con el RNA.

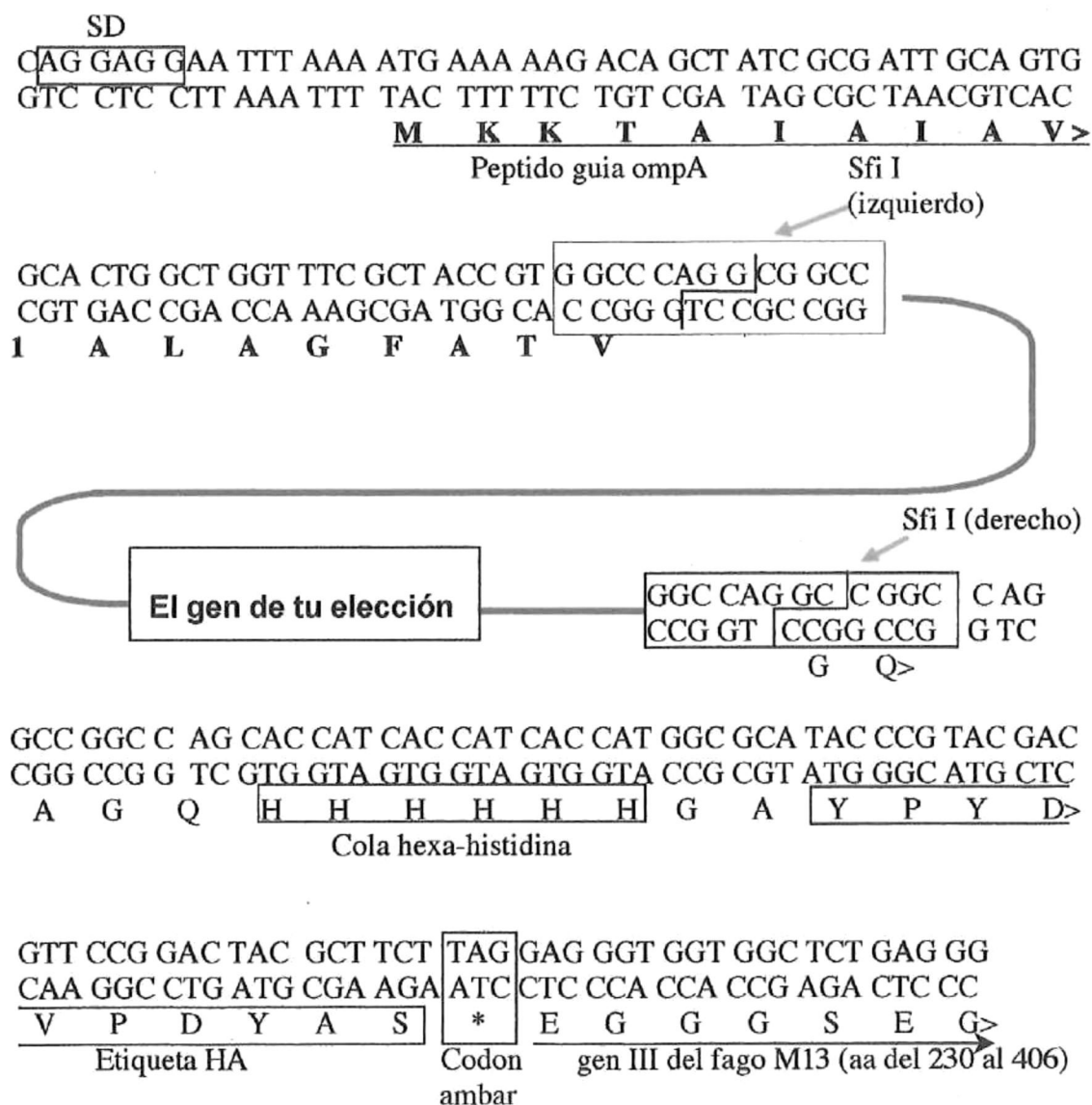
Kanamicina.- Bactericida, inhibe la síntesis de proteínas uniéndose de manera irreversible a la subunidad 30s del ribosoma, el complejo ribosoma – kanamicina inicia la síntesis de proteína al unir el RNAm y el primer RNAt, sin embargo el segundo RNAt no se une y el complejo ribosoma – RNAm se separa, por lo tanto inhibe específicamente la translocación.

MgCl₂.- Cofactor esencial para el funcionamiento de la transcriptasa reversa.

Oligo dT₁₂₋₁₈. -Se utiliza como cebador en la síntesis de la primera hebra de cDNA, llevada a cabo por la transcriptasa reversa. El cebador se hibridiza con el extremo poly (A) del mRNA. Está fosforilado en el extremo 5' para facilitar la síntesis del cDNA.

PBS.- Este amortiguador contiene la concentración de sales (NaCl y KCl) y pH 7.4, condiciones que se encuentran en el suero de aves y mamíferos y que son favorables para la estabilidad de los anticuerpos.

pComb 3x.- El codon amber se ha insertado entre el extremo 3' del sitio de restricción para *SfiI* y el extremo 5' del gen III permitiendo la expresión soluble del anticuerpo sin la proteína pIII en cepas no supresoras como TOPf10. La etiqueta 6x histidinas (HIS) ha sido insertada para la purificación de los anticuerpos (fab, fvcs, etc.) con níquel. El decapeptido hemaglutinina (HA) como etiqueta, ha sido insertado en el extremo 3' de la etiqueta HIS para su detección usando anticuerpos anti-HA en inmunotransferencia. Este vector permite la expresión de fab, fvcs y otras proteínas. OmpA es un péptido señal que dirige el anticuerpo al periplasma. El SD es el sitio para la unión al ribosoma. Lac Z para la transcripción de la cadena pesada y ligera. Los sitios para los cebadores ompseq y CL-B sirven para secuenciar la cadena ligera al igual que los sitios para los cebadores gback y CL-F para secuenciar la cadena pesada. El sitio trp es la señal de terminación.



PEG.- Es un polímero que secuestra el agua, favoreciendo la agregación de los fagos, facilitando su colección por centrifugación.

Peroxidasa.- Clase de enzima que oxida el sustrato utilizando H_2O_2 .

RNAasa H.- Es una endoribonucleasa que hidroliza específicamente los enlaces fosfodiéster de la hebra de RNA en un híbrido RNA – DNA de manera que lo degrada.

SfiI.- Esta enzima reconoce la secuencia de 8 pares de bases GGCCNNNN↓NGGCC y corta en la región degenerada de su palindromico sitio de restricción. La utilización de sitios 5' (GGCCCAGG↓CGGCC) y 3' (GGCCAGGC↓CGGCC) para Sfi I permite que los fragmentos digeridos sean ligados en la orientación correcta y se facilite la construcción de extensas bibliotecas.

SOC.- Se adiciona inmediatamente después de la electroporación para restablecer la concentración de sales fuera de la célula y proporciona glucosa como una fuente rápida de energía.

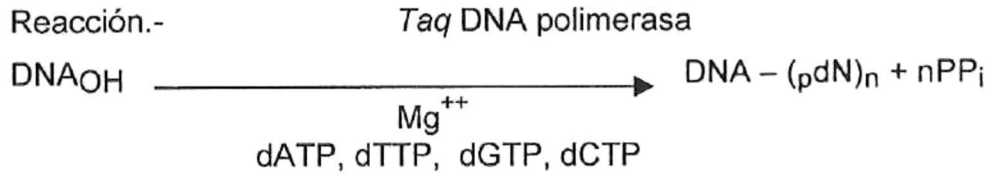
Solución de carga (loading buffer).- Esta solución contiene glicetol y azul de bromofenol. El Azul de bromofenol en geles de agarosa al 0.8% se comporta como una banda de 500pb y sirve para monitorear el corrido del DNA. El glicerol, le da densidad a la muestra de DNA para que se deposite en el fondo del pozo evitando que se disperse en el amortiguador de corrido TAE.

Solución de elución.- En este pH los fagos estan estables, sin embargo la unión fago-antígeno se ve afectada y por lo tanto el fago se desprende del antígeno.

SUPERSCRIPT II transcriptasa reversa.- Es una DNA polimerasa que sintetiza la hebra complementaria de DNA a partir de una hebra de RNA. Esta enzima esta modificada genéticamente por la introducción de mutaciones puntuales (en lugar de deleciones) en el sitio activo de la RNAasa H. Presenta una reducción en la actividad RNAasa H. Pero las mutaciones selectivas dentro del dominio RNAasa H mantienen la total actividad polimerasa. Esta modificación estructural elimina la degradación de moléculas de RNA durante la síntesis de la primera hebra de cDNA.

T4 DNA ligasa.- Utilizando ATP como cofactor cataliza la formación de los enlaces fosfodiéster entre las bases del DNA (doble hebra) con un extremo 3' hidroxilo y un extremo 5' fosfato. Los ácidos nucleicos de hebra sencilla no son sustrato para esta enzima.

Taq Polimerasa.- Polimerasa del DNA de doble hebra. esta enzima presenta una masa molecular de 94kDa., tiene una actividad exonucleasa en dirección 5'→ 3'. Para la incorporacion de nucleotidos la enzima trabaja mejor a los 75 –80 °C. Como cofactor requiere cationes divalentes como el Mg^{++} .



Tetraciclina.- Bacteriostático, inhibe la síntesis de proteína en procariontes evitando la unión del RNA t al sitio A de la subunidad pequeña del ribosoma. La tetraciclina interfiere en el reconocimiento de los codones y en la terminación de la cadena peptídica.

Tris 2M.- Eleva el pH, manteniendo la estabilidad del fago y evitando su desnaturalización.

Tween 20.- Ayuda a remover a las proteínas unidas de manera inespecífica al antígeno, además de evitar que los anticuerpos se peguen al plástico, no inhibe la actividad de la fosfatasa alcalina y la peroxidasa. Sin embargo puede presentar un poco de fondo residual.

VCSM13 Fago ayudador.- Debido a que los fagemidos contienen solo el origen de replicación del bacteriofago filamentoso f1, y carece de todos los genes requeridos para la replicación y ensamblaje de las partículas del fago, se requiere de un fago ayudador que provea las proteínas de replicación y de ensamblaje. El fago ayudador VCSM13 es particularmente adecuado debido a que también contiene un gen que codifica para la resistencia a la kanamicina, así la kanamicina puede ser usada para seleccionar las *E. coli* que hayan sido infectadas con VCSM13. Una mutación en el origen de replicación del VCSM13 provoca que la producción del fago ayudador sea menos eficiente que la del fago pComb3. Por lo que la adición del fago ayudador VCSM13 a células que han sido transformadas con el fagemido pComb3 va a producir una población mezclada de fagos en donde principalmente se encuentre fago pComb3.

Debido a que los fagemidos contienen solo el origen de replicación del bacteriofago filamentoso f1, y carece de todos los genes requeridos para la replicación y ensamblaje de las partículas del fago, se requiere de un fago ayudador que provea las proteínas de replicación y de ensamblaje. El fago ayudador VCSM13 es particularmente adecuado debido a que también contiene un gen que codifica para la resistencia a la kanamicina, así la kanamicina puede

ser usada para seleccionar las *E. coli* que hayan sido infectadas con VCSM13. Una mutacion en el origen de replicacion del VCSM13 provoca que la produccion del fago ayudador sea menos eficiente que la del fago pComb3. Por lo que la adicion del fago ayudador VCSM13 a celulas que han sido transformadas con el fagemido pComb3 va a producir una poblacion mezclada de fagos en donde principalmente se encuentre fago pComb3.

ANEXO 6

Reactivos y sus marcas

ABTS 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline -9- ácido sulfónico)	SIGMA No. de catálogo A-1888
Adyuvante de Freund's completo	SIGMA No de catálogo F5881 www.sigma.aldrich.com/order
Adyuvante de Freund's incompleto	SIGMA No de catálogo F5506 www.sigma.aldrich.com/order
Agarosa	GIBCO-BRL #15510-019
Agarosa de bajo punto de fusión	GIBCO Cat. 15517-014
Anticuerpo de conejo contra gallina acoplada con fosfatasa	SIGMA P-1379
Anticuerpo contra fago M13 acoplada con peroxidasa	Pharmacia Biotech (Amersham) cat. 27-8402A
Cebadores para anticuerpos de gallina	Operon Technology INC. www.operon.com
Células XL-1BLUE resistentes a tetraciclina	STRATAGENE #200268
Centricon 3000	AMICON Cat. 4202
DNA Ligasa T4 Amortiguador 5X para la ligasa	GIBCO/ BRL cat 15224025 1unidad/ μ l

Enzima de Restricción <i>Sfi</i> I Amortiguador para la digestión	New England Biolabs # RO 123S
Estandar de tamaño de DNA	GIBCO- BRL
Glicerol	SIGMA G6279
Kit de Preamplificación para la síntesis de cDNA de hebra sencilla Transcriptasa Reversa SUPERScript II RNAasa H	GIBCO- BRL #18089
Kanamicina	SIGMA K4000
Marcador de tamaño y concentración para DNA: Baja concentración 200 µl (4 µl/ aplicación) Alta concentración 200 µl (4 µl/ aplicación)	Invitrogen No de catálogo 10068-013 No. de catálogo 10496-016
PEG 8000	SIGMA 2139
Placa de poliestireno, fondo plano y alta adhesión	COSTAR EIA/RIA cat.3690
PMSF	SIGMA P7626
Primers para anticuerpos de gallina	Operon Technology
p-nitrofenilfosfato 50 tabletas de 5 mg c/u	SIGMA N-9389
RNA-STAT	TEL-test "B" INC. CS-110 P.O. Box 1421 *1511 County Road 129 Friendswood, TX 77546 Atención al cliente (713) 482 – 2672 Para ordenar 1-800-631-0600 Tel (713) 482 – 2672

Taq PCR core Kit Taq Polimerasa Amortiguador para PCR DNTP's	QIAGEN cat. 221223
Tetraciclina	SIGMA T3383
Triptona	SIGMA T9410
Triton	Pierce cat.28314
Trizma	SIGMA T 1503
Tubos con filtro .45 μ m	MILLIPORE #UFC3 OHV 00
Tubos para PCR con capacidad de 0.5 ml caja con 1000	Gene Amp No. de catálogo 801-0180 Tel 1- 800 – 327- 3002
Tween 20 (polyoxyethyleno- sorbitan monolaurato)	SIGMA P-1379
Vector pComb3X	Donado por Carlos Barbas Scribs Institute