

ÍNDICE

ABREVIATURAS.	1
I. INTRODUCCIÓN.	5
1. PLAGUICIDAS.	7
2. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS.	10
2.1. Métodos cromatográficos.	10
2.2. Métodos inmunológicos.	11
3. ELISA DE PLAGUICIDAS: CONCEPTOS BÁSICOS.	14
3.1. Haptenos y conjugados.	14
3.2. Formatos de ELISA.	15
3.3. Heterología.	16
4. LOS ANTICUERPOS: HERRAMIENTAS INMUNOANALÍTICAS.	18
4.1. Estructura del anticuerpo.	19
4.2. Estructura del anticuerpo recombinante.	20
5. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES.	22
5.1. Construcción de bibliotecas de anticuerpos recombinantes.	24
5.1.1. Obtención de mRNA.	25
5.1.2. Síntesis de la primera cadena de cDNA.	26
5.1.3. Amplificación de las cadenas variables V_H y V_L	27
5.1.4. Formación de fragmentos scFv mediante ensamblaje de las cadenas variables V_H y V_L	27
5.1.5. Clonación del fragmento recombinante y transformación.	28
5.2. Selección de anticuerpos recombinantes mediante su expresión en la superficie de fagos (phage display).	29
5.2.1. El fago M13.	29
5.2.1.1. El genoma del fago.	30
5.2.1.2. Estructura del fago filamentoso.	31
5.2.1.3. Ciclo infectivo del fago filamentoso.	32
5.2.2. Expresión de proteínas foráneas en la superficie de fagos filamentosos.	34
5.2.2.1. Tipos de vectores.	34
5.2.3. Enriquecimiento de bibliotecas: <i>biopanning</i>	38
5.2.4. Análisis de fagos recombinantes.	41
5.3. Expresión de anticuerpos recombinantes.	42
6. APLICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS RECOMBINANTES AL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS.	44

7.FUNGICIDAS AZÓLICOS.	47
7.1. Generalidades.	47
7.2. Tetraconazol, hexaconazol e imazalil.	49
8.DETERMINACIÓN DE FUNGICIDAS AZÓLICOS.	54
8.1. Determinación de fungicidas azólicos mediante técnicas cromatográficas.	54
8.2. Determinación de fungicidas azólicos mediante ELISA.	56
9.OBJETIVOS.	57
II. MATERIALES Y MÉTODOS.	59
1.REACTIVOS E INSTRUMENTOS.	61
2.PREPARACIÓN DE CONJUGADOS Y OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.	64
3.OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES.	66
3.1. Construcción de bibliotecas de AcRbs a partir de hibridomas.	68
3.1.1. Extracción de mRNA y síntesis de cDNA.	68
3.1.1.1. Precipitación de mRNA con etanol.	68
3.1.2. Síntesis de la cadena ligera y la cadena pesada.	69
3.1.3. Construcción del fragmento de anticuerpo recombinante scFv.	69
3.1.4. Clonación del fragmento scFv en el vector pAK100.	70
3.1.4.1. Precipitación de DNA con etanol.	70
3.1.4.2. Preparación de células electrocompetentes.	71
3.1.4.3. Transformación de células electrocompetentes.	71
3.2. Construcción de bibliotecas de AcRbs a partir de linfocitos.	72
3.2.1. Extracción de mRNA y síntesis de cDNA.	72
3.2.2. Síntesis de la cadena ligera y la cadena pesada.	73
3.2.3. Construcción y clonación del fragmento scFv.	73
3.3. Detección de clones positivos mediante ELISA de fagos.	74
3.3.1. Recuperación de fagos.	74
3.3.2. ELISA de fagos.	75
3.4. Detección de clones positivos mediante ELISA de fracción soluble.	75
3.5. Enriquecimiento de bibliotecas (<i>panning</i>).	76
3.5.1. Producción de fagos recombinantes.	76
3.5.2. Enriquecimiento de bibliotecas utilizando placas de ELISA como soporte sólido.	76
3.5.3. Enriquecimiento de bibliotecas utilizando partículas magnéticas como soporte sólido.	77
3.5.3.1. Inmovilización covalente de los conjugados a las partículas magnéticas.	77
3.5.3.2. Selección de fagos por elución específica.	77

3.6. Producción de fragmentos solubles de AcRb.	78
3.6.1. Producción de fragmentos solubles como proteínas de fusión scFv-pIII.	78
3.6.2. Producción de fragmentos solubles como proteínas libres scFv.....	79
3.6.2.1. Preparación de células competentes mediante CaCl ₂	79
3.6.2.2. Transformación de células competentes.	80
3.7. Determinación de la secuencia de los fragmentos scFv.	80
4. INMUNOENSAYOS (ELISA).	81
4.1. Preparación de las disoluciones estándar.	81
4.2. Condiciones generales de los inmunoensayos.....	82
4.2.1. ELISA con anticuerpos monoclonales.....	82
4.2.2. ELISA con anticuerpos recombinantes.....	83
4.2.3. Determinación de las condiciones óptimas de los inmunoensayos....	85
5. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS INMUNOENSAYOS.....	87
5.1. Parámetros de las curvas competitivas estándar.....	87
5.2. Estimación de la reactividad cruzada.	88
6. ANÁLISIS DE ZUMOS.	89
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	91
1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES A PARTIR DE HIBRIDOMAS.	93
1.1. Construcción de bibliotecas.....	93
1.2. Estudio del método de cribado y selección de clones positivos.	96
1.3. Enriquecimiento de las bibliotecas mediante <i>panning</i>	98
2. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES A PARTIR DE LINFOCITOS DE RATONES INMUNIZADOS.....	100
2.1. Construcción de bibliotecas.....	100
2.2. Enriquecimiento de las bibliotecas mediante el proceso de <i>panning</i>	108
2.2.1. Enriquecimiento de la biblioteca de tetraconazol: <i>panning</i> en pocillos de placa ELISA.	108
2.2.2. Estudio de diferentes condiciones de <i>panning</i>	110
2.2.3. Enriquecimiento de la biblioteca de hexaconazol mediante el proceso de <i>panning</i> en soporte de partículas magnéticas.	114
2.2.4. Enriquecimiento de la biblioteca de imazalil mediante el proceso de <i>panning</i> en soporte de partículas magnéticas.....	116
3. EXPRESIÓN DE FRAGMENTOS SOLUBLES scFv Y PROTEÍNAS DE FUSIÓN scFv-pIII.	117

4. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS ANTICUERPOS RECOMBINANTES FRENTE A TETRACONAZOL.	119
5. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE LOS INMUNOENSAYOS.	122
5.1. Inmunoensayos con anticuerpos monoclonales.	122
5.1.1. Determinación de las concentraciones óptimas de los inmunorreactivos.	122
5.1.2. Influencia del detergente.	124
5.1.3. Influencia de la fuerza iónica.	126
5.1.4. Influencia del pH.	129
5.1.5. Tolerancia a disolventes orgánicos.	132
5.2. Inmunoensayos con anticuerpos recombinantes.	135
6. COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LOS ANTICUERPOS RECOMBINANTES Y DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.	139
6.1. Parámetros analíticos del ensayo.	139
6.2. Estudio de la especificidad de los inmunoensayos.	144
6.3. Recapitulación.	150
7. APLICACIÓN DE LOS INMUNOENSAYOS AL ANÁLISIS DE LOS PLAGUICIDAS EN MUESTRAS FORTIFICADAS.	154
7.1. Determinación de tetraconazol en zumos de fruta.	154
7.2. Determinación de hexaconazol en zumos de fruta.	158
7.3. Determinación de imazalil en zumos de fruta.	161
7.4. Recapitulación.	164
IV. CONCLUSIONES.	167
V. BIBLIOGRAFÍA.	171
APÉNDICE I: Publicaciones derivadas de la tesis.	189