

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EXPRESIÓN EN LA SUPERFICIE DEL FAGO M13 LA
REGIÓN VARIABLE DE LA CADENA PESADA DE UNA
INMUNOGLOBULINA DIRIGIDA CONTRA EL PÉPTIDO
 β -AMILOIDE₁₋₄₂”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA
GILDA MARÍA BALDERAS ÁVILA

MÉXICO, D. F. 2007





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Jorge Fernando Paniagua Solís
Vocal	Prof. Constantino III Roberto López Macías
Secretario	Prof. María Elena Munguia Zamudio
1°. Suplente	Prof. Enrique Ortega Soto
2°. Suplente	Prof. Maria Benita Leonor Fernández Salgado

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Asesor: M en C. María Elena Munguia Zamudio

Supervisor técnico: Biol. Gonzalo Acero Galindo

Sustentante: Balderas Ávila Gilda Maria

DEDICATORIA

Este trabajo es para todos aquellos mexicanos,
que buscan y luchan por un México mejor.

AGRADECIMIENTOS

Bueno, realmente hay muchas cosas y personas a las que hay que agradecer. El llegar hasta este momento es algo que no solo a mi me costo trabajo, sino también a la gente que me rodea e incluso a mis profesores durante la carrera. El camino ha sido difícil, pero ya estoy aquí. Primero debo agradecer a Dios porque me permitió terminar un ciclo más de mi vida, el cual ha sido de los mejores, que tal vez fue el mejor de mi vida hasta ahora.

A mis padres que me han enseñado el valor del esfuerzo, son mi guía y por su amor y comprensión que siempre me dan... GRACIAS por todo. A mi Kike, gracias por todo tu esfuerzo que has hecho por sacar adelante a esta familia. A mi Ray, realmente me has enseñado que siempre hay que buscar y luchar por nuestros sueños y metas. A mi Pamela, solo te puedo decir que gracias por haber aguantado todo este tiempo, el que yo trabajara en el cuarto y que aunque eres aun pequeña, siempre me escuchas.

Muchas gracias al Dr. Karen Manoutcharian y a la Dra. Gohar Gevorkian, por haberme aceptado en su grupo de trabajo, el haber aprendido tantas cosas ahí, sin olvidar su apoyo económico, y de alguna forma el haber confiado en mi capacidad.

A Mariel y Gonzalo, por toda su paciencia, su conocimiento y todo el tiempo que dedicaron para que yo pudiera terminar este proyecto. Mil gracias Mariel por todos los momentos compartidos y tu apoyo en todos los sentidos. Gonzalo gracias por que realmente siempre hiciste divertida la estancia en el laboratorio. Al M. en C. Erik González, por tu apoyo en la parte de la secuenciación (que nos costo mucho trabajo, ja), por tenerme mucha paciencia y por escucharme.

Ahora bien, este es un agradecimiento para mis amigos de la facultad (que eso incluye a los comárquenos y los anexos) y por favor no se sientan si no escribo el

nombre de cada uno!!!! prefiero dedicarles unas palabras. A cada quien lo conocí en diferente grado, tal vez con unos compartí mas que con otros pero gracias por todos lo momentos compartidos, por el brindarme su amistad y por que gracias a ustedes la Universidad fue mucho mas placentera.

A mis amigos de biomédicas, eso incluye a ti Rod, gracias por todos los buenos momentos en el laboratorio y por su apoyo durante mi estancia ahí.

Mon petit français, je veux seulement remercier parce que tu es avec moi, pour tout l'amour que tu me donnes et pour ton support et confiance. Je t'aime très fort!!!

En general a todos mis profesores, y no solo a los de la facultad, ya que todos son parte fundamental de lo que ahora soy y quiero ser. Por todo su conocimiento y formación para hacerme mejor persona... y sin olvidar a todo lo que es la máxima casa de estudios, la UNAM, que aunque no es una persona, pero hay personas que creyeron y creen en este proyecto para que todos aquellos que quieran estudiar lo hagan. Estoy tan orgullosa de haber estudiado en ella y de ser o haber sido universitaria.

INDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1 La enfermedad de Alzheimer	5
2.2 Alteraciones neuropatológicas	6
2.3 El péptido β -Amiloide y el Procesamiento de APP	8
2.4 Daño oxidativo	10
2.5 Terapias anti- β Amiloide	10
2.6 Anticuerpos	12
2.7 Despliegue en fago (phage display)	13
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. OBJETIVOS	17
5. METODOLOGÍA	18
5.1 Clonación	
5.1.1 Preparación del vector pG8SAET	18
5.1.2 Obtención del fragmento V _H de la clona b4.4	19
5.1.3 Ligación	21
5.1.4 Transformación y selección de las clonas positivas	21
5.2 Caracterización de las clonas	23
5.2.1 Rescate y purificación de fagos	24
5.2.2 Secuenciación del ADN de cadena sencilla	25
5.2.3 Ensayos inmunoenzimáticos y tinción de plata	27
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
6.1 Identificación y selección de las clonas que presentan el tamaño del fragmento V _H expresado en la superficie del fago M13	30

6.2 Análisis del fragmento V _H revela la conservación de la secuencia original	31
6.2 Reconocimiento del fragmento V _H hacia el péptido βA ₁₋₄₂	31
6.3 La expresión del fragmento V _H en el fago M13 en alto número de copias confirmada por Inmunoblot y Tinción de Plata	33
7. CONCLUSIONES	35
8. PERSPECTIVAS	35
9. BIBLIOGRAFÍA	36
10. APÉNDICE	42

“Expresión en la superficie del fago M13 la región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina dirigida contra el péptido β -Amiloide₁₋₄₂”

1. RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo del Sistema Nervioso Central (SNC) que se manifiesta por deficiencias cognitivas y de la memoria, causando como consecuencia demencia y finalmente la muerte. Esta enfermedad está caracterizada por la presencia de depósitos extracelulares en células del hipocampo llamadas placas seniles, formadas por el péptido β -Amiloide (β A), y la formación intracelular de marañas neurofibrilares, constituidas por una proteína hiperfosforilada llamada TAU. Se sabe que el β A₁₋₄₂ es el más tóxico y que predomina en las placas seniles. La acumulación y el depósito de éste péptido en el cerebro juega un papel central y crítico en la neuropatología de la enfermedad del Alzheimer.

En recientes estudios se han dirigido esfuerzos para encontrar moléculas que remuevan o inactiven las placas de β A, así como prevenir la agregación del mismo. Algunas de estas moléculas son anticuerpos anti- β A o fragmentos de anticuerpos (Fab, scFv), los cuales muestran unión a fibrillas preformadas y llevan a la disgregación de éstas o la inhibición de efectos neurotóxicos.

En nuestro laboratorio se seleccionaron y caracterizaron fragmentos de anticuerpos de una biblioteca humana no inmune del fragmento variable de la cadena sencilla (single-chain Fv, scFv) desplegada en fagos (*phage display*). Actualmente hemos caracterizado un scFv que mostró alta reactividad para el β A₁₋₄₂ en ensayos de ELISA y un efecto neuroprotector en ensayos de neurotoxicidad del β A₁₋₄₂ en células de neuroblastoma humano.

En el presente trabajo se expresó la cadena pesada de la región variable de la clona b4.4, en la superficie del fago filamentoso M13 en alto número de copias. Además de comprobar su correcta clonación se realizaron ensayos inmunoenzimáticos para caracterizar su reconocimiento hacia el péptido βA_{1-42} , tales como ensayos de ELISA y Western blot.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 La enfermedad de Alzheimer

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo que afecta alrededor del 2% de población en países industrializados y más de 20 millones de personas presentan esta enfermedad en todo el mundo. Se predice que para el 2050 el número de enfermos se puede triplicar (<http://www.alz.org>). En México, esta enfermedad afecta a 350 mil personas y mueren anualmente 2030 pacientes, convirtiendo a la enfermedad de Alzheimer en la cuarta causa de muerte en personas mayores de 65 años (<http://www.innn.edu.mx>). En esta enfermedad, los pacientes presentan deterioro progresivo de la memoria, desordenes en las funciones cognitivas, alteraciones en el comportamiento (paranoia y alucinaciones), un decremento en las funciones lingüísticas, desorientación espacio-temporal y por último la muerte (Selkoe, 2001).

Actualmente, un diagnóstico definitivo de la EA es posible solo por medio de análisis postmortem del cerebro. El análisis histopatológico del cerebro muestra la presencia de *placas seniles*, *marañas neurofibrilares* y una amplia y progresiva pérdida neuronal en el hipocampo y selectas áreas corticales y subcorticales (Golde, 2003). Las placas y marañas están presentes en su mayoría en regiones del cerebro que participan en el aprendizaje, memoria y comportamientos emocionales. Las neuronas que degeneran en la EA presentan incrementado el daño oxidativo, deteriorado el metabolismo de energía e interrumpida la homeostasis de calcio celular (Mattson, 2004).

La mayoría de los casos de la EA son esporádicos o de establecimiento tardío, cuyas causas se atribuyen a diferentes factores. Por otro lado, una pequeña fracción (menor al 1%) de estos casos se debe a una herencia dominante autosomal con un inicio de antes los 65 años de edad, llamado Alzheimer familiar o temprano. Las mutaciones que incrementan la deposición del péptido β A están

asociadas con formas familiares de la EA. Actualmente, se cree que las mutaciones en cuatro genes tienen una participación en la enfermedad; presenilina 1 (PSEN1), presenilina 2 (PSEN 2), el alelo $\epsilon 4$ de la APOE y en la proteína precursora del amiloide (Amyloid β protein precursor, APP), los cuales se han localizado en los cromosomas 1, 14, 19 y 21 respectivamente. Productos de estos genes participan en el tráfico y procesamiento proteolítico del APP (Hardy, et al., 2002).

La hipótesis de la cascada amiloide postula que la primera causa de la EA es el incremento de la producción y la acumulación del βA_{1-42} . La oligomerización del βA_{1-42} y la deposición como placas difusas en el cerebro conduce a la activación de células de microglia y de astrocitos. Además que la oligomerización del βA altera la homeostasis iónica de la neurona y aumenta la fosforilación de Tau, llevando a la formación de marañas neurofibrilares (Weiner, et al., 2006).

2.2 Alteraciones neuropatológicas

Las *placas seniles*, también llamadas placas neuríticas, son depósitos extracelulares de fibrillas y agregados amorfos del péptido β -amilode (βA), rodeados por terminales presinápticas degenerativas junto con astrocitos y células de microglia (Morgan, et. al. 2004, Weiner, et al, 2006). Se ha postulado que las placas seniles presentan neurotoxicidad que conduce a la muerte celular y en algunos estudios se han correlacionado la densidad de las placas, y no el número de ellas, con las características clínicas de la EA (Hardy, et al., 2002). La densidad Amiloide del centro de cada placa se ha relacionado con el estadio de formación de la placa, desde placas recién formadas con un centro muy difuso, hasta las placas terminales con un centro denso (Vickers, et. al. 2000).

Se ha encontrado que las fibrillas de péptido βA no son las únicas formas neurotóxicas, sino que este también se ensambla en formas solubles: las protofibrillas que forman estructuras curvilíneas de 4-11 nm en diámetro y menos

de 200 nm de longitud, *in vitro* causan estrés oxidativo que desacopla los transportadores iónicos y de glucosa en la membrana celular, y la desestabilización de la homeostasis celular del calcio. Las protofibrillas también causan cambios electrofisiológicos lo que eventualmente conduce a la muerte neuronal. Oligómeros pequeños llamados ligandos difusibles derivado de β A (ADDL) también son neurotóxicos *in vitro*. Ambas formas escapan a la detección con anticuerpos dirigidos a las fibrillas del péptido β A (Klein, et al. 2001). Especies oligoméricas del β A han demostrado que interrumpen la plasticidad sináptica incluso cuando hay ausencia local de placas seniles.

Las placas difusas son estructuras amorfas, que no poseen un centro denso de β A pero por medio de anticuerpos se ha determinado que éste se encuentra presente y tal vez en un estadio temprano de agregación (Dickson, 1997). Ambos tipos de placas pueden presentarse en cerebros de personas viejas que no presenten demencia.

Las *marañas neurofibrilares* son agregados intracelulares insolubles en neuronas formadas por la proteína asociada a microtúbulos TAU, que exhibe hiperfosforilación y modificaciones oxidativas. Tau es una proteína neuronal que se une a microtúbulos, promoviendo la unión y la estabilidad (Weiner, et al., 2006). Una variedad de cinasas han mostrado ser capaces de fosforilar a TAU *in vitro* en varios sitios. No obstante, no está claro como una o más cinasas son las responsables de iniciar la hiperfosforilación de Tau *in vivo*, que lleva a la aparente disociación de los microtúbulos y la agregación en filamentos helicoidales apareados (PHF).

Las dos clásicas lesiones de la EA, placas seniles y marañas neurofibrilares, puede ocurrir independientemente una de otra. Depósitos de β A pueden ser vistos en los cerebros de humanos adultos cognitivamente normales en virtual ausencia de marañas (Selkoe, 2001).

2.3 El péptido β -Amiloide y el Procesamiento del APP

Los péptidos de β A son un grupo de fragmentos proteolíticos de 39 a 43 residuos, que son producto del procesamiento de la glucoproteína transmembranal de tipo I llamada Proteína Precursora del Amiloide (APP). El fragmento más abundante es el β A₁₋₄₀, el cual representa cerca del 90 % del total de péptido β A producido en las células. Alrededor del 10 % es representado por el fragmento β A₁₋₄₂, mientras que los fragmentos β A₁₋₃₉ y β A₁₋₄₃ son observados en cantidades muy bajas (Morgan et al., 2004).

La APP es una proteína integral de membrana con un dominio sencillo en ésta, la región N-terminal es extracelular y una pequeña región citoplasmática C-terminal. APP es procesada proteolíticamente por tres enzimas conocidas como α -, β - y γ -secretasa (Selkoe, et al., 2003). Existen dos vías para dicho procesamiento: en el primer caso o ruta no amiloidogénica, el primer corte lo realiza la α -secretasa liberando a la superficie celular el dominio sAPP α y dejando un fragmento de 83 aminoácidos (C83) que es procesado por la γ -secretasa. En el segundo caso o ruta amiloidogénica, inicia por un corte de la β -secretasa (BACE) en la región N-terminal, generando un fragmento en la región C-terminal de 99 aminoácidos (C99), dicho fragmento es procesado por la enzima γ -secretasa obteniendo el β A₁₋₄₀/ β A₁₋₄₂ (Leissring, et al, 2002).

APP es transportado a lo largo de los axones hasta las terminales presinápticas donde es acumulado en niveles relativamente altos, el cual puede resultar en la deposición del β A en la sinapsis (Lazarov, et al., 2002).

La presenilina 1 y 2 (PS1 y PS2), son dos proteasas de membrana homólogas, las cuales son probables γ -secretasas. Si su actividad no es de γ -secretasa, al menos las PSs son cofactores esenciales para este procesamiento (Golde, et al., 2001).

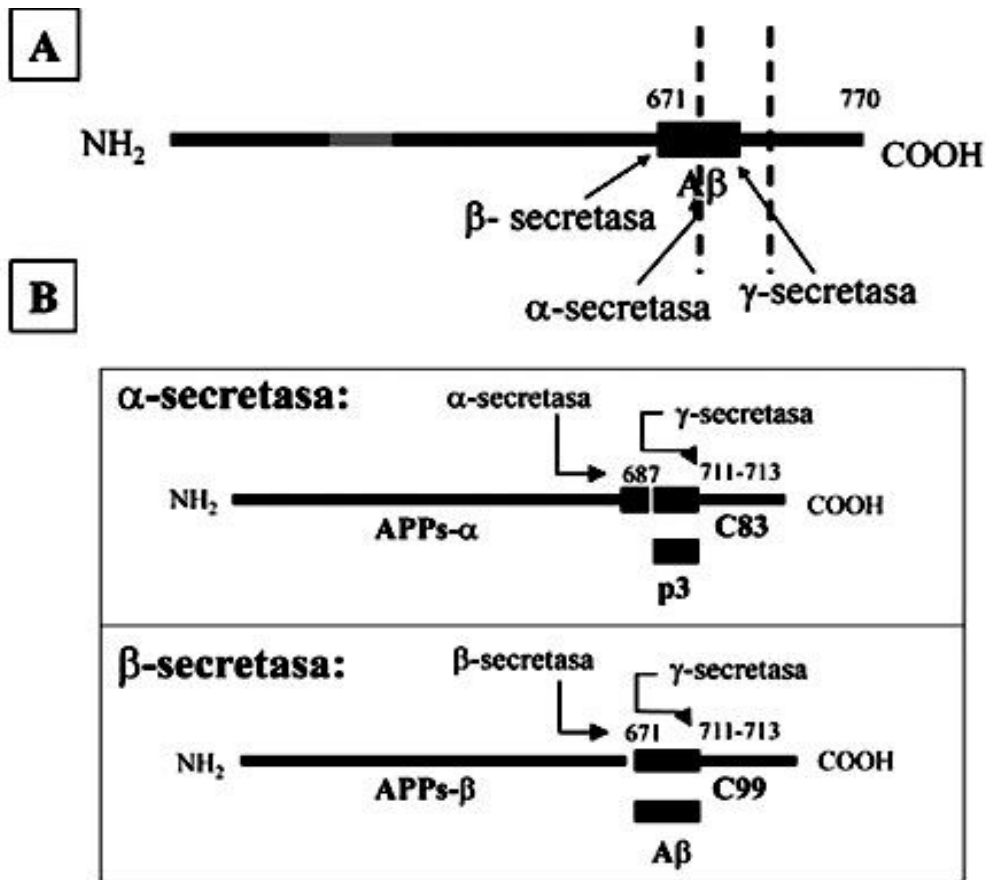


Figura 1. A) Representación grafica de la APP y su procesamiento. B) En el primer cuadro (α -secretasa) se observa la ruta no amiloidogénica y en el segundo cuadro (β -secretasa) la ruta amiloidogénica.

La relación entre la neurotoxicidad del péptido β A y la APP no es clara pero es posible que la APP puede modular la toxicidad del péptido. La formación de fibrillas de péptido β A convierte a éste en una forma con alta afinidad por proteínas de membrana de las neuronas, y particularmente por la APP. En contraste, los agregados amorfos de péptido β A no muestran unión a proteínas de membrana, este resultado correlaciona bien con la ausencia de toxicidad. Existen varios mecanismos por los que APP promueve la muerte celular, pero los resultados experimentales sugieren que la unión de APP y β A aumentan la toxicidad por cambios conformacionales que disparan la muerte celular (Lorenzo, et al., 2000).

2.4 Daño oxidativo

La acción neurotóxica del β A implica la generación de especies reactivas de oxígeno y la interrupción de la homeostasis del calcio celular. La interacción de los oligómeros del β A con Cu^+ o Fe^{2+} genera H_2O_2 . Cuando la agregación del β A ocurre en la membrana celular, el estrés oxidativo produce la peroxidación de lípidos y como consecuencia se genera 4-hydroxynonenal (4HNE), un aldehído neurotóxico que modifica covalentemente a las proteínas en los residuos de cisteína, lisina e histidina. Las modificaciones oxidativas de TAU por 4HNE y otras especies reactivas de oxígeno pueden promover su agregación y pueda de tal modo inducir la formación de marañas neurofibrilares. El β A también puede causar estrés oxidativo en la mitocondria y la desregularización en la homeostasis de Ca^{2+} , resultando en el deterioro de la cadena de transporte de electrones, incrementando la producción de radicales superóxido y la disminución de la producción de ATP (Mattson, 2004).

2.5 Terapias anti- β Amiloide

Los fármacos en desarrollo tienen como blanco sitios específicos en la cascada neurodegenerativa. Debido a que la producción de formas neurotóxicas del β A a partir del APP parece tener un evento reversible en la patogénesis de la EA. Hay un intenso interés en el desarrollo de fármacos que bloqueen las enzimas β - ó γ -secretasa (Mattson, 2004). Múltiples clases de potentes inhibidores de γ - secretasa han sido descritos, y muchos de estos han mostrado tener como blanco a PS1 y PS2 (Golde, et al., 2001). Sin embargo el uso en humanos puede estar comprometido por efectos alternos tales como el bloqueo de la γ - secretasa hacia Notch y otros sustratos proteicos (Dewachter, et al., 2002).

El empleo de agentes quelantes del hierro y cobre, como el clioquinol, se esperaba que se redujera el estrés oxidativo en las neuronas. El clioquinol es un fármaco bien tolerado en humanos y actualmente se encuentra en fase II para el

tratamiento clínico de la EA (Ritchie, et al., 2003). Datos epidemiológicos y de modelos de sistemas indican que fármacos que alteran el colesterol pueden tener un impacto en el desarrollo de la EA, y este efecto puede ser atribuido sobre la acumulación del β A (Golde, 2003).

Otros acercamientos terapéuticos están siendo probados, incluyendo agentes antiinflamatorios tales como inhibidores de COX-2 y la aspirina (Hoozemans, et al. 2003). Se han empleado algunos de estos fármacos que tienen como blanco sitios específicos de la cascada neurodegenerativa, hasta la fecha, en cultivos celulares y modelos animales de la EA, y su potencial clínico no es muy claro (Mattson, 2004).

Una estrategia prometedora para prevenir y tratar la EA esta basada en la estimulación del sistema inmune para remover el β A del cerebro. Se demostró originalmente que la inmunización directa con agregados del β A₁₋₄₂ atenuaban la deposición de éste significativamente en ratones transgénicos (Schenk, et al. 1999). Los resultados de los primeros tratamientos clínicos ha sugerido que la inmunización con β A puede ser un tratamiento efectivo para la EA, aunque ocurren reacciones adversas en algunos pacientes y se requiere de un mejoramiento en los métodos de inmunización (Hock, et al. 2003).

En el intento de diseñar otros inmunógenos capaces de inducir anticuerpos anti- β A con propiedades anti-agregación, se identificaron epítopes de anticuerpos anti- β A, usando péptidos sintéticos y bibliotecas de péptidos expresados en fagos filamentosos. Se demostró que los residuos EFRH localizados en las posiciones 3 al 6 del extremo amino-terminal del péptido β A comprenden el epítipo inmunodominante y el principal sitio regulador para la formación de fibrillas. Subsecuentemente los fagos filamentosos que expresaban el péptido EFRH fueron usados como inmunógenos específicos no tóxicos en cobayos para la producción de anticuerpos que evitaban la agregación del péptido β A *in vitro*.

Estos autores han demostrado que los anticuerpos en suero, generados contra el fago que expresa el péptido EFRH, previenen los efectos neurotóxicos y desagregan fibrillas de β A (Frenkel, et al., 2000).

Con la administración pasiva de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de anticuerpos se espera que no induzcan una respuesta inmune celular nociva. Cuando se da la eliminación del complejo scFv- β A₁₋₄₂ *in vivo*, puede no activarse la microglia, como ocurre con un anticuerpo completo, debido a la falta de la porción Fc de la inmunoglobulina. Esta fuente adicional de inflamación en pacientes puede ser evitada (Lue, et al., 2002). Ha sido demostrado que la administración intranasal de scFv de anticuerpos anti- β A₁₋₄₂ expresados en fagos en ratones transgénicos, no presentan efectos tóxicos visibles después de la administración del fago en estudios histopatológicos de cerebros (Frenkel, et al., 2002).

Una de las desventajas de la inmunización activa es la generación de una fuerte respuesta inmune, particularmente la respuesta inmune celular que posiblemente no sea lo más deseable en una población de pacientes mayores que sufren de la EA. La hipótesis de la inmunización pasiva con anticuerpos puede ser más apropiada para estos esfuerzos dirigidos a la generación de moléculas que sean capaces de prevenir y remover los agregados amiloidales (Manoutcharian, 2004).

2.6 Anticuerpos

Todos los anticuerpos tienen una estructura básica que consiste de un par idéntico de polipéptidos de cadena pesada y un par idéntico de polipéptidos de cadena ligera unidos por un puente disulfuro y enlaces no covalentes. La cadena pesada esta codificada por los segmentos genéticos: variable (V_H), diversidad (D), unión (J_H) y constante (C_H). Cada región V consiste de regiones "framework" (FW) y tres regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDRs) con una secuencia de gran diversidad. Los CDRs y una extensión menor de la

región del FW, interactúa con el antígeno para formar la base del sitio de unión al antígeno (Hassan, et al., 2002).

El Fab consiste de segmentos V_H-C_{H1} y V_L-C_L unidos por enlaces disulfuro. El Fv (fragmento variable) está compuesto por los dominios V_L y V_H solamente. La versión recombinante de Fv es llamado fragmento variable de cadena sencilla (single-chain fragment variable, scFv). Las dos regiones variables en el scFv son artificialmente unidas con un péptido flexible llamado "linker", este péptido está formado por 15 aminoácidos $(Gly_4Ser)_3$. El linker permite la asociación de V_H y V_L para formar el sitio de unión al antígeno (Huston, et al., 1993, Hassan, et al., 2002).

El uso de anticuerpos completos como agentes terapéuticos o de inmunodetección tiene aplicaciones limitadas debido a su alto costo y sus características de estabilidad, es por eso que hoy día se prefieren moléculas con la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo pero que no tenga una base de inmunoglobulina completa. Para cubrir estos requisitos se seleccionan y se emplean péptidos o fragmentos de anticuerpos (con los sitios de unión al antígeno) expresados en fagos mediante una tecnología llamada despliegue en fagos (Manoutcharian, et al., 2001).

2.7 Despliegue en fago (*Phage Display*)

La tecnología de despliegue en fago (*Phage Display*) fue desarrollada por primera vez en el bacteriófago M13 por el Dr. James D. Smith en 1985. Esta técnica describe la expresión de un péptido o proteína genéticamente fusionada a la capa proteica del bacteriófago, resultando en el despliegue de una proteína recombinante sobre la superficie del fago. Esta técnica principalmente tiene dos aplicaciones, el uso de bibliotecas de péptidos y de bibliotecas de anticuerpos (Jacobsson, et al., 2001). La tecnología de despliegue en fago, utiliza

bacteriófagos filamentosos como M13, f1 y fd, que son virus no líticos filiformes que infectan bacterias mediante el pilus F'.

El fago filamentosos más usado es M13, este es específico de *Escherichia coli*, de aproximadamente 6.5 nm de diámetro y una longitud de 900 nm. La partícula viral consiste en un núcleo de ADN de cadena sencilla rodeada por una envoltura de 5 diferentes proteínas. La más abundante es la proteína 8 (pVIII) de aproximadamente 2700 copias, 5 copias de las proteínas 7 y 9 que forman un extremo de la partícula viral mientras que otras 5 copias de las proteínas 3 (pIII) y 6 constituyen el extremo opuesto (Manoutcharian, et al., 2001, Sidhu, 2001).

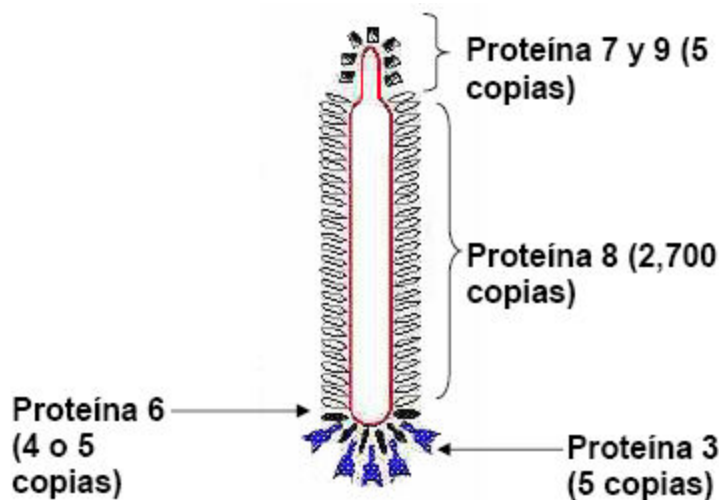


Figura 2. Estructura del fago filamentosos con sus principales proteínas de la cápside.

El sistema de despliegue en fago está generalmente basado en la fusión de la proteína de interés en la región N-terminal de las proteínas pIII y pVIII de la cubierta del fago. Esta tecnología emplea en general seis sistemas de expresión. En el sistema que empleamos, se utiliza un plásmido llamado fagémido donde se inserta el ADN de interés como fusión al gene pIII o pVIII, posteriormente se transforma a *E. coli* y se infectan éstas con fagos ayudadores “helper” que tienen todos los genes del fago nativo incluyendo pIII o pVIII. Finalmente, el fago contiene

tanto las proteínas nativas como recombinantes (con el inserto de interés) de pIII/pVIII y se obtienen fagos de los tipos 3+3 o 8+8.

De manera general, los sistemas de expresión de tipo 3 toleran péptidos y proteínas de gran tamaño mientras que los de tipo 8 solo expresan péptidos de menor tamaño. En tanto que los sistemas 8+8/88 soportan la expresión de proteínas más grandes generando fagos híbridos en lugar de fagos recombinantes (Sidhu, 2001).

La generación de fragmentos de anticuerpos expresados en el fago en forma de Fab y scFv se convirtió rápidamente en una importante parte de la tecnología de despliegue en fago. A pesar de que el scFv y los fragmentos Fab proveen una efectiva y rápida interacción *in vivo* con antígenos, son capaces de tener una mejor penetración a varios tejidos en el cuerpo comparado con el anticuerpo intacto, estos fragmentos de anticuerpos monovalentes son rápidamente eliminados de la sangre debido a su pequeño tamaño (Manoutcharian, et al., 2001).

3. JUSTIFICACIÓN

En el laboratorio, se han seleccionado y caracterizado dos nuevos anticuerpos scFv anti- β A fusionados a la proteína pIII del fago M13, de una biblioteca humana no inmune de fragmentos de scFv. La clona más reactiva (clona b4.4) se caracterizó mediante ensayos de ELISA y de neuroprotección *in vitro* con el péptido β A₁₋₄₂.

Se diseñó un péptido con la secuencia del CDR3 de la cadena pesada de esta clona y se observó que exhibe el mismo patrón de reconocimiento del scFv original. Esto nos sugiere que también péptidos basados en las secuencias de CDR3 o del fragmento V_H pueden ser potenciales candidatos para una terapia basada en pequeñas moléculas para la EA (Manoutcharian, et al., 2004). Además, el fragmento V_H presenta una alta especificidad, correcto plegamiento y es una molécula monomérica estable. Las características de estas moléculas las hacen atractivas para el uso clínico, industrial y de investigación, así como un paso hacia la mejora en el diseño de moléculas pequeñas que se basan en las regiones hipervariables de los anticuerpos (Reiter, et al, 1999). Por esta razón se decidió expresar el fragmento V_H de la clona b4.4 en el fago M13 en alto número de copias para probar la reactividad hacia el péptido β A₁₋₄₂.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Expresar la región variable de la cadena pesada de un scFv anti- β Amiloide en la superficie del fago filamentoso M13 en alto número de copias, y evaluar la unión de este fragmento con el péptido β -Amiloide₁₋₄₂.

Objetivos particulares

- Expresar la región variable de la cadena pesada de un scFv de la clona 4.4 anti- β Amiloide en la proteína pVIII del fago filamentoso M13.
- Caracterizar esta construcción mediante PCR y secuenciación de ADN.
- Evaluar el reconocimiento de las clonas seleccionadas hacia el péptido β A₁₋₄₂, con ensayos inmunológicos.

5. METODOLOGÍA

5.1 Clonación

5.1.1 Preparación del vector pG8SAET

Digestión del vector (pG8SAET)

Se colocaron 2 µg del vector, 10 U de la enzima Nco I, buffer 2 [10x] (New England Biolabs, USA) y H₂O, obteniendo un volumen final de 20 µL. Esto se incubó a 37°C durante 1 h. Se realizó un análisis electroforético en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1x, el cual se tiñó en bromuro de etidio y se observó en un transiluminador por excitación con luz UV. Se empleó como control el mismo vector diluido 1:10.

Posteriormente a la digestión y verificación anterior se adicionó 20 U de la enzima Hind III, buffer 2 [10x] (New England Biolabs, USA) y H₂O, obteniendo un volumen final de 30 µL. Esto se incubó durante 1 h a 37°C. Nuevamente se realizó un análisis electroforético en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1x, teñido en bromuro de etidio y observado en el transiluminador de luz UV. Esto fue para comprobar que la digestión fue completa y el vector se encontraba lineal, observando una sola banda en el carril del vector.

Purificación del vector

El ADN del vector se purificó utilizando el kit de Rapid PCR Purification System (Marligen, USA). De acuerdo a la especificación del fabricante brevemente se mencionan los siguientes pasos. Al vector digerido se le agregó la solución de unión y se mezcló bien. Esta solución se colocó dentro de un cartucho y se centrifugó descartando el sobrenadante. Al cartucho se le agregó buffer de lavado, se centrifugó y descartó el sobrenadante. Se colocó el cartucho en un tubo de 1.5

mL, se le agregó buffer TE caliente e incubó a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó obteniendo el vector purificado.

Cuantificación del ADN de vector digerido

Se preparó un gel de agarosa al 0.8%, donde se cargó 2 μ L de un marcador de peso molecular de 100 bp ladder (Invitrogen, USA), 1 μ L de colorante y 1 μ L de H₂O. Además se cargó 1 μ L del vector digerido, 1 μ L de colorante y 2 μ L de H₂O, aplicando una diferencia de potencial de 100 V durante aproximadamente 40 minutos y posteriormente se tiñó con bromuro de etidio (1 μ g/1 L de H₂O).

5.1.2 Obtención del fragmento V_H de la clona 4.4

PCR del fragmento de V_H

Se realizó un cocktail donde se agregó 4 μ L de ADN de la clona b4.4 [1ng/ μ L], 20 μ L de buffer taq polimerasa 10x, 6 μ L MgCl₂ [50 mM], 1 μ L Taq polimerasa [5 U/ μ L] (Altaenzyme), 4 μ L dNTP's [10 mM] y adicionalmente 156 μ L de H₂O. A cada reacción se agregó 1 μ L del oligonucleótido 5PHE y 1 μ L de 3LINK, ambos a 25 pmol/ μ L, y 23 μ L del cocktail. Se usó como control el mismo templado pero los oligonucleótidos que se emplearon fueron 5PHE y 3PHE.

3PHE (5'TATGATACGAAGGATCCAAAGATCTCTATGCGGCCCCATTCAGATC 3')

TM = 74.43°C

5PHE (5'CTTATCGGTGAATTCTACCTATCTCGCGGCCAGCCGGCCATGG3')

TM = 78.61 °C

3LINK (5 TTCTTAGATCGTCGACAAGCTTCGATCCGCCACCGCCAGAGCCACC
TCCGCCT 3') TM = 80.58 °C

Se colocaron las reacciones en el termociclador *Gene Cyclor* (BIO-RAD, USA) donde el programa consistía en: 1 minuto a 94°C, 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1

minuto a 65°C, 1 minuto a 70°C, y 3 ciclos de 3-5 minutos a 72°C. Éste PCR se purificó usando el mismo método que en el vector.

Digestión del ADN de PCR del fragmento de V_H

Del ADN de PCR purificado, se digirió con 20 U de la enzima NcoI, en buffer K 10x, BSA 0.1% (Amersham Pharmacia Biotech, USA) y H₂O, en un volumen final de 70 µL. Se incubó durante 1 hora a 37°C. Después se adicionó 40 U de la enzima Hind III (New England Biolabs, USA) y nuevamente se incubó durante 1 hora a 37°C.

Purificación del fragmento V_H digerido

El ADN del fragmento V_H digerido se purificó utilizando el kit de Rapid Gel Extraction System (Marligen, USA). De acuerdo a la especificación del fabricante brevemente se mencionan los siguientes pasos.

Se preparó un gel de agarosa al 1.5% con buffer TBE 1x, en donde se cargó toda la digestión (80 µL). Se cortó el área del gel que contenía el fragmento de V_H y se peso la rebanada de gel. Se agregó buffer de solubilización de gel, se mezcló e incubó a 50°C. Se colocó un cartucho dentro de un tubo de lavado y se agregó la mezcla anterior. Esto se centrifugó y descartó el sobrenadante. Al cartucho nuevamente se le agregó buffer de solubilización del gel e incubó a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó y descartó el sobrenadante. Nuevamente se centrifugó y se descartó el sobrenadante, una vez se centrifugó por 1 minuto.

Por último el cartucho se colocó en un tubo de 1.5 mL, se agregó buffer TE caliente e incubó a temperatura ambiente; se centrifugó obteniendo el ADN del fragmento V_H digerido y purificado.

Cuantificación de la digestión purificada

Se preparó un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1x, donde se cargaron 2 μL de marcador de peso molecular de 50 ng $V_H/\mu\text{L}$ (Invitrogen, USA), 1 μL de colorante y 5 μL de H_2O . Para la digestión purificada se pusieron 5 μL de esta, 1 μL de colorante y 2 μL de H_2O aplicando una diferencia de potencial de 100 V durante aproximadamente 40 minutos, posteriormente se tiñó con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/1\text{ L H}_2\text{O}$) y se observó en un transiluminador de luz UV.

5.1.3 Ligación

- Ligación del vector y del fragmento V_H

Se ligó ADN del fragmento V_H [10 ng/ μL] y ADN del vector pG8SAET [30 ng/ μL] en una relación de radio molar de 3:1 (fragmento V_H : vector), en 1 μL de la enzima T4 DNA ligasa [1 U/ μL], 1.5 buffer de T4 DNA ligasa 10x (Roche, USA) y 6.5 μL de H_2O

- Ligación del vector

Se colocó la misma proporción del ADN del vector usado en la ligación con el inserto, al igual que el buffer de ligasa y la enzima T4 DNA ligasa (Roche, USA) para tener las mismas concentraciones en ambos casos.

Se incubaron durante 4 hrs a temperatura ambiente.

5.1.4 Transformación y selección de las clonas positivas

Para la transformación se emplearon 5 tubos de 15 mL, en el tubo 1 se colocaron 4 μL de la ligación del vector con el fragmento de V_H y 6 μL de H_2O , en el tubo 2 se colocaron 4 μL de la ligación del vector y 6 μL de H_2O , en el tubo 3 se colocó

2.7 μL del vector lineal (digerido y purificado) y 7.3 μL de H_2O . La cantidad de ADN en estos tubos fue de 8 ng. En el tubo 4 se agregó 1 μL ADN control comercial (PUC 19 [1 ng/ μL]) y 9 μL de H_2O . En el tubo 5, 10 μL de H_2O .

A cada tubo se le agregó 100 μL de células competentes obtenidas por el método químico (Hanahan, 1985), estos tubos se pusieron en hielo durante 30 minutos, 90 segundos en un baño a 42°C y luego de 3-5 minutos en hielo. Posteriormente se adicionó a cada tubo medio SOC a un volumen de 1 mL, estos tubos se incubaron a 37°C durante 40 minutos. Finalmente se plaquearon los siguientes volúmenes en cajas petri con medio LB con carbenicilina [50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$]:

Tubo 1 (ligación del inserto y el vector): 200 $\mu\text{L}/\text{caja}$ y 500 $\mu\text{L}/\text{caja}$

Tubo 2 (ligación del vector): 500 $\mu\text{L}/\text{caja}$

Tubo 3 (vector lineal): 500 $\mu\text{L}/\text{caja}$

Tubo 4 (ADN control): 200 $\mu\text{L}/\text{caja}$ y 100 $\mu\text{L}/\text{caja}$

Tubo 5 (Control negativo): 200 $\mu\text{L}/\text{caja}$ y 200 $\mu\text{L}/\text{caja}$ con LB y top agar.

Estas cajas se incubaron a 37°C toda la noche.

Preparación de Células competentes por el método químico (Hanahan, 1985)

Previamente se crecieron células de *Escherichia coli* de la cepa TG1 en 10 mL de medio YT 2x, toda la noche a 37°C en agitación (250 rpm). Se diluyó el cultivo de toda la noche (1:100) en medio YT 2x y se incubó a 37°C hasta que la densidad óptica fue de 0.5-0.7 (alrededor de 2 horas). Posteriormente se incubó en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C . Después se resuspendieron las células suavemente en 30 mL de TFB-I frío (30 mL/100 mL cultivo) y se incubaron en hielo por 30 minutos. Se centrifugaron las células resuspendidas a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C . Nuevamente se resuspendió el pellet de células en 4 mL de TFB-II. Finalmente se hacen alícuotas de 200 μL de estas células competentes, colocándolas en hielo seco con etanol. Se guardan a -70°C .

5.2 Caracterización de la clona

PCR de colonia

Para realizar las reacciones de PCR de colonia es necesario obtener el ADN de dichas colonias, a continuación se menciona el procedimiento. Se tomaron 6 colonias al azar de las cajas del inserto con el vector. Con un palillo de madera estéril se tomó una asada de una de las colonias seleccionadas y se sembró por estría recta en una caja con medio LB y carbenicilina [50 µg/µL], esta misma asada se resuspende en 20 µL de H₂O, después se agitó en vortex, se centrifugó para bajar lo que quedo en las paredes y se calentó durante 5 minutos en el termoblock a 90°C. Posteriormente los tubos se centrifugaron a máxima velocidad y colocaron en hielo. Este proceso se realizó con las otras 5 colonias seleccionadas.

Se tomaron 5 µL del sobrenadante de cada tubo los cuales se utilizaron como templado para la reacción de PCR. A cada tubo se le agregó un 1 µL del oligonucleótido F8 (5'GACAATGACAACAACCATCATCGCCCACGCATA 3') $T_M = 68.1^\circ\text{C}$, 1 µL de 5YSAET (5' GGAAAAACATTTATTCAATTCGTAACTAG 3') [25 pmol/µL] y 18 µL del cocktail (Buffer 10x Taq polimerasa, MgCl₂ [50 mM], enzima Taq polimerasa [5 U/µL] de Altaenzyme, dNTP's [10 mM] y H₂O). Para el control se colocaron 1 µL de ADN de la clona 4.4 [1 ng/µL], 1 µL de 3PHE y 1 µL de 5PHE [25 pmol/µL], 22 µL del cocktail.

Se colocaron las reacciones en el termociclador *Gene Cyclor* (BIO-RAD, USA) donde el programa consistía en: 1 minuto a 94°C, 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos 70°C. Posteriormente se realizó un análisis electroforético en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1x empleando un marcador de peso molecular de 100 pb (Leader, Invitrogen, USA). Se corrió a 100 V durante aproximadamente por 45 minutos, posteriormente se tiñó en bromuro de etidio.

5.2.1 Rescate y purificación de fagos

En tubos cónicos de 50 mL, se crecieron células de 2 colonias seleccionadas al azar que presentaban el tamaño esperado del inserto, en 6 mL de YT 2x con carbenicilina [50 µg/µL] a 37°C en agitación (250 rpm) hasta obtener una densidad óptica de 0.7 - 1. Parte de este cultivo se guardó con glicerol (30%) y se almacenó a -70°C.

A continuación, a 2.5 mL del cultivo se le agrego fago helper M13KO7 (Invitrogen, USA), que tiene un título de 1×10^{11} fagos/mL, con un MOI = 10 (Multiplicidad de infección). Se incubó a 37°C durante 30 minutos sin agitación. Posteriormente se incubó a 37°C durante 30 minutos en agitación (250 rpm). Este cultivo se llevó a un matraz de 100 mL con 50 mL de medio YT 2x, adicionalmente con carbenicilina y kanamicina, ambos a una concentración final de 50 µg/mL, dejando crecer este cultivo toda la noche a 30°C en agitación (250 rpm) por mínimo 16 hrs.

Después de la incubación se colocó el cultivo en tubos de policarbonato para centrifugar a 6000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se precipitó con una quinta parte del volumen con PEG/NaCl frío incubando en hielo durante 2 hrs como mínimo. Posteriormente se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 1 mL de TBS. Esto se colocó en un tubo de 2 mL al cual se le agregó nuevamente una quinta parte del volumen con PEG/NaCl, se mezcló e incubó en hielo por 1 hora. Después se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se descarto el sobrenadante y se resuspendió el botón en 200 µL de TBS, nuevamente se centrifugo a 6000 rpm durante 1 minuto. Se juntaron los volúmenes obtenidos de la misma clona en un tubo de 1.5 mL y se refrigeraron a 4°C.

Titulación de fagos

Se realizaron 4 diluciones seriadas de los fagos obtenidos (1:1000 y la última en 1:10). De las dos últimas diluciones se tomaron 30 μL y se pusieron a incubar con 200 μL de células de *E. coli* de la cepa TG1 previamente crecidas en medio YT 2x ($\text{DO}_{600} \sim 0.5$), durante 45 minutos a 37°C sin agitación.

Posteriormente se tomaron todas las células infectadas de cada dilución (230 μL) y se plaquearon en una caja petri con medio LB con carbenicilina [50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$], se realizó lo mismo con 200 μL de células control. En 3 mL de Top agar fundido se agregaron los 200 μL de células restantes, esto se colocó sobre medio LB. Posteriormente se incubaron las cajas a 37°C toda la noche. Finalmente se contaron las colonias obtenidas y se calculó el título.

5.2.2 Secuenciación del ADN de cadena sencilla de los fagos

- Extracción de la cadena sencilla

Se tomaron 30 μL de fago y se le agregó 250 μL de buffer de yoduros, se mezcló. Después se agregó 2 $\frac{1}{2}$ volúmenes de etanol absoluto, se mezcló e incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm descartando el sobrenadante. Se lavó con 200 μL de etanol al 70% frío, se centrifugó 2 minutos a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante. Nuevamente se centrifugó por 10 segundos para quitar el exceso de etanol. Finalmente se dejó secar a temperatura ambiente 1 minuto y se resuspendió en 30 μL de H_2O estéril.

- Secuenciación

El método de secuenciación que se siguió, de terminación de la cadena de ADN, es el reportado por Sanger y colaboradores en 1977.

Previamente se etiquetaron 4 tubos con las letras “A”, “C”, “G” y “T”, donde se colocaron 2.5 μL de ddGTP en el tubo “G”, de igual forma con ddATP, ddTTP y ddCTP para cada letra correspondiente. Posteriormente se realizaron los siguientes tres pasos:

a) Annealing: 12.5 μL ADN ss (0.5-3 μg de ADN)

1.5 μL primer F8 [25 ng/ μL]

2 μL plasmid buffer

15 μL

Se calentó esta mezcla a 37°C durante 10 minutos y posteriormente se colocó en hielo por otros 10 minutos.

A esta mezcla se le agregó lo siguiente:

b) Labeling: 1 μL DTT (dithiotritol) [0.1 M]

3 μL dilución del labeling mix (1x)

0.8 μL [$\alpha^{35}\text{S}$] dATP (5 μCi)

2 μL enzima T7 secuenasa [13 U/ μL]

21.8 μL

Esto se mezcló evitando formar burbujas e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.

c) Terminación:

Previamente se calentaron los tubos de cada letra a 37°C, a cada tubo se agregaron 4.5 μL de la reacción de labeling, se mezcló y continuo con la

incubación a 37°C por 5 minutos. Posteriormente se agregó a cada tubo 4 μ L de stop solution 2x y mezcló perfectamente.

Estos tubos, se calentaron a 75°C durante 3 minutos e inmediatamente se cargaron 7 μ L de cada “terminador” en un gel poliacrilamida con buffer TBE 1x (previamente montado en la cámara de electroforesis). La diferencia de potencial que se aplicó fue de 1500 Volts durante aproximadamente 5 hrs.

Posteriormente el gel se pasó a un papel filtro y colocó en una cámara de secado de geles (BIO-RAD, USA) durante 1 hr a 80°C. Después se puso dentro de un casete de revelado con una placa de 35 x 45 cm (X-OMAT LS, Kodak, UK) y se dejó exponiéndose durante una semana. Finalmente se reveló esta placa con solución fijadora y reveladora (Kodak, UK).

5.2.3 Ensayos inmunoenzimáticos

ELISA

Con el fin de evaluar el reconocimiento del fragmento V_H hacia el péptido βA_{1-42} , se llevaron a cabo ensayos de ELISA (Enzyme Linked Inmuno Sorbent Assay).

Inicialmente se sensibilizó la placa de ELISA Nunc Maxisorp con los fagos, se usó el fago M13 como control negativo, la clona C2.8 como control positivo y la clona a evaluar C3. De cada fago se colocó 10^{10} fagos en 100 μ L/pozo en PBS 1x y la placa se sensibilizó toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se retiraron los fagos, se lavó la placa 4 veces con PBS-Tween 0.2% y se bloqueó con 200 μ L/pozo de PBS-leche descremada 2% durante 1 hr a temperatura ambiente. Se volvió a lavar la placa 4 veces con PBS-Tween 0.2%, enseguida se agregó 100 μ L/pozo de una solución del péptido βA_{1-42} biotinilado [2 μ g/mL] y el $A\beta_{1-16}$ biotinilado como control negativo en igual cantidad y

concentración. Posteriormente se incubó durante 1 hr a 37°C y 1 hr a temperatura ambiente. Nuevamente se lavó con PBS-Tween 0.2% y se le agregó Estreptavidina-HRP (Zymed, USA) [1:5000] en PBS-BSA 1% Tween 0.1% con 100 μ L/pozo y se incubó durante 30 minutos a 37°C.

Finalmente se lavó con PBS-Tween 0.2% y se agregó 100 μ L/pozo del sustrato ABTS (2,2-azino-bis/3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid). Se leyó la densidad óptica (DO) de la reacción en un lector de placas de ELISA (DYNEX Technologies) a una longitud de onda de 405 nm.

Electroforesis e Inmunoblot

Los fagos fueron analizados por electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida de 1.0 mm (85 x 75 mm) en gradiente de 4% al 12% (NuPAGE, Invitrogen, USA) en buffer MES, según instrucciones del fabricante. Se utilizó un marcador de peso molecular para proteínas (Multimark, multi-colored, invitrogen, USA). En cada carril se cargo 10^{10} partículas de cada uno de los fagos: M13, la clona C3 y la clona b4.4. Las muestras se hirvieron durante 3 minutos en buffer de carga. Se corrieron 16 μ L de cada muestras en el gel por duplicado a 200 volts durante aproximadamente 55 minutos.

Posteriormente el gel se cortó en dos partes, donde a la primera parte se realizó una tinción con plata y la segunda parte del gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Inmunoblot). Para la transferencia, el gel se equilibró en buffer de transferencia durante 30 minutos a temperatura ambiente. La transferencia se llevó a cabo en una cámara semi-seca (Bio Rad, USA) utilizando filtros *extra thick blot paper Criterion size* (Bio Rad, USA), una membrana Hybond-C (Amersham Bioscience, UK) y se corrió a 25 volts durante 40 minutos.

- *Tinción de plata*

Se colocó el gel por 1 hr en solución fijadora en agitación a temperatura ambiente. Se lavó el gel 3 veces en solución de lavado durante 20 minutos en cada ocasión. Después se incubó el gel durante 1 minuto en solución de pre-tratamiento, cubriendo de la luz durante la incubación. Se lavó con H₂O durante 20 segundos, esto se repitió 3 veces. Después se incubó en solución de plata durante 1 hr en agitación a temperatura ambiente, nuevamente se lavó el gel 2 veces con H₂O por 20 segundos. Se incubó en solución reveladora hasta que las bandas se aprecian claras. Posteriormente se lavó con H₂O milliQ 2 veces, la primera ocasión se enjuagó y la segunda ocasión durante 1 minuto. Finalmente se incubó en solución de paro durante 10 minutos. El gel se colocó en una cámara de secado (BIO-RAD, USA) durante 40 minutos a 80°C.

- *Inmunoblot*

La membrana transferida se incubó en PBS durante 20 minutos en agitación a temperatura ambiente. La membrana se bloqueó con PBS-leche descremada 2% durante 1 hr en agitación a temperatura ambiente. Se retiró la solución de bloqueo y se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.2% durante 5 minutos cada lavado. Posteriormente se agregó el péptido βA_{1-42} biotinilado [5 μ g/mL] en PBS-BSA 1% Tween 0.1% y se dejó incubando durante 2 hrs a temperatura ambiente en agitación. Se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.2% y se agregó estreptavidina-HRP (Zymed, USA) [1:2500] diluida en PBS-BSA 1% Tween 0.1% durante 1 hr en agitación a temperatura ambiente. Nuevamente se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.2%. Finalmente para revelar se agregó el sustrato (solución de diaminobenzidina) durante aproximadamente 15 minutos en agitación a temperatura ambiente. Esta reacción se detuvo con agua corriente.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Identificación y selección de las clonas que presentan el tamaño del fragmento V_H expresado en la superficie del fago M13

A partir de las cajas en donde se sembraron las células transformadas con la mezcla de la ligación, se seleccionaron 6 colonias para verificar que el inserto estuviera presente. Para esto se les realizó un análisis de PCR usando los oligonucleótidos F8 y 5YSAET para amplificar el ADN del vector y ver la diferencia de tamaño en la construcción con respecto al control (b4.4).

Se identificaron las clonas que presentaban el tamaño esperado del inserto. El tamaño del fragmento V_H es de aproximadamente 340 pb, adicionando los oligonucleótidos de la región del vector amplificado (310 pb), por lo que se esperaba que el tamaño de la región amplificada fuera de aproximadamente 650 pb. En la figura 3, las bandas de los carriles 1 al 6 (clonas seleccionadas) se localizan a la altura de la banda de 700 pb, lo cual es aproximado al peso molecular esperado. En el control se utilizó el ADN de la clona b4.4, la cual es el scFv de la clona original, que presenta un tamaño de 800 bp.

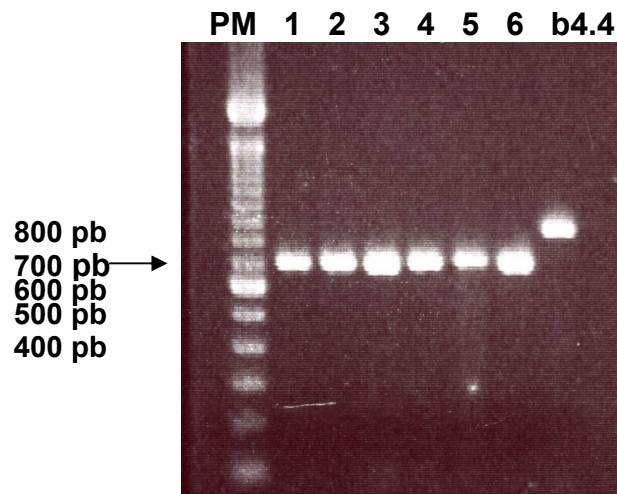


Figura 3. Análisis de PCR del ADN aislado de las clonas positivas, las bandas de los carriles 1 al 6 (clonas seleccionadas) se localizan a la altura de la banda de 700 pb, en contraste con el control que presenta un peso molecular de aproximadamente 800 pb.

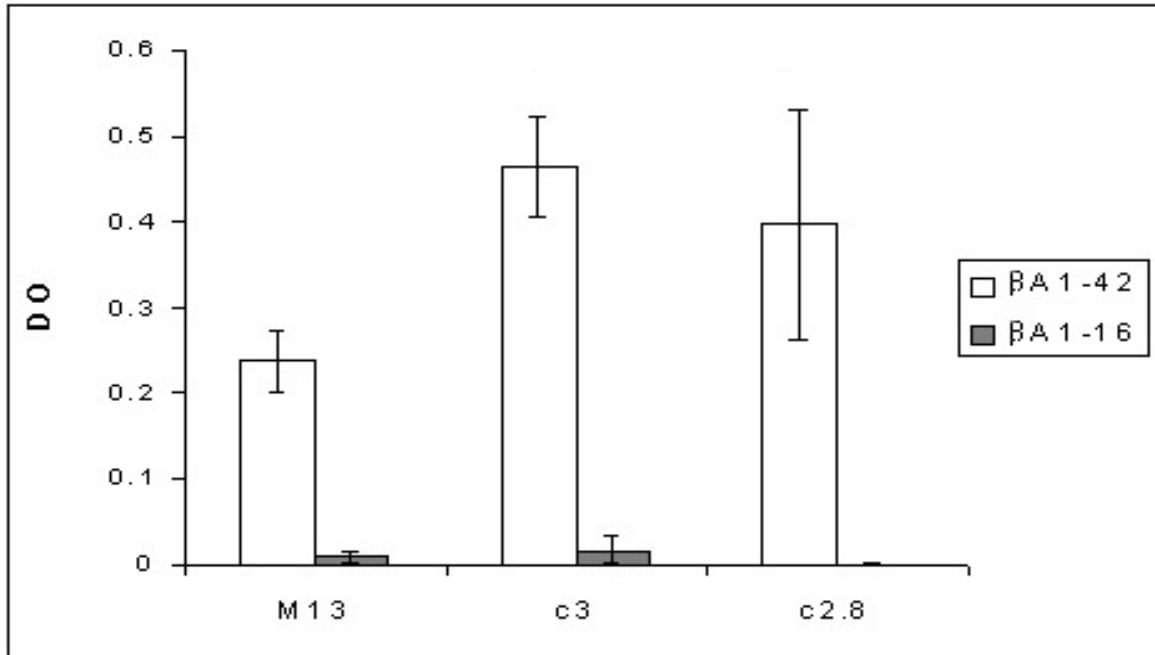
6.2 Análisis del fragmento V_H revela la conservación de la secuencia original

Para continuar con la caracterización de la construcción, se analizó la secuencia nucleotídica del inserto. Esta se alineó con la secuencia de la clona b4.4 expresado en bajo número de copias (Manoutcharian, 2004), se comprobó que la clona (C3) no presentaba cambios en la secuencia nucleotídica del fragmento V_H y que se encontraba dentro del marco de lectura con el gen gVIII que codifica para la proteína de fusión pVIII.

6.3 Reconocimiento del fragmento V_H hacia el péptido βA_{1-42}

Para evaluar el reconocimiento de la construcción hacia el péptido βA_{1-42} , se llevó a cabo un ensayo de ELISA, donde se utilizó como control negativo el fago silvestre M13 y como control positivo la clona C2.8. La clona C2.8 se obtuvo, en el laboratorio, de una biblioteca de V_H construida a partir de células de bazo de ratón inmunizado contra el péptido βA_{1-42} y que además esta expresada en alto número de copias. Ésta (C2.8) fue una de tres clonas que presentó mayor reactividad hacia el βA_{1-42} .

Para evaluar las diferencias de reconocimiento entre la clona C3 y los controles, se realizó un análisis estadístico de ANOVA “post hoc” de Turbey. En la gráfica se observa que la clona C3 reconoce más al péptido βA_{1-42} con respecto al control negativo (fago M13) e incluso mas que el control positivo que fue la clona C2.8, que es otro fragmento V_H fusionado a la proteína pVIII.



Gráfica 1. ELISA con fago fijo en placa. Se evaluó la clona C3, el fago M13 como el control negativo y la clona C2.8 como control positivo. Esto muestra que la clona C3 reconoce al βA_{1-42} biotinilado, mientras que no reconoce al βA_{1-16} biotinilado.

En estudios previos, se observó que la clona b4.4 reconoce al péptido βA_{1-28} , lo que indicaba que este scFv de anticuerpo reconoce un epítipo dentro de los primeros 28 aminoácidos del βA_{1-42} (Manoutcharian, 2004). Aunque no se evaluó el reconocimiento de la clona C3 por fragmentos del βA , en la clona a caracterizar (C3) se probó la unión con el péptido βA_{1-16} . Se observó que dicha clona no reconoció a éste fragmento del βA . Esto nos hace suponer que, de igual forma que el scFv original, reconoce un epítipo posterior a los primeros 16 aminoácidos.

Esta característica es importante debido a que se ha observado que al administrar anticuerpos monoclonales dirigidos a la región amino-terminal del péptido βA en ratones APP23 transgénicos, se presentaron efectos tales como microhemorragias (Pfeifer, et al., 2002). Adicionalmente, el uso de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que tengan como blanco un epítipo de la región media a la carboxilo-terminal del βA , tiene un alto potencial en estrategias de vacunación, debido a que se ha visto que las especies del péptido βA truncadas en la región amino-terminal

participan en la formación de fibrillas y exhiben una significativa actividad neurotóxica. (Pike, et al., 1995, Teplow, 1999)

6.3 La expresión del fragmento V_H en el fago M13 en alto número de copias confirmada por Inmunoblot y Tinción de Plata

Del análisis electroforético, una parte del gel se tiñó con Plata y a la otra parte se realizó un inmunoblot. Los fagos que se usaron fueron el fago M13 y la clona b4.4, donde scFv esta fusionado con pIII. El tamaño aproximado de la proteína recombinante es de 19 KDa, debido a que el peso molecular del fragmento V_H es de 13 kDa y el de la proteína pVIII es de 5.5 kDa.

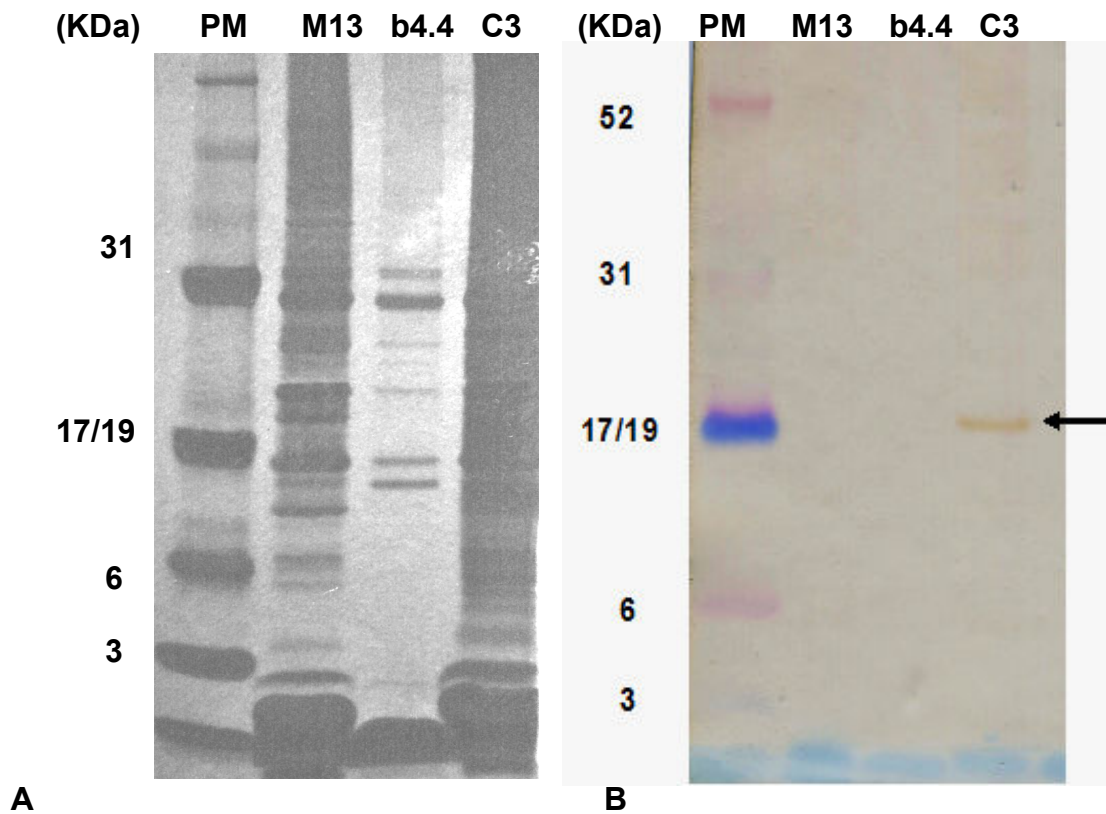


Figura 4. A) Tinción de plata en gel acrilamida (4%-12%), no se aprecia diferencia entre las bandas de proteínas de la clona C3 y los controles. B) Inmunoblot en membrana de nitrocelulosa, se observa una banda en el carril de C3 (línea 4), la cual expresa el fragmento V_H en la proteína pVIII.

En el caso de la tinción de Plata no se puede apreciar la banda de la proteína recombinante probablemente porque la expresión de ésta es baja, debido que la cantidad de proteína recombinante que se expresa es menor al 10% en proporción a la cantidad total de pVIII silvestre en el fago, 50-200 copias de pVIII recombinante por partícula fágica (Barbas, et al., 2001), y se requiere de un método de identificación de proteínas más sensible. Adicionalmente, las proteínas pVIII suelen ser inestables debido a la fusión de un inserto mayor a 100 residuos, esto disminuye la cantidad de proteína desplegada. La sobre-expresión de la proteína en el fago puede llegar a ser tóxico para la bacteria, generando así fagos inestables. (Sidhu, 2000)

Por otro lado en el inmunoblot se llevó a cabo una reacción específica con el complejo de estreptavidina – biotina (péptido biotinilado), ya que éste se unió al fragmento V_H . En el carril de la clona C3, se observa una única banda con un peso molecular entre 17-19 KDa, esta información nos indica que aunque la cantidad de proteína recombinante sea baja, se está expresando ésta.

Se sabe que los scFv anti-péptido βA_{1-42} son biomoléculas de gran interés en el desarrollo de nuevos terapéuticos para combatir la EA debido a que pueden actuar extracelularmente pero también intracelularmente como intracuerpos. En estudios anteriores, se comparó la unión de fragmentos de anticuerpo scFv y dominios V_H específicos para melanoma, sugiriendo que la biblioteca de V_H puede ser una fuente importante de clonas específicas dirigidas a tumores. Adicionalmente se ha caracterizado bioquímicamente y biofísicamente la proteína V_H , revelando que este dominio V_H presenta una alta afinidad sin la presencia del dominio V_L , además de mostrar una buena estabilidad monomérica (Cai, et al., 1997, Reiter, et al., 1999). Con la tecnología de despliegue en fago, usar un fragmento V_H que reconoce al péptido βA_{1-42} puede ser de gran interés terapéutico contra la Enfermedad de Alzheimer.

7. CONCLUSIONES

- i. En el presente estudio, se expresó la región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina (fragmento de V_H) como fusión a la proteína pVIII del fago M13, obteniendo así, una clona que expresa dicho fragmento en alto número de copias.
- ii. Se demostró que el fragmento V_H de un anticuerpo que reconoce al péptido βA_{1-42} , mantiene la capacidad de unión del scFv original.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectiva será evaluar la unión de esta clona con otros fragmentos del péptido βA en ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), así como la capacidad neuroprotectora de esta clona *in vitro* y en ratones. Debido a que esta clona expresa V_H en alto número de copias, se espera que la capacidad de impedir la agregación del péptido βA sea de igual o mayor efecto neuroprotector que presenta la clona b4.4. Además, éste fragmento de anticuerpo expresado en fago, podría ser de interés para uso terapéutico mediante inmunización pasiva en pacientes con la Enfermedad de Alzheimer.

9. BIBLIOGRAFÍA

Barbas III, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K., y Silverman G. J. Phage Display, A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Lab. Press.* 18.26-18.33. (2001)

Cai, X., y Garen, A. Comparison of fusion phage libraries displaying VH or single-chain FV antibody fragments derived from the antibody repertoire of a vaccinated melanoma patient as a source of melanoma-specific targeting molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 9261-9266. (1997)

Dewachter, L., y Van Leuven, F. Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's disease the prospects. *Lancet Neurol.* 1, 409-416 (2002).

Dickson, D. W. The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 321-339 (1997).

Frenkel, D., Katz, O., y Solomon, B. Immunization against Alzheimer's β -amyloid plaques via EFRH phage administration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 11455-11459. (2000)

Frenkel, D., Solomon, B. Filamentous phage as vector-mediated antibody delivery to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 5675-5679 (2002).

Frenkel, D., Dori, M y Solomon, B. Generation of anti-beta-amyloid antibodies via phage display technology. *Vaccine.* 22, 2505-2508 (2004).

Golde, T. E., y Younkin, S. G. Presenilins as therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.* 7, 264-269 (2001).

Golde, T. E. Alzheimer disease therapy: Can the amyloid cascade be halted? *J. Clin. Invest.* 111, 11-18 (2003).

Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 136, 557-580 (1983).

Hanahan, D. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In *DNA Cloning, Volume I, a practical approach* (Glover, D.M.; Hrsg.), S. 109-135. Oxford. (1985).

Hardy, J. Selkoe, D. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 297. 353-356 (2002).

Hassan, M. E., Azzazy, W. y Highsmith, E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry*. 35, 425-455 (2002).

Hock, C., Konierzko, U., Streffer, J. R., Tracy, J., Signorell, A., Müller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E., Garcia, E., Wollmer, M. A., Umbricht, D., De Quervain, D. J. F., Hofmann, M., Maddalena, A., Papassotiropoulos, A., y Nitsch, R. M. Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron*. 38, 547-554 (2003).

Hoozemans, J. J., Veehuis, R., Rozemuller, A. J. R., y Eikelenboom, P. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase in Alzheimer's disease. *Curr. Drug Targets*. 4, 461-468 (2003).

Huston, J. S., McCartney, J., Tai, M. S., Mottola-Hartshorn, C., Jin, D., Warren, F. Keck, P., y Oppermann, H. Medicar applications of single-chain antibodies. *Int. Rev. Immunol*. 216, 165-181. (1993)

Jacobsson, K., Fykberg, L. Shotgun phage display cloning. *Comb. Chem. & High Through. Screening*. 4, 135-143 (2001)

Klein, W., Kraft, G., y Finch, C. Targeting small A β oligomeros: the solution to an Alzheimer disease conundrum? *Trends in Neurosci*. 24, 219-224 (2001).

Lazarov, O., Lee, M., Peterson, D. A. y Sisodia, S. S. Evidence that synaptically released beta- amyloid accumulates as extracellular deposits in the hippocampus of transgenic mice. *J. Neurosci.* 22, 9785-9793 (2002).

Leissiring, M. A., Murphy, M. P., Mead, T. R., Akbari, Y. Sugarman, M. C., Jannatipour, M., Anliker, B., Müller, U., Saftig, P., De Strooper, B., Wolfe, M. S., Golde, T. E., y LaFerla, F. M. A physiologic signaling role for the gamma-secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 4697-4702 (2002).

Lorenzo, A., Yuan, M., Zhang, Z., Paganetti, P., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Mautino, J., Sol, F., Sommer, B., y Yankner, B. Amyloid β interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience.* 5, 460-464 (2000).

Lue, L. F., Walter, D. G., Modeling Alzheimer's disease immune therapy mechanisms: interactions of human postmortem microglia with antibody-opsonized amyloid- β peptide. *J. Neurosci. Res.* 70, 599-610 (2002).

Manoutcharian, K., Gevorkian, G., Cano, A., y Almagro, J. C. Phage Displayed biomolecules as preventive and therapeutic agents. *Curr. Pharma. Biotech,* 2, 217-223. (2001).

Manoutcharian, K., Acero, G., Munguia, M. E., Montero, J. A., Govezensky, T., Cao, C., Ugen, K y Gevorkian, G. Amyloid-beta peptide-specific single chain Fv antibodies isolated from immuned phage display library. *J. Neuroimmunol.* 145, 12-17 (2003).

Manoutcharian, K., Acero, G., Munguía, M. E., Becerril, B., Massieu, L., Govezensky, T., Ortiz, E., Marks, J. D., Cao, C., Ugen, K y Gevorkian, G. Human

single chain Fv antibodies and complementarity determining region derived peptide binding to amyloid-beta 1-42. *Neurobiol. Dis.* 17, 114-121 (2004).

Mattson, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer disease. *Nature.* 430, 631-639 (2004).

Morgan, C., Colombres, M., Nuñez, M. T y Inestrosa, N. C. Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 74, 323-349 (2004).

Pfeifer, M., Boncristiano, S., Bondolfi, L., Stalder, A., Sèller, T., Staufenbiel, M., Mathews, P. M. Jucker, M. Cerebral hemorrhage after passive anti-A β immunotherapy. *Science.* 298, 1379. (2002).

Pike, c. M., Overman, M. J., y Cotman, C. W. Amino-terminal deletions enhance aggregation of β -Amyloid peptides *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 270, 23895-23898. (1995)

Reiter, Y., Schuck, P., Boyd, L. F., y Piaksin, D. An antibody single-domain phage display library of functional single-domain VH molecules with a unique interface. *J. Mol. Biol.* 290, 685-698. (1999)

Ritchie, C. W. Bush, A. I., Mackinnon, A., Macfarlane, S., Mastwyk, M., MacGregor, L., Kiers, L., Chery, R., Li, O. X., Tammer, A., Carrington, D., Mauros, C., Volitakis, I., Lilianas, M., Ames, D., Davis, S., Beyreuther, K., Tanzi, R. E., y Masters, W. Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Arch. Neurol.* 60, 1685-1691 (2003).

Sambrook, J y Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning. A laboratory manual. 3rd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* N. Y. 1.105-1.108, 1.25-1.26.

Sanger, F., Niklen, S., y Coulson, A. R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 74, 5463-5467. (1977).

Selkoe, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiol. Rev.* 81, 741-766 (2001).

Selkoe, D. J. y Schenk, D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 545-584 (2003).

Shenk, D., Barbour, R., Whitney, D., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Jonson-Wood, K., Kholodendo, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandervert, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., y Seubert, P. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature.* 400, 173-177 (1999).

Sidhu, S. S., Weiss, G. A., y Wells, J.A. High copy display of large proteins on phage for functional selections. *J. Mol. Biol.* 296, 487-495. (2000)

Sidhu, S. S. Engineering M13 for phage display. *Biomolecular Engineering.* 18, 57-63. (2001).

Solomon, B. Generation of anti- β -amyloid antibodies via phage display technology towards Alzheimer's disease vaccination. *Vaccine.* 23, 2327-2330 (2005).

Teplow, D. B. Truncating the amyloid cascade hypothesis: the role of C-terminal A β peptides in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 20, 71-73 (1999).

Vickers, J., Dickinson, R., Adlard, P., Saunders, H., King, C., y McCormack, G. The cause of neural degeneration in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 60. 139-165 (2000)

Weiner, H. L. y Frenkel, D. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 404-416 (2006)

<http://www.alz.org>

<http://www.innn.edu.mx>

10. APENDICE

Medios de cultivo y soluciones

Bromuro de Etidio

- Bromuro de Etido 1 μ g
- H₂O 1L

Disolver y almacenar en un recipiente cerrado a temperatura ambiente.

Buffer Salino de Fosfatos PBS 10 x

- NaCl 80 g
- Na₂HPO₄ 14.4 g
- KH₂PO₄ 2.4 g
- KCl 2 g
- H₂O 1L

Ajustar el pH a 7.4 con HCl y almacenar.

Gel de agarosa 0.8 %

- Agarosa 0.8 g
- TBE 1x 100 g

Calentar la mezcla hasta que se funda totalmente la agarosa.

LB (Luria Bertani)

- Bactotripton 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- NaCl 5 g
- H₂O 1 L

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente

Medio YT 2x

- Bactotriptona 16 g
- Extracto de levadura 10 g
- NaCl 5 g
- H₂O 1 L

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente

Medio SOB

- Triptona 20 g
- Extracto de levadura 5.0 g
- NaCl 0.5 g
- KCl 186 mg

Mezclar la solución hasta que se disuelva y ajustar el pH a 7.0 con NaOH. Ajustar el volumen a 1 L. Esterilizar por autoclave. Alternativamente, cuando este frío, se le agrega 10 mL de MgCl₂ 1 M estéril.

Medio SOC

- Medio SOB 98 mL
- Mg²⁺ 2M 1 mL
- Glucosa 1 mL

Alicuotar y almacenar a temperatura ambiente

PEG/NaCl

- 20% (w/w) polietilenglicol 8000
- 2.5 M NaCl

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente.

TBE (tris-Borate-EDTA) 5x

- Tris-HCl 60.5 g
- Acido bórico H₃BO₃ 31 g
- Na₂EDTA-2H₂O 3.7

Disolver los ingredientes en 900 mL de H₂O purificada, mezclar y aforar a 1L.
Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente.

Tris-buffered saline (TBS)

- 50 mM tris-HCl (pH 7.5)
- 150 mM NaCl

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente.

Top agar

- Bactotriptona 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- NaCl 5 g
- MgCl₂-6H₂O 1 g
- Agarosa 7 g
- H₂O 1 L

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente

TFB-I (500 mL)

- C₂H₃COOK 0.147 g
- RbCl 0.604 g
- MnCl 0.494 g
- CaCl₂ 0.074 g
- Glicerol al 15% 7.5 g

Ajustar a pH 5.8 con ácido acético y esterilizar por filtración.

TFB-II (500 mL)

- MOPS 10 mM 1.04 g
- CaCl₂ 75 mM 5.50 g
- RbCl 10 mM 0.60 g
- Glicerol 15% 75.0 g

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH y esterilizar por filtración.

Geles de poliacrilamida

Stock de poliacrilamida (30 %)

- Acrilamida 30 g
- Bis-acrilamida 0.8 g
- Aforar con H₂O a 100 mL

Disolver y filtrar por 0.45 μm, guardar en un frasco ámbar y a 4°C.

Persulfato de Amonio al 10 % (PSA)

- (NH₄)₂S₂O₈ 0.1 g
- H₂O 1 mL

Este reactivo se prepara en el momento de elaborar el gel .

Gel de poliacrilamida para secuenciar

- Urea 39.6 g
- Stock de poliacrilamida 16 mL
- TBE 10 x 8 mL
- H₂O milliQ 26.4 mL

Una vez disuelto lo anterior, se agregan 675 μL de APS (10%) y 25 μL de TEMED. Se mezcla y se vacía esta solución rápidamente entre los vidrios de secuenciación, para que gelifique.

Tinción de plata

Solución fijadora (Para una solución de 60 mL):

- CH₃OH 50% 30 mL
- CH₃COOH 12% 7.2 mL
- H₂O milli Q 38% 22.8 mL
- HCOOH 30 μL

Solución de lavado

- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 30% 40 mL
- H_2O milliQ 80 mL

Solución de pre-tratamiento o de tiosulfato

- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 mg
- H_2O milliQ 50 mL

Revelador

- Na_2CO_3 3.6 g
- HCOH 30 μL
- H_2O 60 mL
- Sol. de tiosulfato 1.2 mL

Solución de plata

- AgNO_3 (0.54 g/3 mL) 333.3 μL
- HCOH 22.5 μL
- H_2O 30 mL

Solución de paro

- CH_3OH 30 mL
- CH_3COOH 7.2 mL
- H_2O 22.8 mL

Inmunoblot

Buffer de transferencia

Mezclar 1.46g de glicina (39 mM), 2.9 g de Tris base (48 mM), y 0.19 g de SDS (0.04%), agregar 100 mL de metanol. Llevar a 500 mL con H_2O milliQ. No es necesario ajustar el pH.

Solución de diaminobenzidina

- H_2O_2 10 μL
- Diaminobenzidina pizca
- H_2O 10 mL