

Desarrollo de un ELISA para la cuantificación de la enzima dextrana-sacarasa fusionada a histidina, obtenida por vía recombinante

Meinardo Lafargue-Gómez^{1*}, Reinaldo Fraga-Vidal¹, Miriam Rodríguez-Burón², Roberto Carlos Arísticas-Ribalta¹, Lisandra Martínez-Valdés¹, Amanda Montes-Álvarez¹, Arianne Rubio-Sánchez¹ y Aidin Martínez-Sánchez¹

1. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).
Vía Blanca 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón, La Habana, Cuba.
* meinardo.lafargue@icidca.azcuba.cu
2. Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).
Calle 3ra. No. 40759 e/ 6ta. y Carretera de Tirabeque, Reparto La Unión, Municipio Boyeros, La Habana, Cuba.
Código Postal: 10300.

RESUMEN

En el presente trabajo se exponen los resultados de la evaluación de la técnica ELISA, con el uso de un ensayo competitivo, y el conjugado antihistidina/fosfatasa alcalina como molécula de revelado, que emplea la detección de señales de fluorescencia para la cuantificación de la enzima. Para la detección de la dextrana-sacarasa fusionada a un péptido de poli-histidina (8 aminoácidos), se evaluaron 81 variantes de ensayo, que se correspondieron con los regímenes de recubrimiento del antígeno (enzima inmovilizada) a la fase sólida del ensayo (Placas de poliestireno transparente). Se describe el uso del equipamiento de la tecnología SUMA para el desarrollo de esta técnica. Se logró establecer un modelo lineal para definir la mayor cantidad de proteína recubierta por ELISA y, además, se obtuvieron niveles de exactitud superiores al 90 %, y límite de detección de la enzima de 0.09 µg/mL. Adicionalmente, se realizó una comparación entre el ensayo desarrollado y los métodos tradicionales de detección de esta enzima; es decir, tinción con Coomassie y Periodic Acid-Schiff (PAS), luego de migración por electroforesis de esta.

Palabras clave: dextrana-sacarasa, ELISA, anticuerpos IgG, conjugación con per-yodato.

ABSTRACT

Results in evaluation of ELISA technique are exposed. Using a competitive assay and anti-histidine / alkaline phosphatase conjugate as reaction detector and using fluorescence signal detection for enzyme quantification. 81 variants of ELISA were evaluated. Thus, Polystyrene ELISA Plates coated with dextran-sucrase fused to poly-histidine peptide (8 amino acids) were used in such variants. Use of SUMA technology equipment for development of this technique is described. A linear relationship was defined between coated protein mass and analyzed coating variables to define the highest amount of coated protein. Accuracy greater than 90 % and enzyme limit of detection of 0.09 µg / mL were obtained. Additionally, a comparison was made between ELISA assay and traditional methods for enzyme detection such as, staining with Coomassie and Periodic Acid-Schiff (PAS) once migration by electrophoresis has been carried out.

Key words: dextran-sucrase, competitive ELISA, IgG antibodies, per-iodate conjugation.

INTRODUCCIÓN

La dextrana constituye un polímero formado por residuos de glucosa, que se obtiene a partir del microorganismo *Leuconostoc mesenteroides*, y emplea, como sustrato, sacarosa. La utilidad de este polímero ha sido bien establecida en procesos asociados a la industria de los alimentos, por su alto poder en la formación de geles, aumento de viscosidad, en la industria de los cosméticos y, como soporte, para la elaboración de columnas de cromatografía, con fines de investigación (1). Además, es conocido su uso, como elemento potenciador del incremento de niveles de hemoglobina, tanto en humanos como en animales, cuando es administrada en forma de ferridextrana (2).

Por este amplio uso de la dextrana, la expresión de la enzima que cataliza su formación, la dextrana-sacarasa, por vía recombinante, ha tenido un gran incremento en las dos últimas décadas (3). Uno de los pasos críticos, para la evaluación de la expresión de esta enzima, lo constituyen los métodos de su detección, entre ellos, la medición de actividad enzimática que emplea el método del ácido di-nitro salicílico (DNS) y la tinción, tanto con azul de Coomassie, como la tinción del ácido per-yódico, en combinación con el reactivo de Schiff, luego de la migración electroforética de la proteína. En el siguiente trabajo se describe el desarrollo de otro método de cuantificación de dextrana-sacarasa, basado en la técnica ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay).

Este tipo de ensayo, basado en la detección de biomoléculas que hace uso de la alta afinidad entre antígenos y anticuerpos, ha mostrado ser de elevada sensibilidad y especificidad en la detección de macromoléculas. Reportes asociados al empleo del ensayo ELISA, para la detección de enzimas, están ampliamente difundidos (4-9). Resulta, además, notorio, el uso de este tipo de técnicas, para la detección de biomoléculas de interés en la industria azucarera, tales como la dextrana, con técnicas ELISA validadas en la última década (10-13).

En el presente trabajo se describe el desarrollo de un ensayo ELISA, que permitió cuantificar indirectamente la enzima dextrana-sacarasa, a través de la determinación de los niveles de histidina (en forma péptido de poli-histidina, 8 residuos), fusionada y expresada por vía recombinante, a la proteína antes citada. Se usó el equipamiento de la tecnología SUMA, desarrollada en Cuba, de alto grado de automatización, para la determinación sensible de varias muestras; se logró el desarrollo de este ensayo, con parámetros tales como: condiciones óptimas para el recubrimiento de la proteína de interés en el soporte empleado (placas de poliestireno, de 96 pocillos), límite de detección y exactitud acordes a los reportados para este tipo de análisis. Un nivel de exactitud del método, superior al 85 %, en la totalidad de las muestras analizadas y el límite de detección de 0,09 ug/mL, avalan lo antes expresado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desarrollo del ensayo ELISA

Se desarrolló un ELISA competitivo, similar al empleado por la firma LIFESPAN, para la cuantificación de dextrana, con la diferencia de que el principio de detección de la señal no se basó en la determinación del color (DO a 455 nm), sino en la medición de la fluorescencia de la muestra, se empleó el sustrato fluorescente, 4-metil-umberiferil-fosfato. Brevemente, placas de poli-estireno transparente, de 96 pocillos (firma Greiner-Bio-One), fueron recubiertas con la enzima dextrana-sacarasa, que se fusionó a un polipéptido (8 residuos) de histidina y se emplearon las siguientes variables de recubrimiento:

- Concentración de la proteína a recubrir (0.5, 2.75 y 5 ug/mL).
- pH (controlado a partir del tampón empleado) (7.4 tampón PBS, 8.5 tampón TRIS y 9.6 tampón carbonato-bicarbonato).
- Temperatura (4 °C; 25 °C y 37 °C).
- Tiempo de incubación del proceso de recubrimiento (4, 11 y 18 horas).

Para cada una de las 81 variantes analizadas se emplearon similares condiciones de lavado (3 lavados con tampón TRIS, pH =8), de conjugado antihistidina- fosfatasa alcalina (1.5 horas a 37 °C, diluido 1/5000 en tampón TRIS, pH =8), de sustrato fluorescente (4-metil-umberiferil-fosfato), y de lectura realizada en lector de fluorescencia de la tecnología SUMA, rango de excitación/emisión: 355 nm - 450 nm.

Validación del ELISA (cuantificación de las muestras)

A partir de muestras obtenidas de sobrenadantes de cultivo microbiano, 5 preparaciones, se realizó la purificación de la enzima dextrana-sacarasa, usando columnas recubiertas con celulosa amorfa regenerada. Posteriormente, el contenido proteico de las muestras purificadas (5 preparaciones) fue determinado em-

pleando el reactivo de Bradford, oscilando en un rango de 0.2 a 0.8 mg/mL. A partir de la cuantificación así establecida, se procedió a la preparación de diferentes concentraciones de dextrana-sacarasa, por dilución de la muestra inicial, las cuales se emplearon para determinar la exactitud en la cuantificación del ELISA, empleando la expresión:

$$\text{Exactitud} = 100 - 100 * \frac{\text{ABS}(O-E)}{E}$$

Definida previamente por Pino *et al.* (14).

Siendo:

ABS: El valor absoluto de la medición.

O: El valor observado o cuantificado, con empleo de la técnica desarrollada.

E: El valor esperado de la muestra, definido a partir de las diluciones realizadas, a partir de cuantificación por Bradford de la enzima purificada.

Electroforesis y tinción

Las preparaciones de enzima purificada (n = 5) fueron, además, evaluadas con el uso de SDS-PAGE al 8 %, siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (15). Brevemente, las muestras y el patrón de peso molecular, fueron aplicados en pocillos de geles de electroforesis, en regímenes de 20 min a 80 Volt y, posteriormente, 70 min a 120 Volt. El revelado de las bandas para la definición proteica de las muestras fue establecido a través de tinción con Azul-Coomassie. Además, la formación de dextrana, debido a la acción de la enzima se visualizó a partir de la tinción Periodic Acid-Schiff (PAS).

Análisis estadístico

Se empleó el software STATGRAPHICS (Centurion II), se realizaron los siguientes análisis:

Se estableció el uso de un diseño factorial fraccionado 34 (4 factores, 3 niveles, 81 variantes de ensayo) empleado para el análisis de la variable respuesta (contenido de proteína fijada en el pocillo de la placa ELISA).

- Empleo del estadígrafo t de student, para la comparación de los resultados observados y esperados en la cuantificación de las muestras con uso de la técnica.
- Análisis de normalidad (cumplimiento de curva gaussiana), en la medición de la señal del blanco del ensayo, lo cual permitió el cálculo del límite de detección del ensayo (LD). Aybay *et al.* (9), según la expresión:

$$LD = \frac{\text{Fluorescencia del límite de detección} - \text{Intercepto}}{\text{pendiente}}$$

Donde:

Fluorescencia del límite de detección = Fluorescencia del blanco + 3 DS del blanco

Siendo:

- *Fluorescencia del blanco*: Es el valor promedio de 35 valores de fluorescencia de la muestra blanco, previamente, comprobado el ajuste de dichos valores a una distribución normal.
- *DS*: La desviación estándar de la señal de fluorescencia del blanco.
- *Intercepto*: Es el intercepto de un gráfico comprendido entre el blanco del ensayo y el primer punto de la curva de calibración de concentración de enzima, versus fluorescencia (0.25 ppm).
- *Pendiente*: Es la pendiente de un gráfico, comprendido entre el blanco del ensayo y el primer punto de la curva de calibración de concentración de enzima, versus fluorescencia (0.25 ppm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo del ensayo ELISA

En el ELISA desarrollado, la señal de fluorescencia obtenida fue inversamente proporcional a la concentración de la muestra analizada (figura 1), comportamiento típico en ensayos competitivos, donde a mayor concentración del analito a detectar se obtiene una disminución de la señal de fluorescencia emitida, pues se establece una competencia por la molécula de revelado (conjugado antihistidina-fosfatasa alcalina) entre la

enzima presente en la muestra y la enzima fijada en el proceso de recubrimiento a la placa de poli-estireno transparente, soporte que usa en la reacción del ensayo. Este ensayo, su principio y pasos, son ilustrados en la figura 2.

Tres de los 4 factores analizados (concentración de recubrimiento, pH y tiempo de incubación), presentaron significación estadística en el diseño empleado ($p > 0.05$), tabla 1. Se logró establecer como condición óptima

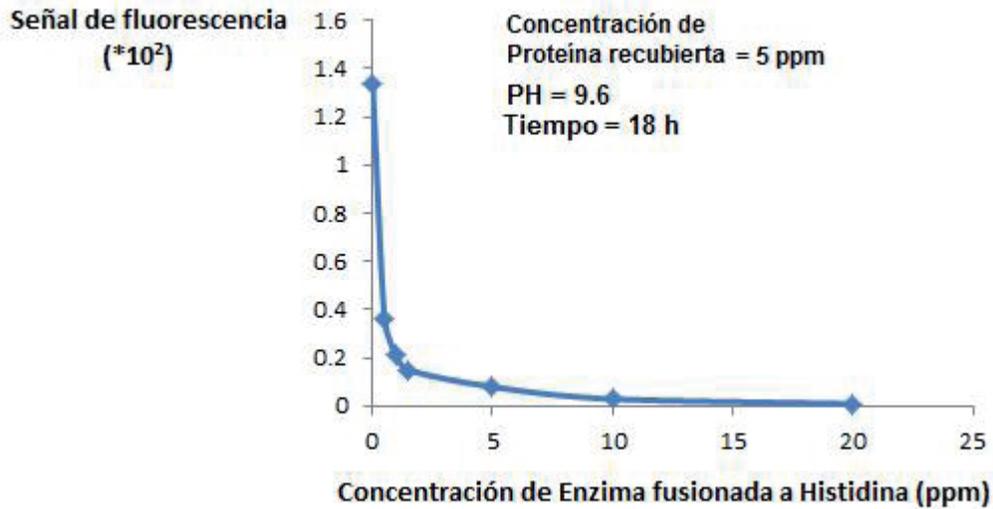


Figura 1. Relación entre la señal de fluorescencia y la concentración de enzima detectada en el ELISA competitivo desarrollado.

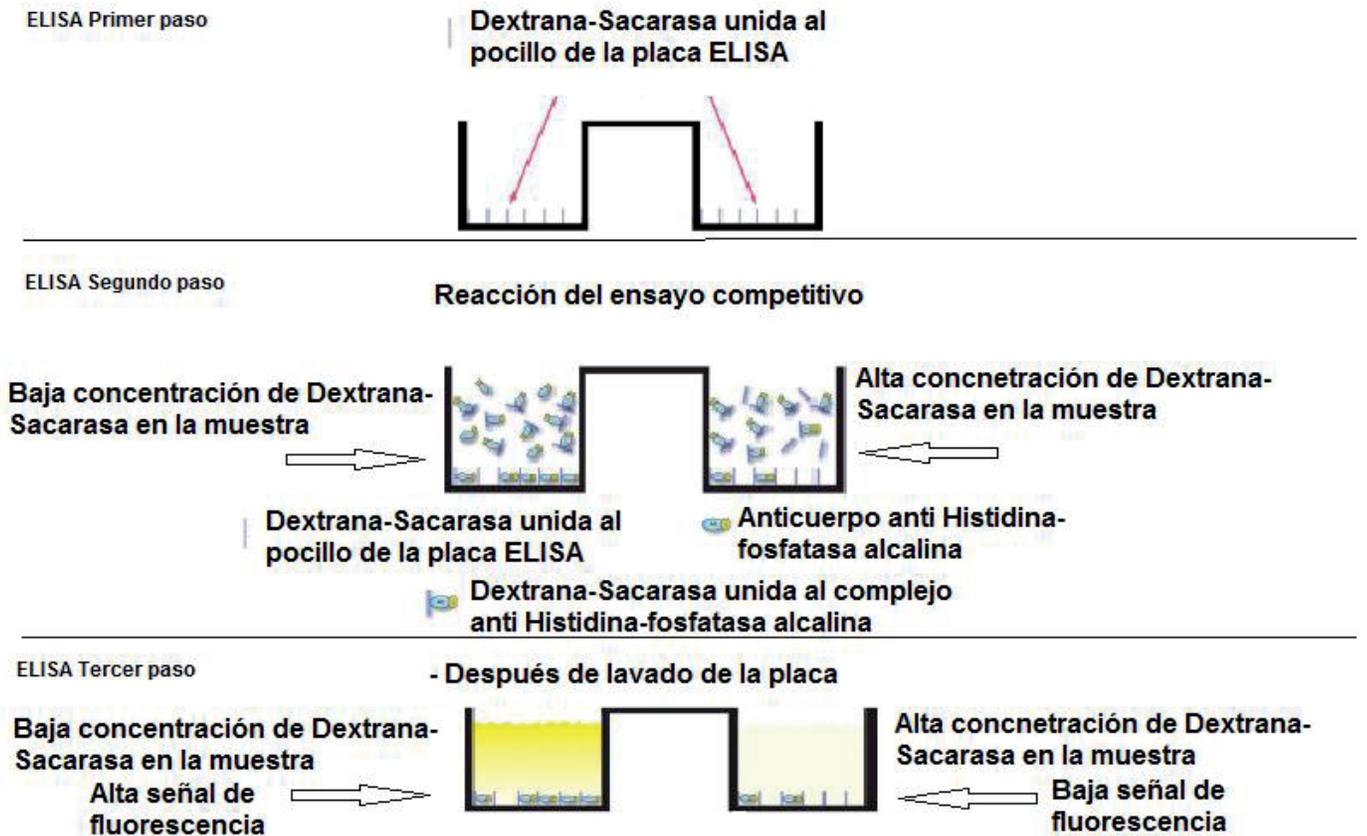


Figura 2. Pasos y principio de la obtención de la señal fluorescente de la reacción del ELISA competitivo desarrollado.

de recubrimiento de la enzima dextrana-sacarasa fusionada a histidina, aquella que empleaba las variables de recubrimiento de pH = 9.6 (empleando tampón carbonato-bicarbonato), 18 horas de incubación y 5 ug/mL de concentración de recubrimiento, se obtuvieron valores superiores a 115 ug/mL de masa de proteína recubierta, lo que evidenció una superioridad con relación a las otras 80 variantes de ensayo analizadas (p = 0.03).

Tabla 1. Análisis de Varianza del diseño factorial 3⁴

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón -F	Valor-P
A: concentración recubrimiento	1249.98	1	1249.98	26.34	0.0009
B: temperatura	0.030625	1	0.030625	0.00	0.9804
C. pH	498.852	1	498.852	10.51	0.0118
AB	973.128	1	973.128	20.50	0.0119
AC	0.030625	1	0.030625	0.00	0.9804
AD	260.338	1	260.338	5.49	0.0473
BC	0.030625	1	0.030625	5.49	0.0473
BD	0.030625	1	0.030625	0.00	0.9804
CD + bloque	52.0676	1	52.0676	0.00	0.9804
Bloques	0.0	1	0.0	1.10	0.3255
Error total	379.679	8	47.4599	0.00	1.0000
Total (corr.)	3882.77	19			

Este resultado en cuanto a los valores óptimos para las 3 variables que presentaron significación estadística, está en correspondencia con el modelo obtenido, en el cual se obtiene un aumento de la variable respuesta (masa de proteína recubierta), en función del aumento de las variables analizadas, lo cual es, además, visualizado en el gráfico de superficie respuesta que se obtuvo, figura 4. Dos interacciones, además, presentaron significación estadística y son incluidas en el modelo.

Ecuación del modelo obtenido:

$$\text{Masa proteína recubierta} = 55.9 - 12.7 * \text{Conc recubrimiento} + 0.0006 * \text{Temperatura} + 0.59 * \text{pH} + 0.41 * \text{Tiempo de Incubación} - 0.0011 * \text{Conc recubrimiento} * \text{Temperatura} + 1.62 * \text{Conc recubrimiento} * \text{pH} + 0.256111 * \text{Conc recubrimiento} * \text{Tiempo de Incubación}$$

Validación del ELISA (cuantificación de las muestras)

Se logró la mejor condición, en cuanto a la variable de respuesta analizada, masa de proteína recubierta, luego se procedió a la cuantificación de 10 muestras correspondientes a dos condiciones, por cada una de las 5 preparaciones (n = 5), que se obtuvieron, a partir de purificación de la enzima alcanzada, a partir de sobrenadantes cultivos microbianos. Se prepararon 10 concentraciones que abarcaron un rango comprendido entre 0.2 y 2.4 mg/mL, con un valor promedio de 1.03 mg/mL. La comparación de la mejor variante (pH = 9.6, Incubación = 18 horas y concentración de proteína recubierta = 5 ug/mL), con el resto de las 81 variantes empleadas, mostró una evidente ventaja, en cuanto al parámetro de exactitud, solo tres de las variantes analizadas presentaron indicadores de exactitud cercanos al de dicha variante.

La condición óptima analizada presentó los mejores resultados, en relación con la exactitud establecida, este parámetro resultó superior al 90 %. La tabla 2, muestra la comparación de la condición 1 (condición definida como óptima, pH =9.6; tiempo = 18 horas y concentración = 5 ug/mL) con dos de las restantes 80 condiciones analizadas. Adicionalmente, las muestras preparadas fueron analizadas con el estadígrafo t-student y, en todos los casos, no se presentaron diferencias con relación a las concentraciones esperadas (p >0.05), tabla 2.

Tabla 2. Resumen de la evaluación de la exactitud del método ELISA desarrollado (se exponen 3 de las 81 condiciones de ensayo)

Muestra	Conc. esperada (ug/mL)	Conc. obtenida condición 1 (n = 10)	Conc. obtenida condición 2 (n = 10)	Conc. obtenida condición 3 (n = 10)
Muestra 1	1.5	1.72 (p = 0.047)	1.3 (p = 0.0005)	2.6 (p < 0.0005)
Muestra 2	0.8	0.71 (p = 0.034)	0.66 (p = 0.008)	1.11 (p < 0.0005)
Muestra 3	0.2	0.19 (p = 0.782)	0.15 (p = 0.2143)	0.34 (p < 0.0005)
Muestra 4	0.6	0.54 (p = 0.174)	0.76 (p = 0.0116)	1.1 (p < 0.0005)
Muestra 5	0.7	0.68 (p = 0.558)	0.51 (p = 0.0037)	1.22 (p < 0.0005)
Muestra 6	1.9	1.75 (p = 0.022)	2.24 (p = 0.0006)	2.74 (p < 0.0005)
Muestra 7	2.4	2.15 (p = 0.102)	2.37 (p = 0.4621)	3.87 (p < 0.0005)
Muestra 8	1.3	1.26 (p = 0.278)	1.64 (p = 0.0004)	3.34 (p < 0.0005)
Muestra 9	0.5	0.54 (p = 0.143)	0.42 (p = 0.0221)	1.19 (p < 0.0005)
Muestra 10	0.4	0.38 (p = 0.422)	0.61 (p = 0.0007)	0.96 (p < 0.0005)
		Exactitud 1	Exactitud 2	Exactitud 3
Muestra 1	1.5	85.3	86.7	26.7
Muestra 2	0.8	88.8	82.5	61.3
Muestra 3	0.2	95.0	75.0	30.0
Muestra 4	0.6	90.0	73.3	16.7
Muestra 5	0.7	97.1	72.9	25.7
Muestra 6	1.9	87.4	82.1	55.8
Muestra 7	2.4	89.6	98.8	38.8
Muestra 8	1.3	96.9	73.8	38.9
Muestra 9	0.5	92.0	84.0	42.0
Muestra 10	0.4	95.0	47.5	41.7
		Exact. promedio 1	Exact. promedio 2	Exact. promedio 3
		91.7	77.7	37.7

Comparación del método con ensayos comúnmente empleados para la determinación de dextrana-sacarosa

El ELISA que se desarrolló, se comparó con las tinciones con Coomassie y PAS, luego de la realización de electroforesis. Para ello, se procedió a evaluar la sensibilidad de los tres métodos, es decir, la mínima cantidad de enzima que cada uno de ellos es capaz de detectar. El límite de detección del ELISA, fue definido en 0.09 ppm y se basa en el método previamente descrito por Aybay (9). La preparación de muestras, a dicho valor, permitió la cuantificación de este nivel de concentración con la técnica desarrollada, pues la señal de fluorescencia emitida, para esa muestra, fue claramente diferenciada de la señal del blanco reactivo (muestra con concentración teórica de 0 ppm de dextrana-sacarosa) (p < 0.05).

Sin embargo, una concentración similar de 10 ppm (0.01 mg/mL), no pudo ser detectada con la tinción de Coomassie, ni siquiera realizando la tinción de PAS, de mucho más sensibilidad que el Coomassie, como se aprecia en la figura 5. Además de ello, este resultado de no detección se evidenció al emplear otro método de

Superficie de Respuesta Estimada para
Temperatura = 25°C, Tiempo de Incubación = 11 horas

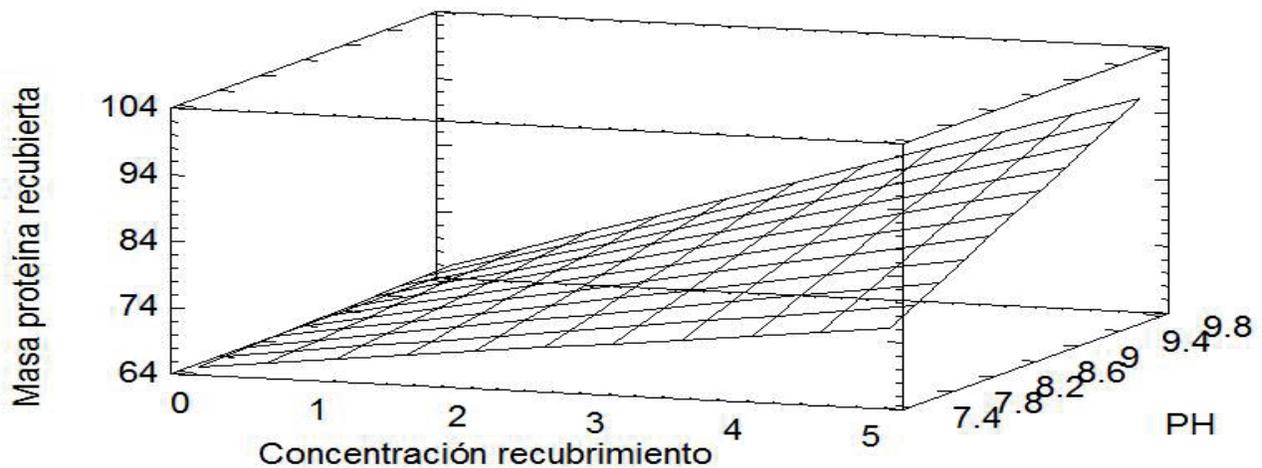


Figura 3. Superficie respuesta estimada para la evaluación de las variables pH y concentración de recubrimiento.



Figura 4. Equipamiento empleado en el desarrollo de la técnica ELISA, lavador (izquierda) y lector de placas (derecha).

purificación de la enzima, con el uso de columnas de níquel, de alta afinidad por los residuos de poli-histidina presentes en esta. Luego de la elución de la enzima retenida en las columnas, y ajuste de las concentraciones del purificado a 0.5 y 0.01 mg/mL, se obtuvieron resultados similares en cuanto a nivel de detección con relación a la purificación empleando celulosa amorfa regenerada, es decir, detección a 0.5 mg/mL (figura 5), y no detección a 0.01 mg/mL, dato no mostrado.

Estos resultados son significativos, pues avalan este tipo de técnicas para la determinación sensible de enzimas de interés en la industria azucarera. Si adicionamos la ventaja de la sensibilidad de la prueba, a su fácil automatización, y se usa el equipamiento antes señalado, la técnica desarrollada es ideal para la evaluación de múltiples variantes; por ejemplo, evaluación de varios clones productores de la enzima de interés, donde cada pocillo de la placa ELISA, representaría un clon potencial, y cada placa permitiría realizar hasta 96 determinaciones (96 clones), en solo 2 horas de ensayo.

Realizar similar proceder, evaluar alrededor de 100 muestras, empleando electroforesis necesitaría correr 10 geles, (10 muestras por gel), y el tiempo de análisis oscilaría entre 2.5 horas para el Coomassie y 18 horas para la tinción PAS. Es decir, similar tiempo en la opción de Coomassie, pero con una menor sensibilidad en la detección, y en el caso de la tinción de PAS, de mayor sensibilidad, el tiempo para el resultado del análisis es 9 veces mayor, 18 horas versus 2. Redondeando esta idea, un analista con cierta destreza en la realización de electroforesis, que cuente con una fuente de voltaje y una cámara de electro, puede realizar 8 electroforesis (80 muestras) con tinción de Coomassie, en un período de 10 horas (40 min preparación de geles + 90 min

de corrida + 30 min de revelado de la tinción), en tanto que un analista que use de la técnica ELISA, puede evaluar 400 muestras (4 placas) en dos horas, pues el tiempo de pérdida entre placas es despreciable, 3 min que dura el proceso de lavado para cada una de ellas. Es decir, 5 veces mayor capacidad de análisis en favor de la técnica ELISA, en 5 veces menos tiempo.

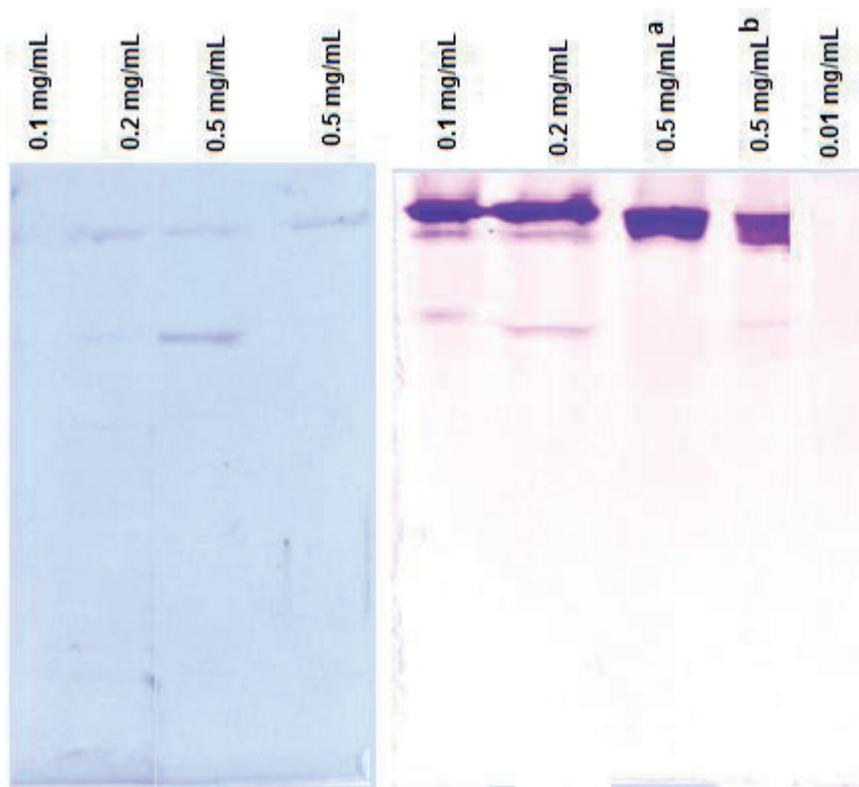


Figura 5. Resultados de la electroforesis de una de las preparaciones, a diferentes concentraciones de la muestra, reveladas con las tinciones de azul de Comassie (izquierda) y tinción PAS (derecha). Los dos valores de 0.5 mg/mL, se refieren a la purificación de la enzima, que emplea celulosa amorfa regenerada (0.05 mg/mL a) y con el uso de columnas de níquel (0.05 mg/mL b).

Por otra parte, si bien es cierto que los análisis de actividad enzimática, para la determinación de dextrana-sacarasa, a través de la evaluación del métodos colorimétricos como DNS (17), se obtienen en intervalos de tiempo similares e, incluso, inferiores a los análisis realizados por ELISA o Micro ELISA, este tipo de determinación es poco sensible, hasta inferior a los niveles de sensibilidad asociados a análisis de zimograma y de SDS-PAGE (11), por lo que avala el empleo del ELISA como ensayo de elección.

Ensayos de este tipo constituyen un elemento inicial para el desarrollo y validación de estas técnicas en la cuantificación de enzimas y polímeros de interés para la producción de derivados de la Industria azucarera. La enzima fosfatasa alcalina, que se emplea en el ensayo, como molécula de revelado de la reacción tiene dos sustratos, uno (el para-nitro-fenol-fosfato), cuya hidrólisis propicia la aparición de un color amarillo (405 nm), y el otro (4-metil-umberiferil-fosfato), cuya hidrólisis permite la emisión de señales de fluorescencia de 450 nm, que son detectadas por el lector de placas, y cuya intensidad es función de la concentración de fosfatasa alcalina, presente en el pocillo de la placa ELISA.

En el ensayo desarrollado, se empleó el sustrato fluorescente por dos razones fundamentales; primeramente, por la mayor afinidad de la enzima con el sustrato fluorescente en relación con el sustrato colorimétrico, lo cual dota a este tipo de sustrato de una mayor sensibilidad en su uso para la detección de macromoléculas, que disminuyó a 0.09 ppm el límite de detección. En segundo lugar, por la posibilidad de contar con el equipamiento necesario, lector de fluorescencia y placas de poli-estireno recubiertas con dióxido de titanio, ambas de la tecnología SUMA, que permiten la lectura de este tipo de señal.

El uso de la expresión de enzimas por vía recombinante, que tengan fusionados residuos de histidina, es muy empleado en la actualidad, pues permite, posteriormente, la purificación de las enzimas de interés, a través de columnas de níquel de alta afinidad, por este aminoácido. Por ello, la técnica desarrollada tiene una doble importancia; en primer lugar, la cuantificación con un alto grado de sensibilidad (límite de detección 0,09 ug/mL) y, en segundo lugar, abre nuevas oportunidades para la detección, no solo de la enzima detectada en este trabajo, sino de todas aquellas que, expresadas por vía recombinante, estén fusionadas a residuos de histidina, práctica muy común en la actualidad por quienes tienen como finalidad la expresión heteróloga de proteínas.

CONCLUSIONES

1. Se logró definir la mejor condición de recubrimiento (o fusión) de la enzima dextrana-sacarasa, definida como masa de proteína recubierta sobre el plástico (poliestireno), a través de un diseño factorial, que incluyó la obtención de un modelo que empleó variables independientes e interacciones.
2. Se logró desarrollar un ensayo ELISA, que permite la cuantificación indirecta de la enzima dextrana-sacarasa, expresada por vía recombinante, que tengan fusionados residuos de histidina, con una alta sensibilidad (límite de detección = 0,09 ug/mL), y elevada exactitud > 90 %, dado el empleo de sustratos fluorescentes.
3. Se logró comprobar la ventaja que tiene este tipo de técnica, sobre aquellas que se emplean tradicionalmente en el análisis de la expresión de enzimas, como electroforesis y tinción de Coomassie e, incluso, análisis de zimogramas.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar similar ensayo para otros tipos de enzimas de interés en la industria azucarera, que tengan fusionados residuos de histidina.
2. Promover la obtención de anticuerpos en sistemas hospederos, como conejos de Nueva Zelandia o cerdos, para extrapolar la detección de macromoléculas, no solo a enzimas, sino a polímeros de interés como la dextrana, inulina o levana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Leemhuis, H.; Pijning, T.; Dobruchowska, J.M.; van Leeuwen, S.S., Kralj, S., Dijkstra, B.W.; Dijkhuizen, L. Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism, analysis and their implications in biotechnology and food applications. *Journal of Biotechnology*. 2013. 250-272.
2. Bell, A.; Michelena, G.; Díaz, M.; Guadarrama, R.; Carrera, E.; Valencia, R.; Pons, M. Nuevo proceso de ferri-dextrana inyectable. *Experiencias en planta piloto Reyes. ICIDCA*.2000:41-47..
3. Vidal, R.F.; Martínez, A.; Moulis, C.; Escalier, P.; Morel, S.; Remaud-Simeon, M.; Monsan, P. A novel dextranase is produced by *Leuconostoc citreum* strain B/110-1-2: an isolate used for the industrial production of dextran and dextran derivatives. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2011:1499-506.
4. Farzad, Z.; James, K.; McClelland, DBL. Measurement of human and mouse anti-tetanus antibodies and isotype analysis by ELISA. *J Immunol Methods*. 1986: 119-125.
5. Kolbe, D.R.; Clough, N.E. Quantitation of commercial equine tetanus antitoxin by competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999:313-317.
6. Vernacchio, L.; Madico, G.; Verastegui, M.; et al. Neonatal tetanus in Peru: Risk assessment with modified enzyme-linked immunosorbent assay and toxoid skin test. *Am J Public Health*. 1993:1754-1756.
7. Martínez, J.C.; Ochoa, R.; Cruces, A.; Fajardo, E.M.; Alvarez, E.; Ferriol, X.; et al. Quantitation of Diphtheria Antitoxin in Human Serum. *Biotecnología Aplicada*. 2000:183-186.
8. Kusters, K.; Riffelmann, M.; Dohrn, B.; et al. Comparison of five commercial enzyme-linked-immunosorbent assays for detection of antibodies to Bordetella pertussis . *Clin Diagn Lab Immunol* . 2000:422-426.

9. Aybay, C.; Karakup, R.; Gškhhan, A. Development of a Diagnostic and Screening Elisa System for Measuring Tetanus Antitoxoid Levels. *Turk J Med Sci.* 2003:289-294.
 10. Xie, Z.M.; Yu, L.; Fang, L.S. Preparation and Characteristic of Dextran-BSA Antibody and Establishment of its Elisa immunoassay. *J Immunoassay Immunochem.* 2015:597-612.
 11. Hashizume, T.; Kuwahara, N.S.; Tomita, N.; Ochiai, T.K. Establishment of a Convenient Sandwich-ELISA for Direct Quantification of Glucosyltransferase-I: Application for Dual Diagnosis of Dental Caries. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2014:89-93.
 12. Hamada, S.; Michalek, S.M.; Torii, M.; Morisaki, I.; McGhee, J.R. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification of antibodies to *Streptococcus mutans* surface antigens. *Mol Immunol.* 1983:453-464.
 13. Wang, X.; Xiong, Y.L. Oxidative polyaldehyde production: a novel approach to the conjugation of dextran with soy peptides for improved emulsifying properties. *J Food Sci Technol.* 2016:3215-3224.
 14. Pino, Y.; Valmaseda, T.; Medina, Y.; Cedré, B.; Año, G.; García, H.M.; Pérez, J.L.; et al. Validación de un ensayo ELISA para la determinación de anticuerpos anti LPS de *Vibrio Cholerae*. *VacciMonitor.* 2003:15-20
 15. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970:680-685.
 16. Porstmann, T.; Kiessig, S.T. Enzyme immunoassay techniques : An overview. *Journal of Immunological Methods.* 1992:5-21.
 17. Gusakov, A.V.; Kondratyeva, E.G.; Sinitsyn, A.P. Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities. *Intern J Analyt Chem.* 2011:28-31.
-