

24/11/83

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

FACULTAD DE CIENCIAS.

Algunas propiedades de la subunidad-B, de la enterotoxina termolábil de E. coli, aislada de una cepa portadora del plásmido recombinante pUB1844.

Tesis que sustenta el pasante.

Zamora Zavala César Zeferino.

para obtener el título de Biólogo.

México, D.F., noviembre 1983.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

20/11/83

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

FACULTAD DE CIENCIAS.

Algunas propiedades de la subunidad-B, de la enterotoxina termolábil de E. coli, aislada de una cepa portadora del plásmido recombinante pUB1844.

Tesis que sustenta el pasante.  
Zamora Zavala César Zeferino.  
para obtener el título de Biólogo.  
México, D.F., noviembre 1983.

## RESUMEN.

El plásmido pUB1844 es un recombinante que lleva el gene elt-B aislado del plásmido p307 como un fragmento Hind-III. En este estudio se empleó una cepa portadora de pUB1844, para intentar la purificación de la subunidad-B (TL<sub>B</sub>) de la enterotoxina termolábil de E.coli (TL).

Dado que la TL<sub>B</sub> codificada por pUB1844 se une al gangliósido GM<sub>1</sub> in vitro se decidió intentar la purificación de la proteína por cromatografía en agarosa, método útil en la purificación de la toxina TL. El uso de este método se basa, en la afinidad que la toxina tiene por la resina, presumiblemente debido a la semejanza estructural con el gangliósido GM<sub>1</sub> al cual la TL se une muy eficientemente.

## INDICE GENERAL.

Página.

### CAPITULO 1.0 ANTECEDENTES.

1.1 <u>Escherichia coli</u> como patógeno.	1
1.2 Modo de acción de TL y TC.	2
1.3 Plásmidos.	4
1.4 Objetivo del estudio.	6

### CAPITULO 2.0 MATERIALES.

2.1 Antibióticos.	8
2.2 Medios de cultivo.	8
2.3 Reactivos.	8

### CAPITULO 3.0 METODOS.

3.1 Preparación de antisuero antitoxina del cólera.	9
3.2 Inmunodifusión simple en agar (Prueba de --- Ouchterlony).	10
3.3 Ensayo inmunoenzimático (ELISA).	12
3.4 Medio de crecimiento para la preparación de TL <sub>B</sub> .	16
3.5 Preparación de lisados celulares mediante pre- sión hidrostática (Prensa Francesa).	17
3.6 Precipitación de proteínas con sulfato de amonio.	18
3.7 Cromatografía de TL <sub>B</sub> en agarosa.	20
3.8 Preparación de lisados celulares mediante soni- cación, y obtención de TL <sub>B</sub> .	23
3.9 Cromatografía de TL <sub>B</sub> en agarosa y pH alcalino.	25
3.10 Medio de crecimiento para la preparación de TL.	26
3.11 Preparación de lisados celulares para la obten- ción de TL.	27
3.12 Precipitación de TL con sulfato de amonio.	27
3.13 Cromatografía de TL en agarosa.	28

### CAPITULO 4.0 DISCUSION DE RESULTADOS.

4.1 Cromatografía de TL <sub>B</sub> en columnas de agarosa.	30
4.2 Cromatografía de TL <sub>B</sub> en columnas de agarosa y pH no neutro.	33
4.3 Cromatografía de TL en agarosa.	35

**CAPITULO 5.0 CONCLUSIONES.**

**5.1 Conclusiones.**

**37**

**BIBLIOGRAFIA.**

**39**

## CAPITULO 1.0

### ANTECEDENTES

### 1.1 Escherichia coli como patógeno.

El síndrome diarreico aparece registrado en la historia de la humanidad desde épocas muy antiguas tales como la biblia, y en registros antiguos como los que se describen en los trabajos de Hipocrates de Cos (22). En la cultura prehispánica de nuestro país se consideraba a la diarrea, castigo del dios Tlaloc (22).

La diarrea puede ser de graves consecuencias pues según estadísticas presentadas en el año de 1975, se produjeron 500 millones de casos de diarrea en neonatos y niños de Asia, África, e Hispanoamérica, y la enfermedad -- causó entre 5 y 18 millones de fallecimientos (3).

En nuestro país en el año de 1968 se registró una tasa de mortalidad de 1094.7 por 100,000, contrastando con una tasa de 29.5 y 17 por 100,000 de EUA y Alemania Occidental respectivamente(22).

Mas recientemente, un estudio realizado durante 1980-



81 demostró que el porcentaje de agentes potencialmente causales de diarrea en 256 niños estudiados fueron los siguientes: Rotavirus 28.1%, Campylobacter 10.9%, Shigella 9.4%, Salmonella 5.9%, Yersinia 5.6%, y E.coli serotipificable 39.5%. (Frecuencia de C.fetus y Y.enterocolitica en niños con diarrea aguda de la ciudad de México. --- Morales M. et al.1983. Boletín Médico del Hospital Infantil de México.).

Escherichia coli, bacteria gram negativa perteneciente a la tribu Eschericheae (2,37), desencadena procesos diarreicos mediante varios mecanismos tales como la producción de enterotoxinas (42,47), por la producción de una toxina llamada VT (31) y por mecanismos aún en vías de elucidar.

1.2 Modo de acción de la toxina termolábil (TL) y de la toxina del cólera (TC).

Las enterotoxinas de E. coli son dos, la toxina termo

estable (TE) y la toxina termolábil (TL) (20,44,45).

Las primeras cepas de E. coli enterotoxigénicas (ECET) se aislaron de animales, identificándose en 1966 casos diarreicos en humanos causados por E. coli enterotoxigénica, siendo estos cuadros diarreicos muy semejante a los provocados por V. cholerae, éste hecho parece tener relación, dada la semejanza de la toxina termolábil de E. coli, con la toxina del cólera (TC). Ambas son proteínas de cerca de 90,000 daltons, y están formadas por dos subunidades, una copia de la subunidad-A de 25-30,000 daltons, y cinco copias de la subunidad-B de 11-12,000 daltons (7,13,14,15,17,23,25,32,33).

La TC y la TL causan diarrea eluyendo secreción del fluido intestinal (12), y se sabe que tanto la TL como la TC producen un incremento en la concentración de ---

\*  
AMP cíclico por activación de la adenilato ciclase en el tejido intestinal (12). Esta activación de la adenilato

\* Adenil mono-fosfato

ciclase sucede en dos etapas: I) Unión de las toxinas:

La TL al igual que la TC se unen a la célula intestinal, interactuando con un receptor de la membrana denominado gangliosido  $GM_1$ , además con un receptor de TL de naturaleza glicoproteica. Esta unión es mediada por la subunidad-B de TL (TLB) o de TC (TC<sub>B</sub>) (5,10,24,26,28,36,48).

II) Entrada de la subunidad-A y activación de la adenilato ciclase: La subunidad-A de TL o la subunidad-A de TC, son las directamente responsables de la activación de la adenilato ciclase (6,7,18,27,32,35,49). Los efectos a nivel celular de TL y TC implican una alteración en el transporte de los iones cloro y sodio, inhibiendo la absorción de sodio e incrementando la excreción del cloro, tanto en las células con microvellosidades, y de las criptas en el intestino delgado (12)

### 1.3 Plásmidos.

La información genética que determina la síntesis de

TL, reside en elementos extracromosomales denominados -- plásmidos Ent, los cuales son con frecuencia autotransmisibles (21,43). Los plásmidos Ent que codifican TL están relacionados con los grupos de incompatibilidad FI, FII y FIV (34).

Uno de los plásmidos más estudiados, es el plásmido -- p307, proveniente de una cepa aislada de un cerdo (20). Este plásmido pertenece al grupo de incompatibilidad FI (34,46). Los estudios en p307 incluyen el aislamiento de la región responsable de la síntesis de TL, esta última comprende tanto el gene que determina la síntesis de la subunidad-A (gene elt-A), como el gene que codifica la subunidad-B (gene elt-B). Recientemente gracias a técnicas en ingeniería genética, se han podido generar plásmidos que contienen y expresan exclusivamente elt-A o bien elt-B (39,40,52).

El gene elt-B en p307 está flanqueado por sitios de -

restricción reconocidos por la enzima Hind-III (9). La inserción de elt-B de p307 como un fragmento Hind-III en los plásmidos vectores pACYC184 y pBR322 da como resultado la expresión del gene, debido a un promotor -- contenido en ambos vectores(40).

La inserción de elt-B en estos plásmidos recombinantes es eficiente y la subunidad-B sintetizada retiene sus propiedades originales, que son las inmunológicas y de reconocimiento del gangliósido GM<sub>1</sub> (40).

#### 1.4 Objetivo del estudio.

En este trabajo se describen los primeros pasos para la purificación de la subunidad-B, la razón de intentar una purificación de TL<sub>B</sub>, es que esta proteína podría ser utilizada como agente protector contra la diarrea causada por E.coli productora de TL.

La protección podría conseguirse por inmunización o bien por bloqueo específico de los receptores para la

toxina en el intestino del huésped. A este respecto informes muy recientes han demostrado la protección contra la TL de E. coli enterotoxigénica en animales de experimentación inmunizados con un híbrido de la toxina termoestable acoplada a la subunidad-B de TL (29). Por otra parte inoculaciones de conejos con preparaciones crudas de una cepa recombinante análoga a la portadora del plásmido pUB1844, apoyan el uso exitoso de TL<sub>B</sub> para bloquear los receptores de TL en el intestino delgado. (30).

Es importante señalar que el plásmido pUB1844 codifica la subunidad-B en ausencia de la subunidad-A, y también codifica para resistencia a clorafenicol.

## CAPITULO 2.0

### MATERIALES.

## 2.1 Antibióticos.

- 1.-Ampicilina.Sanfer.
- 2.-Clorafenicol.Park Davis.

## 2.2 Medios de cultivo.

- 1.-B.H.I. agar.Bioxon.
- 2.-B.H.I. caldo.Bioxon.

## 2.3 Reactivos.

- 1.-Acetato de amonio.Merck.
- 2.-Acetato de sodio.Monterrey.
- 3.-Acido acético glacial.Merck.
- 4.-Acido clorhídrico.Merck.
- 5.-Agar noble.Difco.
- 6.-Alcohol etílico absoluto.Merck.
- 7.-Albumina bovina.Sigma.
- 8.-Anti-IGg de conejo en cabra acoplada a fosfatasa alcalina.Miles.
- 9.-Aquacide.Sigma.
- 10.-Azida de sodio.Sigma.
- 11.-Azul de Coomasie.Sigma.
- 12.-Cloruro de potasio.Mallinchrodt.
- 13.-Cloruro de sodio.Monterrey.
- 14.-Dietanol amina.Merck.
- 15.-E.D.T.A..Monterrey.
- 16.-Folin y Ciatous.Sigma.
- 17.-Fosfato de potasio monobásico.Sigma.
- 18.-Fosfato de sodio dibásico.Merck.
- 19.-D-Galactosa.Sigma.
- 20.-Gangliosido GM<sub>1</sub>.Cat.No.4-6033.Supelco.
- 21.-Hidroxido de sodio.Monterrey.
- 22.-p-Nitofenil-fosfato.Sigma.
- 23.-Polietilenglicol 6000.Sigma.
- 24.-Suero fetal de ternera.Gibco.
- 25.-Tween 20,Difco.
- 26.-Bio-Gel A 1.5m.Bio-Rad.  
Límite de exclusión. 1,500,000 peso molecular.  
Rango de Operación.10,000 a 1,500,000 peso molecular.
- 27.-Bio-Gel A 50m.Bio-Rad.  
Límite de exclusión.50,000 peso molecular.  
Rango de Operación.100,000 a 50,000,000 peso molecular.



## CAPITULO 3.0

### METODOS.

### 3.1 Preparación de suero antitoxina del cólera.

La preparación de suero antitoxina del cólera en conejo, se hizo por inmunización intramuscular de 25µg de toxina del cólera (Cholera enterotoxin, Schwarz/Mann) en 1 ml. de amortiguador de fosfatos solución salina (PBS) y 1 ml. de adyuvante completo de Freund's (Freund's -- Adjuvant Complete. Gibco Laboratories). Posteriormente se prepararon 3 inoculaciones, 1 cada 25 días con 25 µg de toxina del cólera en 1 ml. de adyuvante incompleto de Freund's (Freund's Adjuvant Incomplete. Gibco Laboratories).

Una vez completo el esquema de inmunización, se comprobó la presencia de anticuerpos mediante inmunodifusión simple en agar contra toxina del cólera.

### 3.2 Inmunodifusión Simple en Agar

(Prueba de Ouchterlony)

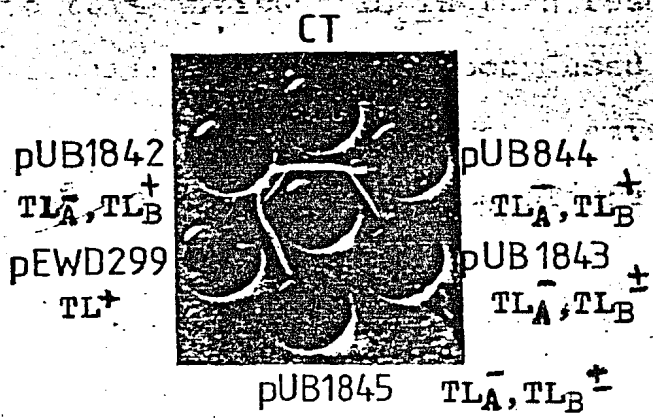
El ensayo de inmunodifusión simple en agar, es un método semicuantitativo de detección de antígenos simples, en el que se aplica un anticuerpo de título conocido.

Durante el proceso de gelificación del agar, se forma una estructura micelar, en la cual, moléculas con un peso molecular menor a 200,000, pasan a través de las micelas, no haciéndolo moléculas de mayor peso, por lo que se forman inmunoprecipitados de antígeno y anticuerpo (51).

La inmunodifusión simple se hizo en agar noble al 1%, disuelto en solución amortiguadora de PBS conteniendo 3 mM de azida de sodio, de esta manera 7.5 ml de agar fundido fueron vertidos en una caja petri de 5 cm. de diámetro, una vez gelificado el agar se exca-

varon 6 pozos. En el pozo central se depositaron 50  $\mu$ l. de antisuero de antitoxina del cólera, y las muestras por ensayar fueron colocadas en los cinco pozos circundantes.

La formación de inmunoprecipitado se llevó a cabo a temperatura ambiente toda una noche. (ilustración mostrada a continuación)



### 3.3 Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)

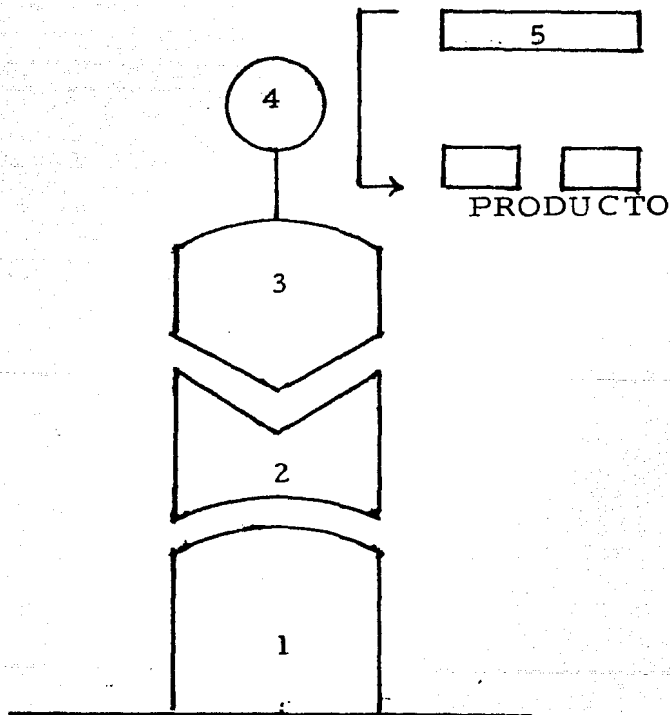
El ensayo inmunoenzimático tiene un alto nivel de especificidad y sensibilidad, debido a ello se utiliza desde 1972 para la detección de antígenos, o anticuerpos de agentes infecciosos. Este ensayo tiene como fundamento, la unión de antígenos o anticuerpos solubles a una fase sólida, de manera que la reactividad de los componentes inmunológicos sea retenida (50).

El método denominado GM<sub>1</sub>-ELISA utilizado en este trabajo, está basado en el propuesto por Sack, et al. (1980) ya que es el más adecuado para la detección de TL<sub>B</sub> o TL (38). Brevemente el método consiste en:

- 1) Unión de GM<sub>1</sub> a los pozos de la placa.
- 2) Adición del antígeno (TL<sub>B</sub> o TL).
- 3) Reacción entre el antígeno y el antisuero antitoxina del cólera de conejo.
- 4) Adición de un conjugado apropiado.

5) Adición del substrato de la enzima la cual forma parte de el conjugado. (Representación gráfica abajo).

Una descripción mas detallada del método empleado se encuentra en la siguiente pagina.



G<sub>M1</sub> ELISA pra TC, TL y TL<sub>B</sub>

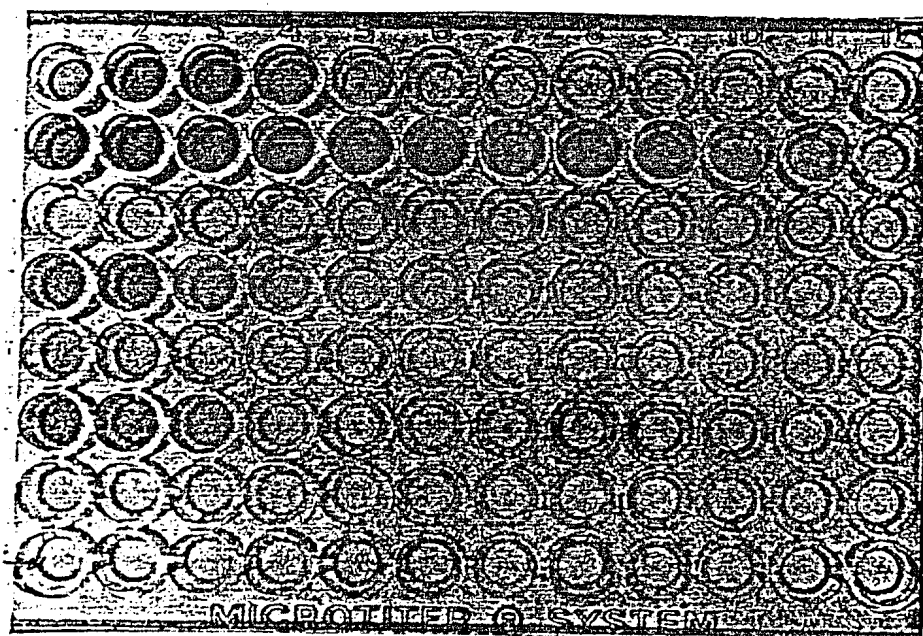
El método descrito abajo esta basado en el de Sack et al. (1980).

Paso	Diluyente	Concen- tración	Vol/pozo ( $\mu$ l)	Tiempo de incu- bación Temp.
1. Recubrir la placa con G <sub>M1</sub> (gangliosido)	PBS	5 $\mu$ g/ml	100	1h/37°C
2. Lavar 3 veces con agua	---	---	llenando	temp. ambiente
3. Adición de antígeno	PBSTFN	dilución seriada	100	12 hrs. 0°C.
4. Lavar 3 veces con agua	---	---	llenando	temp. ambiente
5. Adición de antisuero anti-TC de conejo	PBSTFN	1:400	100	1h/37°C
6. Lavar 3 veces con agua	---	---	llenando	temp. ambiente
7. Adición de anti-IgG de conejo en cebra acoplada a fosfatasa alcalina	PBSTFN	1:500	100	1h/37°C
8. Lavar 3 veces con agua	---	---	llenando	temp. ambiente

Paso	Diluyente	Concen- tración	Vol/pozo	Tiempo de incu- cación Temp.
9. Adición de substrato (p-Nitrofenil- fosfato)	10% DEA amortigua- dór	1mg/ml	100	1h/37°C
10. Parar reacción con NaOH	agua	3 M	50	temp.. ambiente.

11. Leer la densidad óptica a 405 nm. (Titertek/Multiskan-

Spectrophotometer). Las placas usadas para el ensayo son de 96 pozos fondo plano (Nunc) (Ilustración a continuación)



Control +  
Control +  
Muestra -  
Muestra +  
Muestra -  
Muestra +  
Muestra -  
Control -

\* PBSTFN=Amortiguador de fosfatos- solución salina, 0.05% - Tween 20, 1% suero fetal de ternera, y 3mM NaN<sub>3</sub>.



### 3.4 Medio de crecimiento para la preparacion de TL<sub>B</sub>.

El medio óptimo de crecimiento para E.coli enterotoxigénica es el caldo de Evans o TL (11). Se prepararon 10 litros de éste adicionado con clorafenicol (25µg por mililitro), a este se le inoculó un litro de la cepa C600 (1), portadora del plásmido pUB1844 (41), previamente cultivada 24 hrs. a 37 °C. en medio TL. Este inóculo se obtuvo a partir de una placa de agar BHI, y tanto el inóculo como la placa se suplementan con clorafenicol --- (25 µg/ml)..

El cultivo se hizo en un Magnaferm Fermentor (New --- Brunswick Scientific) a 37°C., 24 hrs., siendo las células cosechadas por centrifugación en volúmenes de 500 ml. a 3,000 G.S, a 5°C. (Cru-500/Centrifuge.Damon.IEC/Division).

El botón celular (15 g. peso húmedo) se resuspendió en 500 ml. de amortiguador de fosfatos-solución salina

(PBS) pH 7.4 .

### 3.5 Preparación de lisados celulares mediante presión hidrostática (Prensa Francesa).

La presión hidrostática puede afectar o no a los organismos dependiendo de variables tales como pH, temperatura, la especie por presionar, así como otras propiedades dadas por el medio.

La fragmentación de la gruesa pared celular bacteriana mediante el uso de una prensa francesa, sirve para liberar las proteínas en forma soluble, sin que estas pierdan su actividad. La prensa de elevada presión llamada -- francesa consiste en un cilindro de acero donde son colocadas las bacterias en soluciones acuósas (amortiguadores), y sobre esta suspensión actúa un pistón a una fuerza determinada fragmentando las células (16).

El resuspendido celular (500 ml) se dividió en alícuotas, las cuales fueron prensadas a una temperatura de

4°C..La presión aplicada con la prensa francesa fué de 250, que es equivalente a 15,000 psi (psi=libra/pulgada<sup>2</sup>)

El lisado celular obtenido se centrifugó a 400,000G's a 0°C. durante 45 min. Cada uno de los sobrenadantes fué colectado y concentrado con aquacide y polietilenglicol 6000, en tubo de diálisis (con peso molecular de corte de 6-8000) a una temperatura de 4°C., hasta un volumen final de 200 µl.. Estos concentrados se utilizaron para verificar la presencia de TL<sub>B</sub> por inmunodifusión simple en agar contra suero antitoxina del cólera.

### 3.6 Precipitación de proteínas con sulfato de amonio.

La separación de proteínas en base a su solubilidad, depende de variables como pH, Temperatura, características del solvente o bien de la proteína misma.

El sulfato de amonio es la sal más comunmente usada para la precipitación de una proteína..Al ser una sal divalente le confiere mayor efectividad que las sales mono

valentes. El suministro del electrolito puede ser con la sal en su forma sólida, en disoluciones saturadas, o bien dializando la sal a través de una membrana semipermeable (51).

Los dos sobrenadantes obtenidos de la lisis por prensado, fueron sometidos a precipitación de proteínas con sulfato de amonio sólido, hasta alcanzar un porcentaje de saturación de 40-60%. La precipitación se llevó a cabo a 0°C., y agitación constante por una noche. Las alícuotas se centrifugaron a 3,000G'S, por 45 min. en un rotor enfriado previamente a 0°C., los sobrenadantes se colectaron y dializaron contra 100 vol. de tris-solución salina (TEAN), en tubo de diálisis con peso molecular de corte de 6-8,000, hasta eliminar el exceso de sulfato de amonio.

Una vez dializadas las muestras de proteína, se les verificó la presencia de TL<sub>P</sub> por inmunodifusión simple en agar contra antisuero antitoxina del cólera.

### 3.7 Cromatografía de TL<sub>B</sub> en agarosa.

Uno de los métodos para la separación de proteínas es el empleo de la cromatografía de afinidad, este método se basa en la propiedad que tienen algunas proteínas de unión específica no covalente con otra molécula llamada ligando.

La toxina termolábil al tener afinidad por la agarosa puede eluirse en forma específica con D-galactosa, esto es posible, ya que la agarosa es un polímero lineal de D-galactosa y 3,6 anhidro L-galactosa. Basandose en este método para la purificación de TL descrito por Clements y Finkelstein (1979), se utilizó este tipo de cromatografía para el aislamiento de TL<sub>B</sub>.

Una primera cromatografía se llevó a cabo con una muestra de 4 ml. que contenía partes iguales de proteína provenientes de las dos alícuotas precipitadas con sulfato de amonio. Esta se filtró en una columna de agarosa ----

(1.6 cm.  $\phi$  y 95 cm. de long.) previamente empacada con la resina (Bio-Gel A 1.5m) y equilibrada con amortiguador de TEAN pH 7.4 a temperatura ambiente. La muestra se pasó a un flujo de 7 ml./hr. a una temperatura de 5°C.

La elución de las proteínas no unidas a la agarosa se realizó con TEAN pH 7.4, hasta que la densidad óptica a 280 nm. fué cero. Registrada esta lectura se puede eluir la proteína unida a la agarosa con galactosa 0.2 M en -- amortiguador de TEAN pH 7.4. Alícuotas de 5.4 ml. se obtuvieron en un colector automático de fracciones (LKB - 2111 MultiRac), leyendose la densidad óptica a 280 nm. - (SP8-100 Ultraviolet Spectrophotometer. PYE Unicam).

Las fracciones que mostraron lectura se reunieron, dia lizaron y concentraron con polietilenglicol 6000 para mos trar la presencia de la subunidad-B de la toxina termolá bil, mediante prueba de Öuchterlony contra antisuero --- antitoxina del cólera.

La segunda cromatografía se realizó con una muestra

de 11.5 ml. Esta se equilibró con amortiguador de TEAN -- como se describió anteriormente. La proteína unida a la agarosa se eluyó con galactosa a una concentración de 0.5 M , una vez que nos dió la lectura de galactosa, se pasó TEAN pH 7.4 hasta que la densidad óptica fué cero, siendo el flujo en la columna de 7 ml/hr., la colecta de fracciones se hizo automáticamente y la absorbancia -- registrada en espectrofotómetro.

Las fracciones que presentaron lectura diferencial -- por la elución con galactosa, se reunieron y dializaron contra 100 vols. de amortiguador de TEAN en tubo de diálisis con peso molecular de corte de 6-8,000 , una vez dializadas se concentraron con polietilenglicol 6000 hasta una vigésima parte del volumen original, esta concentración se hizo a 5°C.

Las fracciones reunidas y concentradas fueron: 223, 236, 255, 265, 278, 283 además las comprendidas entre la 305 a -- 315.

La presencia de TL<sub>B</sub> se probó mediante inmunodifusión simple en agar contra antisuero antitoxina del cólera y por ELISA, determinándose la concentración de proteínas por el método de Lowry.

### 3.8 Preparación de lisados celulares mediante sonicación, y obtención de TL<sub>B</sub>.

Un método alternativo para la obtención de proteínas en forma soluble, sin que éstas pierdan actividad, es la sonicación. En éste se utiliza la radiación sónica para fragmentar las células, obteniendo de esta manera proteínas.

Se cultivó nuevamente la cepa C600 portadora del plásmido pUB1844 en presencia de clorafenicol (25µg/ml) siguiendo el procedimiento señalado anteriormente. Las células separadas por centrifugación (15 gr peso húmedo) se resuspendieron en 250 ml. de amortiguador de PBS. Este resuspendido celular fué fragmentado en un sonica-



dor (Lab-Line 9100) con pulsos de 30 seg. e intervalos de un minuto. La temperatura se mantuvo a 5°C. sumergiendo la muestra en un baño de hielo-alcohol. Este proceso se repitió hasta no observar cambios en la densidad óptica. Los restos celulares se separaron por centrifugación a 17,000 G'S 1 hr. y 0°C. (Sorvall RC-5 Centrifuge)

El sobrenadante se filtró a través de membranas de poro 0.45 µm de diámetro (Millipore), y se comprobó la presencia de TL<sub>B</sub> en el filtrado mediante prueba de Ouchterlony utilizando suero antitoxina del cólera.

Las proteínas obtenidas por la metodología anteriormente descrita, se precipitaron con sulfato de amonio, (ver 3.6), las proteínas resultantes se dializaron contra 100 vols. de TEAN en tubo de diálisis. La existencia de TL<sub>B</sub> en el dializado se probó por inmunodifusión simple en agar contra antisuero antitoxina del cólera .

### 3.9 Cromatografía de TL<sub>B</sub> en agarosa y pH alcalino.

Como método alternativo de purificación y teniendo en cuenta la evidencia de que la subunidad-B en un pH alcalino, modifica su estado de agregación, se intentó aislar la TL<sub>B</sub> en modificando el pH (pH neutro) (Sanchez, J. datos no publicados).

Una columna (16 mm.  $\phi$  y 35 cm. de long.) fué empacada con Bio-Gel A 50m equilibrada con amortiguador de hidróxido de amonio 0.1 M pH 9.5 a una temperatura de 5°C, una vez equilibrada se aplicó una muestra de 10 ml. obtenida de la precipitación con sulfato de amonio al 40%, lavando se con amortiguador de hidróxido de amonio 0.1 M pH 9.5 a 5°C. ajustando el valor de densidad óptica a cero, en una longitud de onda de 280 nm.

La elución se llevo a cabo con amortiguador de acetato de sodio en ácido acético glacial pH 5.

Las fracciones que presentaron lectura diferencial a 280 nm. se reunieron y dializaron contra 100 vols. de --

amortiguador de TEAN pH 7.4 y se concentraron con polietilenglicol 6000 y evaporación a 5°C.

La presencia de TL<sub>B</sub> en el concentrado se sometió a la prueba de Ouchterlony contra antisuero antitoxina del cólera y por ELISA.

### 3.10 Medio de crecimiento para la preparación de TL.

Se inoculó un litro de la cepa C600 (1), portadora del plásmido pEWD299 (8) a 10 litros de caldo de Evans o TL (11) suplementado con ampicilina (250µg/ml). Esta cepa es productora de TL y resistente a ampicilina.

El cultivo se hizo en un Magnaferm Fermentor (antes mencionado) a 37°C. durante 24 hrs., las células fueron cosechadas por centrifugación en volúmenes de 500 ml. a 3000 G'S .

La fracción celular obtenida (15 g.peso húmedo) se resuspendió en 250 ml. de amortiguador de PBS pH 7.4.

### 3.11 Preparación de lisados celulares para la obtención de TL.

La suspensión celular (250 ml.) se lisó por sonicación (método antes descrito). El sonificado se centrifugó a -- 17,000 G'S 1 hr. y a 0°C., el sobrenadante obtenido se filtró a través de membranas con poros de 0.45  $\mu\text{m}$   $\phi$ . --

Para comprobar la presencia de TL en el filtrado, se hizo una inmunodifusión simple en agar contra antisuero - antitoxina del cólera (Prueba de Öuchterlony).

### 3.12 Precipitación de TL con sulfato de amonio.

La TL del filtrado (240 ml.) se precipitó hasta un - 60% de saturación a 0°C. y agitación constante durante una noche. La proteína precipitada por este método fué colectada por centrifugación a 1500 G'S 1 hr. y 0°C. en un rotor enfriado previamente.

El precipitado obtenido se resuspendió en 100 ml. de amortiguador de PBS pH 7.4 y se dializó contra 100 vols.

de TEAN mismo pH a 5°C. en tubo de diálisis con peso molecular de corte de 6-8,000. El dializado fué subsecuentemente concentrado por medios físicos. Se verificó la presencia de TL en el concentrado por inmunodifusión simple en agar contra antisuero antitoxina del cólera.

### 3.13 Cromatografía de TL en agarosa.

En una columna (2.6 cm  $\phi$  y 65 cm de long.) fueron filtrados 20 ml. de concentrado de proteína, que contenía Bio-Gel A 50m. Esta columna se equilibró con amortiguador de TEAN pH 7.4.

La primera elución se hizo con el mismo amortiguador, las proteínas unidas a la agarosa se eluyeron con galactosa 0.5 M en TEAN. Las fracciones de 5 ml. fueron colectadas automáticamente y la densidad óptica registrada a 280 nm. (Uvicord S UV-monitor).

La segunda filtración se llevó a cabo con una muestra de 40 ml. en la misma columna, siguiendo el método an-

tes descrito. Las fracciones que presentaron lectura diferencial fueron examinadas mediante ELISA y Öuchterlony para verificar la presencia de TL en éstas fracciones.

Algunas fracciones correspondientes al primer pico de exclusión y otras que no presentaron lectura, también fueron analizadas mediante ELISA para descubrir si la TL era detectable en estas zonas del perfil.

## CAPITULO 4.0

### DISCUSION DE RESULTADOS.

#### 4.1 Cromatografía de TL<sub>B</sub> en columnas de agarosa.

La gráfica uno muestra el perfil cromatográfico obtenido después de aplicar 4 ml. de muestra de proteína filtrada a través de una columna de Bio-Gel A 1.5m. Un pico de elución es observado entre las fracciones 40 a 61, pertenecientes a las proteínas no unidas a la agarosa y que son eluidas por la solución amortiguadora de TEAN.

Una segunda curva comprende las fracciones 164-354 -- que presenta una lectura diferenciada, esta zona comprende de aquellas fracciones que se eluyen con galactosa 0.2 M en TEAN, la lectura se hizo a una longitud de onda de -- 280 nm., siendo el registro máximo de densidad óptica 0.274 que se localizó en el pico comprendido entre las fracciones 174-200.

Las fracciones que se concentraron con polietilenglicol 6000, para probar la presencia de TL<sub>B</sub> por inmunodifusión simple en agar, no formaron bandas de precipitina.

La gráfica dos, presenta una segunda cromatografía de



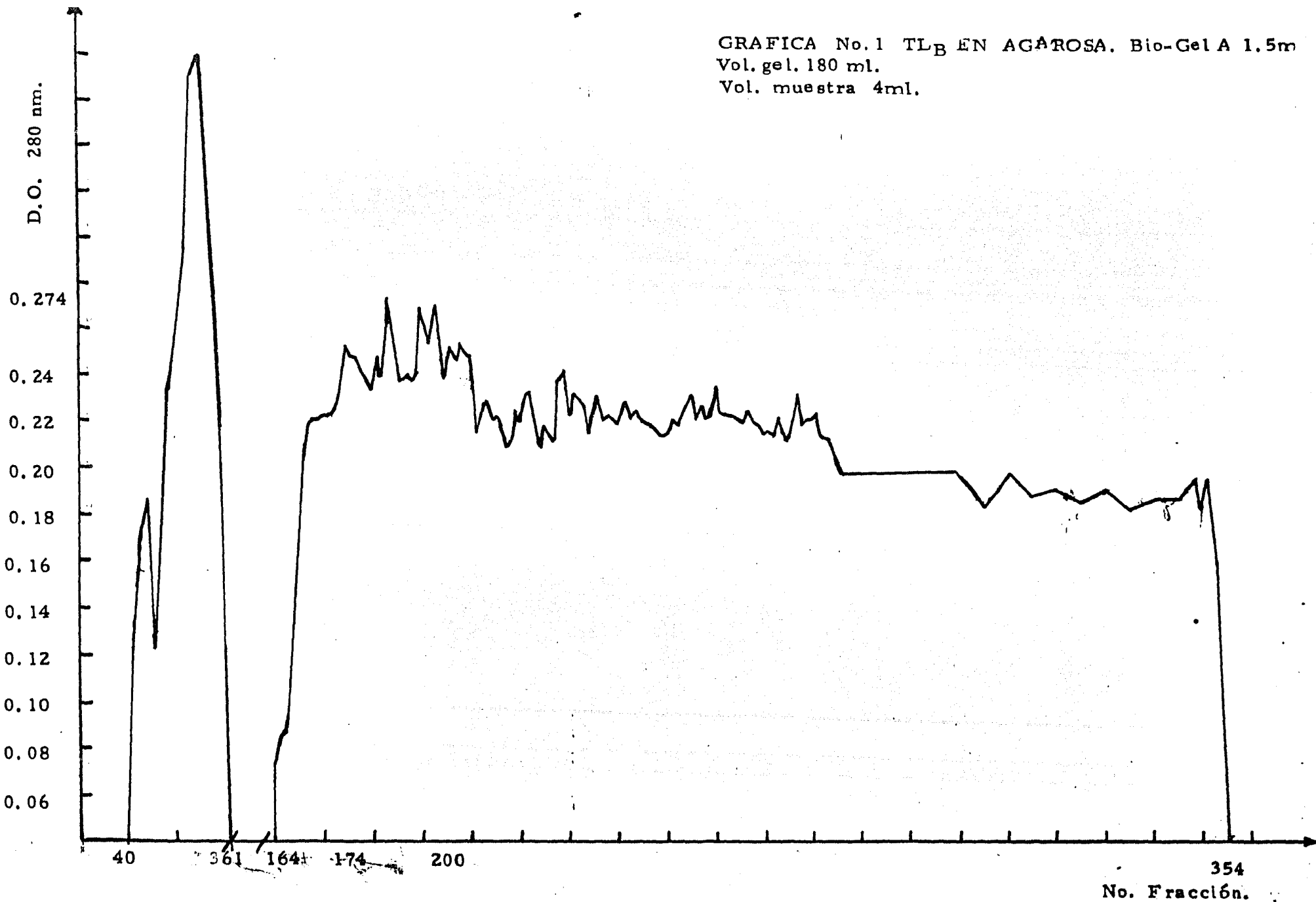
la misma columna. El perfil contiene una primera curva de elución con amortiguador de TEAN, y una segunda curva al iniciar la elución con galactosa 0.5 M, esta curva comprende las fracciones 225 a 343, siendo estas las que probablemente estuvieron unidas a la agaosa, registrándose lectura máxima de 0.294.

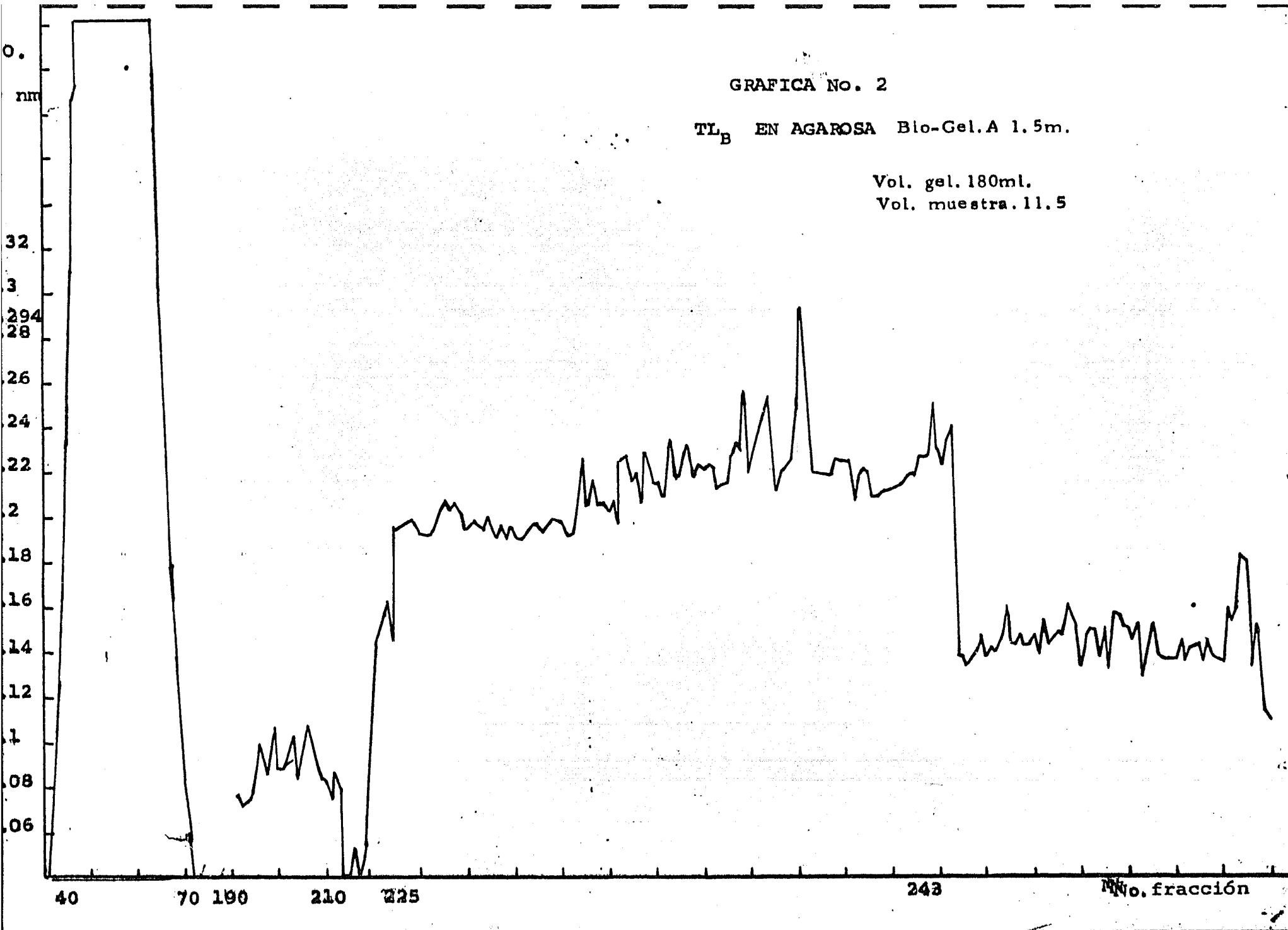
En la prueba de inmunodifusión simple en agar (Ouchterlony), las fracciones reunidas y concentradas no produjeron bandas de precipitación. En el caso del ensayo inmunoenzimático ELISA (leída a 405 nm.) no se distinguió un valor significativo en densidad óptica, que confirmara la presencia de  $TL_B$ , comparado con los controles positivos (toxina del cólera y un extracto crudo de una cepa que porta el plásmido pEWD299 que codifica para la producción de TL). Los resultados de este ensayo pueden observarse en la gráfica 3.

Al determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry, se construyó una curva patrón. La lec-

tura que correspondió al problema fué de 0.71 que co-  
rresponde a la 475  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína (gráfica 4).

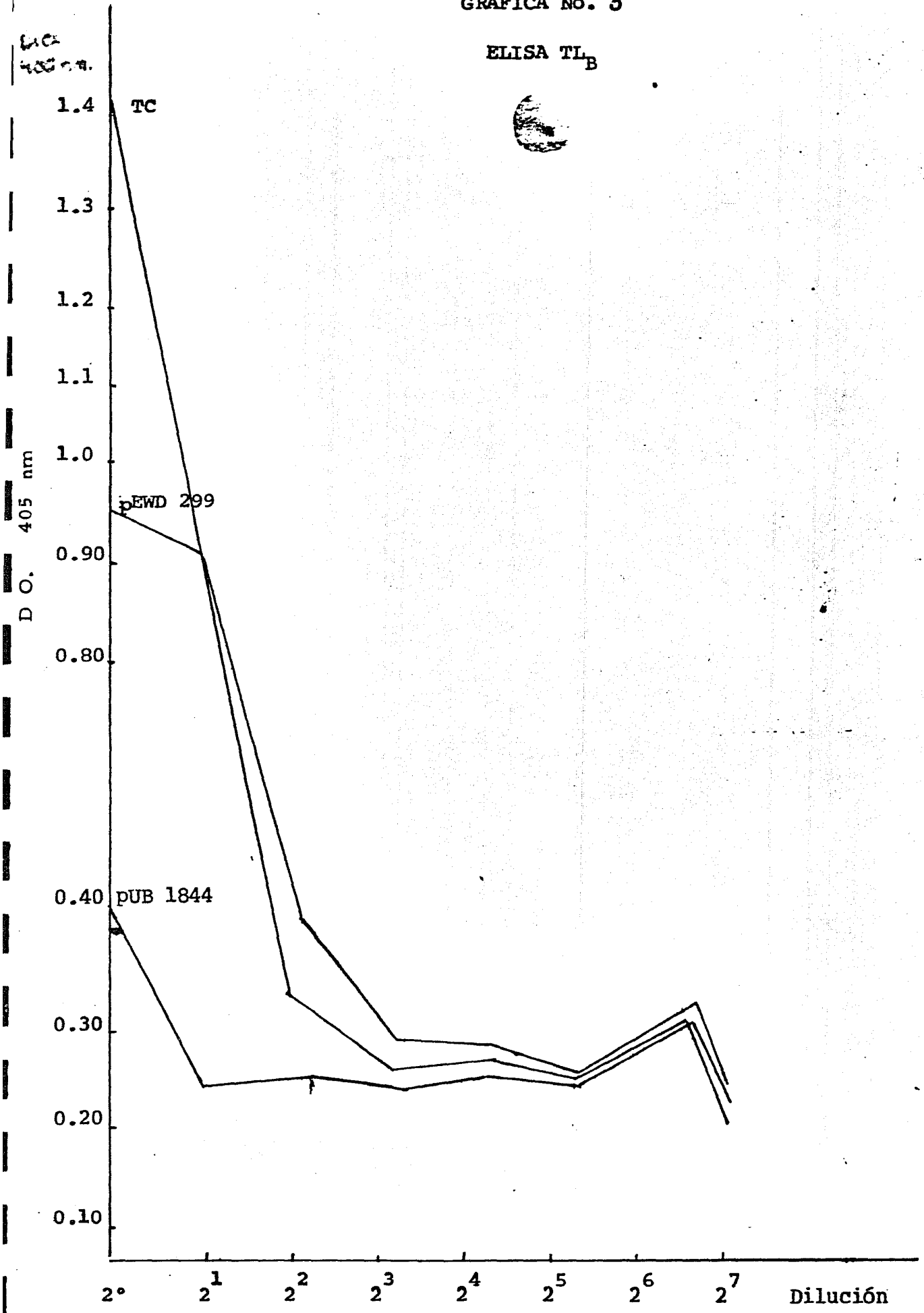
GRAFICA No.1 TL<sub>B</sub> EN AGAROSA. Bio-Gel A 1.5m  
Vol. gel. 180 ml.  
Vol. muestra 4ml.





GRAFICA No. 3

ELISA TL<sub>B</sub>



GRAFICA No.4

DETERMINACION DE PROTEINAS

(METODO DE LOWRY)

D.O. 700 nm.

0.71

0.44

0.37

0.29

0.17

0.12

0.085

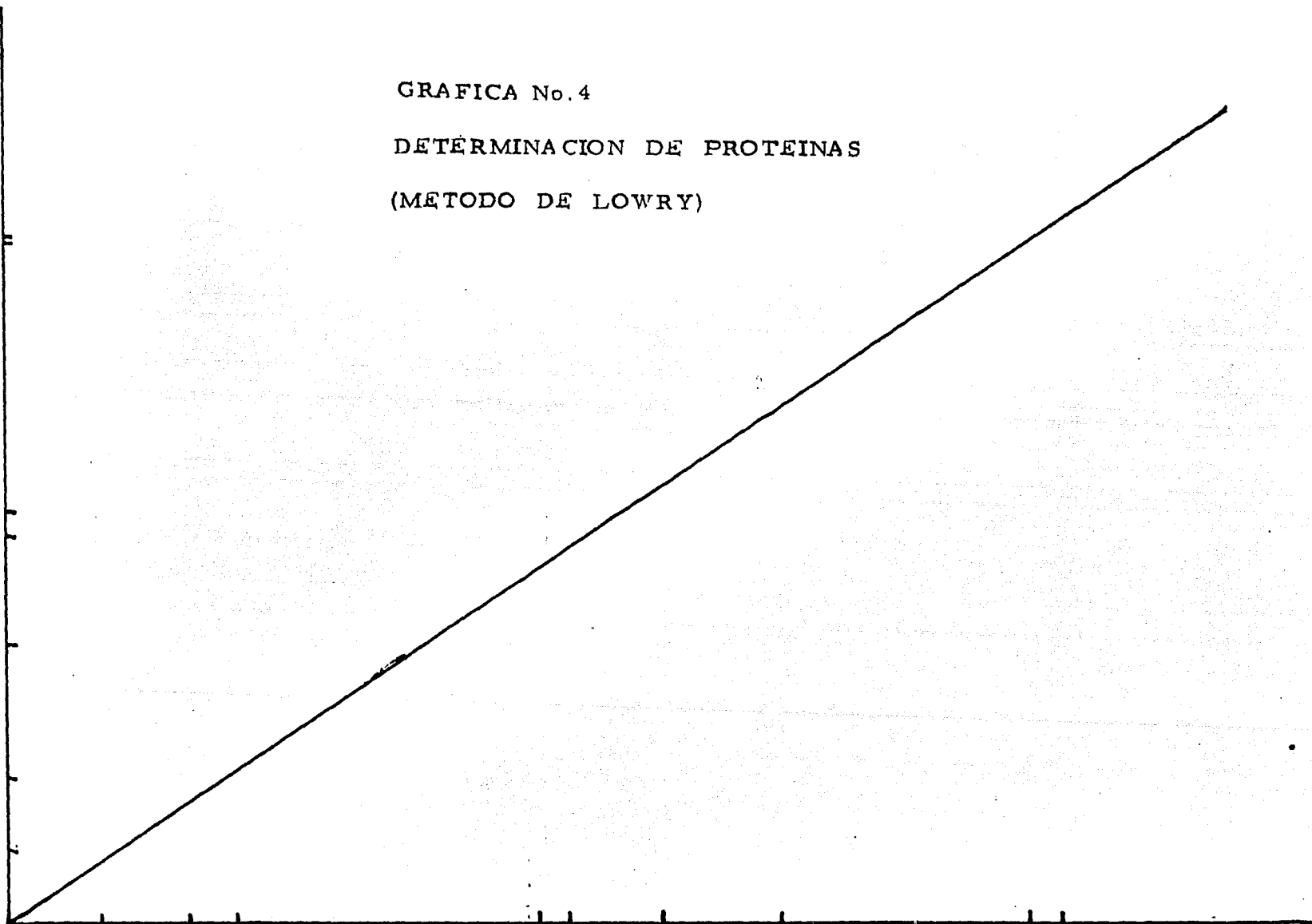
20 40 50

100 125 200 250

475 500

conc.  
problema.

conc albumina  
(ug/ml.)



#### 4.2 Cromatografía de TL<sub>B</sub> en columnas de agarosa y:

pH. no neutro.

La gráfica 5 muestra el perfil de elución de una muestra de 10 ml. .

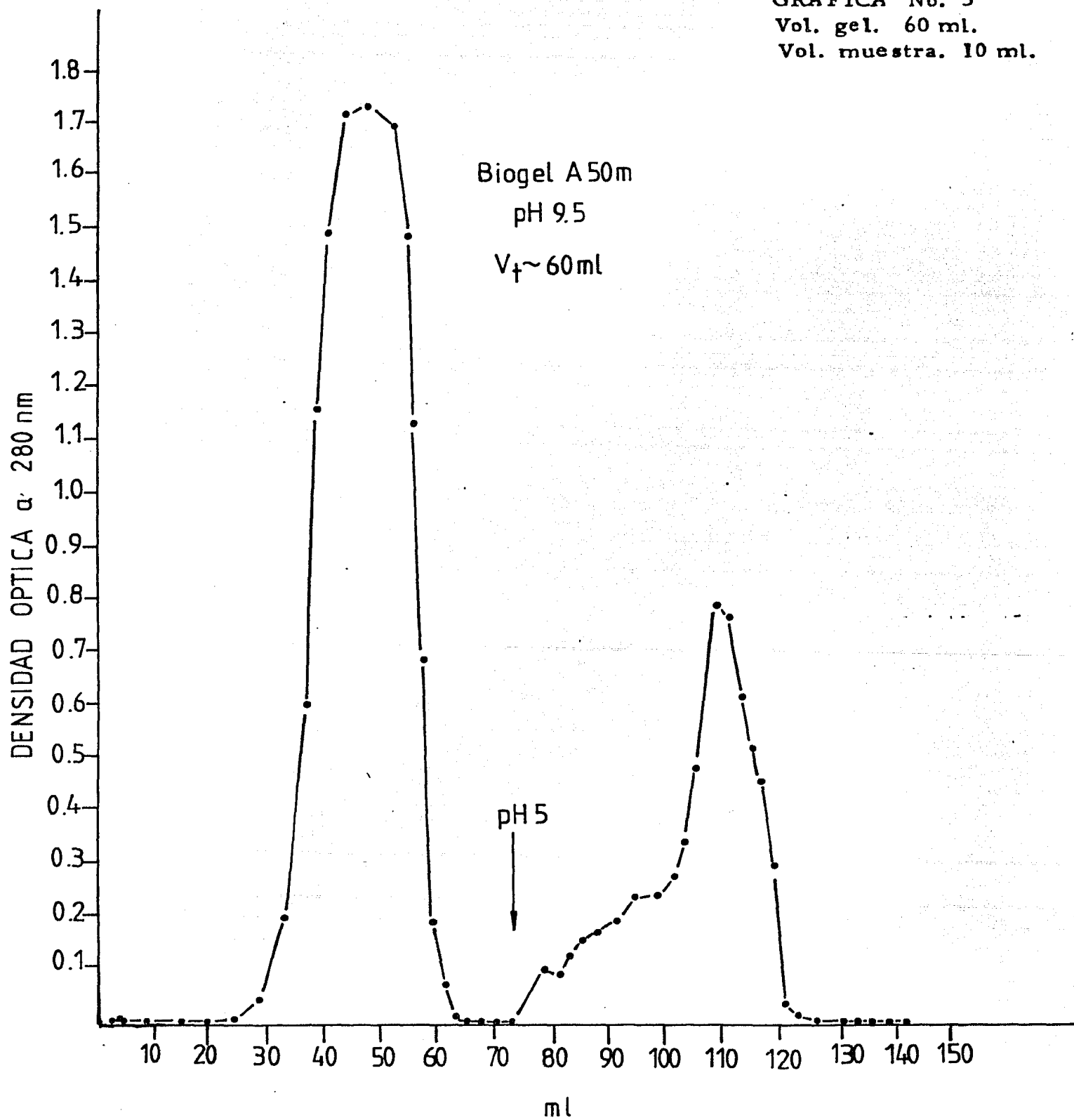
El primer pico del perfil, representa la proteína que no se adhiere a la agarosa al pH alcalino empleado. (amortiguador de hidroxido de amonio pH 9.5). Al aplicar un amortiguador de acetatos pH 5, se eluye una proteína o mezclas de proteínas que se hallaban adheridas a la resina. Esta proteína (s) esta representada por el pico comprendido en el volumen de elución 75-125 ml. Al investigar por inmunodifusión simple la presencia de TL<sub>B</sub> en estas fracciones despues de ser concentradas, no permitió demostrar la formación de bandas de precipitina, sin embargo al investigar por el mismo ensayo si la proteína se encontraba en el primer pico de elución (vol. 40-50), se demostró la presencia de TL<sub>B</sub>, lo que indica que una

gran proporción de la subunidad-B no se adhiere a la ~~---~~  
agarosa.

El pico de elución que comprende la región ácida se  
sometió a ensayo inmunoenzimático, no demostrándose por  
este método la existencia de la TL<sub>B</sub> .



GRAFICA No. 5  
Vol. gel. 60 ml.  
Vol. muestra. 10 ml.



#### 4.3 Cromatografía de TL en agarosa.

La gráfica numero 6 denota el perfil cromatográfico de 20 ml. de concentrado de proteínas filtradas a través de agarosa (Bio-Gel A 50m) entre las fracciones 28 a 66 se localiza el pico de elución efectuado con amortiguador de TEAN y representa las proteínas no retenidas por la resina. De la fracción 91 a 103 se identifican dos curvas que tal vez correspondan a la elución diferencial de las proteínas unidas a la agarosa, estas fracciones despues de ser reunidas, dializadas y concentradas por evaporación, no formaron bandas de precipitación contra antisuero antitoxina del cólera (Prueba de Öuchterlony), aunado a esto, en el perfil no se reconoce con claridad el pico de elución por galactosa, lo que motivó la realización de una segunda cromatografía, ahora con una cantidad mayor de muestra, eluyendo con galactosa 0.5M.

La segunda cromatografía representada en la gráfica -

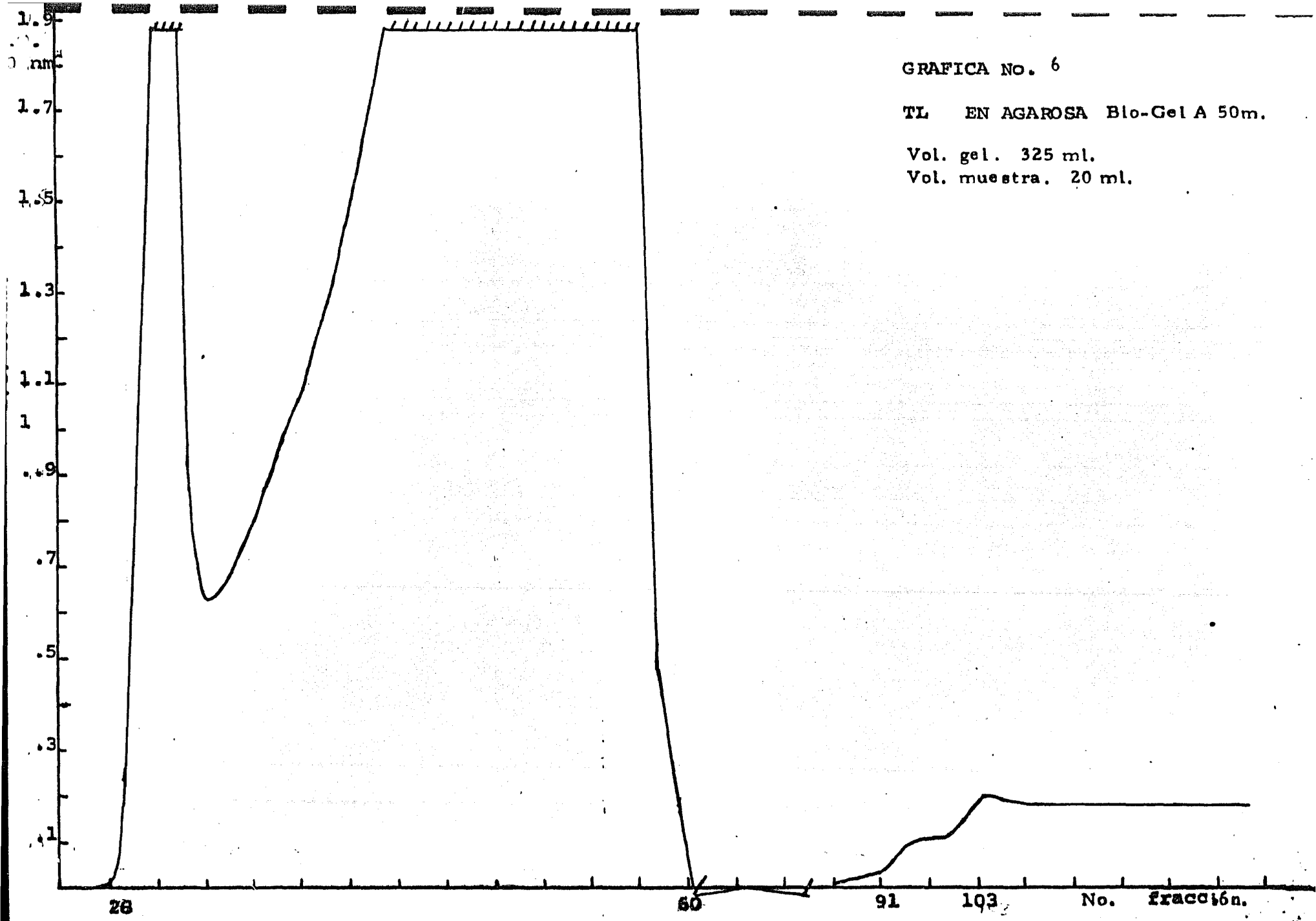
siete, presenta el perfil de 40 ml. de muestra pasada a través de la misma columna. Las fracciones 21 a 60 representan una primera curva de elución debido al TEAN.

Entre las fracciones 98 a 106 se advierte una pequeña curva de elución por galactosa, la zona comprendida entre las fracciones 115 y 125, destacan dos curvas muy semejantes a las obtenidas a la primera filtración.

Para examinar la presencia de TL a lo largo del perfil, se sometieron a ELISA varias fracciones, encontrando a la TL en las siguientes: 85, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 115 y 124, no sucediendo lo mismo con la 23 y 54, pertenecientes al pico de elución por TEAN.

Dados estos resultados se puede pensar que después de la elución con TEAN, la TL ya no es retenida suficientemente por la agarosa y por lo tanto es detectable en varias zonas que le siguen al primer pico de elución.

Los resultados de la ELISA pueden observarse en la gráfica 8.



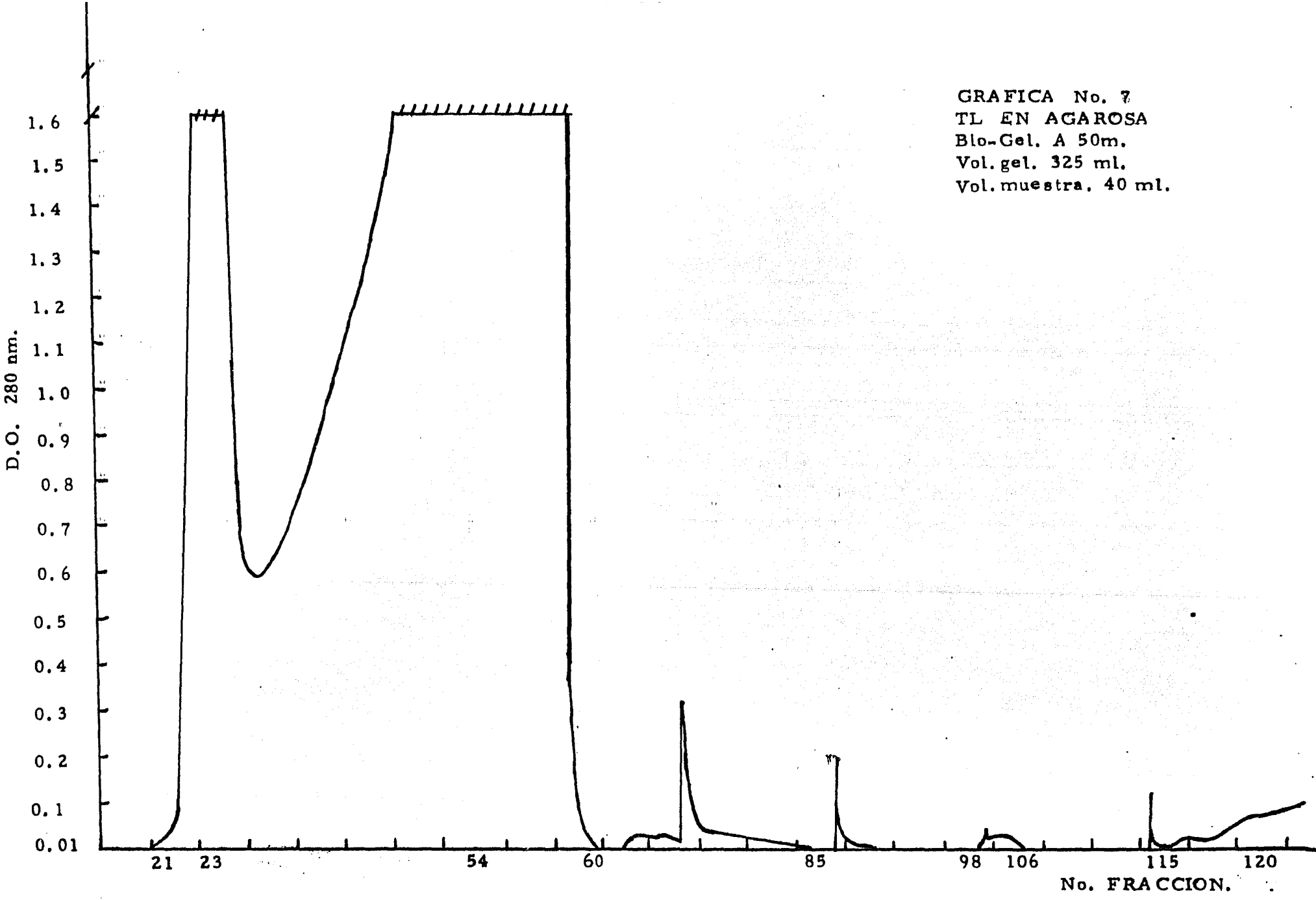
GRAFICA No. 6

TL EN AGAROSA Bio-Gel A 50m.

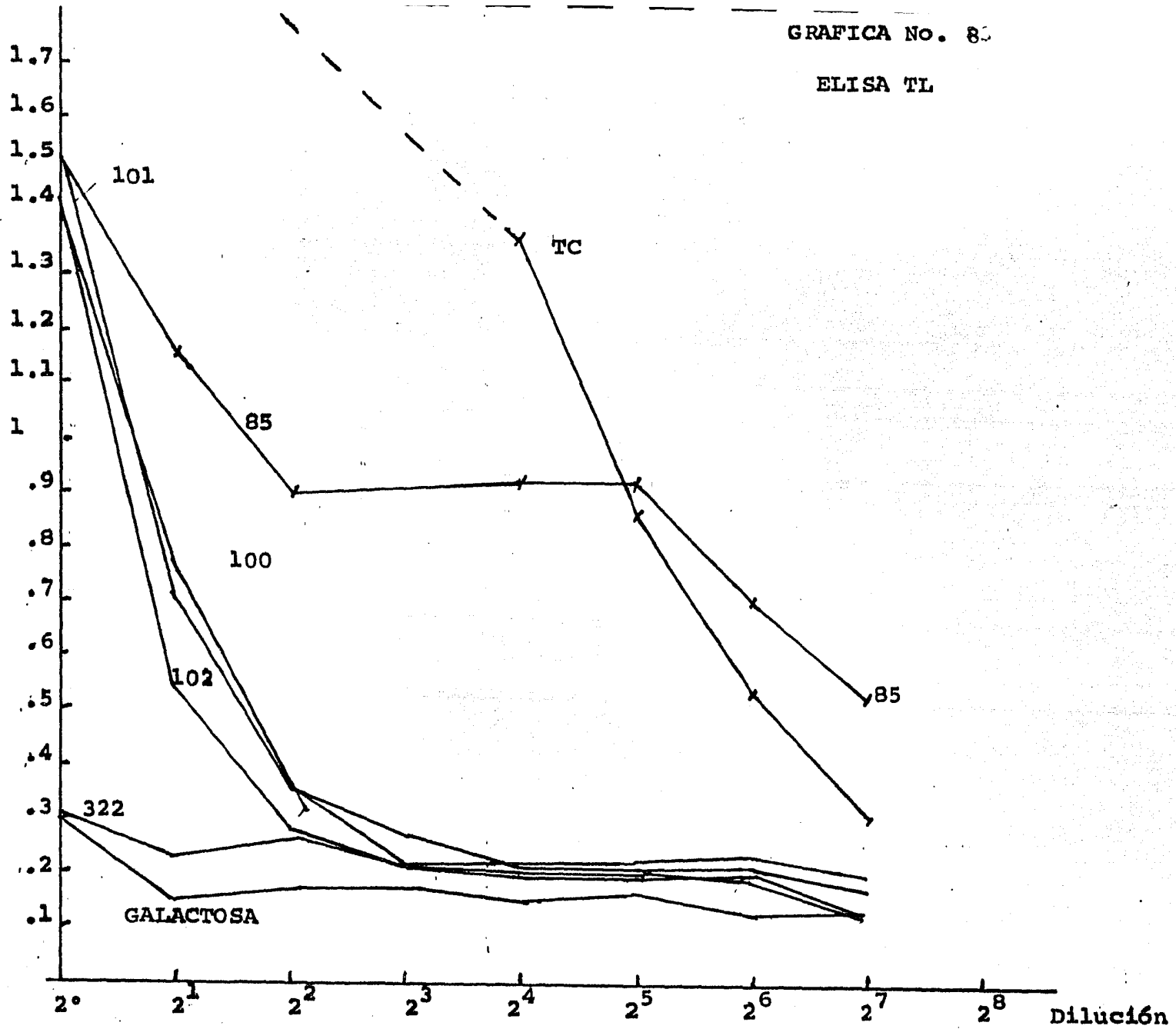
Vol. gel. 325 ml.

Vol. muestra. 20 ml.

GRAFICA No. 7  
TL EN AGAROSA  
Blo-Gel. A 50m.  
Vol. gel. 325 ml.  
Vol. muestra. 40 ml.



D. O. 4050-am.

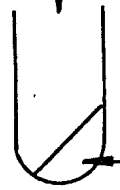


. 11 Litros / 18 horas 37°C  
(agitación / aereación vigorosa)

Cosecha

CROMATOGRAFIA DE TL<sub>B</sub>

EN AGAROSA.



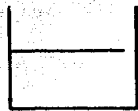
Resusp. Tris/NaCl

Sonicación Ⓟ

Centrif. Prensado

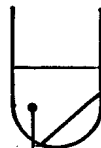


Sobrenadante



$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
40%

Centrif.



Sobrenadante

Diálisis exhaustiva  
(Tris/NaCl)

CROMATOGRAFIA EN AGAROSA

## **CAPITULO 5.0**

### **CONCLUSIONES**



## 5.1 Conclusiones.

Se puede concluir que los dos métodos de fragmentación utilizados aquí, son adecuados, sin embargo tiene ventaja la lisis por radiación sónica, sobre el rompimiento con la prensa francesa, por que con el primero se obtiene un extracto crudo de proteínas mas concentrado.

Por otro lado se demostró que la subunidad-B de la toxina termolábil no se une a la agarosa, al menos bajo las condiciones aquí probadas, Una explicación de esto puede ser, que la agarosa sirve como resina de afinidad y esto aparentemente engaña a la TL por lo que esta se puede purificar, pero a pesar de que la TL<sub>B</sub> contiene los sitios responsables de la unión al receptor de la toxina, y el hecho que esta es producida por la cepa recombinante en ausencia de la subunidad-A, parece ser determinante de una conformación, que si bien reconoce al gangliósido GM<sub>1</sub>, como es demostrable por una ELISA

positiva para el extracto crudo concentrado, ya no se une específicamente a la agarosa.

Podría ocurrir un fenómeno muy semejante al ya descrito cuando se filtra la TL<sub>B</sub> pero que ha sufrido un proceso de desnaturalización, por lo cual la reacción contra antisuero antitoxina del cólera no se presenta y la TL<sub>B</sub> no se detecta en los ensayos de inmunodifusión simple en agar y ELISA. Otra alternativa puede ser que la proteína obtenida no es la subunidad-B y sí una proteína diferente, para demostrar esto se podría someter a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio, para estimar su homogeneidad y peso molecular.

Un hecho que confirma que la TL<sub>B</sub> no se une a la agarosa, es aislamiento de la TL en condiciones semejantes, pues este experimento cumplió con el objetivo de confirmar la afinidad de la TL por la agarosa, aunque el rendimiento no es semejante al reportado.

## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Appleyard, R.K. (1954). Doubly lysogenic strain of Escherichia coli. 39:440-452. USA.
- 2.- Bergey's (1923-74). Manual of determinative bacteriology. Eight edns., The Williams & Wilkins Co. U.S.A.
- 3.- CIBA Symposium on Diarrhoea of Childhood. (1975). CIBA Foundation, London.
- 4.- Clements J.D. and R.A. Finkelstein, (1979). Isolation and characterization of homogenous heat-labile enterotoxins with high specific activity from Escherichia coli cultures. Infect. Immun. 24:760-769. U.S.A.
- 5.- Crutchley, D.R., J.L. Magnani and P.H. Fishman (1981). Interaction of cholera toxin with rat intestinal brush borders. Relative roles of gangliosides and galactoproteins as receptors. J. Biol. Chem. 256:8724-8731 USA.
- 6.- Cuatrecasas, P.I. Parikh, and M.D. Hollenberg, (1973). Affinity chromatography and structural analysis of Vibrio cholerae enterotoxin ganglioside agarose and the biological effects of ganglioside-containing soluble polymers. Biochemistry 12:4523-4264. USA.
- 7.- Dallas, W. and S. Falkow, (1979). The molecular nature of heat-labile enterotoxin (LT) of Escherichia coli. Nature 227:406-407. USA.
- 8.- Dallas, W.S.D.M., Gill and S. Falkow (1979). Clones encoding Escherichia coli heat-labile toxin. J. Bact. 139:850-858. USA.
- 9.- Dallas W.S., Moseley and S. Falkow. (1979). The characterization of an Escherichia coli plasmid that encodes for the production of heat-labile enterotoxin. In: K.N. Timmis and A. Puhler (ed.) Plasmids of medical, environmental and commercial importance. pp 113-122. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- 10.- Donta S.T. and J.P. Viner. (1975). Inhibition of the steroidogenic effects of cholera and heat-labile E. coli enterotoxins by GM<sub>1</sub> ganglioside: Evidence for a similar receptor site for the two toxins. Infect. Immun. 11:982-985. USA.

- 11.-Evans DJ., DG.Evans, SH. Richardson and SD.Gorbach -- (1976).Purification of the polymixin-released heat-labile enterotoxin of Escherichia coli.J.Infect.Dis. 133(Suppl.):S97-S102.USA.
- 12.-Field M.(1980).Role of cyclic nucleotides in enterotoxigenic diarrhea.Adv.Cyclic Nucleotides Res.12:267-277 USA.
- 13.-Finkelstein,RA.and JJ.LoSpalluto.(1969).Pathogenesis of experimental cholera.Preparation and isolation of cholerae<sub>1</sub> and cholerae<sub>2</sub>.J.Exp.Med.130:185-202.USA.
- 14.-Finkelstein,RA.N.Boesman,SH.Neoh,WK.LaRue and RJ.Delaney (1974).Dissociation and recombination of the subunits of the cholera enterotoxin (cholerae<sub>1</sub>)J.Immun. 113:145-150.USA.
- 15.-Fishman,PH.,J.Moss,and JC.Osborne.(1978).Interaction of cholerae<sub>1</sub> with the oligosaccharide of ganglioside GM<sub>1</sub>:evidence for multiple oligosaccharide binding sites Biochemistry 17:711-716.USA.
- 16.-Frobisher,M.,R.Hindsdill,KT.Crabtree and CR.Goodheart.(1974).Fundamentals microbiology.WB.Saunders,Co.- Philadelphia Pa.USA.
- 17.-Gill,DM.(1976).The arrangement of subunits in cholera toxin.Biochemistry 15:1242-1248.USA.
- 18.-Gill,DM.(1976).Multiple roles of erythrocyte supernatant in activation of adenylate cyclase by Vibrio cholerae toxin in vitro.J.Infect.Dis.133(suppl.)S55-S63.USA.
- 19.-Green,AA.,and LH.Walter.(1955).Proteins fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents.M.Enzymology.1:67-89.USA.
- 20.-Gyles C.(1971).Heat-labile and heat-stable forms of an enterotoxin from E.coli strain enteropathogenic for pigs Ann.N.Y.Acad.Sci.176:314-322.USA.

- 21.-Gyles G.M., So, and S. Falkow (1974). The enterotoxin plasmids of Escherichia coli. J. Infect. Dis. 130:40-49 USA.
- 22.-HIM (1981). Enfermedades diarreicas en el niño. Ediciones del hospital infantil de Mexico. México.
- 23.-Holmgren, J. I., Lonroth and L. Svennerholm. (1973). Tissue receptor for cholera exotoxin: postulated structure - from studies with GM<sub>1</sub> ganglioside and related glycolipids. Infect. Immun. 8:208-214. USA.
- 24.-Holmgren, J., I. Lonroth, O. Ouchterlony and A.M. Svennerholm. (1972). Studies on cholera toxins. J. gen. Microbiol. -- (Abstr.) 73:29. USA.
- 25.-Holmgren, J., and I. Lonroth (1975). Oligomeric structure of cholera toxin: Characteristics of H and L subunits. -- J. gen. Microbiol. 86:49-65. USA.
- 26.- Holmgren, J. (1973). Comparison of the tissue receptors for Vibrio cholerae and Escherichia coli enterotoxin by means of gangliosides and natural cholera toxoid. Infect. Immun. 8:851-859. USA.
- 27.-Holmgren, J., P. Fredman, M. Lindblad and A. Svennerholm. --- (1982). Rabbit intestinal glycoprotein receptor for Escherichia coli heat-labile enterotoxin lacking -- affinity for cholera toxin. Infect. Immun. Vol. 38 No. 2 424-433. USA.
- 28.-King, CA., and WE (1973). The activation of cholera toxin by sialidase resistant monosialosylganglioside. J. Infect Dis. 127:639-647. USA.
- 29.- Klipstein, FA., RF. Engert, JD. Clemmets and RA. Houghten (1983). Protection against human and porcine enterotoxigenic strain of Escherichia coli in rats immunized with a cross-linked toxoid vaccine. Infect. Immun. 40: 924-929. USA.

- 30.-Klipstein,FA.,RF,Engert and RA.(1983).Protection in rabbits immunized with a vaccine of Escherichia coli heat-stable toxin cross-linked to the heat-labile -- toxin-B subunit.Infect.Immun.40:888-893.USA.
- 31.-Konowalchuk,J.,Dickie,N.Stravirick and JI.Speirs.--- (1978).Properties of an Escherichia coli cytotoxin. Infect.Immun.20:575-577.USA.
- 32.-Lonroth I.,and J.Holmgren.(1973).Subunit structure of cholera toxin. J.gen.Microbiol.76:417-427.USA.
- 33.-LoSpalluto,JJ.and RA.Finkelstein.(1972).Chemical and physical prperties of cholera exo-enterotoxin (cholera-gen) and its spontaneously formed toxoid (cholera-genoid , Biochim.biophys.Acta.257:158-166.USA.
- 34.-McConell,MM.,HR.Smith,GA.Willshaw,SM.Scotland and -- B.Rowe.(1980).P<sup>+</sup>asmids encoding for heat-labile enterotoxin production isolated fromm Escherichia coli O78: Comparison of properties.J.Bacteriol.143:158-167.USA.
- 35.-Moss,J.and SH.Richardson.(1978).Activation of adenylate cyclase by heat-labile Escherichia coli enterotoxin. Evidence for ADP ribosyltransferase activity similar to that of cholera-gen.J.clin.Invest.62:281-285.USA.
- 36.-Moss,J.,JC.Øsborne,M.Raham,H.Yunus,and G.Curtin (1981) Escherichia coli heat-labile enterotoxin ganglioside - specificity and ADP-riboseiltransferase activity.J.biol. Chem.256:12861-12865.USA.
- 37.-Edwards,PR.and WH.Ewing.(1972).Identification of enterobacteriaceae.American Society for Microbiology Washington DC.USA.
- 38.-Sack,DA.,S.Huda,PKB.Neogi,RR.Daniel,and WW.Spira(1980) Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent - assay for Vibrio and Escherichia coli,heat-labile - enterotoxins and antitoxins.J.clin.Microbiol.11:35-40 USA.

- 39.-Sanchez J., PM. Bennet and MH. Richmond. (1981). Manipulation of the genes coding for the heat-labile toxin of Escherichia coli En: Molecular Biology. Pathogenicity - and Ecology of Bacterial Plasmids. (1981). S.B. Levy, R.C. Clones and E. Koenig (Eds.) p.633 Plenum Press.-- New York. USA.
- 40.-Sanchez J., PM. Benett and MH. Richmond (1982). Expression of elt-B the gene encoding the subunit-B of heat-labile enterotoxin of Escherichia coli, when cloned in pACYC184 FEMS Microbiol. Lett. 14:1-5. USA.
- 41.-Sanchez J. (1982). Expression of the gene encoding the B-Subunit of the heat-labile enterotoxin of Escherichia coli when cloned in pBR322 and pACYC. (thesis). England.
- 42.-Smith, HW. and S. Halls; (1967). Studies on Escherichia coli enterotoxin. J. Path. Bact. 93:531-543. USA.
- 43.-Smith, HW. and S. Halls. (1968). The transmissible nature of the genetic factor in Escherichia coli that controls -- enterotoxin-production, J. Gen. Microbiol. 52:319-334. USA.
- 44.-Smith, HW. and C. Gyles (1970). The relationship between - two apparently different enterotoxin produced by enteropathogenic strains of Escherichia coli of porcine origin. J. med. Microbiol. 3:387-3401. USA.
- 45.-Smith, HW. and MA. Linggod (1971). The transmissible nature of enterotoxin production in a human enteropathogenic - strain of Escherichia coli of porcine origin. J. med. - Microbiol. 4:301-305. USA.
- 46.-So, M., JH. Cross and S. Falkow. (1975). Polynucleotide sequence relationships among Ent plasmids and the relationship between Ent and other plasmids. J. Bact. 121:234-238. USA.
- 47.-Taylor, J. and KA. Bettelheim (1966). The action of chloroform killed suspensions of enteropathogenic Escherichia coli on ligated rabbit gut segments. J. gen Microbiol. 42: 309-313. USA.



- 48.-VanHeyningen WE., CCJ. Carpenter, NF. Pierce and W. Greenough. (1971). Deactivation of cholera toxin by ganglioside . J. Infect. Dis. 124:415-418. USA.
- 49.-VanHeyningen, S. and CA: King. (1975). Subunit-A from --- cholera toxin is an activator of adenylate cyclase in pigeon erythrocytes. Biochem. J. 146:269-279. USA.
- 50.-Voller, A., DE. Bidwell, and A. Bartlett. (1979). The enzyme linked immunosorbent assay. (ELISA). Dynatech Lab. Inc. USA.
- 51.-Work, TS., and E. Work. (1981). Laboratory techniques in --- biochemistry and molecular biology. Vol. 1, part 3. Immunochemical techniques for identification and estimation of macromolecules. 2<sup>nd</sup>. Edition. Elsevier/North Holland Biomedical Press.
- 52.-Yamamoto T., T. Yokota and A. Kaji (1981). Molecular organization of heat-labile enterotoxin genes originating in Escherichia coli of human origin and construction of heat-labile toxoid-producing strains. J. Bact. 148:--- 983-987. USA.