



Tesina de grado - Licenciatura en Cs. Biológicas

GENERACIÓN DE BIBLIOTECAS MEDIANTE GOLDEN GATE Y SELECCIÓN DE NANOBODIES PARA INMUNOENSAYOS

Kevin Karlen

Tutora: Mag. Paula Segovia
Co-tutor: Dr. Gualberto González

Montevideo - Uruguay
2025

RESUMEN

En esta tesina se evaluó la implementación de una estrategia de clonado mediante Golden Gate para la generación de bibliotecas de nanobodies presentados en fagos filamentosos. Mediante esta estrategia, se generó una biblioteca a partir de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de una llama inmunizada con distintos antígenos. Para evaluar la funcionalidad de la biblioteca, se realizó una búsqueda de clones que pudieran tener utilidad como herramientas analíticas para la vigilancia de microcistinas en agua.

Las microcistinas (MCs) son toxinas producidas por cianobacterias de relevancia sanitaria y ambiental, por su potencial impacto en la calidad del agua y la salud pública. Desde el punto de vista analítico, son moléculas pequeñas y químicamente diversas, con numerosas variantes, y suelen encontrarse a bajas concentraciones en matrices ambientales. Por este motivo, el desarrollo de alternativas prácticas para su detección constituye un desafío vigente. A partir del inmunoensayo competitivo en formato ELISA disponible en el Laboratorio de Inmunología del Instituto de Higiene basado en el nanobody A2 (NbA2), se planteó avanzar hacia un formato no competitivo sustentado en el reconocimiento del inmunocomplejo NbA2/MC, uno de los antígenos incluidos en la inmunización, con el fin de evitar limitaciones inherentes al fenómeno de competencia tales como la necesidad de un ajuste exhaustivo de las concentraciones de reactivos y la fuerte dependencia del tiempo de reacción.

La estrategia de selección de nanobodies incluyó una etapa de pre-adsorción para depletar clones que reconocieran NbA2 libre, y tras dos rondas de panning se logró identificar un clon anti-inmunocomplejo, NbK3, que no presentó reactividad cruzada con NbA2 libre. El nanobody se expresó y purificó, fue caracterizado por ELISA y por interferometría de biocapa, determinándose una constante de afinidad (K_D) de $1,05 \times 10^{-8}$ M.

Con NbK3 como reactivo de detección se desarrolló un ELISA no competitivo. La optimización evidenció el impacto de la estrategia de inmovilización, determinándose que la captura orientada de NbA2 biotinilado sobre estreptavidina redujo el SC_{50} ~6 veces respecto a la adsorción directa, y se ajustaron condiciones como la concentración del reactivo de detección y el buffer de dilución de muestra para maximizar la señal específica y adaptar el ensayo a la detección en muestras de agua.

El ensayo presentó reactividad cruzada elevada con variantes frecuentes y menor reconocimiento de congéneres más hidrofóbicos, delimitando el reporte como equivalentes de MC-LR, la variante empleada para la curva de calibración. En matrices fortificadas, las recuperaciones a 0,1 µg/L fueron variables con promedio cercano a 100%, y la precisión intra- e inter-ensayo se mantuvo dentro de los rangos aceptados presentando coeficientes de variación $\leq 15\%$. En conjunto, los resultados sustentan la viabilidad del enfoque anti-inmunocomplejo propuesto para el desarrollo de un ensayo no competitivo, y deja planteadas las etapas necesarias para su consolidación y transferencia a formatos más accesibles para su uso en campo.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	1
Abreviaturas	6
1. Introducción	12
1.1. Anticuerpos convencionales y anticuerpos de cadena pesada de camélidos.....	12
1.2. Dominios VHH y nanobodies: propiedades estructurales y aplicaciones.....	14
1.3. Tecnologías de selección y presentación: phage display y bibliotecas de Nbs	15
1.3.1. Proceso de Selección mediante panning	16
1.3.2. Generación de Biblioteca de Nanobodies.....	18
1.3.3. Clonado Golden Gate	19
1.4. Inmunoensayos para la detección de haptenos	22
1.4.1. Formatos competitivos.....	22
1.4.2. Formatos no competitivos y anticuerpos anti-inmunocomplejo.....	24
1.5. Microcistinas.....	25
1.5.1. Variantes estructurales y mecanismos de toxicidad.....	25
1.5.2. Impacto ambiental y sanitario.....	26
1.5.3. Métodos de detección de microcistinas e inmunoensayos basados en nanobodies.....	26
2. Objetivos	28
2.1. Objetivo general.....	28
2.2. Objetivos específicos.....	28
3. Materiales y Métodos.....	29
3.1 Buffers, soluciones y reactivos	29
3.2 Medios de cultivo	30
3.3 Cepas bacterianas, vectores y fagos.....	30

3.3.1 Cepas de <i>Escherichia coli</i>	30
3.3.2 Vectores plasmídicos	30
3.4. Protocolos generales	31
3.4.1. Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	31
3.4.2 Preparación de células electro-competentes.....	31
3.4.3. Transformación	32
3.4.4. Extracción de ADN plasmídico.	32
3.4.5. Secuenciación y análisis de las secuencias	32
3.4.6. Cuantificación de ADN y proteínas	32
3.4.7. Electroforesis en gel de agarosa	33
3.4.8. Electroforesis SDS-PAGE	33
3.4.9. ELISA	33
3.4.10. Análisis de datos y Generación de imágenes.....	34
3.5. Construcción de biblioteca de nanobodies	34
3.5.1. Inmunización y obtención de PBMC.....	34
3.5.2. Síntesis de ADNc y amplificación de genes VHH	35
3.5.3. Modificación del vector pComb3XSS para la generación de pCombGG.....	35
3.5.4. Clonado de la biblioteca mediante Golden Gate Assembly.....	37
3.5.5. Construcción de la biblioteca de fagos	38
3.6. Selección de nanobodies específicos contra el inmunocomplejo NbA2/MC	40
3.6.1. Panning.....	40
3.6.2. Titulación de fagos	42
3.6.3. Screening de clones anti-inmunocomplejo NbA2/MC mediante ensayos de ELISA	42
3.7. Expresión y purificación de los nanobodies seleccionados.....	43

3.7.1. Optimización de condiciones mediante expresión a pequeña escala	43
3.7.2. Expresión de nanobodies a mayor escala	44
3.7.3. Purificación de nanobodies mediante cromatografía de afinidad.....	44
3.8. Caracterización funcional de los nanobodies purificados.....	45
3.8.1. Evaluación de la especificidad por ELISA	45
3.8.2. Determinación de constantes cinéticas por BLI	47
3.9 Desarrollo y evaluación del desempeño analítico del inmunoensayo no competitivo	48
3.9.1. Optimización del inmunoensayo para la Detección de Microcistina en Muestras de Agua	48
3.9.2. Evaluación de la reactividad cruzada frente a otras variantes de MC	49
3.9.3. Recuperación en muestras de agua	50
3.9.4. Evaluación de la precisión del inmunoensayo (intra- e inter-ensayo)	51
4. Resultados y Discusión.....	52
4.1. Construcción de la biblioteca de fagos utilizando clonado Golden Gate	52
4.1.1. Evaluación de la eficiencia del clonado mediante golden gate	52
4.1.2. Optimización de las condiciones de Golden Gate	54
4.1.3 Caracterización de la biblioteca Golden Gate y comparación con la biblioteca convencional.....	55
4.2. Selección de clones anti-inmunocomplejo NbA2/MC.....	57
4.2.1. Panning y enriquecimiento de clones anti-inmunocomplejo.....	57
4.2.2. Screening de clones por ELISA y selección de NbK3	58
4.2.3 Secuenciación de los clones positivos	61
4.3 Expresión y purificación de nanobodies	62
4.3.1 Optimización de condiciones mediante expresión a pequeña escala	62
4.3.2 Escalado de la producción de nanobodies	64

4.4 Caracterización funcional de los Nbs seleccionados frente al inmunocomplejo NbA2/MC.....	65
4.4.1 Determinación de la especificidad de los Nbs producidos	65
4.4.2 Determinación de constantes cinéticas por interferometría de biocapa.....	69
4.5 Desarrollo y evaluación del desempeño analítico de un inmunoensayo no competitivo para la detección de microcistinas.....	70
4.5.1 Optimización de las condiciones del inmunoensayo	70
4.5.2. Evaluación de la reactividad cruzada frente a diferentes variantes de microcistina	74
4.5.3 Detección y cuantificación de MC-LR en muestras de agua ambientales	75
4.5.4 Precisión intraensayo e interensayo del método.....	77
5. Conclusiones y perspectivas	79
6. Referencias	81

ABREVIATURAS

4PL	Modelo logístico de cuatro parámetros (ajuste de curvas de calibración).
ADDA	Residuo 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienoico (aminoácido característico de microcistinas).
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	ADN copia obtenido por retrotranscripción.
ARN	Ácido ribonucleico.
BI	Buffer de interferencia.
BL21(DE3)	Cepa de <i>E. coli</i> para expresión inducible (promotor T7/lac).
BLI	Interferometría de biocapa (Bio-Layer Interferometry).
BSA	Albúmina sérica bovina (proteína de bloqueo/diluyente).
CDR	Región determinante de complementariedad (Complementarity-Determining Region).
CDR1	Región determinante de complementariedad 1.
CDR3	Región determinante de complementariedad 3.
CV	Coeficiente de variación.
DB3.1	Cepa de <i>E. coli</i> utilizada para mantenimiento de vectores con ccdB.

DE	Desviación estándar.
DTT	Ditiotreitol (agente reductor).
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (agente quelante).
ELISA	Ensayo inmunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).
ER2738	Cepa de <i>E. coli</i> empleada para amplificación/producción de fagos (<i>phage display</i>).
Fab	Fragmento de unión a antígeno (fragment antigen-binding).
FR	Región framework (marco estructural del dominio variable).
GG	Golden Gate (estrategia de clonado por enzimas tipo IIS).
HA	Epítoto/tag HA (hemaglutinina) para detección/purificación.
HcAb	Anticuerpo de cadena pesada (heavy-chain antibody).
HcAbs	Anticuerpos de cadena pesada.
IgG	Inmunoglobulina G.
IgNAR	Inmunoglobulina de nuevo receptor de antígeno (tiburones).
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (inductor del operón <i>lac</i>).
K _D	Constante de afinidad.

kDa	Kilodalton (unidad de masa molecular).
k _{off}	Constante de disociación.
k _{on}	Constante de asociación.
LB	Medio Luria-Bertani.
LOD	Límite de detección.
LOQ	Límite de cuantificación.
M13K07	Fago helper M13K07.
MC	Microcistina.
MCs	Microcistinas (conjunto/variantes).
MC-LA	Variante de microcistina: Leu-Ala.
MC-LF	Variante de microcistina: Leu-Phe.
MC-LR	Variante de microcistina: Leu-Arg.
MC-LW	Variante de microcistina: Leu-Trp.
MC-RR	Variante de microcistina: Arg-Arg.
MC-YR	Variante de microcistina: Tyr-Arg.
mM	Milimolar.

nM	Nanomolar.
Nb	Nanobody.
NbA2	Nanobody A2.
NbA2/MC	Inmunocomplejo formado por NbA2 unido a microcistina.
NbA2Bt	NbA2 biotinilado.
NbK2	Nanobody candidato K2
NbK3	Nanobody candidato K3 y seleccionado como reactivo de detección.
Nb-pIII	Fusión nanobody-pIII (proteína de cápside del fago M13).
Nbs	Nanobodies (plural).
OmpA	Péptido señal OmpA (direccionamiento al periplasma).
PaqCI	Endonucleasa tipo IIS PaqCI (clonado Golden Gate).
PBS	Buffer fosfato salino.
PBS-T	PBS con Tween 20 (buffer de lavado).
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica (Peripheral Blood Mononuclear Cells).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.

PEG	Polietilenglicol.
pComb3XSS	Vector fagémido pComb3XSS.
pCombGG	Vector fagémido pCombGG (adaptado para Golden Gate).
pINQ-HA	Vector de expresión pINQ con tag HA.
pIII	Proteína pIII del fago filamentoso M13.
PO	Peroxidasa.
rpm	Revoluciones por minuto.
SB	Medio SB (Super Broth) para cultivo/amplificación.
SC ₅₀	Concentración de saturación 50% (punto medio de la curva 4PL).
scFv	Fragmento variable de cadena única (single-chain variable fragment).
SDS	Dodecil sulfato de sodio (sodium dodecyl sulfate).
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.
SfiI	Endonucleasa de restricción SfiI.
SOC	Medio SOC (recuperación post-transformación).
TAE	Buffer Tris-acetato-EDTA.

TBS	Buffer Tris-salina (Tris-buffered saline).
TES	Buffer TES (Tris-EDTA-sacarosa).
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina (sustrato cromogénico de peroxidasa).
Tween 20	Polisorbato 20 (detergente no iónico).
UFC	Unidades formadoras de colonias.
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro.
V-NAR	Dominio variable de IgNAR.
VH	Dominio variable de cadena pesada (anticuerpos convencionales).
VHH	Dominio variable de HcAbs (nanobodies).
µg/L	Microgramos por litro.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTICUERPOS CONVENCIONALES Y ANTICUERPOS DE CADENA PESADA DE CAMÉLIDOS

Los anticuerpos son herramientas moleculares clave en inmunología, biotecnología y en la práctica clínica. El desarrollo de tecnologías de descubrimiento e ingeniería de anticuerpos revolucionó tanto el diagnóstico como el abordaje terapéutico de numerosas patologías. En vertebrados, los anticuerpos convencionales corresponden mayoritariamente a inmunoglobulinas de clase IgG y se organizan como moléculas heterotetraméricas formadas por dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L). La diversidad del repertorio se genera mediante la recombinación de distintos segmentos génicos que originan los dominios variables de ambas cadenas, VL y VH ¹. Desde la descripción de los anticuerpos monoclonales en 1975 ², estos formatos han sustentado el desarrollo de múltiples ensayos inmunológicos, biosensores y terapias.

En 1993, el descubrimiento de una nueva clase de inmunoglobulinas carentes de cadenas livianas en animales camélidos introdujo una alternativa atractiva a los anticuerpos convencionales ³. Estas moléculas, denominadas anticuerpos de cadena pesada (HcAbs), están compuestas únicamente por homodímeros de cadenas pesadas sin comprometer su funcionalidad y conservando su capacidad de reconocer una gran variedad de antígenos con alta afinidad ⁴. Este hallazgo permitió una nueva perspectiva sobre la generación de diversidad y reconocimiento antigénico en el sistema inmune ⁵.

La existencia de HcAbs se constató inicialmente en la familia de los camélidos, que incluye llamas, alpacas y dromedarios. Investigaciones posteriores revelaron que la presencia de anticuerpos carentes de cadena liviana no es exclusiva de este grupo, sino que surgió de forma independiente al menos en otro linaje, constituyendo un ejemplo de evolución convergente ⁶. En peces cartilaginosos, particularmente en la subclase de los elasmobranquios (tiburones y rayas), se han descrito anticuerpos funcionalmente análogos, también desprovistos de cadenas livianas. Estos anticuerpos, conocidos como inmunoglobulinas de nuevo receptor de antígeno (IgNAR), poseen un dominio variable denominado V-NAR. Filogenéticamente, la aparición de las IgNAR es un evento evolutivo antiguo, mientras que los HcAbs de camélidos surgieron mucho más recientemente. A pesar de sus orígenes temporales y linajes evolutivos dispares, tanto los VHH de camélidos como los V-NAR de elasmobranquios han convergido en soluciones estructurales similares para lograr el reconocimiento de antígenos mediante un único dominio variable ⁷.

Una diferencia estructural clave de los HcAbs es la ausencia del dominio CH1 en la cadena pesada, esencial en anticuerpos convencionales para anclar la cadena liviana ⁸. En camélidos, mutaciones puntuales en el sitio de *splicing* del exón CH1 conducen a su

exclusión del ARNm ⁹ (**figura 1**). La pérdida de CH1 impide la asociación con la cadena liviana y obliga al dominio variable de la cadena pesada (VHH) a ser autónomo.

El dominio VHH presenta una organización estructural similar a la del dominio variable de los anticuerpos convencionales (VH), ya que está conformado por cuatro regiones framework (FR) y tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs). Sin embargo, existen diferencias importantes que lo distinguen. Una de ellas es la sustitución de ciertos residuos conservados, que en los anticuerpos convencionales participan en la interacción con la cadena liviana, por residuos más hidrofílicos que favorecen la solubilidad del dominio. En particular, se observa el reemplazo de Val42, Gly49, Leu50 y Trp52 por Phe/Tyr42, Glu49, Arg/Cys50 y Gly52, respectivamente ^{10,11}.

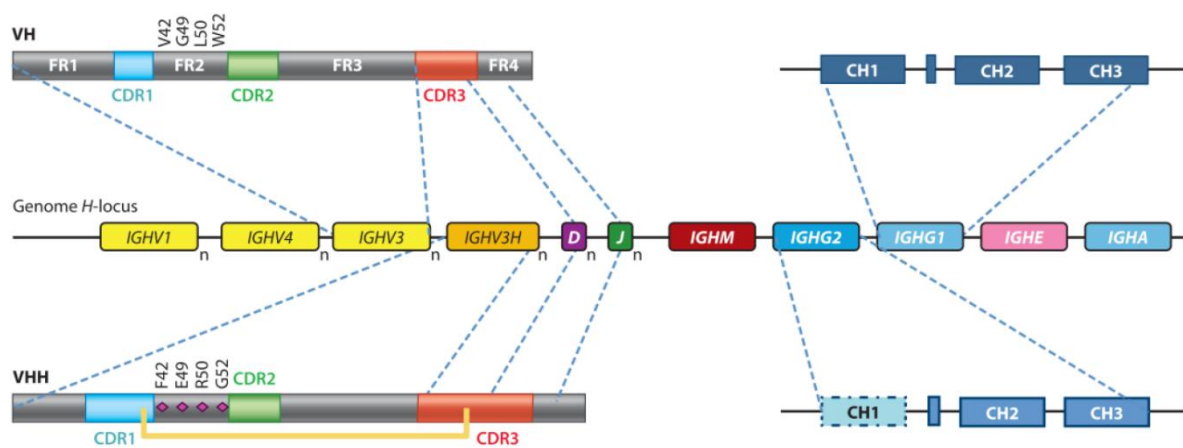


Figura 1 | Esquema simplificado del locus IGH en camélidos y de la organización de dominios VH y VHH. Los segmentos génicos V que originan dominios VH pertenecen a las familias IGHV1, IGHV4 e IGHV3, mientras que los que originan dominios VHH derivan del grupo IGHV3H. Mediante recombinación somática, estos segmentos se reordenan con segmentos D y J, que forman un clúster común para ambos tipos de V, y se unen a exones de región constante que codifican las distintas clases de inmunoglobulinas (se muestran solo algunos por simplicidad). El exón CH1 codificado por IGHG2, que da lugar a la región constante de IgG2 (HcAb), se elimina durante el splicing (indicado por la línea discontinua). En la parte superior e inferior izquierda se esquematizan los dominios VH y VHH, resaltando las sustituciones aminoacídicas características de la región FR2, así como un posible puente disulfuro adicional que en algunos casos conecta las regiones CDR1 y CDR3. Imagen modificada por Paula Segovia de Muyldermans, 2013 ¹².

Otra característica relevante es la presencia de residuos de cisteína no canónicos en las regiones CDR y FR, así como un CDR3 de mayor longitud en comparación con los anticuerpos convencionales. Este rasgo resulta fundamental, ya que le otorga al VHH un espectro de reconocimiento más amplio, compensando en parte la diversidad que se pierde debido a la ausencia de la cadena liviana ¹¹. Además, la extensión del CDR3 y la forma convexa del parátipe permiten que los VHH se unan a epítopes de difícil acceso para los anticuerpos convencionales, como los sitios activos de enzimas o epítopes virales crípticos ¹³. Se considera que esta capacidad fue un factor clave en la evolución de los

HcAbs, al complementar a los anticuerpos convencionales y contribuir a ampliar el repertorio de reconocimiento del sistema inmune ⁶.

Dentro del grupo de HcAbs, una minoría corresponde a dominios denominados VH solubles. Estos comparten similitudes con los VH de los anticuerpos convencionales, pero se diferencian por la capacidad de permanecer solubles incluso en ausencia de un dominio VL. Este comportamiento se explica principalmente por dos factores: la presencia de un CDR3 más largo, que al plegarse puede compensar la falta de interacciones con la cadena liviana, y la sustitución del residuo Trp118 por un residuo de arginina, el cual es indispensable en los anticuerpos convencionales para la interacción con la cadena liviana ⁵.

1.2. DOMINIOS VHH Y NANOBODIES: PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y APLICACIONES

Los dominios variables de los HcAbs de camélidos, denominados VHH (*variable domain of heavy chain of HcAbs*), son los precursores de los nanobodies (Nbs), definidos como dominios VHH recombinantes (**figura 2**). Sus propiedades estructurales y funcionales los convierten en herramientas biotecnológicas especialmente atractivas, lo que ha capturado un amplio interés científico ^{14,15}.

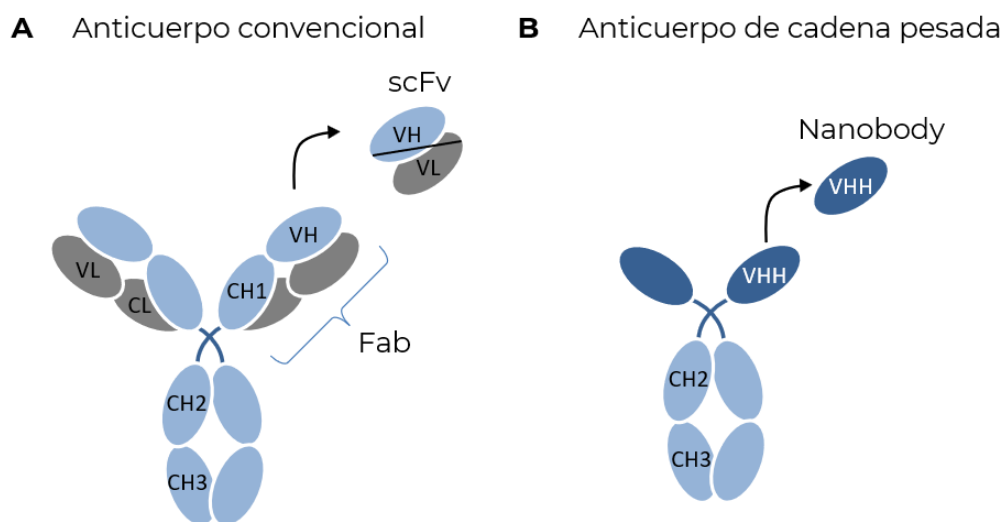


Figura 2 | Representación esquemática de un anticuerpo IgG convencional y de un anticuerpo de cadena pesada de camélido. Se representan además los fragmentos funcionales más empleados (A) Anticuerpo convencional formado por dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas, con sus regiones variables (VH, VL) y constantes (CH1–CH3, CL), del que pueden obtenerse fragmentos Fab y scFv. (B) Anticuerpo de cadena pesada característico de los camélidos, carente de cadenas livianas; su dominio variable VHH, cuando se expresa de forma aislada, se denomina nanobody (Nb).

Sus características estructurales confieren a los dominios VHH, y por ende a los Nbs, propiedades únicas. Con un tamaño molecular de aproximadamente 15 kDa, los Nbs son considerablemente más pequeños que fragmentos de anticuerpos convencionales como los Fab (≈ 50 kDa) o los scFv (≈ 30 kDa), lo que mejora la penetración tisular y facilita el acceso a epítopes crípticos que suelen quedar fuera del alcance de anticuerpos convencionales ^{12,16,17}.

En imagenología *in vivo*, su rápido aclaramiento le brinda otra ventaja significativa ¹⁸; sin embargo, esa misma cinética limita su aplicación terapéutica, donde se requiere exposición prolongada. Esta restricción puede superarse mediante construcciones con proteínas de fusión, por ejemplo a fragmentos Fc, con el fin de aumentar la vida media en el organismo ¹⁹.

La facilidad de producción de Nbs en sistemas de expresión microbiana, como *E. coli* o levaduras, con altos rendimientos y a bajo costo, junto con su versatilidad para la ingeniería genética y la construcción de formatos multivalentes o multiespecíficos, amplía aún más su potencial ⁴. Esta combinación de atributos favorables y la capacidad de ser fácilmente manipulados los posiciona como una herramienta biotecnológica excepcional.

Sin embargo, para materializar este vasto potencial, es imprescindible contar con métodos eficientes y robustos que permitan el descubrimiento y aislamiento de Nbs específicos para una diana molecular determinada. Aquí es donde las tecnologías de generación de bibliotecas juegan un papel crucial. Entre ellas, la técnica de presentación en fagos (*phage display*) es una de las herramientas más poderosas y versátiles para la selección de nanobodies.

1.3. TECNOLOGÍAS DE SELECCIÓN Y PRESENTACIÓN: PHAGE DISPLAY Y BIBLIOTECAS DE NBS

La tecnología de *phage display*, o presentación en fagos, es una poderosa herramienta de selección *in vitro* que permite la expresión de péptidos o proteínas exógenas, como los nanobodies, en la superficie de partículas fágicas ²⁰. Este método destaca por la capacidad de vincular directamente una proteína de interés (el fenotipo, en este caso, un nanobody) con su material genético codificante (el genotipo) dentro de la misma partícula viral. Su fundamento radica en la creación de bibliotecas de fagos, cada uno exponiendo un nanobody diferente, de las cuales se pueden aislar aquellos fagos que interactúan específicamente con una molécula diana de interés ²¹.

El fago filamentoso M13 es el vector más comúnmente empleado en la tecnología de *phage display* ²². Este bacteriófago pertenece al género *Inovirus*, dentro de la familia *Inoviridae*, y se incluye en el grupo denominado Ff, cuyos integrantes se caracterizan por

infectar bacterias *Escherichia coli* que poseen pili F ²³, utilizado como receptor viral. A diferencia de los virus clasificados como estrictamente líticos o lisogénicos, el fago M13 establece infecciones de tipo crónico. En este estado, no detiene el crecimiento ni la división de las bacterias infectadas, aunque sí puede ralentizar dichos procesos ²⁴. Los fagos de este grupo presentan un genoma de ADN circular monocatenario que codifica un total de 11 proteínas: cinco de cápside (pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX) y seis vinculadas a la replicación del genoma y al ensamblaje del virión (pI, pII, pIV, pV, pX y pXI) ²². Para la presentación de nanobodies, la fusión se realiza típicamente con la proteína pIII, de la cual existen de 3 a 5 copias en un extremo de la partícula fágica ²².

Una alternativa al clonado de los fragmentos de ADN directamente en el genoma del fago es el uso de vectores fagémidos, los cuales debido a su menor tamaño permiten una mayor eficiencia de transformación en bacterias, permitiendo la construcción bibliotecas de mayor tamaño ²². Estos plásmidos contienen el gen de fusión (por ejemplo, Nb-pIII), un origen de replicación fágico y una señal de empaquetamiento, además de un marcador de resistencia a antibióticos ²³.

Para producir partículas fágicas que presenten la proteína de fusión, las células de *E. coli* que albergan el vector fagémido deben ser co-infectadas con un fago auxiliar (*helper phage*). Este fago auxiliar proporciona todas las proteínas estructurales y de replicación necesarias para el ensamblaje de nuevas partículas fágicas, pero posee una señal de empaquetamiento defectuosa, lo que favorece el empaquetamiento del vector fagémido en la partícula viral. El resultado es una población de fagos donde una porción presenta la proteína de fusión (Nb-pIII), mientras que el resto de las proteínas pIII provienen del fago auxiliar. Esto suele resultar en una presentación monovalente o de baja valencia, ideal para seleccionar por afinidad ²².

1.3.1. PROCESO DE SELECCIÓN MEDIANTE PANNING

El aislamiento de nanobodies específicos a partir de una biblioteca de *phage display* se lleva a cabo mediante un proceso iterativo de selección por afinidad conocido como *panning* (**figura 3**). La técnica comienza con la inmovilización del antígeno sobre un soporte sólido, como pocillos de ELISA. A continuación, se incuba la biblioteca de fagos, que contiene millones de partículas, cada una exponiendo un único clon de Nb, con el antígeno inmovilizado. Durante esta etapa, los fagos que presentan un Nb específico se unen a la superficie, mientras que el resto permanece en solución. Posteriormente, se aplican lavados rigurosos para eliminar los fagos no unidos o con interacciones débiles o inespecíficas.

Los fagos que permanecen específicamente asociados al antígeno se eluyen del soporte mediante distintas estrategias, como cambios de pH, la adición de un ligando competidor o la digestión enzimática si existe un sitio de corte apropiado entre el Nb y la proteína de fusión pIII. Los fagos eluidos, ahora enriquecidos en clones específicos para la diana, se emplean para infectar nuevas células de *E. coli* susceptibles con el fin de amplificar la

población seleccionada. Esta secuencia de pasos constituye una ronda de *panning*. Habitualmente se realizan entre dos y cinco rondas sucesivas, utilizando como *input* de cada ronda el *output* de la anterior. A medida que avanzan las rondas, pueden endurecerse las condiciones de selección (tiempos de incubación más cortos, lavados más estrictos) para favorecer la recuperación de nanobodies de mayor afinidad ²⁵.

Esta tecnología ha demostrado ser exitosa en la selección de nanobodies contra diversos antígenos. Los nanobodies seleccionados pueden luego ser producidos de forma recombinante y caracterizados para su uso en diagnóstico, investigación, o como agentes terapéuticos.

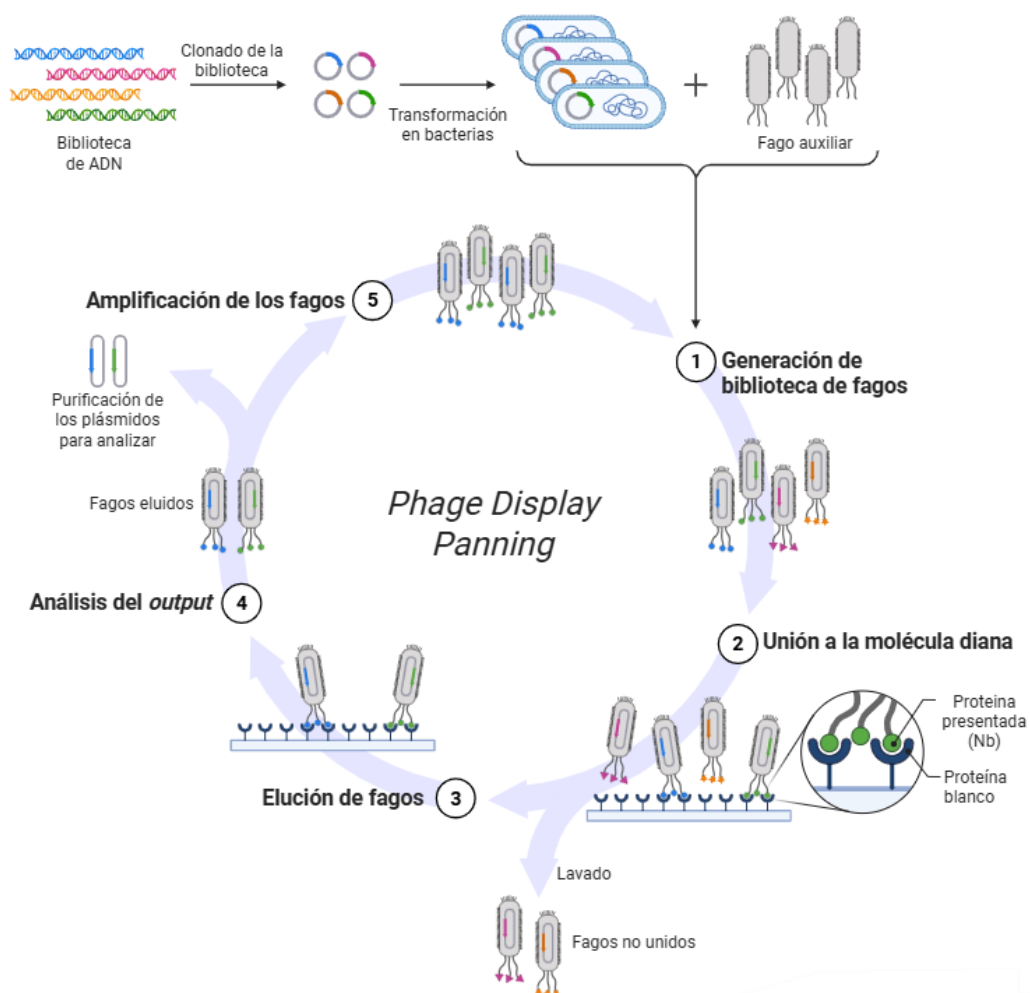


Figura 3 | Esquema del ciclo de selección por *phage display* (*panning*) de una biblioteca de Nbs. La biblioteca de ADN se clona en el vector fagémido y se transforma en bacterias, que tras la coinfección con un fago auxiliar generan la biblioteca de fagos recombinantes (1). Estos fagos se ponen en contacto con la molécula diana inmovilizada, de modo que solo permanecen unidos aquellos que presentan Nbs con afinidad por el blanco, mientras los restantes se eliminan por lavados (2). Los fagos unidos se eluyen (3) y se analiza el output mediante recuperación de plásmidos y/o *screening* de clones individuales (4). Finalmente, los fagos seleccionados se amplifican en bacterias para una nueva ronda de panning o para la caracterización detallada de los clones obtenidos (5).

1.3.2. GENERACIÓN DE BIBLIOTECA DE NANOBODIES

La generación de una biblioteca de nanobodies es el punto de partida para el descubrimiento de clones específicos contra una molécula de interés ¹², y comienza con la obtención del repertorio genético de los dominios VHH. Este proceso implica la extracción del ARN total de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del animal que ha sido previamente inmunizado con el antígeno de interés ²⁶, o de animales no inmunizados para bibliotecas “naïve” ²⁷. Mediante retrotranscripción se obtiene el ADN copia (ADNc), y a partir de este, se amplifica específicamente el repertorio de genes VHH mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando cebadores que flanquean estos dominios variables ²⁵. Este diverso conjunto de genes VHH amplificados debe ser clonado en un vector de presentación adecuado, típicamente un vector fagémido, para su posterior expresión en la superficie de las partículas fágicas ²⁸ (**figura 4**).

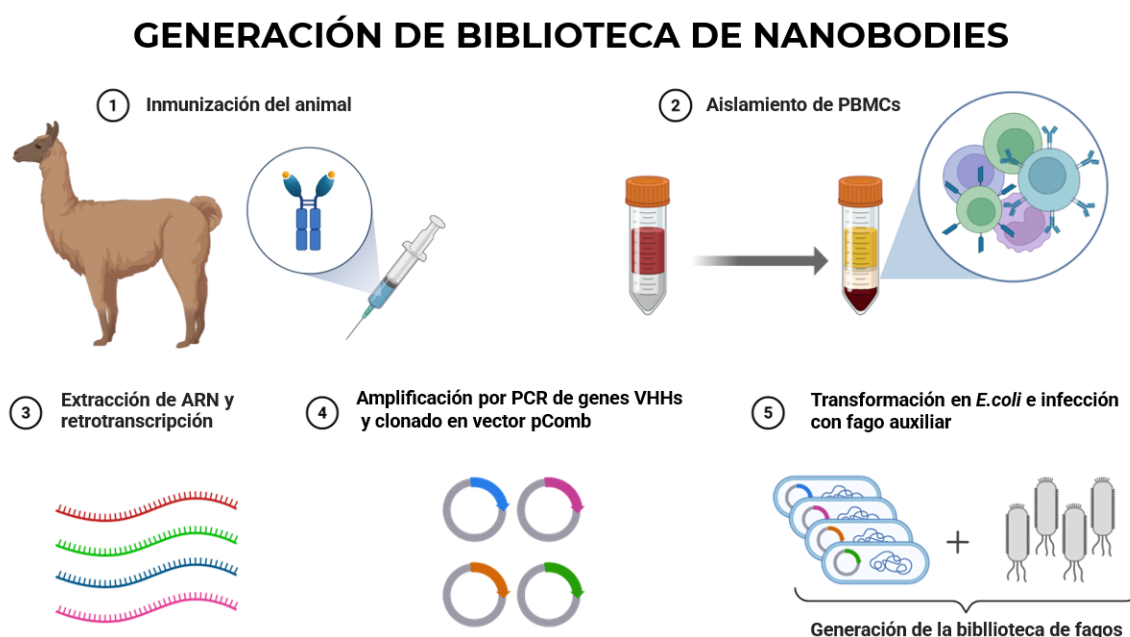


Figura 4 | Esquema de la generación de una biblioteca de nanobodies basada en *phage display*. Esquema del procedimiento para obtener una biblioteca de VHH a partir de un camélido inmunizado. (1) Inmunización del animal con el antígeno de interés. (2) Aislamiento de PBMCs a partir de sangre periférica. (3) Extracción de ARN y síntesis de ADNc. (4) Amplificación por PCR de los genes VHH y clonado en el vector fagémido pComb. (5) Transformación de *E. coli* e infección con fago auxiliar para generar la biblioteca de fagos que exhibe los nanobodies en su superficie.

1.3.3. CLONADO GOLDEN GATE

La etapa de clonado del repertorio de nanobodies para la construcción de bibliotecas es crítica y, tradicionalmente, se ha basado en estrategias de restricción y ligación. En este enfoque clásico, los fragmentos de ADN que codifican los nanobodies se amplifican por PCR y tanto los insertos como el vector fagémido se digieren con enzimas de restricción tipo IIP, que reconocen secuencias palindrómicas (por ejemplo, *EcoRI*, *PstI* o *NotI*). Estos cortes generan extremos cohesivos complementarios que, posteriormente, se unen mediante una ligación catalizada por una ADN ligasa. Los constructos recombinantes resultantes se transforman en cepas de *E. coli* competentes para dar lugar a la biblioteca^{29,30}.

El clonado tradicional presenta la ventaja de ser un método ampliamente establecido, con protocolos estandarizados y reactivos accesibles. Su simplicidad conceptual y el bajo costo relativo de las enzimas de restricción la han convertido en la estrategia predominante durante décadas. Sin embargo, implica una serie de pasos sucesivos (digestión, purificación mediante gel de agarosa, ligación y transformación) que incrementan el tiempo experimental, el riesgo de pérdidas de ADN en las etapas de purificación y la probabilidad de errores técnicos. Se ha reportado que este carácter multietapa y manual reduce la eficiencia global del proceso y aumenta la frecuencia de clones vacíos o truncados³¹. Además, su escalabilidad es limitada: el ensamblaje de múltiples fragmentos de ADN requiere rondas adicionales de subclonado, lo que resulta poco práctico cuando se pretende generar bibliotecas de alta diversidad^{32,33}.

Para superar estas limitaciones, se desarrolló la estrategia de clonado Golden Gate, basada en el uso de enzimas de restricción tipo IIS como *BsaI* o *BsmBI*. A diferencia de las enzimas tipo IIP, las IIS cortan fuera de su sitio de reconocimiento, lo que permite diseñar extremos cohesivos de forma personalizada (**figura 5**). Se trata, además, de un método *scarless*: el producto final de clonado no contiene las secuencias de los sitios de restricción utilizados, ya que estos se eliminan durante el ensamblaje. De este modo, vector e insertos pueden ensamblarse en una única reacción “*one-pot*” que combina ciclos de digestión y ligación, favoreciendo la acumulación del producto correcto y la eliminación de los sitios de reconocimiento en el constructo final^{31,32} (**figura 6**).

El método Golden Gate ofrece varias ventajas frente al sistema tradicional. En primer lugar, reduce de forma drástica el tiempo experimental, ya que la reacción se completa en aproximadamente 30 minutos y no requiere purificaciones intermedias³⁴. En segundo lugar, alcanza eficiencias de ensamblaje cercanas al 100 %, minimizando la proporción de clones incorrectos³¹. Gracias a su diseño modular, permite además el ensamblaje simultáneo de múltiples fragmentos de ADN en un orden predeterminado, lo que resulta especialmente atractivo para la construcción de bibliotecas complejas, por ejemplo de anticuerpos convencionales³¹.

Una consideración importante al emplear clonados mediante Golden Gate es garantizar que tanto los fragmentos de ADN a ensamblar como el vector de destino no contengan sitios de reconocimiento internos para la enzima tipo IIS utilizada. En caso de haberlos en el vector, este puede “domesticarse” mediante mutagénesis dirigida para eliminar dichos sitios ³⁵. En cambio, resulta inviable analizar todos los genes de Nb de una biblioteca dada la enorme diversidad (millones de variantes). Una estrategia para reducir esta probabilidad consiste en utilizar enzimas con sitios de reconocimiento más largos, lo que disminuye la frecuencia esperada de dichos motivos en las secuencias.

Aunque la necesidad de enzimas específicas y la eliminación de sitios internos pueden requerir ajustes de diseño, el ahorro en tiempo y reactivos convierte a Golden Gate en una opción más eficiente y, en muchos casos, más económica que la clonación convencional. Este método mantiene las fortalezas del clonado tradicional (compatibilidad con *E. coli*, disponibilidad de vectores fagémido), pero supera sus principales limitaciones al ofrecer un proceso más rápido, preciso y escalable para la generación de bibliotecas de nanobodies de alta diversidad ³⁶.

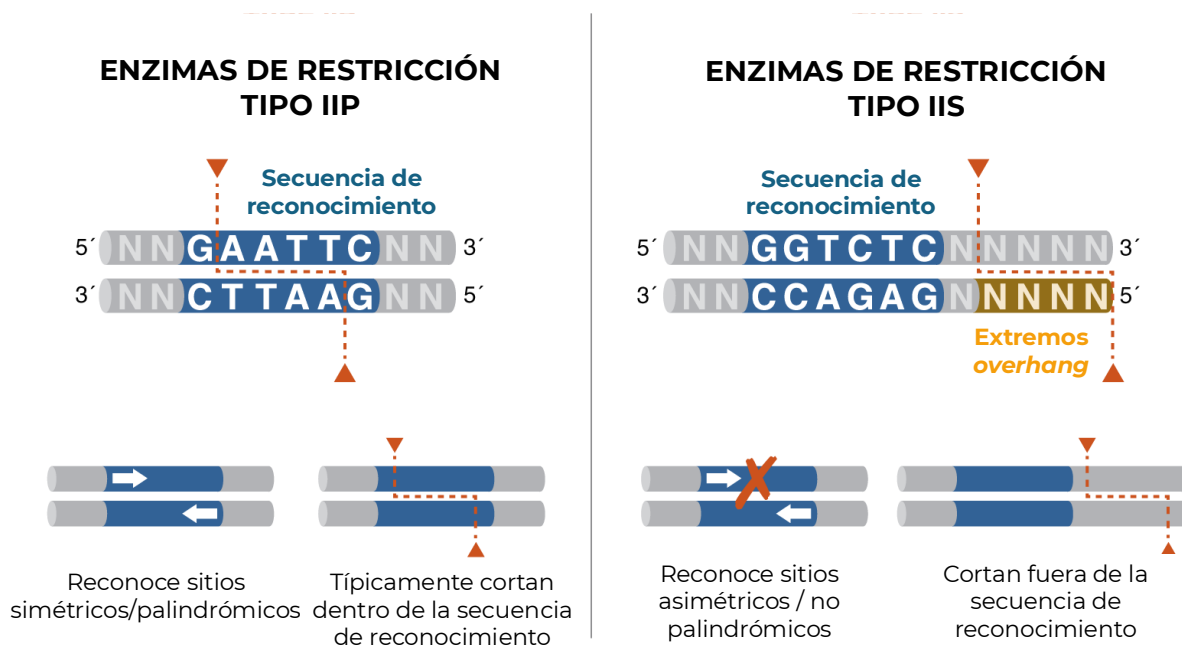


Figura 5 | Esquema comparativo de enzimas de restricción tipo IIP y tipo IIS y sus características relevantes para el clonado. Las enzimas tipo IIP (izquierda) reconocen secuencias palindrómicas y realizan el corte dentro del sitio de reconocimiento, generando extremos definidos por dicha secuencia. En contraste, las enzimas tipo IIS (derecha) reconocen secuencias asimétricas/no palindrómicas y cortan a una distancia fija fuera del sitio de reconocimiento, produciendo extremos cohesivos (“overhangs”) que pueden diseñarse de forma independiente de la secuencia de reconocimiento, lo que permite un clonado más versátil y dirigido. Figura modificada de los recursos de NEB®.

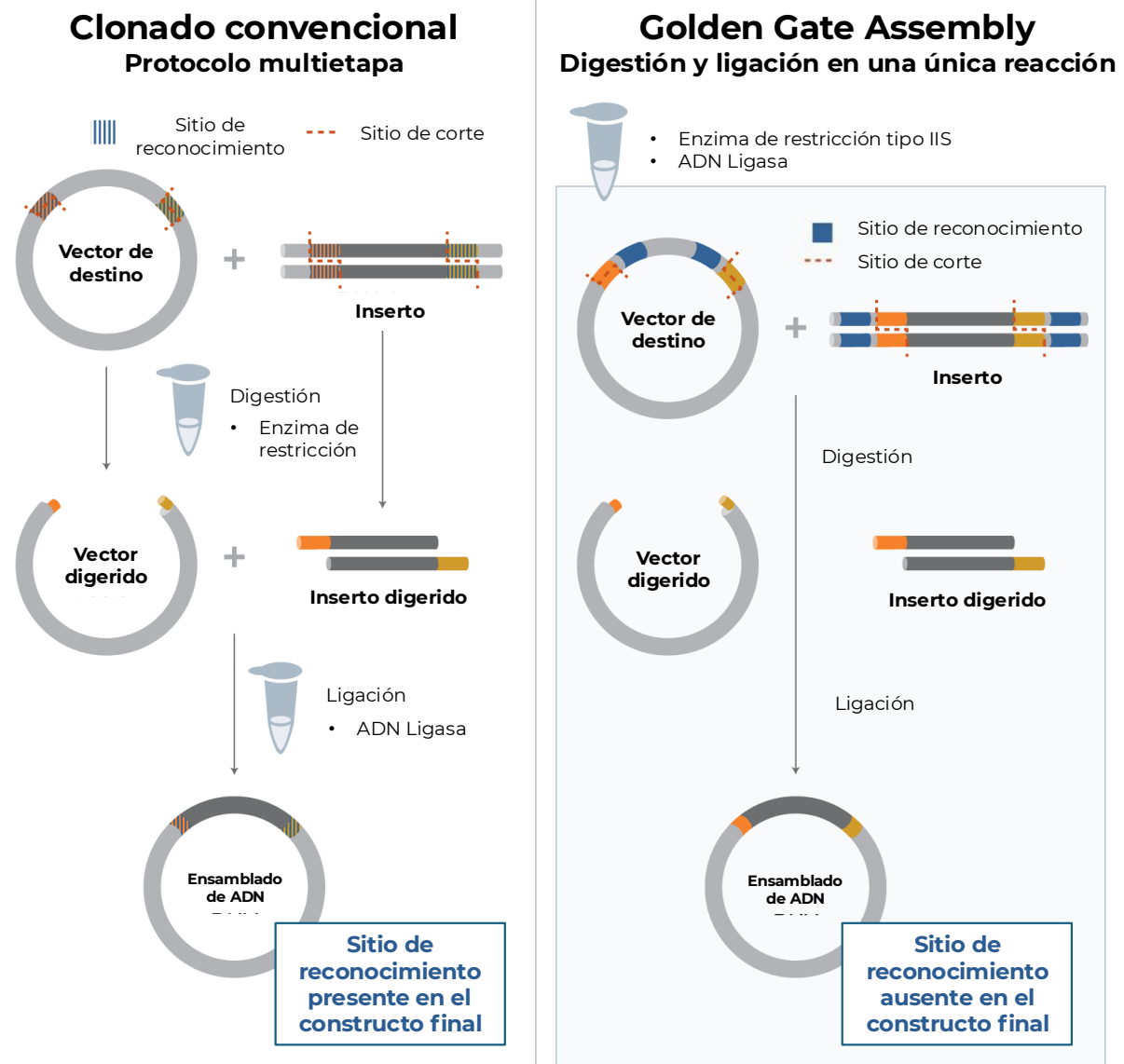


Figura 6 | Comparación esquemática entre el clonado convencional y la estrategia Golden Gate Assembly. En el clonado convencional, vector de destino e inserto se digieren por separado con enzimas de restricción tipo IIP y posteriormente se ligan en una etapa independiente, de modo que los sitios de reconocimiento permanecen en el constructo final. En Golden Gate Assembly, una enzima de restricción tipo IIS y una ligasa actúan de forma simultánea en una única reacción, generando extremos cohesivos dirigidos que permiten el ensamblaje eficiente del inserto y la eliminación de los sitios de reconocimiento en el producto final. Figura modificada de los recursos de NEB®.

1.4. INMUNOENSAYOS PARA LA DETECCIÓN DE HAPTENOS

Los inmunoensayos representan una herramienta analítica fundamental en diversas disciplinas, destacándose por su alta especificidad y sensibilidad en la detección y cuantificación de una amplia gama de analitos ^{37,38}. Estas técnicas se basan en la interacción específica entre un antígeno y un anticuerpo ³⁹, y en el contexto de la detección de analitos de bajo peso molecular, conocidos como haptenos, ofrecen ventajas significativas en términos de simplicidad, costo y rapidez frente a métodos cromatográficos acoplados a espectrometría de masas ⁴⁰.

Los haptenos son moléculas pequeñas que, si bien en principio pueden ser reconocidas por anticuerpos, no pueden dar lugar a respuestas de producción de anticuerpos debido a que carecen de epítopos T, requiriendo su conjugación a una proteína portadora para volverse inmunogénicas ^{41,42}. Una característica distintiva como consecuencia de su pequeño tamaño es que los haptenos generalmente poseen un solo epítotope, lo cual condiciona el tipo de inmunoensayo aplicable para su detección ⁴¹.

1.4.1. FORMATOS COMPETITIVOS

Tradicionalmente, la detección de haptenos mediante inmunoensayos se ha basado principalmente en formatos competitivos. En este tipo de ensayos, el analito presente en la muestra compite con una cantidad conocida de analito marcado por los sitios de unión disponibles en el anticuerpo específico ³⁹. Generalmente, el anticuerpo se encuentra inmovilizado en una fase sólida; sin embargo, existen variaciones metodológicas en las que es el antígeno el que se inmoviliza, permitiendo posteriormente la coincubación de la muestra con el anticuerpo ^{37,40} (**figura 7**). La señal generada en un inmunoensayo competitivo (ya sea radiactiva, enzimática o fluorescente) es inversamente proporcional a la concentración del analito presente en la muestra ³⁹ (**figura 8**). Si bien estos ensayos son robustos y ampliamente utilizados, su sensibilidad puede estar condicionada por la afinidad del anticuerpo, así como por la necesidad de sintetizar y purificar un conjugado analito-marcador estable ^{37,42}.

Además, suelen requerir el uso de bajas concentraciones tanto de anticuerpo como de antígeno marcado, lo que implica una cuidadosa optimización de las condiciones de reacción para favorecer el fenómeno de competencia ³⁷. Por último, este formato presenta típicamente un rango dinámico más estrecho y puede ser más susceptible a los efectos de la matriz en comparación con ensayos no competitivos o basados en formatos alternativos ^{40,43}.

Formatos Competitivos

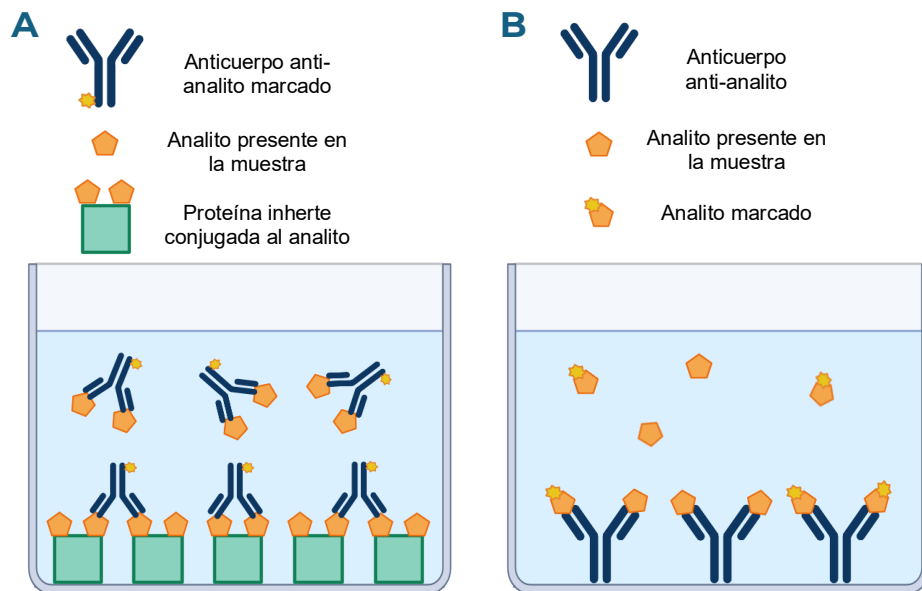


Figura 7 | Esquemas de inmunoensayos competitivos para la detección de analitos de bajo peso molecular (haptenos). Se muestran dos configuraciones alternativas: (A) formato en el que el analito de la muestra compite con un análogo inmovilizado en la superficie por la unión a un anticuerpo marcado, responsable de generar la señal del ensayo; (B) formato en el que el anticuerpo está inmovilizado y el analito de la muestra compite en solución con un análogo marcado por los sitios de unión del anticuerpo. En ambos casos, la intensidad de la señal es inversamente proporcional a la concentración de analito libre en la muestra.

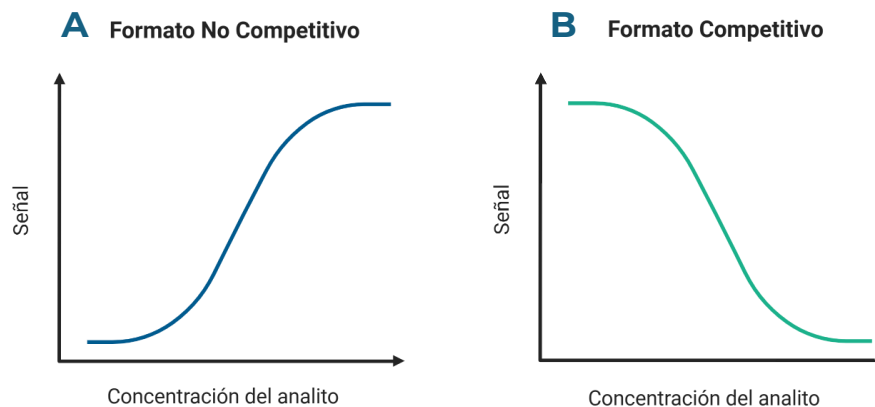


Figura 8 | Representación esquemática de las curvas señal–concentración en inmunoensayos no competitivos y competitivos. En el formato no competitivo (A) la señal aumenta de forma sigmoideal con la concentración del analito, mientras que en el formato competitivo (B) la señal disminuye a medida que aumenta la concentración, dando lugar a una curva sigmoideal decreciente.

1.4.2. FORMATOS NO COMPETITIVOS Y ANTICUERPOS ANTI-INMUNOCOMPLEJO

En contraste, los inmunoensayos no competitivos, también conocidos como ensayos tipo sándwich, cuando se aplican a macromoléculas ofrecen varias ventajas respecto a los formatos competitivos ^{37,44}. En los formatos tipo sándwich, la señal generada es directamente proporcional a la concentración del analito en la muestra, ya que mide directamente la presencia del analito en lugar del cambio que éste genera en la unión del analito marcado ⁴⁴. Además, son generalmente más sensibles, pueden ofrecer una mayor precisión debido al uso de anticuerpos en exceso, y a menudo presentan un rango de trabajo más amplio ^{37,45}. El uso de reactivos en exceso no solo promueve una captura más eficiente del analito, incluso en concentraciones traza, sino que también puede acortar los tiempos de incubación necesarios para alcanzar el equilibrio de la reacción antígeno-anticuerpo ⁴⁵⁻⁴⁷.

Sin embargo, la aplicación del formato sándwich a haptenos presenta un desafío inherente: su bajo peso molecular y la característica de poseer, por lo general, un solo epítotope ^{44,48}. Esto impide la unión simultánea de dos anticuerpos diferentes (uno de captura y otro de detección) al mismo hapteno, que es el principio fundamental del ensayo sándwich clásicamente utilizado para macromoléculas ⁴⁴. A pesar de esta limitación, debido a las ventajas mencionadas de los formatos no competitivos se ha impulsado el desarrollo de diversas estrategias para adaptar estos principios a la detección de moléculas de bajo peso molecular ^{39,49}. Una de estas estrategias busca el desarrollo de anticuerpos que reconocen específicamente el complejo hapteno-anticuerpo primario (anticuerpos anti-inmunocomplejos) ^{39,50}. Esta aproximación supera el desafío del único epítotope del hapteno al considerar que la unión del anticuerpo primario al hapteno genera un complejo de mayor tamaño y con una conformación alterada respecto al hapteno libre, que puede presentar nuevos epítotos o modificar la accesibilidad de los existentes en el anticuerpo primario ⁵⁰. De esta forma, un segundo anticuerpo (el anti-inmunocomplejo) puede unirse específicamente a esta nueva entidad, posibilitando un formato de detección de tipo sándwich modificado ^{49,50} (**figura 9**).

Formato sándwich para haptenos

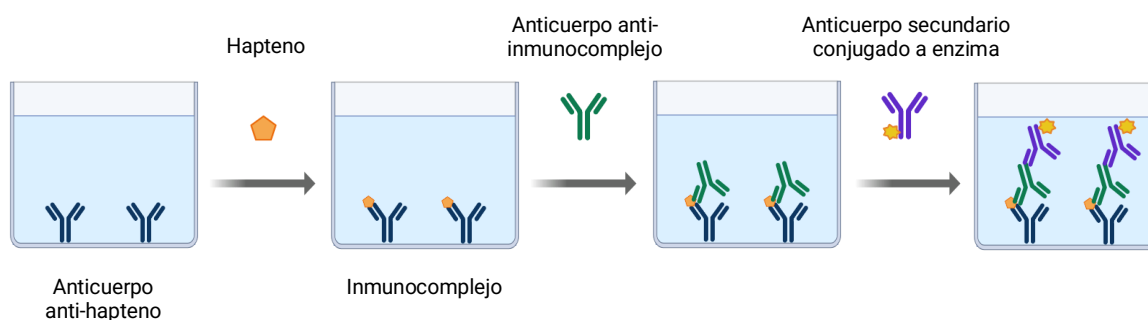


Figura 9 | Esquema de un formato sándwich aplicado a la detección de haptenos mediante anticuerpos anti-inmunocomplejo. Un anticuerpo anti-hapteno inmovilizado captura el hapteno presente en la muestra, generando el inmunocomplejo en la superficie. A continuación, se añade un anticuerpo anti-inmunocomplejo que reconoce específicamente dicho complejo y, finalmente, un anticuerpo secundario conjugado a enzima dirigido contra el anticuerpo detector, responsable de la generación de la señal del ensayo.

1.5. MICROCISTINAS

1.5.1. VARIANTES ESTRUCTURALES Y MECANISMOS DE TOXICIDAD

Las microcistinas (MCs) constituyen un grupo de cianotoxinas producidas principalmente por géneros de cianobacterias como *Microcystis*, *Anabaena* y *Planktothrix*⁵¹. Químicamente, corresponden a heptapéptidos cíclicos y presentan un residuo particular, un β -aminoácido (ADDA), cuya presencia es esencial para su toxicidad^{52,53}. Hasta la fecha se han descrito más de 250 variantes estructurales, siendo la microcistina-LR (MC-LR) la forma más abundante y tóxica⁵⁴. Todas estas variantes comparten el ser heptapéptidos cíclicos con el motivo ADDA y difieren principalmente en los aminoácidos de las posiciones X y Z del anillo (**figura 10**). Esta notación explica la nomenclatura, de modo que MC-LR corresponde a Leu en X y Arg en Z, mientras que variantes como MC-RR o MC-YR sustituyen esos mismos sitios. Las sustituciones en X/Z modifican la hidrofobicidad y la carga del péptido, alterando su captación, su distribución tisular y, en consecuencia, su toxicidad relativa. No obstante, todas comparten una alta resistencia derivada del anillo cíclico y del grupo ADDA, reflejándose en su estabilidad térmica y frente a pH extremos y explican su persistencia en el medio acuático^{53,55}.



1.5.2. IMPACTO AMBIENTAL Y SANITARIO

En humanos, la exposición puede ocurrir por ingestión de agua o alimentos contaminados, así como por inhalación o contacto dérmico, ocasionando desde daño hepático agudo, necrosis y hemorragias hasta, en casos extremos, la muerte ⁵⁹. La exposición crónica a concentraciones bajas se ha asociado con la promoción de tumores hepáticos, motivo por el cual la MC-LR ha sido clasificada como posible carcinógeno ⁶⁰. Aunque el hígado constituye el principal órgano diana, también se han descrito efectos en los sistemas renal, cardíaco y reproductivo ^{59,61}. Esta convergencia de impactos ecológicos y sanitarios resalta la necesidad de vigilancia y control de las MCs, tal como lo establece la directriz de la Organización Mundial de la Salud para el agua potable ⁶².

La detección y cuantificación de MCs representa un desafío analítico debido a su diversidad estructural y su baja concentración en muestras ambientales ⁶³. En este contexto, los inmunoensayos se han consolidado como herramientas de gran valor, al ofrecer métodos sensibles, específicos y adaptables para la detección de MCs tanto en

matrices ambientales como biológicas ⁶⁴. Constituyen una alternativa práctica frente a técnicas instrumentales como la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas que, si bien son más específicas, resultan costosas y requieren equipamiento especializado ^{63,65}.

Actualmente, el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Química cuenta con un inmunoensayo de competencia para la detección de MCs ⁶⁶, basado en el uso del nanobody A2 (NbA2), el cual fue seleccionado a partir de una biblioteca de fagos construida a partir de una llama inmunizada con MC-LR conjugada a ovoalbúmina. Este ensayo presenta un límite de detección (LOD) de 0.05 µg/L, por debajo del límite provisional de 1.0 µg/L establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para agua potable e incluso del valor de 0.3 µg/L recomendado por la Environmental Protection Agency de EE. UU (EPA). Además, presenta un perfil de reactividad cruzada amplio, mostrando alta reactividad frente a los congéneres más relevantes y tóxicos.

Sobre la base del inmunoensayo competitivo desarrollado en el Laboratorio de Inmunología, en esta tesina se plantea la construcción de una biblioteca de nanobodies mediante clonado Golden Gate y la selección de nanobodies específicos frente al inmunocomplejo NbA2/MC, con el fin de avanzar hacia el desarrollo de un inmunoensayo no competitivo para la detección de microcistinas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una biblioteca de fagos filamentosos que presenten nanobodies en su superficie mediante clonado Golden Gate y aplicarla a la selección de nanobodies específicos contra el inmunocomplejo NbA2/MC, como base para el diseño de un inmunoensayo no competitivo para la detección de microcistinas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar las condiciones de clonado mediante Golden Gate de una biblioteca de genes de nanobody en el vector pCombGG.
2. Construir una biblioteca de fagos filamentosos que presenten nanobodies en base a las condiciones de clonado optimizadas.
3. Seleccionar nanobodies específicos frente al inmunocomplejo NbA2/MC a partir de la biblioteca construida.
4. Caracterizar el nanobody seleccionado en términos de reconocimiento del inmunocomplejo NbA2/MC mediante ELISA y afinidad de la interacción por bio-layer interferometry (BLI).
5. Poner a punto un inmunoensayo no competitivo para la detección y cuantificación de microcistinas basado en el inmunocomplejo NbA2/MC y el nanobody seleccionado.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 BUFFERS, SOLUCIONES Y REACTIVOS

- ❖ Buffer fosfato salino (PBS): NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 2 mM y Na₂HPO₄ 10 mM en agua destilada, pH 7,5
- ❖ Buffer Tris salino (TBS): Tris 50 mM y NaCl 150 mM en agua Milli-Q, pH 7,5
- ❖ Solución sustrato para la enzima peroxidasa (sustrato-PO): Buffer acetato 0,1 M, TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) 0,096 mg/mL y H₂O₂ 0,004%, pH 5,5
- ❖ Buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE): Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 1 mM en agua Milli-Q, pH 8,0
- ❖ Buffer de carga 6X para electroforesis SDS-PAGE: Tris-HCl 0,35 M, SDS (dodecilsulfato sódico) 10% m/v, glicerol 30% v/v, azul de bromofenol 0,175 mM y DTT (ditiotreitól) 0,1 M
- ❖ Buffer de corrida para electroforesis SDS-PAGE: Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS (dodecilsulfato sódico) 0,1% m/v en agua destilada
- ❖ Solución colorante para la tinción con azul de Coomassie: Azul de Coomassie 1 g/L, ácido acético glacial 7,5% v/v y metanol 5% v/v en agua destilada
- ❖ Solución decolorante para la tinción con azul de Coomassie: Ácido acético glacial 7,5% v/v y metanol 5% v/v en agua destilada
- ❖ Buffers para cromatografía de afinidad:
 - Buffer de equilibrio (buffer A): NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 20 mM en agua Milli-Q, pH 8,0
 - Buffer de elución (buffer B): NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 500 mM en agua Milli-Q, pH 8,0
- ❖ Buffer cinético (kinetic buffer): PBS 1X, Tween 20 0,2%, BSA 1%, azida de sodio 0,05%.
- ❖ Buffer Tris-EDTA-Sacarosa (TES): Tris-HCl 0,2 M, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0,5 mM y sacarosa 0,5 M en agua destilada, pH 8,0
- ❖ Buffer de Interferencia (BI): Tris: 1 M, Cloruro de sodio (NaCl): 0,3 M, EDTA: 0,2 M, BSA (álbumina sérica bovina): 1% en agua destilada, pH 7,5
- ❖ ABRAXIS® Microcystin YR Standard, 10 µg/mL, 1 mL
- ❖ ABRAXIS® Microcystin LR Standard, 10 µg/mL, 1 mL
- ❖ ABRAXIS® Microcystin RR Standard, 10 µg/mL, 1 mL
- ❖ ABRAXIS® Microcystin LA Standard, 10 µg/mL, 1 mL
- ❖ ABRAXIS® Microcystin LW Standard, 10 µg/mL, 1 mL
- ❖ ABRAXIS® Microcystin LF Standard, 10 µg/mL, 1 mL
- ❖ Estreptavidina SA10 (Agilent)
- ❖ Anti-HA-Peroxidasa (#12013819001, Roche)

3.2 MEDIOS DE CULTIVO

- ❖ Luria Bertani broth (LB, Sigma-Aldrich)
- ❖ Luria Bertani agar (LB agar, Sigma-Aldrich)
- ❖ Super Broth (SB): triptona 30 g/L (Sigma-Aldrich), extracto de levadura 20 g/L (Sigma-Aldrich) y MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico) 10 g/L (Sigma-Aldrich) en agua destilada, pH 7,0
- ❖ Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC): triptona 20 g/L (Sigma-Aldrich), extracto de levadura 5 g/L (Sigma-Aldrich) y NaCl 0,5 g/L en agua Milli-Q, pH 7,0. Luego de autoclavar se agrega MgCl₂ a concentración final 10 mM y glucosa a concentración final 20 mM, a partir de soluciones stock esterilizadas mediante filtrado.

3.3 CEPAS BACTERIANAS, VECTORES Y FAGOS

3.3.1 CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*

Se utilizaron distintas cepas de *E. coli* en función de la etapa experimental. La cepa DB3.1 se empleó para el mantenimiento de vectores que codifican la toxina CcdB, dado que presenta la mutación gyrA462 en la ADN girasa, que confiere resistencia a dicha toxina⁶⁷. La cepa DH5α se utilizó para el clonado y la amplificación de plásmidos, mientras que la cepa BL21(DE3) se utilizó para la expresión recombinante de nanobodies. Para la propagación y titulación de fagos filamentosos derivados de los vectores fagémidos se empleó la cepa ER2738. Las condiciones generales de cultivo y las concentraciones de antibióticos utilizadas se describen en el apartado 3.4.1.

3.3.2 VECTORES PLASMÍDICOS

Para la generación de la biblioteca mediante *phage display* se empleó el vector fagémido pComb3XSS. Este vector permite la expresión de nanobodies fusionados a la proteína pIII truncada, que serán presentados en la superficie de las partículas fágicas. La expresión está regulada por el operador *lac* e incorpora el péptido señal OmpA, que dirige el producto recombinante al espacio periplásmico. Además, pComb3XSS incluye los tags HA y 6xHis para detección y/o purificación. El vector además porta AmpR, confiriendo resistencia a la ampicilina a las bacterias que lo porten.

Con el objetivo de disponer de un sistema compatible con clonado Golden Gate, se utilizó una versión modificada del vector, denominada pCombGG, derivada de pComb3XSS y que conserva los elementos funcionales para *phage display*. La característica diferencial de

pCombGG es la incorporación, en la región de clonado del nanobody, de un *cassette* flanqueado por sitios de reconocimiento para la endonucleasa tipo IIS PaqCI, diseñado por la magister Paula Segovia. Este *cassette* contiene el gen de resistencia a cloranfenicol y el gen *ccdB*. Este *cassette* fue incorporado en pComb para generar pCombGG, mediante el clonado de un fragmento entre sitios de restricción de las enzimas EcoRI y FseI.

Para la producción de nanobodies se utilizó el vector de expresión pINQ-HA⁶⁸, derivado de pET-28a (+) (Novagen). A diferencia de los vectores fagémidos pComb, pINQ-HA no contiene el módulo pIII, por lo que no genera proteínas de fusión Nb-pIII y se utiliza específicamente para obtener el Nb libre. Este vector también incorpora un epítipo HA y una cola 6xHis en el extremo C-terminal, lo que permite su detección mediante anticuerpos anti-HA y su purificación mediante cromatografía de afinidad en columnas de Ni-NTA. La expresión es inducible por IPTG en *E. coli* BL21(DE3).

FAGO AUXILIAR M13KO7

Para la producción y amplificación de partículas fágicas se utilizó el fago auxiliar M13KO7. Este fago, derivado de M13 y portador de resistencia a kanamicina, se utilizó en las etapas de generación y amplificación de las bibliotecas. Las infecciones con M13KO7 se realizaron según se detalla en el apartado 3.6.

3.4. PROTOCOLOS GENERALES

3.4.1. CULTIVO DE *ESCHERICHIA COLI*

Los cultivos bacterianos de *E. coli* se incubaron, salvo indicación en contrario, a 37 °C bajo agitación a 250 rpm.

Salvo especificación contraria, las concentraciones finales de los antibióticos utilizados para suplementar los medios de cultivo, tanto sólidos como líquidos, fueron: tetraciclina 10 µg/mL, ampicilina 100 µg/mL, kanamicina 40 µg/mL y cloranfenicol 34 µg/mL.

3.4.2 PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTRO-COMPETENTES

Las células electrocompetentes de *E. Coli* se prepararon en tres jornadas consecutivas. El primer día se estriaron bacterias en placas de LB-agar y se incubaron ON a 37 °C para obtener colonias aisladas. El segundo día, se inoculó una colonia única en 15 mL de LB sin NaCl suplementado con antibiótico si corresponde, en un matraz de 50 mL, y se incubó ON a 37 °C y 250 rpm para generar el cultivo “starter”. El tercer día, 2,5 mL del cultivo

starter se inocularon en 250 mL de LB sin NaCl y se incubaron a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar una $DO_{600} \approx 0,4$. El cultivo se enfrió en hielo durante aproximadamente 10 minutos y, a partir de este punto, las células se mantuvieron en hielo durante todo el procedimiento. A continuación, el cultivo se dividió en cuatro frascos y se centrifugó a $4.000 \times g$ durante 20 minutos, descartándose el sobrenadante. Para eliminar remanentes del medio de cultivo, se realizaron dos lavados sucesivos: en cada uno, el pellet se resuspendió en agua fría y se centrifugó nuevamente a $5.500 \times g$ durante 20 minutos.

Posteriormente, los pellets se resuspendieron en glicerol al 8,7 % y se agruparon de a dos frascos. Se añadió glicerol al 8,7 % hasta completar un volumen adecuado para una nueva centrifugación a $5.500 \times g$ durante 20 minutos. El pellet final se resuspendió en un volumen total de 2,5 mL de glicerol al 8,7 %. Las suspensiones se alicuotaron en volúmenes de 60 μ L y 120 μ L, se congelaron rápidamente y se almacenaron a -80 °C. Este protocolo se aplicó a todas las cepas de *E. coli* preparadas in-house.

3.4.3. TRANSFORMACIÓN

Para cada transformación, se incubaron 30–50 μ L de células electrocompetentes con 1 μ L de ADN plasmídico durante 30–60 segundos en hielo. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación estéril de 2 mm (Sigma-Aldrich) y se aplicó un pulso de 2,5 kV en un equipo MicroPulser™ (Bio-Rad). Inmediatamente después de la electroporación, las células se resuspendieron en medio SOC y se incubaron a 37 °C con agitación a 250 rpm durante 1 hora. Posteriormente se plaqueó en LB-agar con el antibiótico correspondiente e incubó ON a 37 °C.

3.4.4. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO.

Se realizaron cultivos ON en medio LB suplementado con el antibiótico adecuado a partir de colonias aisladas, de los cuales el ADN plasmídico se extrajo utilizando el kit comercial Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen #27104).

3.4.5. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Las secuencias fueron obtenidas a través de los servicios de secuenciación de la empresa Macrogen (Corea), y fueron analizadas utilizando el software SnapGene.

3.4.6. CUANTIFICACIÓN DE ADN Y PROTEÍNAS

Las medidas de concentración de ADN y proteínas se realizaron con el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), midiendo absorbancia a 260 nm y 280 nm respectivamente. Para determinar la concentración de ADN se utilizó el coeficiente de absortividad $0,020 \text{ (ng/L)}^{-1}\text{cm}^{-1}$, mientras que para las proteínas se utilizaron los

coeficientes de absorptividad molar estimados a partir de las secuencias aminoacídicas a través del sitio web Expasy.

3.4.7. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para visualizar ADN, se realizó electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE, preparado con el agente intercalante de GoodView™ Nucleic Acid Stain (SBS #HGV-2), según instrucciones del fabricante, que permite la visualización del ADN bajo luz UV. A las muestras se les agregó la cantidad correspondiente de buffer de carga 6X (Thermo Scientific #R0611) antes de ser sembradas. Se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific #SM1331).

En los casos de purificación de fragmentos de ADN plasmídico digerido se aisló el fragmento de ADN de interés mediante corte del gel con bisturí, y luego se purificó empleando el kit comercial GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific #K0691).

3.4.8. ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Para la visualización de proteínas se utilizó electroforesis en gel de poliacrilamida 12,5% en presencia del agente desnaturizante dodecilsulfato sódico (SDS) y en condiciones reductoras, con posterior tinción con solución colorante de azul de Coomassie. Antes de ser cargadas en el gel, las muestras fueron incubadas en buffer de carga 6X y calentadas durante 5 minutos a 100 °C. En todos los casos se utilizó el marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard (for SDS-PAGE) (GenScript #M00516).

3.4.9. ELISA

Salvo que se indique lo contrario, los ensayos tipo ELISA se realizaron en placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One #655061). Para la sensibilización, los pocillos se incubaron con 100 µL de una solución proteica en PBS, durante 1 hora a 37 °C o bien ON (16–20 h) a 4 °C. A continuación, se efectuó el bloqueo incubando 200 µL de PBS con BSA al 1 % por pocillo durante 30 minutos a 37 °C.

Posteriormente, se añadieron 100 µL de la muestra a analizar en cada pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación a 450 rpm. Las proteínas de detección conjugadas a peroxidasa se incubaron bajo las mismas condiciones. Cuando se utilizaron anticuerpos primarios y secundarios, estos se aplicaron de forma secuencial manteniendo los mismos tiempos y condiciones de incubación. Las diluciones de muestras y anticuerpos se prepararon en PBS con BSA al 0,1 %.

Para el desarrollo de la señal, se agregaron 100 µL de la solución sustrato-PO por pocillo y se incubó entre 5 y 15 minutos a temperatura ambiente con agitación. La reacción se detuvo añadiendo 50 µL de ácido sulfúrico 2 N por pocillo.

En general, después de cada etapa de incubación se realizaron lavados con PBS que contenía 0,05 % de Tween-20, salvo indicación en contrario. Tras la sensibilización no se efectuaron lavados, mientras que después del bloqueo se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween 0,05 %. En los pasos posteriores se efectuaron seis lavados entre incubaciones. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector de microplacas FLUOstar OPTIMA, corrigiendo los valores con la lectura a 620 nm para compensar señales de fondo.

3.4.10. ANÁLISIS DE DATOS Y GENERACIÓN DE IMÁGENES

Para la generación de gráficos se utilizaron los programas GraphPad Prism y Microsoft Excel. Las imágenes esquemáticas de secuencias de ADN fueron realizadas con SnapGene Viewer. Para la elaboración de esquemas e ilustraciones se empleó la plataforma BioRender y el programa Microsoft PowerPoint. Asimismo, se modificaron imágenes provenientes de otras fuentes, cuyo crédito correspondiente se indica en el pie de figura.

3.5. CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECA DE NANOBODIES

Se construyeron en paralelo dos bibliotecas de nanobodies: una biblioteca “convencional” y una biblioteca basada en la estrategia de clonado Golden Gate. La biblioteca convencional, incluyendo todas las etapas requeridas para su construcción, fue generada por la Lic. Camila Cedrés y se empleó en este trabajo como referencia comparativa para evaluar la calidad de la biblioteca generada mediante Golden Gate. Ambas bibliotecas comparten las etapas iniciales de inmunización y obtención de PBMC (apartado 3.5.1), así como la obtención del ARN total a partir de dichas células (apartado 3.5.2). A partir de la síntesis de ADNc, la amplificación de los genes VHH se llevó a cabo utilizando juegos de cebadores específicos para cada estrategia de clonado, punto en el que los procedimientos se bifurcan y pasan a desarrollarse en paralelo según se detalla en los apartados siguientes.

3.5.1. INMUNIZACIÓN Y OBTENCIÓN DE PBMC

Se inmunizó una llama (*Lama glama*) con el inmunocomplejo NbA2/MC en formato de fusión con la región Fc de una IgG1 humana (NbA2Fc/MC), con el fin de aumentar su inmunogenicidad. Se administraron tres dosis de 500 µg del antígeno espaciadas por 15 días. Una vez comprobada la respuesta humoral mediante titulación de anticuerpos, se recogieron muestras de sangre periférica y se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las células se lisaron bajo condiciones libres de RNasas para la obtención de ARN total utilizando el reactivo TRIzol (Thermo Fisher Scientific). El ARN purificado se utilizó como molde para la síntesis de ADNc y la posterior amplificación de los genes VHH por PCR, según se detalla en el apartado 3.5.2.

3.5.2. SÍNTESIS DE ADNc Y AMPLIFICACIÓN DE GENES VHH

El ARN total obtenido de las PBMC se utilizó como molde para la síntesis de ADNc mediante la transcriptasa reversa M-MuLV Reverse Transcriptase (NEB #M0253), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ADNc resultante se empleó como molde para la amplificación de los genes de Nbs por PCR.

Para la generación de la biblioteca convencional se utilizó un juego de cebadores (Fwd-VH1, Fwd-VH3, Fwd-VH4, Fwd-VH4Arg y Rev-JH) dirigidos a regiones conservadas de los VHH e incluyendo sitios de restricción para SfiI flanqueando los genes VHH, previamente diseñados y reportados por el grupo de trabajo ⁶⁹. Para la construcción de la biblioteca mediante clonado Golden Gate se emplearon cebadores análogos (Fwd-VH1-GG, Fwd-VH3-GG, Fwd-VH4-GG, Fwd-VH4Arg-GG y Rev-JH-GG), diseñados sobre las mismas regiones de hibridación, pero modificados para introducir sitios de restricción para PstI, específicamente diseñados para este proyecto por la Mag. Paula Segovia. En ambos casos, las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 50 µL, conteniendo Buffer Taq 1X (Thermo Scientific #B38), MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 0,3 µM de cada cebador, 5 U de Taq ADN polimerasa (Thermo Scientific #EP0401) y 3 µL de ADNc como molde; para cada par de cebadores se preparó un volumen total de 150 µL.

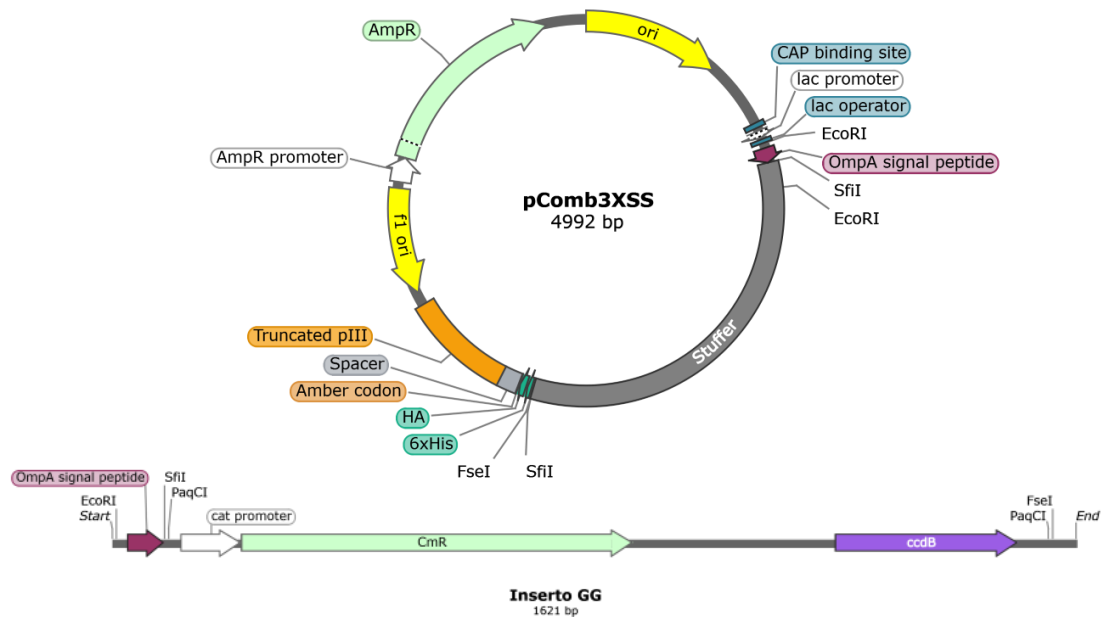
El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 1 minuto a 95 °C, seguida de 25 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C, con una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Las reacciones se realizaron en un termociclador LifeECO (BIOER), y los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa y se purificaron según se describe en el apartado 3.4.7.

3.5.3. MODIFICACIÓN DEL VECTOR PCOMB3XSS PARA LA GENERACIÓN DE PCOMBGG

Para posibilitar el clonado de la biblioteca mediante Golden Gate se requirió un vector que contuviera sitios de reconocimiento para la endonucleasa de tipo IIS PstI. El vector de partida pComb3XSS no presenta dichos sitios, por lo que fue modificado generándose el derivado pCombGG. Para ello, se insertó un *cassette* que incorpora los sitios de reconocimiento para PstI flanqueando la región de inserción de los genes VHH. Entre estos sitios de restricción se incluyó un gen de resistencia a cloranfenicol con su promotor y el gen *ccdB*, utilizado como marcador negativo de clonado.

Para generar pCombGG (**figura 11**), el *cassette* fue clonado en pComb3XSS previamente digerido con las enzimas de restricción FseI y EcoRI (NEB), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La ligación se realizó con T4 ADN ligasa (Thermo Scientific), conforme al protocolo del proveedor. En este trabajo se utilizó el vector resultante, pCombGG, como vector fagémido de partida para el clonado de la biblioteca de nanobodies.

Digestión con EcoRI y FseI



Generación del vector pCombGG

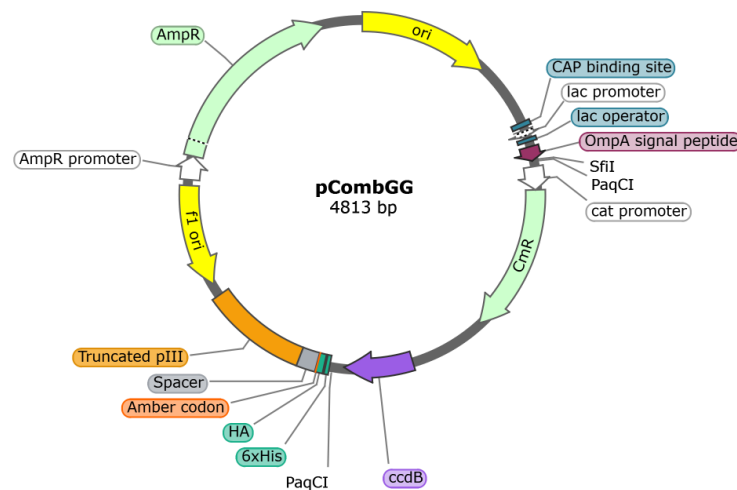


Figura 11 | Generación del vector pCombGG mediante digestión y ligación. El vector fagémico pComb3XSS y el inserto “Golden Gate” se digirieron con EcoRI y FseI para obtener extremos cohesivos compatibles. Tras la digestión, el inserto (que contiene el promotor cat, el gen CmR y ccdB, flanqueados por sitios PaqCI) se ligó en el sitio correspondiente del vector, reemplazando la región “*stuffer*” del pComb3XSS. La ligación dio lugar al vector pCombGG, que conserva los elementos funcionales (señal OmpA, región de fusión con pIII truncada, tags HA/6xHis, ori/f1 ori y AmpR) e incorpora el *cassette* diseñado para permitir el clonado posterior por Golden Gate.

3.5.4. CLONADO DE LA BIBLIOTECA MEDIANTE GOLDEN GATE ASSEMBLY

El clonado de los genes VHH se realizó según ambas estrategias: un método de clonado convencional por digestión seguida de ligación y un método basado en Golden Gate Assembly (**figura 12**). En el caso de la biblioteca convencional, los productos de PCR de VHH obtenidos en el apartado 3.5.2 se combinaron en una única mezcla de inserto, que se sometió a digestión con SfiI y posterior ligación en el vector correspondiente, previamente digerido con la misma enzima, mediante T4 ADN ligasa.

Para la biblioteca generada mediante Golden Gate, se preparó de forma análoga una mezcla de productos de PCR de VHH, y su inserción en el vector pCombGG se realizó por ensamblaje Golden Gate utilizando PaqCI. El clonado de esta biblioteca se llevó a cabo mediante Golden Gate Assembly utilizando la endonucleasa de tipo IIS PaqCI (NEB #R0745). PaqCI reconoce la secuencia de 7 pb CACCTGC y genera extremos cohesivos definidos, permitiendo el ensamblaje “one-pot” de los insertos en el vector pCombGG. Las reacciones se realizaron según las instrucciones del fabricante, incluyendo el vector pCombGG, insertos VHH, Buffer T4 1X, T4 ADN ligasa (NEB #M0202), PaqCI y PaqCI Activator. Este último consiste en un oligonucleótido de doble hebra que aporta sitios adicionales de reconocimiento para PaqCI y contribuye a la eficiencia de digestión.

Se realizaron ensayos preliminares para optimizar las condiciones de clonado mediante Golden Gate. Se evaluaron distintas relaciones molares inserto:vector (2:1, 5:1 y 10:1) y programas de temperatura alternativos que combinaban ciclos de digestión y ligación frente a una reacción isoterma. En las reacciones de clonado Golden Gate, los procesos de digestión y ligación suceden en forma simultánea. Si bien tanto la enzima de restricción como la ligasa son activas a 37 °C, la temperatura óptima para la reacción de ligación es menor (16 °C), por lo que una reacción a temperatura mayor podría resultar en un exceso de vector digerido que no logra ligarse al inserto. Por este motivo, una estrategia de ciclado de temperatura entre las temperaturas óptimas para la digestión y ligación podría aumentar la cantidad de vector recombinante correctamente ligado al final de la reacción. Finalmente, la condición seleccionada para la generación de la biblioteca fue una relación inserto:vector 10:1 y reacción a 37 °C durante 1 hora seguida de 5 minutos a 60 °C.

Para el inserto se preparó una mezcla de los productos de PCR obtenidos con los cebadores modificados (Fwd-VH1-GG, Fwd-VH3-GG, Fwd-VH4-GG y Fwd-VH4Arg-GG), aportando 1 µg de ADN de cada uno. El vector pCombGG se incluyó en la reacción en la relación inserto:vector previamente establecida. La reacción Golden Gate se llevó a cabo a 37 °C durante 1 hora, seguida de una incubación de 5 minutos a 60 °C para la inactivación de las enzimas. El producto de clonado se purificó con el kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific), según se describe en el apartado 3.4.7. El ADN purificado se utilizó para transformar células electrocompetentes de *E. coli* ER2738 mediante electroporación (apartado 3.4.3).

Clonado Golden Gate

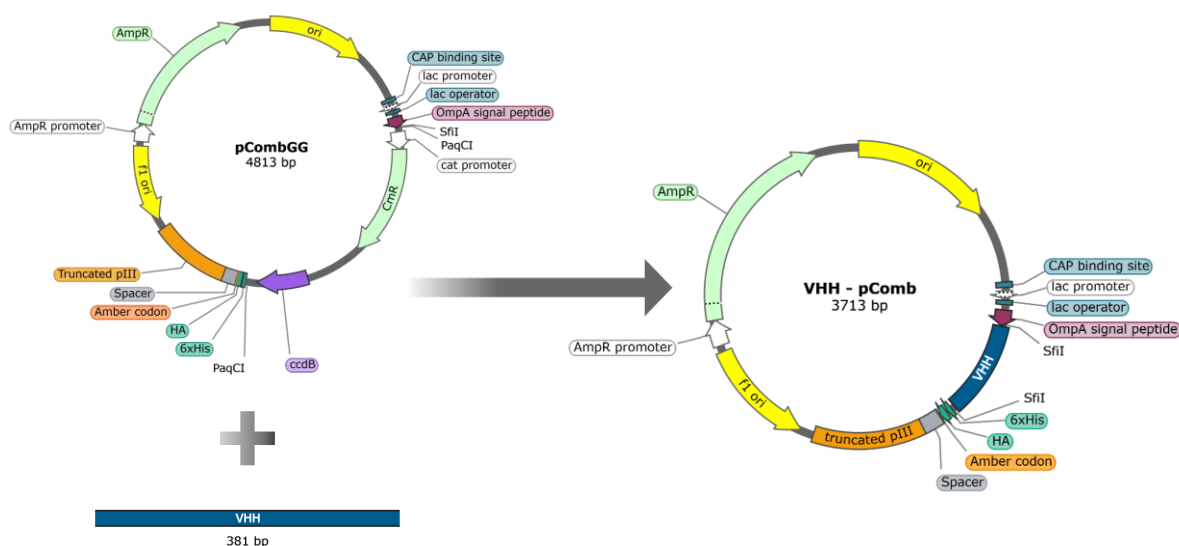


Figura 12 | Clonado Golden Gate de secuencias VHH en pCombGG. El vector pCombGG, que contiene un *cassette* reemplazable (CmR/ccdB) flanqueado por sitios para la endonucleasa tipo IIS PaqCI, se utilizó para el clonado de la biblioteca mediante Golden Gate. La reacción permitió el reemplazo del *cassette* por la secuencia codificante del VHH, generando un vector pComb recombinante que mantiene los elementos necesarios para *phage display* (señal OmpA, pIII truncada, tags HA/6xHis, AmpR, ori/f1 ori). Además, si bien los sitios reconocidos por PaqCI no se mantienen en el vector resultante del clonado, el diseño mantiene sitios de restricción SfiI que flanquean el VHH, lo cual es necesario para su posterior subclonado en el vector de expresión pINQ-HA.

El desempeño del clonado se evaluó a partir del recuento de colonias obtenidas tras la transformación en *E. coli* DB3.1, una cepa resistente a la toxina CcdB. Para ello, se sembraron diluciones seriadas de las bacterias transformadas en placas de LB-Agar suplementadas con ampicilina (A), y en LB-Agar con ampicilina y cloranfenicol (A+CF). Dado que el clonado Golden Gate reemplaza el *cassette* que contiene la resistencia a cloranfenicol y el gen letal ccdB (CmR/ccdB) por el gen VHH, el crecimiento en A+CF se interpretó como indicador de eventos no recombinantes (vector original o religado). En consecuencia, se calculó la proporción de vector religado como el porcentaje de las colonias observadas en A+CF (eventos de religación/vector no digerido) sobre las colonias observadas en A (transformantes totales), y en función de esto se calculó la eficiencia de clonado como:

$$\text{Eficiencia de clonado (\%)} = [1 - (\text{UFC}_{\text{A+CF}}/\text{UFC}_{\text{A}})] \times 100$$

3.5.5. CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA DE FAGOS

Para la construcción de la biblioteca de fagos se tomaron 2 µg del vector resultante y fueron electroporados en células *E. coli* ER2738, realizando 10 transformaciones de 200 ng. Luego de una incubación en medio SOC (15 mL) durante 1 hora a 37 °C, 250 rpm, se tomó una alícuota de 500 µL a partir de la cual se plaquearon diferentes diluciones en

placas de LB agar-ampicilina para determinar la diversidad de la biblioteca. El resto del cultivo fue diluido en 30 mL de medio SB suplementado con ampicilina para una concentración final de 40 µg/mL. Luego de una 1 hora de cultivo, se agregó ampicilina para una concentración final de 100 µg/mL y se incubó 1 hora más. El cultivo fue diluido en 250 mL SB-ampicilina (manteniendo la concentración de 100 µg/mL) y se infectó con fago helper M13K07 (7×10^7 ufc). Luego de 90 minutos de cultivo, se agregó kanamicina (50 µg/mL) y el cultivo se incubó ON en las mismas condiciones.

Al día siguiente, el sobrenadante de cultivo fue obtenido por centrifugación a 12.000g durante 15 minutos a 4 °C. Las partículas de fagos fueron precipitadas mediante el agregado de 0,2 volúmenes de polietilenglicol 8.000 (PEG 8000) 20%-NaCl 2,5 M, e incubadas en hielo durante 1 hora. Luego de una centrifugación a 15.000g durante 20 minutos a 4 °C, los fagos fueron resuspendidos en 30 mL de PBS. Para alcanzar una mayor pureza, los fagos fueron precipitados nuevamente de la misma forma, y luego de la centrifugación fueron resuspendidos en 5 mL de una solución conservadora compuesta por PBS suplementado con BSA 3%, glicerol 10%, Tween 20 0,3%, arginina 120 mM y el cóctel de inhibidores de proteasas cOmplete (Roche #11697498001). Se realizó una centrifugación final a 10.000g durante 5 minutos a 4 °C para eliminar posibles células que hayan permanecido luego de la centrifugación inicial. Finalmente, la biblioteca fue alicuotada y almacenada a -80 °C.

3.6. SELECCIÓN DE NANOBODIES ESPECÍFICOS CONTRA EL INMUNOCOMPLEJO NBA2/MC

La selección de nanobodies específicos frente al inmunocomplejo NbA2/MC se realizó trabajando en paralelo con dos bibliotecas de fagos filamentosos: una construida mediante clonado Golden Gate y otra previamente generada en el grupo mediante clonado convencional. Ambas bibliotecas se obtuvieron a partir del mismo ADNc procedente de PBMC de una *Lama glama* inmunizada con el conjugado NbA2Fc/MC (apartado 3.5.1). Esta estrategia en paralelo se empleó para evaluar el desempeño del clonado Golden Gate en la generación de bibliotecas funcionales de nanobodies.

Las etapas de panning, titulación de fagos y screening de clones se describen en los apartados 3.6.1–3.6.3.

3.6.1. PANNING

Para enriquecer las bibliotecas en clones que reconocieran específicamente el inmunocomplejo NbA2/MC, se utilizó el siguiente protocolo de panning (**figura 13**). En primera instancia, se aplicó una selección negativa previa al panning. La biblioteca de fagos se pre-adsorbió sobre pocillos sensibilizados con estreptavidina (5 µg/mL) y NbA2 (5 µg/mL) de estreptavidina, durante 1 hora a temperatura ambiente con el objetivo de capturar y excluir los fagos que reconocen estos componentes, favoreciendo la recuperación de verdaderos clones anti-inmunocomplejo.

El panning se realizó en placas ELISA de 96 pocillos. Los pocillos se sensibilizaron con 100 µL de estreptavidina 6 µg/mL en PBS e incubaron ON a 4 °C. Al día siguiente se descartó la solución y se bloquearon los pocillos con 300 µL de PBS con BSA al 1 % durante 30 minutos a 37 °C, seguido de cuatro lavados con PBS-Tween 0,05 %. A continuación, se incubaron 100 µL por pocillo de NbA2 biotinilado (10 µg/mL) durante 30 minutos a temperatura ambiente y se realizaron seis lavados con PBS-Tween 0,05 %. Luego se añadió MC-LR a 1 µg/mL en PBS y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, seguida nuevamente de seis lavados. Finalmente, se incubaron 100 µL por pocillo de una dilución 1:5 de la biblioteca de fagos en PBS-BSA 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para eliminar los fagos no unidos al inmunocomplejo, se realizaron diez lavados con PBS-Tween 0,05 %, seguidos de una incubación de 30 minutos con el mismo buffer a temperatura ambiente y otros diez lavados adicionales. Los fagos específicamente unidos se eluyeron mediante la adición de 50 µL de tripsina 10 mg/mL (Sigma-Aldrich #T4799) en TBS, incubando durante 30 minutos a 37 °C. La fracción eluída se denominó output 1.

El output 1 se sometió a un paso de amplificación en *E. coli* ER2738. Para ello, se tomó una alícuota de 2 mL de un cultivo en medio SB con tetraciclina, cultivado hasta DO₆₀₀ =

0,8–1,0 UA, y se infectó con 100 μ L del output 1 durante 20 minutos a 37 °C sin agitación. Las células infectadas se diluyeron en 6 mL de SB con ampicilina 20 μ g/mL y se incubaron 1 hora a 37 °C y 250 rpm. Posteriormente, se ajustó la concentración de ampicilina a 50 μ g/mL y se continuó la incubación 1 hora más bajo las mismas condiciones.

A continuación, el cultivo se diluyó en 12 mL de SB con ampicilina 50 μ g/mL y se añadieron 50 μ L de fago auxiliar M13K07, manteniendo una relación fago:célula aproximada de 10:1. La mezcla se incubó 2 horas a 37 °C con agitación y luego se suplementó con kanamicina hasta una concentración final de 56 μ g/mL, incubándose ON.

Al día siguiente, los fagos se recuperaron del sobrenadante mediante precipitación con PEG. La suspensión celular se centrifugó a 12.000 $\times$ g durante 15 minutos a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, al que se añadieron 0,2 volúmenes de PEG 20%. Tras 1 hora en hielo, se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y el pellet se resuspendió en 1 mL de PBS con BSA al 1%. Esta suspensión se centrifugó brevemente a 17.000 $\times$ g durante 1 minuto para eliminar restos celulares, y el sobrenadante resultante se denominó “amplificado 1”.

Una segunda ronda de panning se realizó siguiendo el mismo procedimiento, utilizando como entrada (“input”) la preparación “amplificado 1” en lugar de la biblioteca original.

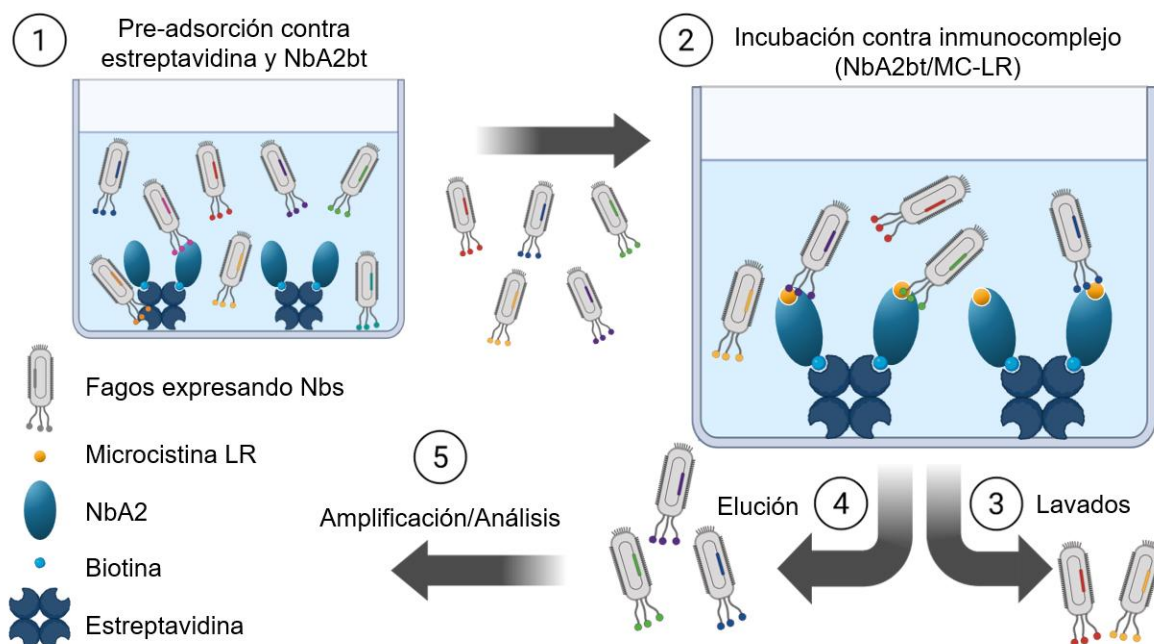


Figura 13 | Esquema del protocolo de *panning* dirigido al inmunocomplejo NbA2/MC-LR. En el paso 1, la biblioteca de fagos se pre-adsorbe sobre superficies recubiertas con estreptavidina/NbA2 biotinilado para depletar variantes que reconocen la matriz o NbA2 en ausencia de MC. Los fagos no retenidos se incuban luego frente al inmunocomplejo NbA2bt/MC-LR (paso 2), tras lo cual los fagos no unidos se eliminan mediante lavados (paso 3) y los específicamente unidos se eluyen (paso 4) y se amplifican/analizan (paso 5). Los pocillos se encuentran además bloqueados con BSA, empleada como proteína de bloqueo, aunque no se representa en el esquema.

3.6.2. TITULACIÓN DE FAGOS

La concentración de fagos se determinó mediante infección de *E. Coli* ER2738 con diluciones seriadas de las soluciones de fagos (outputs o amplificados). Para ello, se utilizaron cultivos de ER2738 en medio SB suplementado con tetraciclina, crecidos hasta una $DO_{600} = 0,8-1,0$ UA.

De cada dilución de fagos se incubaron 10 μ L con 100 μ L de células durante 30 minutos a 37 °C, sin agitación, para promover la infección. Tras la incubación, las células se sembraron en placas de LB-agar con ampicilina y se incubaron ON a 37 °C. Solo las bacterias infectadas por fagos que portan el vector fagémido, el cual confiere resistencia a la ampicilina, fueron capaces de formar colonias.

Al día siguiente, se contaron las colonias y, considerando los factores de dilución, se calculó la concentración de fagos en la muestra, expresada como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

3.6.3. SCREENING DE CLONES ANTI-INMUNOCOMPLEJO NBA2/MC MEDIANTE ENSAYOS DE ELISA

Se seleccionaron colonias individuales a partir de placas de LB-agar con ampicilina utilizadas en la titulación del segundo output y se inocularon en 2 mL de medio SB suplementado con ampicilina. En paralelo, se prepararon cultivos destinados a la extracción de ADN plasmídico (apartado 3.4.4). Los cultivos se incubaron a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar una $DO_{600} \approx 0,5$ UA, momento en el cual se indujo la expresión de los nanobodies mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM. La incubación se realizó ON a 37 °C. Al día siguiente, los cultivos se centrifugaron a $5.000 \times g$ durante 10 minutos y los sobrenadantes se emplearon directamente en los ensayos ELISA de *screening*.

El ELISA de *screening* se realizó siguiendo las condiciones generales descritas en el apartado 3.4.9, con las siguientes modificaciones. Los pocillos se sensibilizaron ON a 4 °C con 100 μ L de estreptavidina 2 μ g/mL en PBS. Tras el bloqueo con PBS con BSA al 1 % durante 30 minutos a 37 °C y cuatro lavados con PBS-Tween 0,05 %, se incubó Nba2 biotinilado a 4 μ g/mL durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de seis lavados. A continuación, se añadió MC-LR a 1 μ g/mL en PBS y se incubó 1 hora a temperatura ambiente, realizando nuevamente seis lavados. Posteriormente, se incubaron los sobrenadantes de cultivo diluidos 1:2 en PBS-BSA 0,1 % durante 1 hora a temperatura ambiente, seguidos de seis lavados adicionales. Para la detección se utilizó un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa (Roche #12013819001) diluido 1:3000, incubado durante 1 hora. El desarrollo de la señal se efectuó mediante la adición de sustrato-PO e incubación durante 10 minutos, deteniéndose la reacción y registrándose la absorbancia según se describe en el apartado 3.4.9.

3.7. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS NANOBODIES SELECCIONADOS

Los Nbs seleccionados a partir del screening por ELISA se subclonaron en el vector de expresión pINQ-HA mediante digestión del inserto y del vector con SfiI (NEB #R0123) y posterior ligación con T4 ADN ligasa (NEB #M0202), siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se expresaron de forma recombinante en *E. coli* BL21(DE3) y se purificaron mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA, aprovechando la cola 6xHis codificada en el vector pINQ-HA. A continuación, se describen las condiciones utilizadas para la optimización de la expresión mediante pruebas a pequeña escala, la expresión a gran escala combinada con lisis por shock osmótico y el procedimiento de purificación y diálisis.

3.7.1. OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES MEDIANTE EXPRESIÓN A PEQUEÑA ESCALA

Para las pruebas de expresión a pequeña escala, se cultivaron células *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el plásmido de expresión correspondiente (pINQ-HA-Nb; apartado 3.3.4), partiendo de colonias individuales. Cada colonia se inoculó en 2 mL de medio LB suplementado con kanamicina y se incubó a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar una $DO_{600} \approx 0,5$ UA.

En ese momento se indujo la expresión mediante la adición de IPTG a distintas concentraciones finales (0, 1, 3, 10 o 100 μ M; 0 μ M como control sin inducción), y los cultivos se incubaron durante la noche (ON) a 20 °C o 28 °C.

Al día siguiente, se recolectó 1 mL de cada cultivo, se recuperaron las células mediante centrifugación a $17.000 \times g$ durante 1 minuto y el pellet se resuspendió en 200 μ L del reactivo de lisis celular B-PER™ (Thermo Scientific #78243), incubando durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una nueva centrifugación a $15.000 \times g$ durante 5 minutos, separando las fracciones soluble (sobrenadante) e insoluble (pellet) que contenían las proteínas expresadas. La fracción insoluble fue resuspendida en urea 8M. Ambas fracciones se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE, según se describe en el apartado 3.4.8.

En esta etapa se evaluaron combinaciones de concentración de IPTG (0–100 μ M) y temperatura de incubación post-inducción (20 °C y 28 °C) con el objetivo de maximizar la cantidad de nanobody obtenida en la fracción soluble. La condición finalmente seleccionada (inducción con 10 μ M de IPTG e incubación ON a 28 °C) se utilizó posteriormente para la expresión a gran escala descrita en el apartado 3.7.2.

3.7.2. EXPRESIÓN DE NANOBODIES A MAYOR ESCALA

La expresión a gran escala de los nanobodies seleccionados se llevó a cabo en *E. coli* BL21(DE3) utilizando las condiciones optimizadas en cultivos a pequeña escala (apartado 3.7.1). 500 mL de cultivo en medio LB suplementado con kanamicina se incubaron a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar una $DO_{600} \approx 0,5$ UA, momento en el que se indujo la expresión con IPTG hasta una concentración final de 10 μ M. Los cultivos se incubaron ON a 28 °C.

Al finalizar la incubación, las células se recolectaron por centrifugación a 5.000g durante 10 minutos y el pellet se resuspendió en 5 mL de buffer TES. Esta suspensión se congeló a -80 °C y posteriormente se descongeló sobre hielo. A continuación, se añadió 5 mL adicionales de buffer TES y se incubó en hielo durante 30 minutos. Para inducir el shock osmótico, se agregaron 15 mL de una dilución 1:5 de buffer TES en agua Milli-Q, manteniendo la mezcla en hielo durante 30 minutos adicionales. Finalmente, se centrifugó a 20.000g durante 30 minutos para eliminar los restos celulares. Este método permite la ruptura de la membrana externa de la bacteria, liberando las proteínas presentes en el espacio periplásmico. El sobrenadante obtenido se utilizó directamente para la purificación por cromatografía de afinidad descrita en el apartado 3.7.3.

3.7.3. PURIFICACIÓN DE NANOBODIES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

La purificación de los Nbs se realizó mediante cromatografía de afinidad sobre Ni-NTA utilizando una columna HisTrap HP (GE Healthcare) acoplada a un sistema ÄKTA purification system (GE Healthcare), aprovechando la cola 6xHis presente en el constructo de expresión.

Antes de cargar la muestra, la columna se equilibró con el buffer A (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 8,0). El sobrenadante periplásmico obtenido tras el shock osmótico se ajustó a las mismas condiciones iónicas, igualando las concentraciones de NaCl e imidazol al buffer A, y se filtró previamente a través de una membrana de 0,22 μ m. Tras la inyección de la muestra, se realizó un lavado inicial con aproximadamente 5 mL de buffer A, seguido de lavados adicionales incrementando la proporción de buffer B (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM, pH 8,0) hasta alcanzar concentraciones de imidazol de 39 mM y 68 mM, respectivamente, para eliminar proteínas inespecíficamente unidas. La elución del nanobody se efectuó aumentando la concentración de imidazol hasta 116 mM. Durante todo el procedimiento se monitorizó la absorbancia a 280 nm para seguir la presencia de proteínas en el efluente.

Las fracciones que contenían la proteína de interés, identificadas por el cromatograma, se combinaron y se dializaron durante la noche a 4 °C frente a 4 L de PBS utilizando membranas con un punto de corte de 13 kDa (Sigma-Aldrich). Al día siguiente se realizó un cambio de buffer y se continuó la diálisis durante 4 horas adicionales bajo las mismas

condiciones. Finalmente, las fracciones dializadas se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE (apartado 3.4.8) y su concentración proteica se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

3.8. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS NANOBODIES PURIFICADOS

Los nanobodies, seleccionados a partir del screening por ELISA, fueron caracterizados funcionalmente para evaluar su afinidad y especificidad frente al inmunocomplejo NbA2/MC. En una primera instancia, se analizó su especificidad por ELISA frente a NbA2 y frente a NbA2/MC, así como su capacidad de reconocer MC-LR en ausencia de NbA2. Esta evaluación inicial permitió descartar al candidato NbK2, por lo que se continuó el trabajo con NbK3. Posteriormente, para este candidato se determinaron las constantes cinéticas de asociación y disociación mediante interferometría de biocapa (BLI), a partir de las cuales se calculó la constante de afinidad (K_D).

3.8.1. EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD POR ELISA

La especificidad de los Nbs seleccionados se evaluó mediante distintos formatos de ELISA, siguiendo las condiciones generales descritas en el apartado 3.4.9, con las modificaciones que se detallan a continuación. En los ensayos en los que los Nbs seleccionados actuaron como anticuerpo de detección, la detección se realizó a través del epítotope HA utilizando un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa (dilución 1:3000), seguido de incubación con la solución sustrato-PO durante 10 minutos a temperatura ambiente y lectura de la absorbancia según 3.4.9. En aquellos ensayos en los que NbA2 biotinilado (previamente producido en el laboratorio) se utilizó como anticuerpo de detección, se empleó estreptavidina conjugada a peroxidasa (estreptavidina-PO) a una dilución 1:10000 como sistema de revelado.

ENSAYOS EXPLORATORIOS CON NANOBODIES PURIFICADOS

Como primera aproximación tras la purificación, se evaluó el comportamiento de los Nbs seleccionados en diferentes configuraciones de captura/detección frente a MC-LR (en adelante, MC). Los ensayos se realizaron en placas ELISA sensibilizadas ON a 4 °C con 100 μ L de estreptavidina 2 μ g/mL en PBS. Tras el bloqueo con PBS-BSA 1 % y los lavados correspondientes, se incubaron los pocillos con NbA2 biotinilado a 4 μ g/mL, permitiendo su captura sobre la estreptavidina.

Sobre esta configuración se ensayaron dos condiciones:

- Curva de MC, partiendo de 10 µg/L y realizando diluciones seriadas 1:3 en PBS. Luego de la incubación, la captura de MC fue revelada mediante la incubación de 1 µg/mL de los Nbs.
- Curva de Nbs. En este caso, se incubó MC a 1 µg/L en PBS, y en el siguiente paso se realizó una curva de Nbs partiendo de 0,5 µg/mL y realizando diluciones seriadas 1:3. Esta condición fue repetida en ausencia de MC, para evaluar la reactividad de los Nbs contra NbA2.

Tras los resultados obtenidos en estos ensayos, se decidió continuar únicamente con el nanobody K3 (NbK3), ya que fue el único candidato que mostró una señal robusta y reproducible y preferencial frente al inmunocomplejo NbA2/MC.

RECONOCIMIENTO DE MICROCISTINA EN AUSENCIA DE NBA2

Para analizar si NbK3 era capaz de reconocer MC en ausencia de NbA2, se emplearon pocillos sensibilizados con un conjugado BSA-MC. Los pocillos se sensibilizaron ON a 4 °C con 100 µL de una solución de BSA-MC a 0,5 µg/mL en PBS y, en paralelo, con el inmunocomplejo NbA2/MC utilizado como control positivo. Tras el bloqueo con PBS-BSA 1 % y los lavados correspondientes, se incubaron los pocillos con NbK3 purificado a 0,5 µg/mL en PBS-BSA 0,1 %.

Este ensayo constituye una primera aproximación al reconocimiento de MC por NbK3, dado que es posible que ciertos epítopes sean modificados como resultado de la conjugación a BSA.

RECONOCIMIENTO DE MICROCISTINA LIBRE E INMUNOCOMPLEJO NBA2/MC

En un tercer conjunto de ensayos se evaluó la reactividad de NbK3 frente a MC en solución y frente al inmunocomplejo NbA2/MC, empleando diferentes pares de captura/detección. Para ello, se preparó una curva de MC-LR en PBS, partiendo de una concentración inicial de 20 µg/L y realizando diluciones seriadas 1:3.

Los ELISA se llevaron a cabo en placas sensibilizadas con NbA2 o con NbK3, según el par de captura/detección evaluado. Tras el bloqueo y lavados, se incubaron los pocillos con las soluciones de MC-LR en serie de dilución. En una de las condiciones se ensayó el par NbK3 (captura) / NbA2 (detección), mientras que en otra se invirtió la disposición (NbA2 como captura y NbK3 como detección). Además, se incluyó una condición en la que se añadió el inmunocomplejo NbA2/MC preformado a pocillos recubiertos con NbK3.

3.8.2. DETERMINACIÓN DE CONSTANTES CINÉTICAS POR BLI

La determinación de las constantes cinéticas de asociación y disociación se realizó mediante interferometría de biocapa (BLI) utilizando un equipo BLItz® System y sensores de estreptavidina Dip and Read™ (ForteBio, Sartorius; Fremont, CA, USA) (**figura 14**).

El inmunocomplejo NbA2 biotinilado/MC se inmovilizó sobre los biosensores siguiendo las recomendaciones del fabricante, incubando las puntas en una solución del inmunocomplejo en kinetic buffer hasta alcanzar una señal estable. A continuación, los sensores se equilibraron en kinetic buffer para registrar la línea de base.

La fase de asociación se midió sumergiendo los biosensores en soluciones de NbK3 a diferentes concentraciones (25–200 nM), registrando el aumento de la señal en función del tiempo. Posteriormente, los sensores se transfirieron nuevamente a kinetic buffer sin analito para registrar la fase de disociación.

Los datos crudos de asociación/disociación se analizaron con el software BLItz Pro v1.2, aplicando corrección de línea de base y ajuste a un modelo de unión 1:1. A partir de los ajustes se obtuvieron las constantes cinéticas de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}), y se calculó la constante de afinidad ($K_D = k_{off} / k_{on}$).

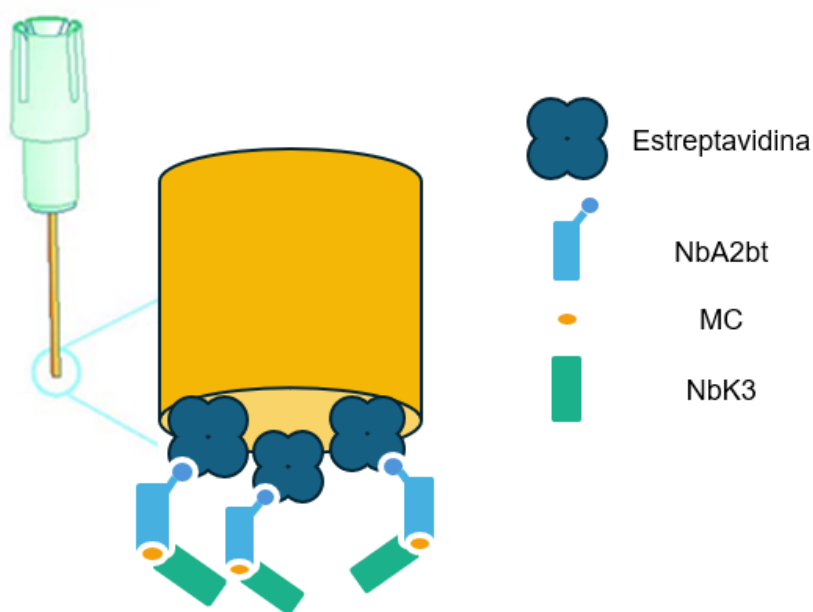


Figura 14 | Esquema del sensor de biointerferencia óptica utilizado en el sistema BLItz®. La punta sensor recubierta con estreptavidina se satura con NbA2 biotinilado (NbA2bt), que captura la microcistina (MC) presente en la disolución. El inmunocomplejo formado en la superficie es reconocido posteriormente por el NbK3 en fase líquida, generando la señal de unión registrada en los sensogramas.

3.9 DESARROLLO Y EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO DEL INMUNOENSAYO NO COMPETITIVO

A partir de NbK3 se desarrolló un inmunoensayo no competitivo (en formato de ELISA de captura) para la detección de microcistinas en muestras de agua. En este esquema, el NbA2 se emplea como nanobody de captura y se incubó posteriormente con MC para la formación del inmunocomplejo NbA2/MC. La detección del inmunocomplejo se llevó a cabo mediante la adición del NbK3 y, en una etapa subsiguiente, mediante un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa, dirigido contra el tag HA presente en el NbK3. Este conjugado enzimático permitió el revelado de la unión a través de una reacción colorimétrica, posibilitando la cuantificación de las MCs. Las curvas de calibración de MCs fueron ajustadas a un modelo logístico de 4 parámetros (4PL).

3.9.1. OPTIMIZACIÓN DEL INMUNOENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE MICROCISTINA EN MUESTRAS DE AGUA

Con el fin de maximizar el desempeño analítico del inmunoensayo no competitivo basado en el reconocimiento del inmunocomplejo NbA2/MC por NbK3, se llevaron a cabo una serie de ensayos de optimización. En primer lugar, se seleccionó la concentración de NbK3 que permitiera una señal robusta frente al inmunocomplejo minimizando la reactividad residual frente a NbA2 en ausencia de MC. A continuación, se compararon dos formatos de captura de NbA2 (estreptavidina–NbA2 biotinilado frente a NbA2 adsorbido directamente a la placa) para evaluar su impacto sobre la sensibilidad del ensayo. Finalmente, se analizó la influencia del buffer de interferencia y se ajustó el rango de trabajo del inmunoensayo para su aplicación en muestras de agua.

SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE NBK3 Y CONFIRMACIÓN DE ESPECIFICIDAD

Para definir la concentración de trabajo de NbK3 y evaluar su especificidad en el formato de inmunocomplejo, se realizó una titulación por ELISA frente a tres condiciones de sensibilización: (i) estreptavidina, (ii) estreptavidina + NbA2, (iii) y estreptavidina + inmunocomplejo NbA2/MC.

Los ensayos se realizaron en placas ELISA sensibilizadas ON a 4 °C con 100 µL de estreptavidina 2 µg/mL en PBS. Tras el bloqueo con PBS-BSA 1 % y los lavados correspondientes (apartado 3.4.9), los pocillos se incubaron con NbA2 biotinilado 4 µg/mL en PBS-BSA 0,1% para las condiciones (ii) y (iii), mientras que la condición (i) se incubó con PBS. En la condición (iii), el inmunocomplejo NbA2/MC se generó mediante una etapa adicional de incubación con MC-LR 1 µg/L en PBS.

A continuación, se realizó una curva de titulación de NbK3 purificado. La curva se inició a 5 µg/mL de NbK3 en PBS-BSA 0,1 %, preparando una serie de 12 puntos en diluciones

seriadas 1:2; el último pocillo se dejó como blanco sin NbK3. Tras la incubación y los lavados, se realizó la detección y lectura de la absorbancia según se describe en el apartado 3.4.9.

COMPARACIÓN DE FORMATOS DE CAPTURA: ESTREPTAVIDINA-NbA2BT VS NbA2 ADSORBIDO

Una vez seleccionada la concentración de trabajo de NbK3, se compararon dos formatos de inmovilización del anticuerpo de captura NbA2: NbA2 biotinilado capturado sobre estreptavidina (formato estreptavidina-NbA2bt) y NbA2 adsorbido directamente sobre la placa.

En el formato estreptavidina-NbA2bt, los pocillos se sensibilizaron ON a 4 °C con estreptavidina 2 µg/mL en PBS, se bloquearon con PBS-BSA 1 % y, tras los lavados, se incubaron con NbA2bt en PBS a una concentración 4 µg/mL. En el formato de adsorción directa, NbA2 se inmovilizó sobre las placas ELISA incubando ON a 4 °C con una solución de NbA2 4 µg/mL en PBS. En ambos formatos, tras el bloqueo y los lavados, se construyó una curva de calibración de MC-LR partiendo de 20 µg/L y realizando diluciones seriadas 1:3 en PBS.

Tras la incubación con las soluciones de MC-LR y los lavados correspondientes, se añadió NbK3 a 0,5 µg/mL, preparado en PBS-BSA 0,1 %. Finalmente, se realizó la detección de NbK3 mediante anti-HA-PO y sustrato-PO, registrándose la absorbancia como se describe en el apartado 3.4.9.

INCORPORACIÓN DEL BUFFER DE INTERFERENCIA (BI)

Para adaptar el inmunoensayo a su aplicación en muestras de agua, se evaluó el uso de un buffer de interferencia (BI; Tris 1 M, NaCl 0,3 M, EDTA 0,2 M, BSA 1 %, pH 7,5; apartado 3.1) en la preparación de la curva de calibración y de las muestras. En estas pruebas, las curvas de MC-LR se prepararon partiendo de 2 µg/L con diluciones seriadas 1:2 en PBS suplementado con BI, manteniendo el formato de captura seleccionado (estreptavidina-NbA2bt) y la concentración de NbK3 previamente optimizada. El resto de las etapas del ELISA (bloqueo, incubaciones, lavados y detección) se realizaron de acuerdo con las condiciones generales descritas en el apartado 3.4.9.

3.9.2. EVALUACIÓN DE LA REACTIVIDAD CRUZADA FRENTE A OTRAS VARIANTES DE MC

Para evaluar la reactividad cruzada del inmunoensayo no competitivo frente a diferentes variantes de MCs se empleó el siguiente panel: MC-LR (empleada en la selección y desarrollo del inmunoensayo), MC-RR, MC-LA, MC-YR, MC-LW y MC-LF.

Las variantes MC-LR, MC-RR, y MC-YR están reportadas con alta frecuencia en la cuenca del Río de la Plata y sistemas asociados en la región (incluyendo Uruguay), por lo que son los “sospechosos habituales” cuya detección es de interés en un ensayo aplicado en el país ⁷⁰. La MC-LA permite evaluar el impacto del residuo cargado arginina (R), y MC-LW + MC-LF son variantes más apolares que suelen mostrar toxicocinética y organotropismo distinto y han sido vinculadas a mayor permeabilidad celular y mayor potencial neurotóxico en comparación con otras variantes más hidrofílicas ^{71,72}.

El ensayo se realizó bajo las condiciones optimizadas descritas en el apartado 3.9.1, incluyendo la captura de MC mediante estreptavidina–NbA2 biotinilado y el revelado con 0,5 µg/mL de NbK3).

Se prepararon curvas de calibración independientes para MC-LR y para cada una de las variantes. En todos los casos, las curvas se iniciaron a 20 µg/L de toxina en PBS suplementado con buffer de interferencia (BI) y se realizaron diluciones seriadas 1:3, sembrando cada punto por triplicado. Tras la incubación con las soluciones de MC y los lavados correspondientes, se añadió NbK3 en las condiciones optimizadas y se procedió a la detección mediante anti-HA-PO y sustrato-PO, registrándose la absorbancia según lo descrito en el apartado 3.4.9.

A partir de las curvas de calibración se determinó para cada variante la concentración de saturación 50 (SC₅₀) es decir la concentración que da lugar al 50% de la señal de saturación del ensayo. La reactividad cruzada relativa se expresó como porcentaje tomando MC-LR como referencia, calculada mediante la relación:

$$\text{Reactividad cruzada (\%)} = \frac{SC_{50}(MC - LR)}{SC_{50}(MC - XX)} \times 100$$

donde MC-XX corresponde a cada una de las variantes evaluadas.

3.9.3. RECUPERACIÓN EN MUESTRAS DE AGUA

La exactitud del inmunoensayo no competitivo para la detección de MC-LR en agua se evaluó mediante ensayos de recuperación en muestras fortificadas (*spiking*).

Se seleccionaron 21 muestras de agua procedentes de diferentes fuentes (represas, sistemas de agua potable, agua Milli-Q) que presentaban valores no detectables o niveles bajos de MCs. Cada muestra se dividió en alícuotas y se agruparon en dos niveles de fortificación: 0,1 µg/L y 0,5 µg/L de MC-LR, añadiendo el volumen correspondiente de un estándar certificado de MC-LR. Para cada muestra se conservó una alícuota sin fortificar (no *spike*) como control.

Las muestras fortificadas y sus correspondientes controles sin fortificar se analizaron en el mismo ensayo mediante el inmunoensayo no competitivo optimizado descrito en el apartado 3.9.1. Las concentraciones de MC-LR se obtuvieron por interpolación en la curva de calibración.

El porcentaje de recuperación se calculó para cada muestra según la siguiente expresión:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{C_{\text{spike}} - C_{\text{no spike}}}{C_{\text{añadido}}} \times 100$$

donde C_{spike} es la concentración medida en la alícuota fortificada, $C_{\text{no spike}}$ la concentración medida en la misma muestra sin fortificar y $C_{\text{añadido}}$ la concentración teórica de MC-LR añadida.

3.9.4. EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DEL INMUNOENSAYO (INTRA- E INTER-ENSAYO)

La precisión intraensayo se evaluó en una única jornada (mismo analista, equipo y lote de reactivos), utilizando tres niveles de concentración de MC-LR en una muestra de agua tratada: 0 µg/L, 0,1 µg/L y 0,5 µg/L. Para cada nivel se prepararon cinco réplicas independientes, que se procesaron de principio a fin en el mismo ensayo (preparación, incubaciones y lectura). Para cada nivel se calculó la media, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV, %) según: $CV\% = (DE/\text{media}) \times 100$

La precisión interensayo se determinó en cinco días distintos ($n = 5$), repitiendo el análisis de los mismos niveles de concentración (blanco de matriz, 0,1 µg/L y 0,5 µg/L) con curvas de calibración recién preparadas en cada jornada. En cada día se analizó una réplica por nivel bajo idénticas condiciones instrumentales, pero utilizando preparaciones independientes de reactivos. Para cada nivel se calculó la media de las concentraciones obtenidas en los cinco días, la DE interdía y el CV (%) correspondiente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA DE FAGOS UTILIZANDO CLONADO GOLDEN GATE

Previo a la construcción de la biblioteca, se evaluó la respuesta humoral de la llama inmunizada frente al inmunocomplejo NbA2/MC mediante la determinación del título de anticuerpos. Si bien se evidenció una respuesta robusta frente al inmunocomplejo, se obtuvo un título similar frente a NbA2 en ausencia de MC. Sin embargo, al tratarse de una respuesta policlonal, la señal detectada podría estar dominada por clones dirigidos contra epítomos propios del NbA2, sin que se pueda confirmar en esta instancia una fracción diferencial específica contra el inmunocomplejo. En consecuencia, se decidió avanzar con la construcción de la biblioteca.

Para la generación de la biblioteca de fagos se partió de las PBMCs de 200 mL de sangre de una llama inmunizada; se determinó un total de $2,5 \times 10^8$ PBMCs mediante conteo celular. Posteriormente se extrajo el ARN total correspondiente a $5,0 \times 10^7$ PBMCs, se generó ADNc y se amplificaron por PCR las secuencias codificantes de los dominios variables de anticuerpos de cadena pesada, que posteriormente se clonaron mediante la técnica Golden Gate en el vector fagémido pCombGG. El producto de ligación se transformó en *E. coli* ER2738 y, tras la infección con el fago auxiliar, se obtuvo la biblioteca de fagos lista para las rondas de selección. En este apartado se presentan y discuten los parámetros que definen su calidad (eficiencia de clonado, diversidad y título), dado que condicionan directamente la probabilidad de aislar clones específicos en etapas posteriores.

4.1.1. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL CLONADO MEDIANTE GOLDEN GATE

Para la generación de la biblioteca, los genes de nanobody fueron clonados en el vector pCombGG. El mismo cuenta con sitios de restricción para la enzima PaeI, los cuales flanquean un *cassette* que contiene un gen de resistencia a cloranfenicol y la toxina proteica CcdB. Cuando el clonado del inserto de interés es exitoso, este *cassette* será reemplazado por un gen de nanobody.

CcdB se dirige a la subunidad A de la ADN girasa (GyrA) y estabiliza el complejo de rotura girasa-ADN, lo que genera roturas de doble hebra y conduce a la muerte celular⁷³. De esta forma, el gen de esta toxina puede utilizarse como marcador de selección, y al transformar la biblioteca clonada en *E. coli* ER2738 (la cepa susceptible a la infección por fagos utilizada para generar la biblioteca) se esperaría la aparición de colonias solo

cuando *ccdB* ha sido eliminado. Por el contrario, religaciones del vector sin inserto mantendrían *ccdB* y no deberían dar lugar a crecimiento.

En la práctica, este esquema no proporcionó la discriminación esperada entre clones recombinantes y religaciones, dado que la transformación de la cepa *E. coli* ER2738 con vector pCombGG no recombinante dio lugar a crecimiento de colonias en condiciones donde, teóricamente, la expresión de CcdB debería ser letal. Estos resultados no coinciden con lo descrito previamente para sistemas de selección basados en CcdB. Una explicación plausible es la presencia del episoma F' en ER2738, que codifica el sistema toxina-antitoxina CcdB/CcdA; la expresión de CcdA podría neutralizar parcialmente la toxicidad de CcdB y permitir la supervivencia de falsos positivos ^{74,75}. Si bien el uso de CcdB como marcador de selección ha sido reportado anteriormente por Wang *et al.* en una cepa que contiene el episoma F', en este reporte no se proporciona evidencia directa de que la presencia de CcdB impida totalmente el crecimiento. (73)

Debido a la incompatibilidad entre un sistema de selección negativa basado en CcdB y la cepa *E. coli* ER2738 (F', portadora del plásmido requerido para la infección por fagos y de la antitoxina CcdA), se recurrió a una estrategia alternativa que, si bien no permitiría eliminar los transformantes producto de vector no recombinante, permitiría evaluar la eficiencia del clonado mediante Golden Gate. Para ello, se empleó el gen de resistencia a cloranfenicol ya presente en el *cassette* del vector pCombGG. En este diseño, el gen de resistencia a cloranfenicol queda intercalado entre los sitios de clonación y se elimina cuando la inserción de la biblioteca es correcta; en consecuencia, los clones recombinantes pierden la resistencia y se vuelven sensibles al antibiótico, mientras que las religaciones conservan el *cassette* de selección y crecen en medio suplementado con cloranfenicol. Dado que además el vector contiene, por fuera de este *cassette*, un gen de resistencia a ampicilina, las colonias observadas en presencia de ampicilina y cloranfenicol indicarían la presencia de vector no recombinante, mientras que las colonias observadas en presencia únicamente de ampicilina indican la presencia de vector en general. Esta diferencia fue utilizada como método de evaluación de la eficiencia de clonado. Para ello, se empleó la cepa *E. coli* DB3.1, que porta la mutación *gyrA462* en la subunidad A de la ADN girasa. Esta sustitución impide que CcdB estabilice el complejo de rotura girasa-ADN, haciendo a la cepa tolerante a la presencia del gen *ccdB* en el vector ⁷⁷.

El uso de la cepa *E. coli* DB3.1 se debió a que, si bien la cepa *E. coli* ER2738 mostró cierta resistencia a la presencia de CcdB, la inconsistencia en el tamaño de las colonias observadas dificultaba el conteo. En particular, se observó que la mayoría de las colonias presentaban un tamaño muy reducido con respecto a lo esperado para la cepa, sugiriendo cierto grado de toxicidad mediada por CcdB, aunque el crecimiento no fuera totalmente impedido. Puede especularse que, a la hora de generar la biblioteca de fagos, esta toxicidad podría aportar una ventaja aún sin ser letal. Esto se debe a que luego de una transformación de *E. coli* ER2738 con vector recombinante que contenga cierta

proporción minoritaria de vector religado que codifique la toxina, el crecimiento de estos transformantes en medio líquido favorecería la competencia y por tanto la replicación preferencial de clones recombinantes frente a clones que expresan CcdB. En el futuro, esto podría verificarse mediante secuenciación masiva de la biblioteca generada, verificando la proporción de clones que codifican nanobodies.

4.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE GOLDEN GATE

Con el objetivo de optimizar la reacción Golden Gate para la construcción de la biblioteca, se evaluaron distintas combinaciones de relación inserto:vector (I:V), cantidad total de ADN en la reacción y la implementación de ciclos de digestión/ligación. El desempeño se midió por el conteo de colonias tras la transformación y por la eficiencia de clonado, calculado según se describe en la Metodología (apartado 3.5.4).

Al aumentar la relación I:V se observó un aumento progresivo de la eficiencia de clonado (69 % → 84 % → 95 %). Este comportamiento es coherente con la cinética esperada en Golden Gate: un exceso moderado de inserto favorece que los extremos cohesivos del vector sean ocupados por el inserto antes de que el propio vector pueda recircularizarse, de modo que una mayor cantidad relativa de inserto compite con la religación del vector vacío y la limita.

Manteniendo la relación I:V en 2:1, se ensayó además un protocolo con ciclos de digestión/ligación: en estas condiciones se observó una eficiencia del 60 % frente al 69% observado en la reacción isoterma.

Tabla 1 | Eficiencia de clonado por Golden Gate. A la izquierda se muestra el porcentaje de clones correctos obtenido para diferentes relaciones molares inserto:vector. A la derecha se indica la eficiencia de clonado para la relación 2:1 bajo dos condiciones de reacción: isoterma y con ciclos de temperatura.

RELACIÓN INSERTO:VECTOR	EFICIENCIA DE CLONADO (%)	CONDICIÓN	EFICIENCIA DE CLONADO (%)
2:1	69	2:1 – REACCIÓN ISOTERMA	69
5:1	84	2:1 – REACCIÓN CON CICLOS	60
10:1	95		

Dentro del conjunto de condiciones evaluadas, la combinación que presentó la mayor eficiencia de clonado fue I:V 10:1 con reacción isoterma a 37 °C (**tabla 1**), por lo que se adoptó para la construcción de la biblioteca. En esta etapa, el propósito no fue realizar una optimización exhaustiva del sistema Golden Gate, sino definir un óptimo operativo dentro del espacio experimental explorado, como suele hacerse en ajustes preliminares. El desempeño se estimó a partir del crecimiento diferencial en placas con ampicilina (A) y con ampicilina más cloranfenicol (A+CF), lo que permitió discriminar la retención del *cassette* original frente a su reemplazo por el inserto VHH y expresar la eficiencia de clonado en consecuencia. Si bien podrían haberse ensayado relaciones I:V superiores

para evaluar si la tendencia se mantenía, se optó por no ampliarlas como un compromiso práctico entre reducir la religación del vector y mantener un consumo razonable de ADN, criterio que resultó suficiente para avanzar con la generación de la biblioteca.

Cabe señalar que el clonado Golden Gate se basa en extremos cohesivos predefinidos, diseñados para favorecer el ensamblaje direccional del inserto y minimizar productos alternativos, por lo que eventos como orientaciones erróneas o inserciones no deseadas no son esperables bajo este diseño. Como validación complementaria, podrían incorporarse análisis sobre clones individuales, como colony-PCR y/o digestiones diagnósticas, así como la secuenciación masiva. Estas aproximaciones permitirían corroborar la presencia e integridad del inserto y aportar mayor resolución sobre la composición de la biblioteca, aunque en el marco de esta tesina la evaluación principal se orientó a su desempeño funcional.

4.1.3 CARACTERIZACIÓN DE LA BIBLIOTECA GOLDEN GATE Y COMPARACIÓN CON LA BIBLIOTECA CONVENCIONAL

Para evaluar la efectividad del método Golden Gate en la construcción de bibliotecas de fagos, se comparó la biblioteca generada mediante este método con una construida por el método convencional de clonado. Ambos enfoques fueron realizados bajo condiciones optimizadas y las transformaciones se llevaron a cabo en células electrocompetentes de *E. coli* ER2738. Esta comparación permitió analizar no solo el rendimiento en términos de transformantes totales y título, sino también la diversidad y la cobertura efectiva de las bibliotecas generadas.

La comparación entre ambas bibliotecas indica que, en las condiciones evaluadas, la construcción por el método convencional produjo valores mayores de transformantes totales y de título que la obtenida por Golden Gate (**tabla 2**). La biblioteca convencional alcanzó $4,8 \times 10^8$ UFC totales frente a $2,4 \times 10^7$ UFC en Golden Gate (≈ 20 veces más), mientras que el título fue de $1,4 \times 10^{12}$ UFC/mL frente a $4,1 \times 10^{11}$ UFC/mL ($\approx 3,4$ veces más).

Es importante subrayar que, si bien la “diversidad” suele ser aproximada a partir del número de transformantes, esto no es una medida directa del número de variantes únicas. En este contexto, el conteo inicial de $5,0 \times 10^7$ PBMCs constituye una referencia del tamaño del material biológico disponible, pero no equivale al número de variantes VHH presentes en la biblioteca. En primer lugar, las PBMCs incluyen múltiples poblaciones celulares y solo una fracción corresponde a linfocitos B, que son los que aportan los transcritos de inmunoglobulinas. Además, la representación final del repertorio depende de etapas posteriores (síntesis de ADNc y amplificación por PCR), donde pueden introducirse sesgos asociados a la abundancia relativa de transcritos y a la eficiencia diferencial de amplificación. Por otro lado, la expansión clonal en animales inmunizados puede incrementar la redundancia del repertorio y reducir el número

efectivo de secuencias únicas respecto del número total de células recuperadas. En consecuencia, la diversidad queda condicionada no solo por la cantidad de PBMCs de partida, sino también por la expansión clonar y los posibles sesgos introducidos en las etapas de síntesis y amplificación.

De todas formas, ambas bibliotecas son utilizables para rondas de panning, aunque la biblioteca convencional presenta una ventaja inicial en términos de cobertura potencial del repertorio.

Además, cada biblioteca se construyó una única vez, de modo que los valores obtenidos reflejan el desempeño de esas preparaciones concretas y no permiten, por sí solos, concluir que una metodología sea intrínsecamente superior a la otra en términos de diversidad o título. La comparación debe interpretarse como una estimación inicial de rendimiento y no como una evaluación exhaustiva de las metodologías.

En el momento de la redacción de este trabajo, ambas bibliotecas se encuentran en análisis por secuenciación masiva, lo que permitirá estimar con mayor resolución la fracción de clones únicos, la distribución de frecuencias y la existencia de posibles sesgos introducidos durante el clonado. Estos datos serán necesarios para validar si las diferencias observadas en UFC se traducen, o no, en diferencias cualitativas relevantes en la diversidad y cobertura efectiva de las bibliotecas.

Tabla 2 | Caracterización de las bibliotecas generadas por el método convencional y por Golden Gate.

Se indican la diversidad, expresada como UFC totales, y el título de la biblioteca, expresado como UFC/mL, para cada estrategia de construcción.

	MÉTODO CONVENCIONAL	GOLDEN GATE
DIVERSIDAD	4,8 x 10 ⁸ UFC totales	2,4 x 10 ⁷ UFC totales
TÍTULO BIBLIOTECA	1,4 x 10 ¹² UFC/mL	4,1 x 10 ¹¹ UFC/mL

4.2. SELECCIÓN DE CLONES ANTI-INMUNOCOMPLEJO NBA2/MC

4.2.1. PANNING Y ENRIQUECIMIENTO DE CLONES ANTI-INMUNOCOMPLEJO

Con el objetivo de aislar nanobodies que reconocieran de forma específica el inmunocomplejo NbA2/MC (y no a sus componentes por separado) se llevaron a cabo rondas sucesivas de panning por *phage display*. Para favorecer esa especificidad “anti-inmunocomplejo”, se incorporó una estrategia de selección negativa mediante preadsorción, destinada a depletar previamente los fagos que mostraran unión inespecífica a la superficie o afinidad por NbA2 en ausencia de MC, enriqueciendo así la población por clones que discriminen el complejo formado. En cada ronda, los fagos recuperados se amplificaron para generar el input de la ronda siguiente y se monitoreó el proceso mediante parámetros de rendimiento y enriquecimiento. En paralelo, la biblioteca obtenida por el clonado convencional se incluyó como control, ya que se trataba de una biblioteca cuya funcionalidad había sido previamente demostrada para la selección de nanobodies contra otros antígenos.

Tras la primera ronda de panning sobre el inmunocomplejo NbA2/MC, se obtuvieron outputs 1 con títulos comparables entre ambas bibliotecas ($7,1 \times 10^5$ y $6,8 \times 10^5$ ufc/mL para Golden Gate y convencional, respectivamente), dentro del mismo orden de magnitud. Dado que los inputs de fago y las condiciones de selección fueron equivalentes, estos valores sugieren una captura inicial similar de partículas de fagos unidas al blanco en ambas construcciones.

Después de la amplificación y una segunda ronda de selección, los outputs 2 alcanzaron $9,6 \times 10^6$ ufc/mL (Golden Gate) y $7,1 \times 10^6$ ufc/mL (convencional), lo que corresponde a factores de enriquecimiento aproximados de 13,5× y 10,4× respecto de sus propios outputs 1. En términos relativos, la biblioteca Golden Gate mostró una tendencia hacia un mayor incremento de partículas recuperadas tras dos rondas, mientras que los títulos finales se mantuvieron en el mismo orden de magnitud para ambas bibliotecas, indicando un desempeño global comparable en este esquema de panning.

No obstante, la interpretación de estos datos presenta varias limitaciones. En primer lugar, los factores de enriquecimiento se calcularon a partir de una única preparación por biblioteca y sin réplicas independientes, por lo que no es posible evaluar la variabilidad experimental ni establecer si la diferencia entre 13,5× y 10,4× es estadísticamente relevante o constituye una fluctuación propia del sistema. En segundo lugar, los outputs se basan en el título total de fagos infecciosos recuperados y no discriminan entre partículas que reconocen específicamente el inmunocomplejo NbA2/MC y aquellas que podrían unirse a otros componentes del formato (por ejemplo, NbA2 sin MC,

estreptavidina o la superficie de recubrimiento), pese a las etapas de selección negativa descritas previamente.

Por tanto, el enriquecimiento observado tras dos rondas debe considerarse una evidencia preliminar de selección efectiva bajo el formato empleado, pero no una demostración directa de que la fracción mayoritaria de los fagos recuperados corresponda a clones verdaderamente anti-inmunocomplejo. La confirmación de la especificidad y calidad funcional de los clones requiere los ensayos de screening por ELISA y la caracterización posterior, presentados en las secciones siguientes.

4.2.2. SCREENING DE CLONES POR ELISA Y SELECCIÓN DE NBK3

El screening por ELISA se realizó a partir del segundo output de panning de cada biblioteca, es decir, sobre una fracción ya enriquecida de la diversidad inicial. En este contexto, se espera que la diversidad absoluta sea menor que la de la biblioteca original, pero concentrada en variantes con mayor probabilidad de reconocer el inmunocomplejo NbA2/MC.

En un primer análisis se evaluó la reactividad de 12 clones de cada biblioteca por ELISA con el objetivo de identificar aquellos con máxima señal frente al inmunocomplejo NbA2/MC y mínima reactividad frente a NbA2 en ausencia del analito, así como controles para descartar clones con especificidad por otros componentes del ensayo. Se observaron 92% (11/12) clones reactivos frente al inmunocomplejo en la biblioteca Golden Gate y 42% (5/12) en la biblioteca convencional (**figura 15**). Las intensidades de señal fueron heterogéneas entre clones, lo que es compatible tanto con diferencias de afinidad aparente como de nivel de expresión del Nb, factores que no pueden discriminarse con la metodología utilizada.

En cuanto al perfil de especificidad, la mayoría de los clones positivos mostraron algún grado de reactividad cruzada frente a NbA2 en ausencia de MC, sugiriendo la presencia de una proporción relevante de clones dirigidos contra NbA2 o contra epítopes compartidos entre NbA2 libre y el inmunocomplejo. Una excepción destacada fue el clon 3 de la biblioteca Golden Gate, que combinó una señal alta frente al inmunocomplejo NbA2/MC con reactividad nula frente a estreptavidina, BSA, NbA2 y BSA-MC, consistente con un reconocimiento preferente del inmunocomplejo en las condiciones del ensayo.

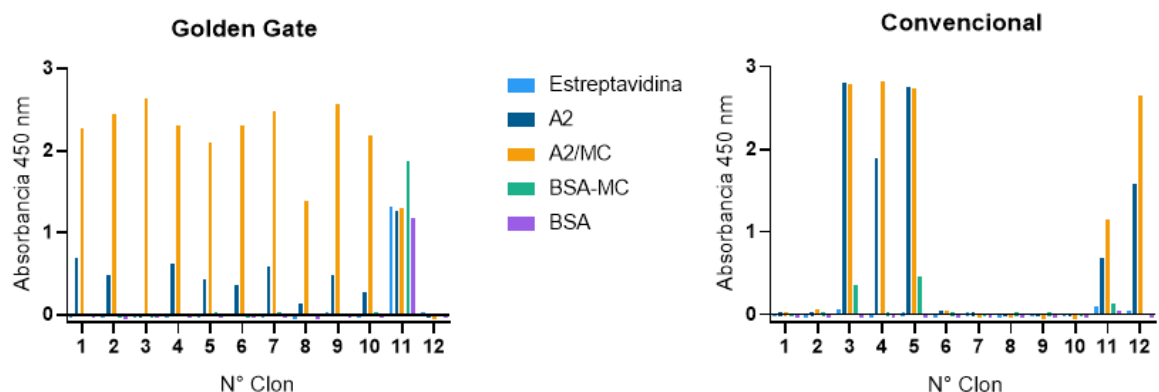


Figura 15 | Screening por ELISA de clones individuales obtenidos por clonado convencional y por Golden Gate. Screening inicial por ELISA de clones individuales procedentes de la biblioteca generada por Golden Gate (izquierda) y de la biblioteca convencional (derecha). Se muestra la absorbancia a 450 nm obtenida para cada clon frente a pocillos recubiertos con estreptavidina, NbA2, inmunocomplejo NbA2/MC, BSA-MC y BSA

Para aumentar la probabilidad de obtener clones con las características deseadas, se amplió el análisis a 59 clones por biblioteca, evaluando esta vez únicamente la reactividad frente al inmunocomplejo NbA2/MC y frente a NbA2. En este segundo screening, se observó para la biblioteca convencional un 62% de clones clasificados como positivos frente al inmunocomplejo (29/47) y un 72 % (34/47) para la biblioteca Golden Gate (**figura 16**). El perfil de reactividad replicó cualitativamente el patrón del primer screening: la mayoría de los clones positivos presentaron señal tanto frente al inmunocomplejo como frente a NbA2, mientras que en la biblioteca Golden Gate aparecieron tres clones adicionales con un comportamiento similar al clon 3 del primer análisis, es decir, alta señal frente a NbA2/MC y reactividad nula (o muy baja) frente a NbA2.

Considerando ambos screenings en conjunto (59 clones analizados por biblioteca), la frecuencia global de clones clasificados como positivos frente al inmunocomplejo fue de 34/59 para la biblioteca convencional (58 %) y de 44/59 para la biblioteca Golden Gate (75 %). Dentro de este conjunto, la biblioteca Golden Gate aportó cuatro clones con un perfil específico hacia el inmunocomplejo NbA2/MC.

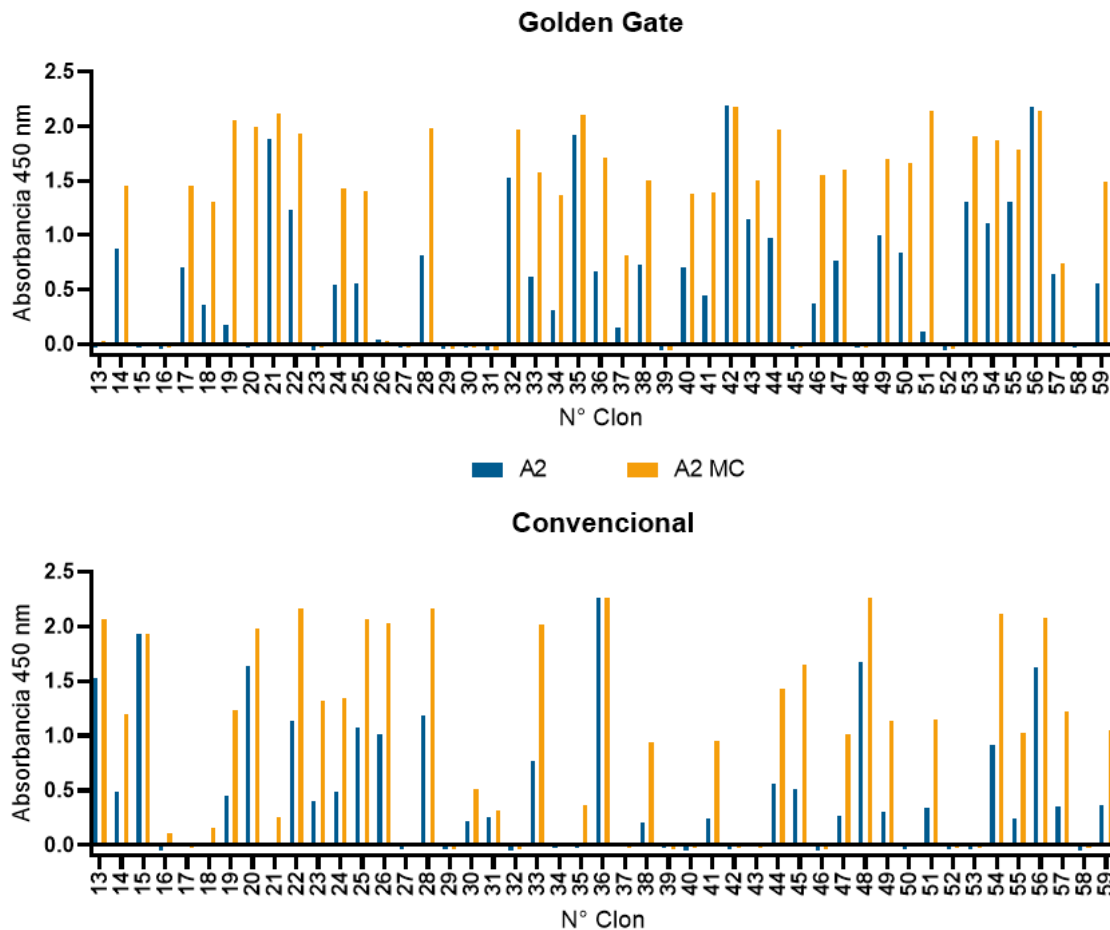


Figura 16 | Segundo screening por ELISA de clones individuales de las bibliotecas convencional y Golden Gate. Segundo screening por ELISA de 47 clones individuales obtenidos a partir de las bibliotecas generadas por Golden Gate y por clonado convencional. Se muestra la absorbancia a 450 nm frente a pocillos recubiertos con NbA2 o con el inmunocomplejo NbA2/MC.

Cabe mencionar que los 59 clones analizados provienen del segundo output de panning, por lo que describen la población remanente y ya enriquecida luego de dos rondas de selección, y no la diversidad inicial de las bibliotecas. Esto no constituye necesariamente una limitación para el objetivo de esta sección (seleccionar clones y evaluar sus perfiles de reactividad), pero sí implica que las frecuencias observadas reflejan la combinación de presión selectiva y eventos de amplificación ocurridos durante el flujo experimental. En este sentido, resulta llamativo que los clones recuperados difieran entre bibliotecas, lo que podría estar sugiriendo la existencia de cuellos de botella que hayan condicionado la representación de variantes en una u otra preparación. Esta hipótesis podrá abordarse con mayor resolución mediante secuenciación masiva, que permitirá estimar la fracción de clones únicos, su distribución de frecuencias y la posible presencia de sesgos asociados al proceso de *panning* y amplificación.

Por otra parte, en este apartado no se discute en detalle la posible redundancia clonal entre pocillos, ya que este aspecto se abordó mediante secuenciación de los clones

positivos del primer screening y algunos del segundo, cuyos resultados se presentan más adelante. Por lo tanto, las proporciones de positivos podrían estar influidas por la expansión de uno o pocos clones predominantes.

En conjunto, los datos de panning y screening indican que, tras dos rondas de selección, ambas bibliotecas contienen una fracción sustancial de clones capaces de reconocer el inmunocomplejo NbA2/MC, con una mayor frecuencia de clones reactivos y varios candidatos con perfil de especificidad preferente en la biblioteca Golden Gate.

4.2.3 SECUENCIACIÓN DE LOS CLONES POSITIVOS

El análisis de secuencias evidenció que el conjunto de clones obtenidos del primer screening a partir de la biblioteca Golden Gate (denominados con el prefijo GG) presentó una baja diversidad. Siete de los diez clones secuenciados presentaron secuencias idénticas en sus CDR (clones GG1, GG2, GG4, GG6, GG7, GG9 y GG10), mientras que los clones GG5 y GG8 presentaron respectivamente 1 y 2 sustituciones en regiones CDR respecto a la serie anterior. Esto indica que estos nueve clones pertenecen a una misma familia, donde algunos clones adquirieron mutaciones durante el proceso de maduración de la afinidad.

Por otra parte, el clon GG3 mostró una secuencia sustancialmente diferente, indicando que pertenece a otra familia resultante de un evento independiente de recombinación de segmentos V/D/J. Presenta una identidad de $\approx 66\%$ respecto a los clones anteriores. Esto concuerda con lo observado en el screening, dado que este clon es el único que presenta nula reactividad contra NbA2 (**figura 15**), sugiriendo que este clon presenta un modo de unión alternativo dentro del repertorio enriquecido. Finalmente, la secuenciación de dos clones seleccionados en el segundo screening (GG20 y GG51) (**figura 16**) evidenció secuencias idénticas en sus CDR a GG3.

En los clones secuenciados provenientes de la biblioteca convencional (denominados con el prefijo C) (**figura 15**) se observó una mayor diversidad. Los clones C3 y C5 presentan secuencias idénticas, mientras que C4, C11 y C12 correspondieron a secuencias únicas, cuyas regiones CDR sugieren que pertenecen a distintas familias.

En cuanto a los clones seleccionados en el segundo screening a partir de la biblioteca convencional (C18, C21 y C41) (**figura 16**), la secuenciación de los tres candidatos analizados reveló que todos correspondieron a secuencias diferentes y, además, no coincidieron con ninguna de las identificadas en el primer screening.

Dado que los procesos de panning para ambas bibliotecas fueron realizados en paralelo y en idénticas condiciones, las diferencias en diversidad sugieren diferencias en la diversidad de las bibliotecas de partida. Esto podría confirmarse mediante secuenciación masiva. Además de las diferencias en diversidad, resulta llamativo que ninguna de las secuencias identificadas fue encontrada en ambos outputs y en particular que la

secuencia del clon GG3, recuperada en más de un clon de la biblioteca Golden Gate, no haya sido recuperado del panning de la biblioteca convencional.

Sobre esta base se seleccionó para la caracterización posterior el clon GG3 de la biblioteca Golden Gate (en adelante NbK3), que mostró un perfil con alta reactividad frente al inmunocomplejo y nula reactividad frente a NbA2 en ausencia de toxina. De manera complementaria, se eligió también el clon GG2 (en adelante NbK2) como representante de un perfil alternativo, caracterizado por una elevada reactividad frente al inmunocomplejo y una reactividad baja frente a NbA2 en ausencia de MC.

4.3 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE NANOBODIES

Previo a la producción de los Nbs a mayor escala, las secuencias correspondientes a los clones NbK2 y NbK3 se subclonaron desde el vector pComb al vector pINQ-HA mediante digestión con SfiI y posterior ligación. El vector de expresión fuerte pINQ-HA permite la producción del Nb en forma soluble y no fusionada a pIII, a diferencia de la construcción utilizada para *phage display*. Este vector incorpora una señal de direccionamiento a la vía secretora/periplásmica, favoreciendo un ambiente oxidante adecuado para el correcto plegamiento y la formación de puentes disulfuro, y añade tags de para la detección y purificación (HA y 6xHis respectivamente).

4.3.1 OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES MEDIANTE EXPRESIÓN A PEQUEÑA ESCALA

En una primera aproximación, se evaluó la expresión recombinante de NbK3 a pequeña escala en *E. coli* BL21(DE3) bajo distintas combinaciones de concentración de IPTG y temperatura post-inducción, con el objetivo de maximizar la cantidad de Nb observado en la fracción soluble del lisado celular (**figura 17**). En las fracciones solubles se observó una banda bien definida ligeramente por debajo del marcador de 20 kDa (compatible con el tamaño esperado del Nb fusionado a los tags HA y 6xHis) para todas las condiciones ensayadas a excepción de la inducción con 100 μ M IPTG, donde la banda es mucho más tenue.

Resulta particularmente relevante que, incluso en la condición sin inducción (0 μ M IPTG), se detectara una banda apreciable en la región correspondiente al tamaño esperado, lo que indica la presencia de expresión basal desde el sistema inducible. Este comportamiento es compatible con lo descrito para sistemas basados en el operador *lac*, en los que se observa una cierta transcripción aun en ausencia de inductor, y pone de manifiesto a una represión incompleta mediada por LacI⁷⁸. En el sistema empleado, el gen de interés se encuentra bajo el control del promotor T7 y un operador *lac*; por su parte, la ARN polimerasa T7 necesaria para transcribir desde dicho promotor es provista

por *E. coli* BL21(DE3), donde su expresión está regulada por el promotor *lacUV5* y el operador *lac*. En ausencia de IPTG, el represor LacI (codificado tanto en el plásmido como en el genoma) se une a los operadores *lac* y reduce la transcripción de la polimerasa T7 y, en consecuencia, de la proteína recombinante. Sin embargo, dado que esta represión no es absoluta, puede observarse un nivel residual de transcripción aun sin inductor. En presencia de IPTG, el inductor se une a LacI y favorece su disociación del operador, habilitando la expresión de la polimerasa T7 y promoviendo posteriormente una mayor expresión de la proteína clonada.

Como consideración metodológica, para fortalecer esta interpretación podría incluirse un control adicional de BL21(DE3) no transformada, de modo de comparar el perfil basal de proteínas de la cepa huésped con el de las muestras transformadas y así distinguir con mayor claridad bandas propias de la cepa de aquellas asociadas a la expresión de la proteína recombinante.

Al comparar cualitativamente la intensidad de la banda correspondiente a NbK3 entre las distintas condiciones de inducción, se observó que la señal más intensa se obtenía con 10 μ M de IPTG a 28 °C, mientras que las condiciones con 100 μ M de IPTG mostraron bandas claramente más tenues en la fracción soluble. Este patrón resulta coherente con lo descrito para sistemas de expresión en *E. coli*, donde concentraciones elevadas de IPTG se asocian con una disminución del crecimiento y del rendimiento de proteína soluble, mientras que condiciones de inducción más suaves favorecen la obtención de mayores cantidades de proteína correctamente plegada ⁷⁹. Por su parte, el análisis de las fracciones insolubles reveló únicamente una banda tenue en torno a los ~20 kDa, sin evidencias de acumulación masiva del Nb en forma de cuerpos de inclusión, lo que indica que, dentro del rango de condiciones ensayadas, la mayor parte de NbK3 se recuperó en forma soluble. Considerando la intensidad de la banda en la fracción soluble, la inducción con 10 μ M de IPTG a 28 °C se definió como la condición óptima y se adoptó para las etapas posteriores de expresión a gran escala de NbK3.

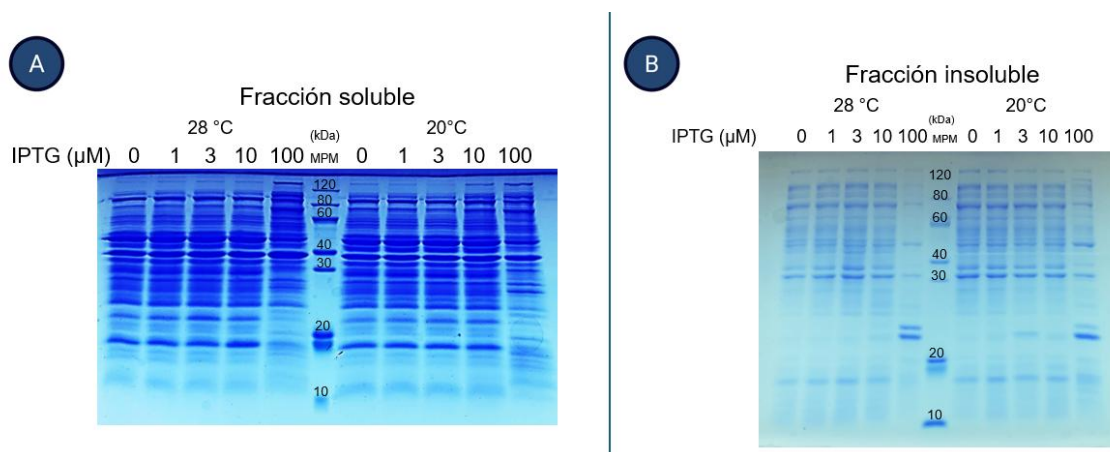


Figura 17 | Optimización de las condiciones de expresión de NbK3. (A) Análisis por SDS-PAGE de la fracción soluble de cultivos de *E. coli* inducidos con distintas concentraciones de IPTG (0, 1, 3, 10 y 100

μM) a 28 °C y 20 °C. (B) Análisis equivalente de la fracción insoluble obtenida en las mismas condiciones. En ambos geles se incluye un marcador de peso molecular (MPM, kDa).

4.3.2 ESCALADO DE LA PRODUCCIÓN DE NANOBODIES

En la etapa de expresión a mayor escala, ambos Nbs (NbK2 y NbK3) se produjeron en cultivos de 500 mL de *E. coli* BL21(DE3) bajo la condición seleccionada a partir de los ensayos a pequeña escala para el clon NbK3 (10 μM de IPTG, 28 °C, incubación ON). Las células colectadas fueron lisadas mediante shock osmótico utilizando un protocolo que promueve la lisis de la membrana externa, dando lugar a un lisado que representa la fracción periplasmática. Posteriormente, el lisado periplasmático fue sometido a purificación mediante cromatografía de afinidad en columnas Ni-NTA, aprovechando la cola 6xHis presente en los Nbs recombinantes. El análisis por SDS-PAGE de las distintas fracciones del proceso (lisado, *flow-through* y eluato) mostró un comportamiento diferencial entre ambos clones (**figura 18**). En el caso de NbK2, se observó una banda intensa en torno a los 20 kDa tanto en el lisado como en el eluato, mientras que dicha banda no fue visible en el *flow-through*, lo que sugiere que la mayor parte del NbK2 soluble presente en el lisado se retuvo eficientemente en la columna y se recuperó en el eluato. Para NbK3, en cambio, la banda correspondiente al Nb se apreció de forma clara en el eluato, pero fue mucho más tenue en el lisado y no se detectó en el *flow-through*, lo que apunta a una menor cantidad de proteína soluble disponible de partida más que a pérdidas significativas durante la cromatografía.

Las fracciones eluidas y dializadas en PBS de esta primera producción se cuantificaron posteriormente por NanoDrop, obteniéndose unos rendimientos aproximados de 4,3 mg por litro de cultivo para NbK2 y 0,24 mg por litro de cultivo para NbK3, es decir, del orden de casi una magnitud inferior en el caso de NbK3, en concordancia con la menor intensidad de su banda en el lisado.

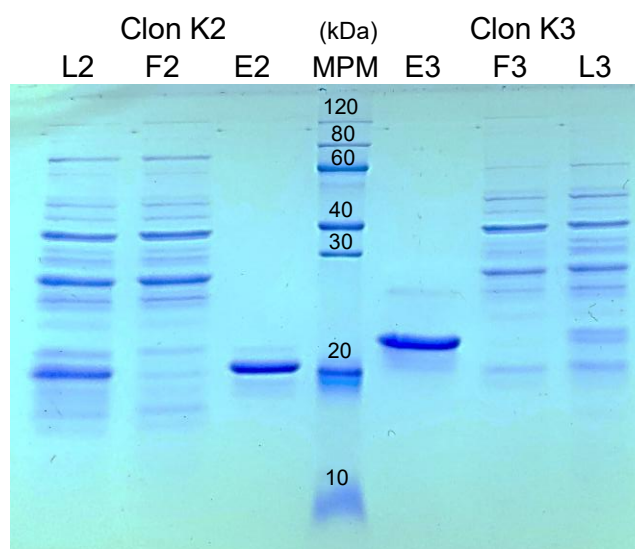


Figura 18 | Análisis por SDS-PAGE de la purificación de los clones K2 y K3 mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA. Para cada clon se muestran el lisado de cultivo (L), el flow-through (F) y el eluato (E). Para cada eluato se sembraron 5 µg de proteína purificada. El carril central (MPM) corresponde al marcador de peso molecular (kDa).

Dado que la cantidad de NbK3 obtenida en este primer lote resultaba limitada para las etapas posteriores de caracterización, se llevó a cabo una segunda producción bajo las mismas condiciones (500 mL de cultivo, 10 µM de IPTG, 28 °C), obteniendo un rendimiento de aproximadamente 3,5 mg por litro de cultivo. Este segundo lote sitúa el rendimiento del NbK3 en un rango mucho más próximo al observado para NbK2, lo que pone de manifiesto cierta variabilidad entre producciones, pero confirma que, bajo las condiciones establecidas, el sistema es capaz de proporcionar cantidades suficientes de ambos Nbs para su uso en los ensayos funcionales y de inmunoensayo descritos en los apartados siguientes.

4.4 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS NBS SELECCIONADOS FRENTE AL INMUNOCOMPLEJO NBA2/MC

Tras la purificación de los NbK2 y NbK3 se realizaron distintos ELISA para caracterizar su reactividad frente a MC-LR y al inmunocomplejo NbA2/MC, sentando las bases para la posterior optimización del inmunoensayo no competitivo de detección de microcistina. El revelado de los ensayos se realizó con anti-HA-HRP cuando NbK2 o NbK3 actuaron como reactivos de detección, y con estreptavidina-peroxidasa (SPO) cuando la detección se efectuó con NbA2; en ambos casos se registró absorbancia a 450 nm. Finalmente, la afinidad del NbK3 fue determinada mediante interferometría de biocapa.

4.4.1 DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS NBS PRODUCIDOS

EVALUACIÓN INICIAL DE LOS CLONES SELECCIONADOS

En esta etapa se evaluó al NbK2 y al NbK3 frente a diluciones seriadas de MC-LR capturada por NbA2 (**figura 19**). Las curvas observadas se adecuaban a un ajuste sigmoideal. En el caso de NbK3, la curva de respuesta alcanza una meseta a concentraciones superiores a 1 µg/L. En contraste, para NbK2 se observó un nivel elevado de ruido de fondo, potencialmente debido a reactividad del clon contra el NbA2, y una señal que comienza a aumentar de forma apreciable sólo a partir de concentraciones superiores a 1 µg/L, lo que sugiere una menor sensibilidad.

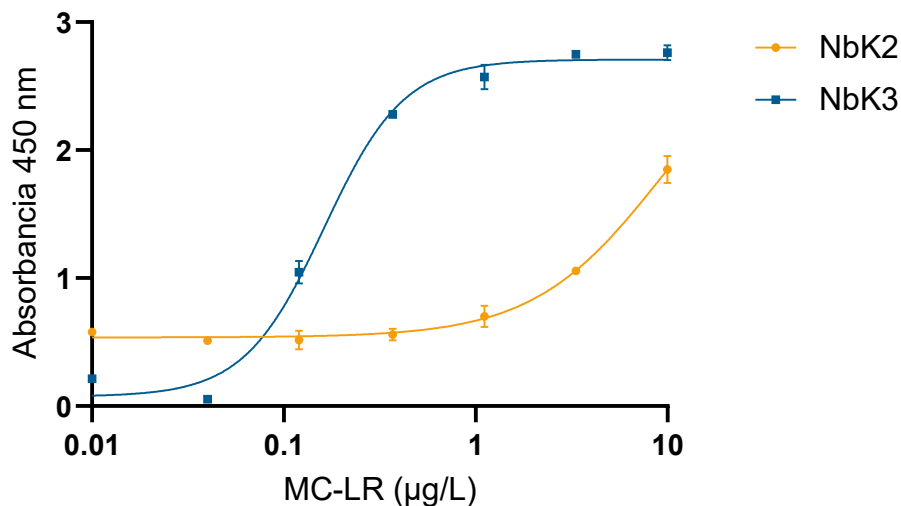


Figura 19 | Curvas de respuesta por ELISA de NbK2 y NbK3 frente a MC-LR. Reactividad por ELISA de los nanobodies NbK2 y NbK3 frente a diluciones seriadas de MC-LR capturada por NbA2. Se representa la absorbancia a 450 nm en función de la concentración de MC-LR, utilizando cada Nb como reactivo de detección. Se grafica el promedio de triplicados, y las barras de error representan la desviación estándar.

Al titular los Nbs NbK2 y NbK3 frente al inmunocomplejo NbA2/MC y NbA2 en ausencia de MC se observaron perfiles de respuesta claramente diferenciados (**figura 20**). Para NbK3, la curva obtenida frente al inmunocomplejo mostró una respuesta dosis-dependiente, con incremento progresivo de la señal hasta alcanzar una zona de saturación, mientras que en presencia de NbA2 en ausencia de toxina la señal se mantuvo en niveles no detectables a lo largo de todo el rango de concentraciones ensayadas (0-500 ng/mL), en concordancia con el perfil de unión selectiva descrito en el screening inicial. En el caso de NbK2, en cambio, la aparición de señal frente al inmunocomplejo apreció en el intervalo de 10–100 ng/mL del Nb, y frente a NbA2 en ausencia de MC la señal comenzó a incrementarse entre 100 y 500 ng/mL, reflejando un comportamiento menos favorable tanto en términos de sensibilidad como de especificidad. Ambos patrones reproducen los perfiles observados en la etapa de selección inicial y, sobre esta base, se decidió continuar exclusivamente con el clon NbK3, para el desarrollo del inmunoensayo.

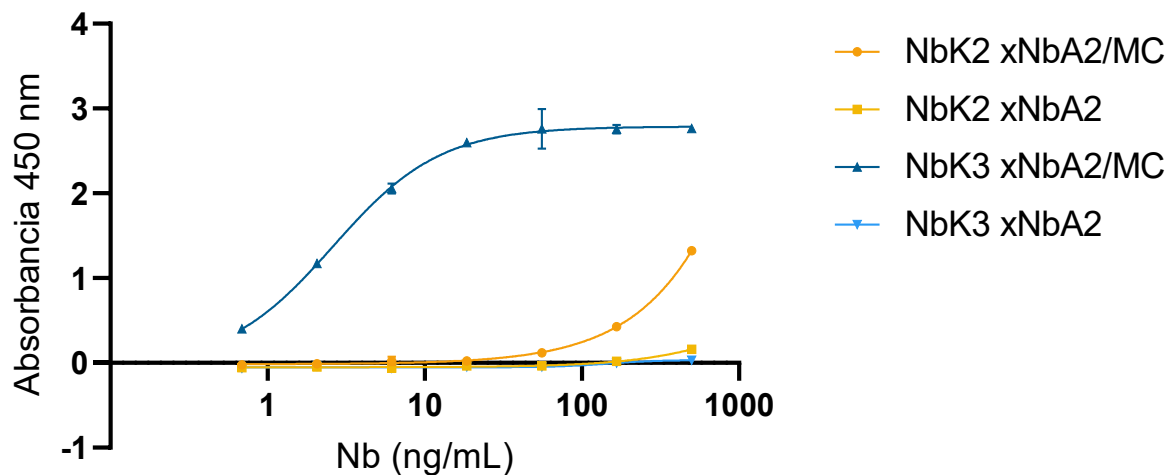


Figura 20 | Reactividad de NbK2 y NbK3 frente a NbA2 y al inmunocomplejo NbA2/MC. Evaluación por ELISA de la reactividad de NbK2 y NbK3 frente a NbA2 solo o al inmunocomplejo NbA2/MC. Se muestran curvas de titulación de cada nanobody (eje X, ng/mL) sobre pocillos recubiertos con NbA2 (NbK2 × NbA2, NbK3 × NbA2) o con el inmunocomplejo NbA2/MC (NbK2 × NbA2/MC, NbK3 × NbA2/MC). Se grafica el promedio de triplicados, y las barras de error representan la desviación estándar.

RECONOCIMIENTO DE MICROCISTINA EN AUSENCIA DE NBA2

Para profundizar en la caracterización, se exploró la capacidad del NbK3 para reconocer MC en ausencia de NbA2. Como primera aproximación, se evaluó su reactividad frente a un conjugado BSA–MC. De observarse reactividad contra este conjugado, podría concluirse que NbK3 es capaz de unir MC en forma independiente de NbA2.

Mientras que se observó una señal de saturación contra el inmunocomplejo NbA2/MC, no se detectó señal frente al conjugado BSA–MC (**figura 21**). Sin embargo, este resultado no permite descartar la posibilidad de que NbK3 sea capaz de reconocer MC en ausencia de NbA2. Esto se debe a que en el conjugado BSA–MC la toxina no está en forma libre sino covalentemente unida a BSA a través de un grupo metileno, lo cual podría alterar la conformación de la MC y/o enmascarar el epítipo relevante para el NbK3, en particular si el mismo se encontrara cercano al sitio de conjugación.

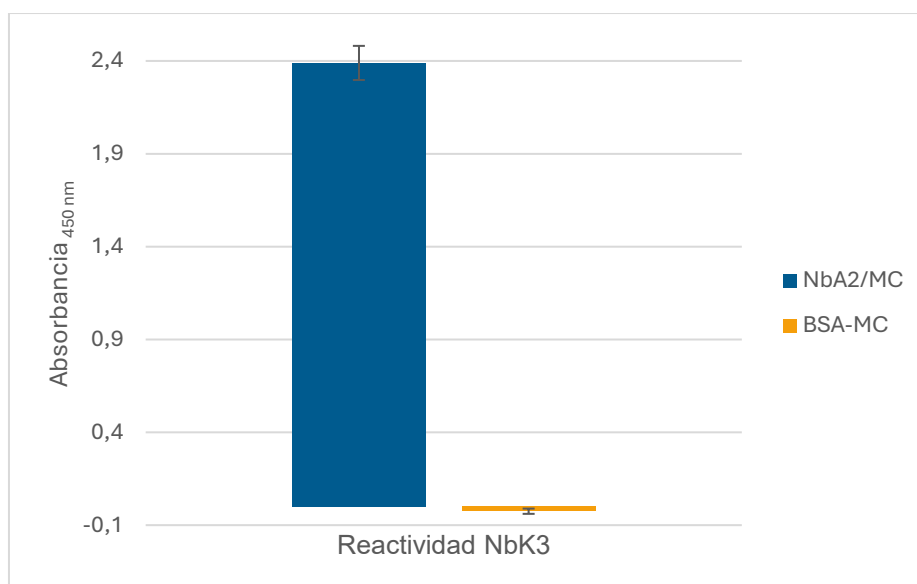


Figura 21 | Reactividad de NbK3 frente al inmunocomplejo NbA2/MC y al conjugado BSA-MC. Absorbancia a 450 nm obtenida por ELISA en pocillos sensibilizados ON a 4 °C con inmunocomplejo NbA2/MC o con el conjugado BSA-MC (0,5 µg/mL en PBS), bloqueados con PBS-BSA 1 % e incubados posteriormente con NbK3 purificado a 0,5 µg/mL en PBS-BSA 0,1 %. Se grafica el promedio de triplicados, y las barras de error representan la desviación estándar.

RECONOCIMIENTO DE MICROCISTINA LIBRE E INMUNOCOMPLEJO NBA2/MC

Con el fin de estudiar si el clon NbK3 reconoce estrictamente el inmunocomplejo formado por NbA2 y MC, pero no los componentes por separado, se diseñó un segundo experimento para evaluar si NbK3 era capaz de reconocer MC libre (**figura 22**).

Se incubaron diluciones seriadas de MC sobre pocillos sensibilizados con NbK3, cuya captura fue revelada en un paso posterior mediante el agregado de NbA2. Asimismo, se realizó una curva similar en la cual se incubó el inmunocomplejo NbA2/MC preformado sobre pocillos sensibilizados con NbK3. Finalmente, se incluyó un control donde la MC libre fue capturada por NbA2 y posteriormente revelada con NbK3.

La captura de MC libre mediante NbK3 no generó señal detectable, mientras que tanto la captura del inmunocomplejo pre-formado mediante NbK3 y la captura de MC libre mediante NbA2 sí.

En conjunto, estos resultados sugieren que, bajo las condiciones evaluadas, el NbK3 muestra preferencia por el inmunocomplejo NbA2/MC. Esto implicaría que su parátipe está dirigido a un neoepítipo generado cuando la toxina se encuentra unida a NbA2. De todas formas, no es posible descartar la posibilidad de que la MC libre pueda unirse a NbK3, pero que esta interacción imposibilite la posterior unión de NbA2.

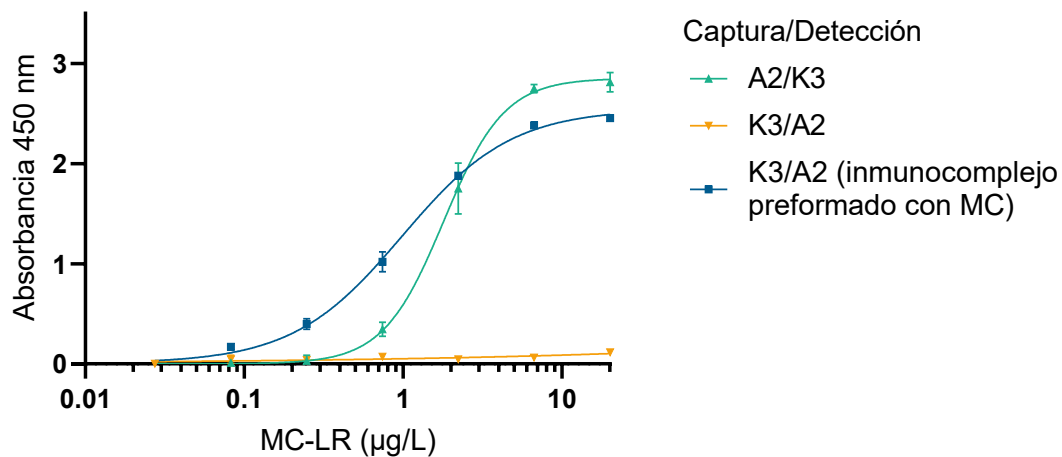


Figura 22 | Evaluación de diferentes formatos de captura/detección en el inmunoensayo no competitivo. Curvas de titulación de microcistina utilizando los pares de captura/detección A2/K3 (▲) o K3/A2 (▼). Una tercera curva se obtuvo añadiendo el inmunocomplejo NbA2/MC preformado a pocillos recubiertos con K3 (■). Se grafica el promedio de triplicados, y las barras de error representan la desviación estándar.

4.4.2 DETERMINACIÓN DE CONSTANTES CINÉTICAS POR INTERFEROMETRÍA DE BIOCAPA

La interacción del NbK3 con el inmunocomplejo NbA2/MC se caracterizó mediante Bio-Layer Interferometry (BLI), empleando biosensores de estreptavidina recubiertos con el inmunocomplejo NbA2/MC y NbK3 en solución a 25–200 nM.

A partir del análisis cinético, se obtuvo una constante de asociación (k_{on}) de $1,14 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y una constante de disociación (k_{off}) de $1.19 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, resultando en una constante de afinidad (K_D) de $1,05 \times 10^{-8} \text{ M}$ (**figura 23**). Este valor, en el rango de 10^{-8} M , se ubica dentro de las afinidades típicamente consideradas altas para anticuerpos monoclonales obtenidos sin procesos de maduración in vitro.

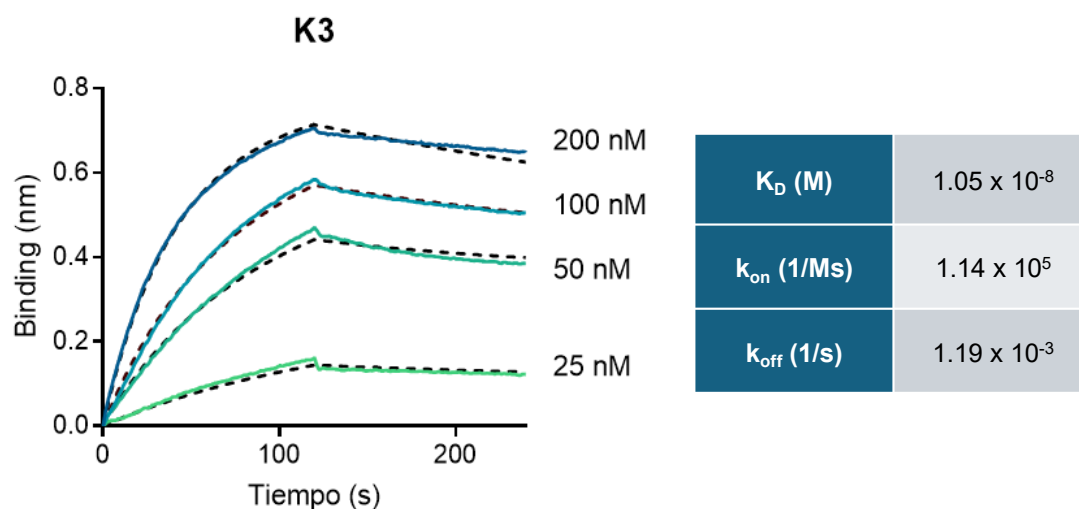


Figura 23 | Análisis cinético de la interacción del NbK3 con el inmunocomplejo inmovilizado mediante bio-layer interferometry (BLItz® System). A la izquierda se muestran los sensogramas obtenidos para K3 a 25, 50, 100 y 200 nM (líneas continuas) junto con el ajuste global a un modelo de unión 1:1 (líneas discontinuas). A la derecha se indican las constantes cinéticas derivadas del ajuste y la constante de afinidad.

4.5 DESARROLLO Y EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO DE UN INMUNOENSAYO NO COMPETITIVO PARA LA DETECCIÓN DE MICROCISTINAS

4.5.1 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL INMUNOENSAYO

En esta sección se presentan los resultados de la optimización del inmunoensayo no competitivo basado en el reconocimiento del inmunocomplejo NbA2/MC por NbK3. Los ensayos realizados permitieron definir una concentración de NbK3 que mantiene una señal elevada frente al inmunocomplejo con reactividad mínima frente a NbA2 solo. Además, la comparación entre los formatos de captura (estreptavidina–NbA2 biotinilado frente a NbA2 adsorbido directamente) mostró diferencias claras en la sensibilidad del ensayo. Por último, la incorporación del buffer de interferencia y el ajuste del rango de trabajo permitieron adaptar el inmunoensayo a la determinación de microcistinas en muestras de agua.

SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE NBK3

Para definir el rango de trabajo del NbK3, se realizó una titulación por ELISA frente a tres condiciones de sensibilización: estreptavidina, estreptavidina + NbA2, y estreptavidina + inmunocomplejo NbA2/MC.

Al evaluar la reactividad de NbK3 contra el inmunocomplejo NbA2/MC se observó una señal de saturación a partir de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la curva de reactividad contra NbA2 evidenció cierta reactividad cruzada a concentraciones mayores (a partir de 1,25 $\mu\text{g/mL}$) (**figura 24**). No se detectó señal frente a la condición con estreptavidina, lo que indica ausencia de unión inespecífica al soporte o a la proteína de bloqueo.

Estos resultados confirman que el NbK3 mantiene un perfil de unión preferencial hacia el inmunocomplejo NbA2/MC, con una reactividad muy limitada frente a NbA2 en ausencia de MC. La diferencia en el comportamiento de las curvas sugiere que la contribución de la toxina al epítipo conformacional es clave para el reconocimiento por el NbK3, comportándose como un anti-inmunocomplejo con mínima reactividad cruzada contra NbA2.

La titulación permite delimitar una ventana de concentraciones de NbK3 en la que se obtiene una señal robusta frente al inmunocomplejo NbA2/MC y, al mismo tiempo, se minimiza la reactividad con NbA2 solo. Esto concuerda con los datos del screening inicial, donde NbK3 ya se había destacado por la ausencia de reactividad cruzada con NbA2, y respalda su selección como candidato para el desarrollo posterior del inmunoensayo dirigido específicamente al complejo NbA2/MC.

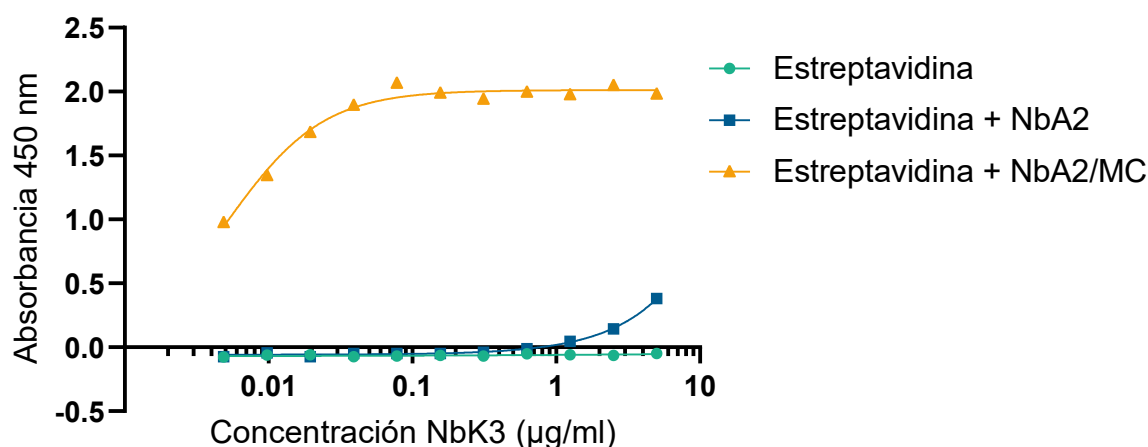


Figura 24 | Titulación por ELISA del NbK3 purificado frente a distintas condiciones de sensibilizado. Placas recubiertas con estreptavidina (●), estreptavidina + NbA2 (■) y estreptavidina + inmunocomplejo NbA2/MC (▲) se incubaron con diluciones seriadas de NbK3.

A partir de estos resultados se seleccionó una concentración de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de NbK3, dado que a este valor la señal frente al inmunocomplejo NbA2/MC se mantiene prácticamente saturada y, al mismo tiempo, no se detecta reactividad apreciable frente al NbA2 solo. Esta condición representa un compromiso adecuado entre sensibilidad y especificidad para el desarrollo del inmunoensayo.

EFFECTO DEL FORMATO DE CAPTURA: ESTREPTAVIDINA-NBA2 BIOTINILADO VS NBA2 ADSORBIDO

Una vez definido el rango de trabajo de NbK3, se evaluó el efecto sobre la sensibilidad del inmunoensayo de un método alternativo de inmovilización, en el cual el NbA2 biotinilado es capturado por estreptavidina, en comparación con el método anterior en el cual NbA2 es adsorbido directamente sobre la placa. En ambos casos se construyó una curva de calibración empleando MC en un rango de 0–20 µg/L (**figura 25**).

El ajuste de las curvas permitió estimar un SC_{50} de 0,31 µg/L para el formato estreptavidina-NbA2bt y de 1,79 µg/L cuando NbA2 se sensibilizó directamente sobre la placa. Es decir, el uso de estreptavidina reduce casi seis veces la concentración de MC necesaria para alcanzar la semisaturación de la señal, lo que se traduce en un aumento marcado de la sensibilidad del ensayo.

Esta diferencia es coherente con el diseño de ambos formatos, y se condice con resultados reportados en la literatura que indican que la inmovilización directa de nanobodies a menudo resulta en una captura poco eficiente^{80,81}. En el sistema estreptavidina-NbA2bt, la estreptavidina dirige una inmovilización más controlada y orientada de NbA2, favoreciendo la exposición del parátipe y maximizando el número de sitios de unión funcionales. En cambio, la adsorción directa sobre la placa probablemente genere una población heterogénea de moléculas parcialmente desnaturalizadas y con el parátipe en distintas orientaciones, lo que disminuye la fracción de NbA2 capaz de formar eficientemente el inmunocomplejo NbA2/MC reconocido por NbK3 y desplaza la curva hacia concentraciones más altas de toxina.

En conjunto, estos resultados indican que el formato basado en estreptavidina-NbA2bt mejora de manera significativa la sensibilidad del inmunoensayo y respalda esta elección como configuración preferente para el desarrollo del inmunoensayo.

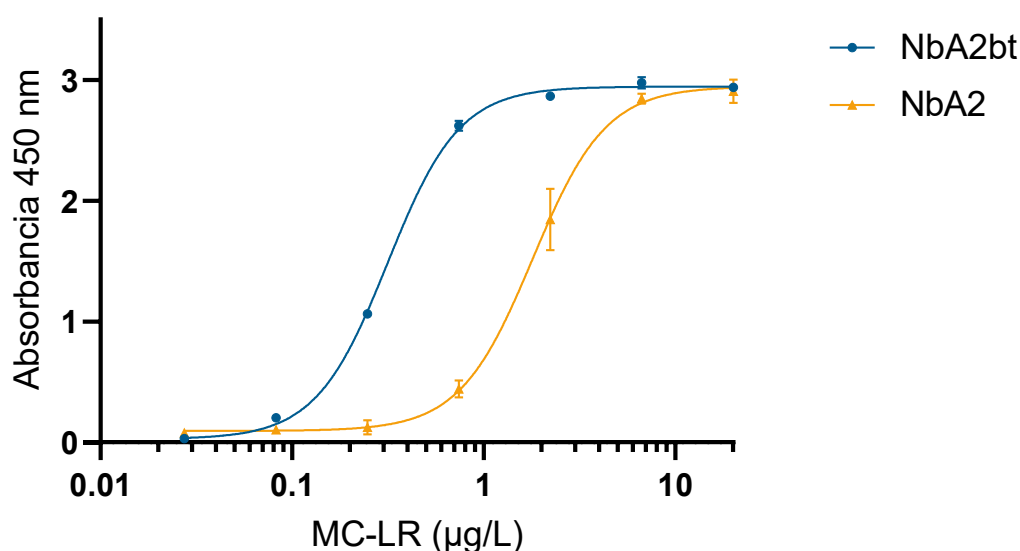


Figura 25 | Efecto del formato de inmovilización del anticuerpo de captura en la sensibilidad del inmunoensayo no competitivo. Curvas de calibración para MC-LR obtenidas empleando NbA2 biotinilado capturado sobre estreptavidina (NbA2bt; ●) o NbA2 adsorbido directamente sobre la placa (NbA2; ▲). El ajuste de las curvas indicó SC_{50} de 0,31 µg/L para el formato estreptavidina-NbA2Bt y de 1,79 µg/L para NbA2 adsorbido. Se grafica el promedio de triplicados, y las barras de error representan la desviación estándar.

INFLUENCIA DEL BUFFER DE INTERFERENCIA

Con el objetivo de mantener la sensibilidad del método y mejorar la compatibilidad del ensayo con matrices de agua reales y potenciales interferentes presentes en muestras ambientales, se incorporó el uso de un buffer de interferencia (BI) previamente formulado para este fin ⁸². Para evaluar el impacto de este buffer sobre el desempeño del ensayo, se construyeron curvas de calibración a partir de un estándar certificado de MC, en el rango 0-2 µg/L.

El ajuste de las curvas mostró valores de EC_{50} de 0,308 µg/L para el ensayo realizado en presencia de BI y de 0,313 µg/L para el formato original con PBS-BSA 0,1 % como diluyente. Las curvas resultaron prácticamente solapantes, indicando que la incorporación del BI no afecta de manera apreciable la sensibilidad ni la pendiente de la respuesta del inmunoensayo (**figura 26**).

En función de estos resultados, se decidió continuar empleando el BI en las etapas posteriores, ya que permite mantener la sensibilidad del método al tiempo que está formulado para mejorar la compatibilidad del ensayo con matrices de agua reales y potenciales interferentes presentes en muestras ambientales.

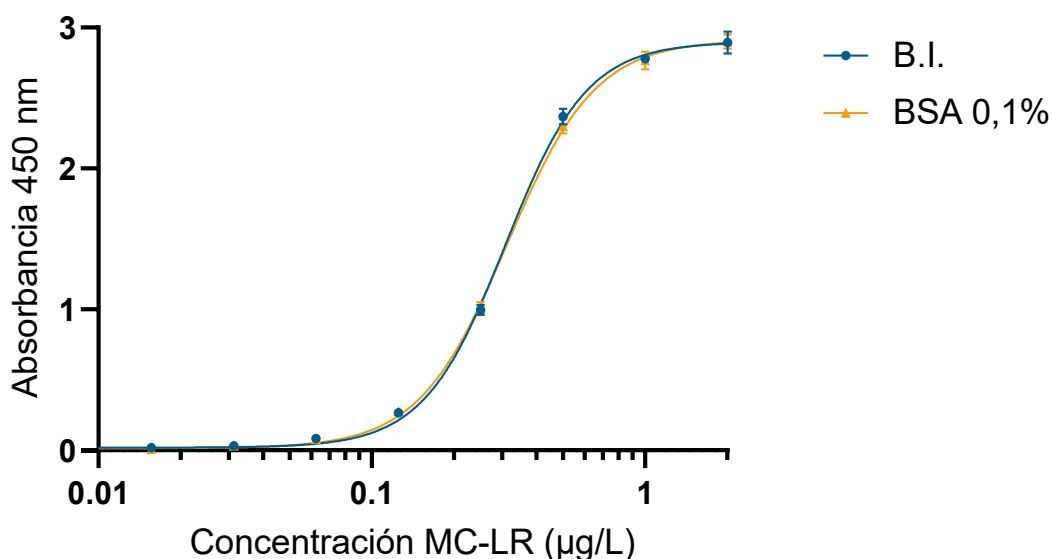


Figura 26 | Influencia del buffer de interferencia en la respuesta del inmunoensayo. Curvas de calibración para MC-LR obtenidas empleando BI (●) o PBS–BSA 0,1 % (▲) como diluyentes. Los SC_{50} determinados fueron de 0,308 y 0,313 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, con curvas prácticamente solapantes. Se grafica el promedio de triplicados, y las barras de error representan la desviación estándar.

4.5.2. EVALUACIÓN DE LA REACTIVIDAD CRUZADA FRENTE A DIFERENTES VARIANTES DE MICROCISTINA

Para evaluar el comportamiento del inmunoensayo frente a diferentes variantes de microcistina, se analizaron seis variantes: MC-LR, MC-RR, MC-LA, MC-YR, MC-LW y MC-LF. A partir de curvas concentración–respuesta se estimaron los valores de SC_{50} y se calculó la reactividad cruzada (RC%) tomando MC-LR como referencia (100 %). La reactividad cruzada se definió como:

$$RC (\%) = \frac{SC_{50}(MC-LR)}{SC_{50}(MC-XX)} \times 100$$

Como puede observarse en la **figura 27**, el inmunoensayo muestra una elevada reactividad cruzada frente a MC-YR y MC-LA (96 % y 78 %, respectivamente), lo que indica que el sistema reconoce eficientemente varios congéneres estructuralmente relacionados con MC-LR. MC-RR y MC-LF presentan una reactividad cruzada intermedia (33 % y 29 %), mientras que MC-LW es reconocida de manera mucho más débil (7 %).

En cuanto a las variantes que introducen modificaciones en posición X, el cambio por otro residuo relativamente apolar (MC-YR) no afectó el reconocimiento, mientras que la introducción de un residuo cargado (MC-RR) implicó un mayor descenso en el reconocimiento. Por otra parte, en cuanto a las modificaciones en posición Z, el cambio por alanina (MC-LA) presentó un impacto moderado en el reconocimiento, mientras que

las variantes que incorporan aminoácidos voluminosos e hidrofóbicos en la posición Z (MC-LW y MC-LF) redujeron notablemente el reconocimiento.

La reactividad cruzada medida en este formato refleja la contribución conjunta de ambos nanobodies. La magnitud de la señal depende, en primer término, de la captura por NbA2, que determina cuánto de cada variante queda retenida, y, en segundo término, de la detección por NbK3. En consecuencia, una menor reactividad cruzada puede originarse por una captura menos eficiente, por un reconocimiento subóptimo del inmunocomplejo, o por la combinación de ambos efectos.

Desde el punto de vista aplicado, la alta reactividad cruzada hacia varios congéneres relevantes implica que el inmunoensayo no solo responde a MC-LR, sino que es capaz de integrar la presencia de otras variantes en términos de “equivalentes de MC-LR”, lo que resulta ventajoso para la vigilancia de MCs en muestras ambientales.

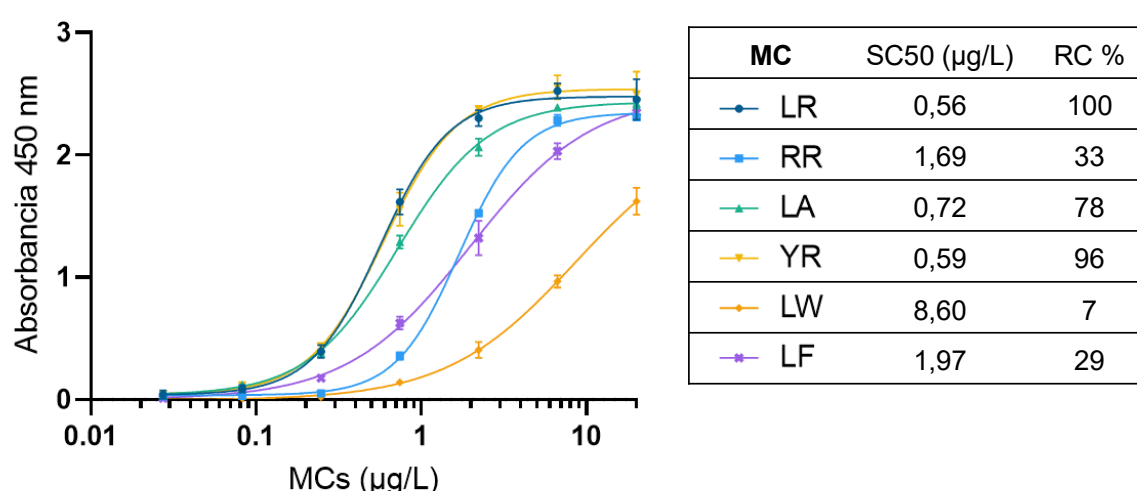


Figura 27 | Evaluación de la reactividad del inmunoensayo frente a distintas variantes de microcistina. Se muestran las curvas obtenidas para MC-LR, MC-RR, MC-LA, MC-YR, MC-LW y MC-LF, y la tabla resume los valores de SC₅₀ y el porcentaje de reactividad cruzada (RC %) calculado tomando MC-LR como referencia (100 %). Se grafica el promedio de triplicados, y las barras de error representan la desviación estándar.

4.5.3 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MC-LR EN MUESTRAS DE AGUA AMBIENTALES

Para caracterizar el desempeño analítico del inmunoensayo, se estableció el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ). Ambos se determinaron a partir de la señal del blanco, definiéndolos como blanco + 3DE y blanco + 10DE, respectivamente. Posteriormente, ambas señales se interpolaron en la curva de calibración ajustada por un modelo logístico de cuatro parámetros (4PL) para expresarlas en unidades de

concentración. A partir del blanco medido por triplicado, se obtuvo un LOD = 0,015 µg/L y un LOQ = 0,074 µg/L de MC-LR.

Para evaluar la exactitud del inmunoensayo en matrices ambientales reales, se realizaron ensayos de recuperación (spiking) en un total de 21 muestras de agua. 7 muestras correspondieron a agua de represa (D) y 13 a aguas tratadas (T) asociadas a tres embalses diferentes del Río Negro (B, P y Y), mientras que dos de ellas de agua Milli-Q (MQ). Cada muestra se analizó sin fortificar y tras la adición de MC-LR a 0,1 (cercano al LOQ) y 0,5 µg/L (menos exigente), calculando el porcentaje de recuperación en cada caso (**tabla 3**).

En las muestras fortificadas con 0,1 µg/L, las recuperaciones oscilaron entre 59 y 167 %, con un valor promedio de 98%. La mayoría de las muestras se ubicó dentro del rango de aceptación habitual para matrices ambientales (70–130 %), aunque se observaron algunos desvíos puntuales, tanto por sub-recuperación (p. ej., DY3, DY4, TP6) como por sobre-recuperación (p. ej., DY2, TB1, TY1). Estas desviaciones se concentraron en el nivel más bajo de fortificación, próximo al LOQ, lo que indica que combinaciones de efecto matriz y variabilidad analítica tienen un impacto más notable en este rango.

Al incrementar la fortificación a 0,5 µg/L, las recuperaciones se estabilizaron entre 85 y 126 %, con un promedio en torno al 100 % y una dispersión menor. En este nivel, todas las matrices (agua de represa, tratadas y MQ) mostraron comportamientos comparables, sin evidencias de un efecto matriz sistemático ni de sesgos asociados a un embalse o tipo de agua particular.

En conjunto, los ensayos de recuperación demuestran que el inmunoensayo basado en el par NbA2/NbK3 proporciona estimaciones precisas de MC-LR en aguas naturales, con recuperaciones mayoritariamente adecuadas en el rango de concentraciones evaluado, lo que respalda su idoneidad para el análisis de muestras ambientales. Los spiking realizados demuestran que el ensayo permite detectar concentraciones de microcistina relevantes a nivel ambiental: a modo de referencia, la OMS propone un valor guía provisional de 1 µg/L para MC-LR total en aguas destinadas al consumo humano (agua potable), mientras que la EPA estableció recomendaciones sanitarias para exposiciones agudas (hasta 10 días) de 0,3 µg/L para lactantes/niños preescolares y 1,6 µg/L para niños en edad escolar y adultos.

Tabla 3 | Recuperación (%) de MC-LR en muestras de agua fortificadas. MCs corresponde a la concentración global de microcistinas medida por ELISA y expresada como equivalentes de MC-LR. Las siglas de las muestras son: D y T para agua de represa y de tratadas, respectivamente, mientras que B, P e Y corresponden a tres reservorios diferentes a lo largo del río Negro (Uruguay). MQ indica agua Milli-Q. <LOD señala concentraciones por debajo del límite de detección. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Sample	Unspiked			Spiking with MC-LR 0.1 µg/L			Spiking with MC-LR 0.5 µg/L				
ID	MCs µg/L			MCs µg/L			% Recovery	MCs µg/L		% Recovery	
DB1	0,191	±	0,006	0,262	±	0,010	71	0,648	±	0,017	91
DB2	0,200	±	0,005	0,260	±	0,006	60	0,763	±	0,023	113
DP1	0,391	±	0,017	0,512	±	0,012	121	0,936	±	0,032	109
DY1	0,157	±	0,001	0,253	±	0,001	97	0,649	±	0,048	98
DY2	<LOD			0,167	±	0,005	167	0,564	±	0,007	113
DY3	0,221	±	0,002	0,281	±	0,004	61	0,646	±	0,050	85
DY4	0,188	±	0,005	0,246	±	0,005	59	0,624	±	0,009	87
MQ	<LOD			0,127	±	0,003	127	0,499	±	0,010	100
MQ	<LOD			0,111	±	0,006	111	0,596	±	0,048	119
TB1	<LOD			0,141	±	0,012	141	0,511	±	0,011	102
TB2	0,070	±	0,002	0,146	±	0,003	76	0,634	±	0,040	113
TB3	0,023	±	0,013	0,140	±	0,002	117	0,653	±	0,079	126
TP1	0,084	±	0,006	0,189	±	0,006	105	0,546	±	0,018	92
TP2	0,174	±	0,001	0,260	±	0,002	86	0,609	±	0,018	87
TP3	<LOD			0,125	±	0,008	125	0,467	±	0,025	93
TP4	0,251	±	0,010	0,354	±	0,007	102	0,679	±	0,053	86
TP5	0,190	±	0,008	0,274	±	0,003	84	0,639	±	0,014	90
TP6	0,114	±	0,001	0,175	±	0,004	60	0,564	±	0,022	90
TP7	0,113	±	0,009	0,191	±	0,002	77	0,700	±	0,009	117
TY1	0,025	±	0,024	0,153	±	0,005	128	0,511	±	0,029	97
TY2	<LOD			0,120	±	0,007	120	0,472	±	0,016	94
TY3	0,068	±	0,001	0,139	±	0,004	71	0,591	±	0,015	105

4.5.4 PRECISIÓN INTRAENSAYO E INTERENSAYO DEL MÉTODO

Los resultados de precisión intra-ensayo e inter-ensayo se presentan en la **tabla 4**. La precisión intra-ensayo se determinó a partir de cinco réplicas independientes de una muestra sin fortificar y de la misma fortificada (*spiking*) con 0,1 y 0,5 µg/L de MC-LR, evaluadas en un mismo ensayo. Las concentraciones medias obtenidas fueron 0,231, 0,309 y 0,707 µg/L, con desvíos estándar de 0,012, 0,012 y 0,050 µg/L, lo que

corresponde a CV de 5,3; 4,0 y 7,0%, respectivamente. Considerando los criterios de desempeño reportados para ensayos comerciales tipo ELISA (Abraxis)⁸³, donde se espera típicamente <15% en matrices/muestras, los valores observados se ubican dentro de los rangos de aceptación y evidencian una muy buena repetibilidad a lo largo del intervalo de trabajo evaluado.

En cuanto a la precisión inter-ensayo, las mismas condiciones (0; 0,1 y 0,5 µg/L de MC-LR) se analizaron en cinco días independientes, obteniéndose concentraciones promedio de 0,223, 0,289 y 0,694 µg/L, con desvíos estándar de 0,021, 0,025 y 0,104 µg/L, equivalentes a CV de 9,3; 8,5 y 15,0%. En el marco de criterios operativos como los propuestos por la EPA (Method 546)⁸⁴, que consideran aceptables variabilidades ≤15% entre réplicas para muestras, los niveles bajo y medio muestran una reproducibilidad sólida (CV <10%), mientras que el nivel alto se sitúa en el umbral de aceptación (15%). Cabe señalar que dicho criterio EPA se formula sobre la señal (absorbancia), mientras que aquí la precisión se expresa sobre concentraciones interpoladas, lo cual incorpora adicionalmente la variabilidad asociada al ajuste de la curva e interpolación; por lo tanto, alcanzar estos CV en concentración resulta consistente con un desempeño robusto del método.

En conjunto, la baja variabilidad intra-ensayo y la reproducibilidad inter-ensayo respaldan la robustez analítica del inmunoensayo para su aplicación en el análisis rutinario de MCs en muestras de agua, manteniéndose dentro de criterios de aceptación comúnmente utilizados para este tipo de metodologías.

Tabla 4 | Precisión intra-ensayo e inter-ensayo del inmunoensayo para MC-LR. Para tres niveles de *spiking* (0; 0,1 y 0,5 µg/L de MC-LR) se indican el número de réplicas o días analizados (n), la concentración media obtenida, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV) en cada condición.

INTRA-ENSAYO					INTER-ENSAYO				
Spiking (MC-LR µg/L)	n (réplicas)	Media (µg/L)	DE (µg/L)	CV (%)	Spiking (MC-LR µg/L)	n (días)	Media (µg/L)	DE (µg/L)	CV (%)
0	5	0,231	0,012	5,3	0	5	0,223	0,021	9,3
0,1	5	0,309	0,012	4,0	0,1	5	0,289	0,025	8,5
0,5	5	0,707	0,050	7,0	0,5	5	0,694	0,104	15,0

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo aborda la necesidad de contar con herramientas alternativas para la detección de microcistinas y demuestra la viabilidad de un formato no competitivo basado en el inmunocomplejo NbA2/MC. Los resultados obtenidos respaldan el uso del inmunocomplejo como selector para recuperar reactivos de detección que permitan desarrollar un inmunoensayo cuantitativo. Asimismo, el desarrollo funcionó como prueba de concepto para la implementación de un esquema de clonado Golden Gate orientado a la generación de bibliotecas de nanobodies, aportando una alternativa eficiente que reduce tanto el uso de reactivos como el tiempo requerido.

A futuro, es de interés profundizar en entender qué diversidad real está representada en las bibliotecas generadas, y qué clones fueron enriquecidos durante el proceso de panning. Para ello, actualmente se está trabajando en el análisis de secuenciación masiva de bibliotecas y outputs de panning, lo que permitirá discriminar entre el tamaño estimado por UFC y la diversidad real, así como identificar sesgos introducidos durante la amplificación.

La selección y caracterización funcional del nanobody candidato (NbK3) permiten destacar un punto clave del enfoque anti-inmunocomplejo: fue posible aislar un clon con reconocimiento preferencial del complejo NbA2/MC y sin reactividad significativa frente a NbA2 en ausencia de toxina, que para la detección de MCs es particularmente valioso por evitar los compromisos de los formatos competitivos propios del fenómeno de competencia. Si bien el desempeño del ensayo no depende de una descripción estructural detallada, resulta de interés avanzar en la caracterización del epítope reconocido por NbK3 para precisar la contribución relativa de NbA2 y de la microcistina. En esa línea, pueden incorporarse abordajes complementarios que permitan interpretar el reconocimiento a nivel molecular, incluyendo el análisis frente a un panel ampliado de variantes estructurales de microcistinas y, de manera ideal, aproximaciones estructurales como la cristalografía del inmunocomplejo, con el fin de describir el sistema con mayor exactitud.

Finalmente, la evaluación del desempeño analítico en muestras fortificadas indica que la sensibilidad y precisión del ensayo son adecuadas para su aplicación. En este marco, el siguiente paso es avanzar hacia la validación del método tomando como referencia los criterios de desempeño y control de calidad descritos para microcistinas en el Método 546 de la EPA. Esto, complementado con la comparación frente a un método instrumental de referencia (p.ej., LC-MS/MS), permitiría delimitar con precisión el alcance del ensayo: en qué condiciones puede emplearse como tamizaje, cuándo habilita una cuantificación más confiable.

Como proyección aplicada, se plantea la transferencia del esquema captura-detección a plataformas alternativas. En esta línea, se está avanzando en la adaptación del sistema a

un inmunoensayo de flujo lateral orientado al monitoreo en campo, con el objetivo de disponer de una herramienta de lectura rápida, operativamente simple y confiable, sin necesidad de equipos de lectura ni de personal altamente cualificado, manteniendo el formato de reconocimiento basada en el inmunocomplejo.

En síntesis, este trabajo cumple con el objetivo propuesto de desarrollar una biblioteca de nanobodies presentados en fagos filamentosos por clonado Golden Gate y aplicarla exitosamente a la selección de nanobodies específicos contra el inmunocomplejo NbA2/MC, avanzando en el desarrollo de un inmunoensayo no competitivo para la detección de microcistinas.

6. REFERENCIAS

1. Roth, D. B. V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity. *Microbiol Spectr* 2, 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0041-2014 (2014).
2. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495–497 (1975).
3. Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J. A. R. G. & Hamers, R. Sequence and structure of V H domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng* 7, 1129–1135 (1994).
4. Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R. & Muyldermans, S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett* 414, 521–526 (1997).
5. Deschacht, N. *et al.* A Novel Promiscuous Class of Camelid Single-Domain Antibody Contributes to the Antigen-Binding Repertoire. *The Journal of Immunology* 184, 5696–5704 (2010).
6. Flajnik, M. F., Deschacht, N. & Muyldermans, S. A case of convergence: Why did a simple alternative to canonical antibodies arise in Sharks and Camels? *PLoS Biol* 9, (2011).
7. Das, S., Hirano, M., Tako, R., McCallister, C. & Nikolaidis, N. Evolutionary Genomics of Immunoglobulin-Encoding Loci in Vertebrates. *Curr Genomics* 13, 95 (2012).
8. Humers-Casterman, C. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446–448 (1993).
9. Nguyen, V. K., Hamers, R., Wyns, L. & Muyldermans, S. Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C H 1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies 1. *Mol Immunol* 36, 515–524 (1999).
10. Vu, K. B., Ghahroudi, M. A., Wyns, L. & Muyldermans, S. Comparison of llama V(H) sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol* 34, 1121–1131 (1997).
11. Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J. A. R. G. & Hamers, R. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng* 7, 1129–1135 (1994).
12. Muyldermans, S. Nanobodies: Natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem* 82, 775–797 (2013).

13. De Genst, E. *et al.* Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4586–4591 (2006).
14. Gonzalez-Sapienza, G., Rossotti, M. A. & Tabares-da Rosa, S. Single-domain antibodies as versatile affinity reagents for analytical and diagnostic applications. *Front Immunol* 8, (2017).
15. Hassanzadeh-Ghassabeh, G., Devoogdt, N., De Pauw, P., Vincke, C. & Muyldermans, S. Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine* 8, 1013–1026 (2013).
16. Helma, J., Cardoso, M. C., Muyldermans, S. & Leonhardt, H. Nanobodies and recombinant binders in cell biology. *Journal of Cell Biology* 209, 633–644 (2015).
17. Van Der Linden Ay, R. H. J. *et al.* Comparison of Physical Chemical Properties of Llama V HH Antibody Fragments and Mouse Monoclonal Antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta* (1999).
18. Ingram, J. R., Schmidt, F. I. & Ploegh, H. L. Exploiting Nanobodies' Singular Traits. *Annu Rev Immunol* 36, 695–715 (2018).
19. Strohl, W. R. Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters. *Biodrugs* 29, 215 (2015).
20. Smith, G. P. & Petrenko, V. A. Phage Display. *American Chemical Society* 391–410 (1997).
21. Pande, J., Szewczyk, M. M. & Grover, A. K. Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnol Adv* 28, 849–858 (2010).
22. Ledsgaard, L., Kilstrup, M., Karatt-Vellatt, A., McCafferty, J. & Laustsen, A. H. Basics of antibody phage display technology. *Toxins (Basel)* 10, (2018).
23. Nemudraya, A. A., Richter, V. A. & Kuligina, E. V. *Phage Peptide Libraries As a Source of Targeted Ligands*. vol. 8 (2016).
24. Hemminga, M. A. *et al.* Viruses: Incredible nanomachines. New advances with filamentous phages. *European Biophysics Journal* 39, 541–550 (2010).
25. Barbas, C. F. *Phage Display: A Laboratory Manual - National Institutes of Health*. (2001).
26. Kim, H. J. *et al.* Isolation of alpaca anti-hapten heavy chain single domain antibodies for development of sensitive immunoassay. *Anal Chem* 84, 1165–1171 (2012).

27. Liu, W. *et al.* Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies. *Mol Immunol* 96, 37–47 (2018).
28. Jovčevska, I. & Muyldermans, S. The Therapeutic Potential of Nanobodies. *BioDrugs* 34, 11–26 (2020).
29. Sorida, M. & Bonasio, R. An efficient cloning method to expand vector and restriction site compatibility of Golden Gate Assembly. *Cell Reports Methods* 3, 100564 (2023).
30. Yan, J., Li, G., Hu, Y., Ou, W. & Wan, Y. Construction of a synthetic phage-displayed Nanobody library with CDR3 regions randomized by trinucleotide cassettes for diagnostic applications. *J Transl Med* 12, 1–12 (2014).
31. Bauer, C. *et al.* Facile One-Step Generation of Camelid VHH and Avian scFv Libraries for Phage Display by Golden Gate Cloning. *Methods in Molecular Biology* 2681, 47–60 (2023).
32. Engler, C., Kandzia, R. & Marillonnet, S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* 3, (2008).
33. Bilotti, K. *et al.* One-pot Golden Gate Assembly of an avian infectious bronchitis virus reverse genetics system. *PLoS One* 19, (2024).
34. Engler, C. & Marillonnet, S. Golden Gate cloning. *Methods in Molecular Biology* 1116, 119–131 (2014).
35. Bird, J. E., Marles-Wright, J. & Giachino, A. A User's Guide to Golden Gate Cloning Methods and Standards. *ACS Synth Biol* 11, 3551–3563 (2022).
36. Laborda-Mansilla, J. & Garcia-Ruiz, E. *Chapter Title: Advancements in Golden Gate Cloning: A Comprehensive Review Running Title: Advancements in Golden Gate: A Review.*
37. Wild, D. The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques. *The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques* 1–1013 (2013).
38. Wild, D. & Davies, C. Immunoassay fundamentals. *The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques* 1-26 pp (2013).
39. Glosing, JP. A decade of development in immunoassay methodology - PubMed. *Clin Chem* 36, (1990).

40. Liang, Y. F., Yang, J. Y., Shen, Y. D., Xu, Z. L. & Wang, H. A breakthrough of immunoassay format for hapten: recent insights into noncompetitive immunoassays to detect small molecules. *Crit Rev Food Sci Nutr* 65, 1963–1973 (2025).
41. Ridley, R. G. Antibodies: A Laboratory Manual. *Genet Res (Camb)* 54, 161–164 (1989).
42. Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques: Third Edition*. *Bioconjugate Techniques: Third Edition* (Elsevier Inc., 2013). doi:10.1016/C2009-0-64240-9.
43. Liu, G. *et al.* Disposable electrochemical immunosensor diagnosis device based on nanoparticle probe and immunochromatographic strip. *Anal Chem* 79, 7644–7653 (2007).
44. Lequin, R. M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* 51, 2415–2418 (2005).
45. *Immunoassays: A Practical Approach*. (Oxford University Press, 2000). doi:10.1093/OSO/9780199637119.001.0001.
46. Hnasko, R. *ELISA: Methods and Protocols*. *ELISA: Methods and Protocols* (Springer New York, 2015). doi:10.1007/978-1-4939-2742-5.
47. Chen, H. *et al.* Competitive and noncompetitive immunoassays for the detection of benzothioistrobin using magnetic nanoparticles and fluorescein isothiocyanate-labeled peptides. *Anal Bioanal Chem* 411, 527–535 (2019).
48. Van Weemen, B. K. & Schuurs, A. H. W. M. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett* 15, 232–236 (1971).
49. Ali, E., Sengupta, J. & Dhar, T. K. Sandwich immunoassay of small molecules: I. Investigation with testosterone as model hapten. *J Immunol Methods* 147, 173–179 (1992).
50. Self, C. H. *et al.* Non-competitive Immunoassays for Small Molecules-the Anti-complex and Selective Antibody Systems. in *The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques* 61–65 (Elsevier, 2013). doi:10.1016/B978-0-08-097037-0.00005-1.
51. Huisman, J. *et al.* Cyanobacterial blooms. *Nat Rev Microbiol* 16, 471–483 (2018).
52. Carmichael, W. W. The toxins of cyanobacteria. *Sci Am* 270, 78–86 (1994).
53. Martens, S. Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. *Adv Oceanogr Limnol* 8, (2017).

54. Bouaïcha, N. *et al.* Structural Diversity, Characterization and Toxicology of Microcystins. *Toxins (Basel)* 11, (2019).
55. Zurawell, R. W., Chen, H., Burke, J. M. & Prepas, E. E. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 8, 1–37 (2005).
56. Paerl, H. W. & Otten, T. G. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microb Ecol* 65, 995–1010 (2013).
57. Chorus, I. *Toxic Cyanobacteria in Water - A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management.* (1999).
58. Xie, L. *et al.* Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. *Environ Toxicol* 20, 293–300 (2005).
59. Codd, G. A., Morrison, L. F. & Metcalf, J. S. Cyanobacterial toxins: Risk management for health protection. *Toxicol Appl Pharmacol* 203, 264–272 (2005).
60. Grosse, Y. *et al.* Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *Lancet Oncol* 7, 628–629 (2006).
61. Chen, J., Xie, P., Li, L. & Xu, J. First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage. *Toxicol Sci* 108, 81–89 (2009).
62. WHO. Guidelines for drinking-water quality, 4th edition, incorporating the 1st addendum. Geneva: World Health Organization. Geneva, Switzerland. *World Health Organization* <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950> (2017).
63. Zeck, A., Weller, M. G., Bursill, D. & Niessner, R. Generic microcystin immunoassay based on monoclonal antibodies against Adda. *Analyst* 126, 2002–2007 (2001).
64. Fischer, W. J. *et al.* Congener-independent immunoassay for microcystins and nodularins. *Environ Sci Technol* 35, 4849–4856 (2001).
65. Neffling, M. R., Lance, E. & Meriluoto, J. Detection of free and covalently bound microcystins in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environmental Pollution* 158, 948–952 (2010).
66. Pérez-Schirmer, M. *et al.* Comparison of three anti-hapten VHH selection strategies for the development of highly sensitive immunoassays for microcystins. *Anal Chem* 89, (2017).

67. Bernard, P. & Couturier, M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* 226, 735–745 (1992).
68. Tabares-Da Rosa, S. *et al.* Competitive selection from single domain antibody libraries allows isolation of high-affinity antihapten antibodies that are not favored in the llama immune response. *Anal Chem* 83, 7213–7220 (2011).
69. Rossotti, M. *et al.* Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells. *Biochim Biophys Acta* 1850, (2015).
70. Badagian, N., Schirmer, M. P., Parada, A. P., Gonzalez-Sapienza, G. & Brena, B. M. Determination of Microcystins in Fish Tissue by ELISA and MALDI-TOF MS Using a Highly Specific Single Domain Antibody. *Toxins (Basel)* 84, (2023).
71. Vesterkvist, P. S. M., Misiorek, J. O., Spoof, L. E. M., Toivola, D. M. & Meriluoto, J. A. O. Comparative Cellular Toxicity of Hydrophilic and Hydrophobic Microcystins on Caco-2 Cells. *Toxins (Basel)* 4, 1008 (2012).
72. Feurstein, D., Kleinteich, J., Heussner, A. H., Stemmer, K. & Dietrich, D. R. Investigation of Microcystin Congener-Dependent Uptake into Primary Murine Neurons. *Environ Health Perspect* 118, 1370 (2010).
73. Bahassi, E. M. *et al.* Interactions of CcdB with DNA Gyrase. *Journal of Biological Chemistry* 274, 10936–10944 (1999).
74. Bernard, P. & Couturier, M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* 226, 735–745 (1992).
75. Hiraga, S., Jaffe, A., Ogura, T., Mori, H. & Takahashi, H. F plasmid ccd mechanism in Escherichia coli. *J Bacteriol* 166, 100–104 (1986).
76. Hust, Michael. & Lim, T. Soon. Phage display : methods and protocols. 605 (2023).
77. Wang, H. *et al.* Improved seamless mutagenesis by recombineering using ccdB for counterselection. *Nucleic Acids Res* 42, e37 (2013).
78. Gomes, L., Monteiro, G. & Mergulhão, F. The impact of IPTG induction on plasmid stability and heterologous protein expression by escherichia coli biofilms. *Int J Mol Sci* 21, (2020).
79. Atroshenko, D. L., Sergeev, E. P., Golovina, D. I. & Pometun, A. A. Additivities for Soluble Recombinant Protein Expression in Cytoplasm of Escherichia coli. *Fermentation* 10, (2024).

80. Girt, G. C. *et al.* The use of nanobodies in a sensitive ELISA test for SARS-CoV-2 Spike 1 protein. *R Soc Open Sci* 8, (2021).
81. Scarrone, M. *et al.* Development of anti-human IgM nanobodies as universal reagents for general immunodiagnosics. *N Biotechnol* 64, 9–16 (2021).
82. Pérez, M. *et al.* Limited analytical capacity for cyanotoxins in developing countries may hide serious environmental health problems: Simple and affordable methods may be the answer. *J Environ Manage* 114, 63–71 (2013).
83. Abraxis. Importance of Microcystins/Nodularins Determination. Preprint at www.epa.gov/etv.
84. Wendelken, S. C. Method 546: Determination of Total Microcystins and Nodularins in Drinking Water and Ambient Water by Adda Enzyme-Linked Immunosorbent Assay i Questions concerning this document should be addressed to. (2016).