

Expresión de anticuerpos de cadena sencilla (ScFv) contra *Helicobacter pylori* en la levadura *Pichia pastoris*

Myrna D. Alonso-Ochoa, Oscar Zavala-Tapia, César Pedroza-Roldán

Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua, México

RESUMEN

Introducción. *Helicobacter pylori* es uno de los agentes causales más importantes de enfermedades gástricas alrededor del mundo, la detección oportuna de la bacteria evitaría el desarrollo de gastritis y en algunos casos cáncer gástrico. El uso de anticuerpos específicos contra la bacteria permite la detección de ésta en la población microbiana de muestras; desafortunadamente la inducción de estos anticuerpos en vectores bacterianos reduce la eficiencia de la expresión. La levadura metanotrófica *Pichia pastoris* permite la expresión de grandes cantidades de proteína recombinante con alta calidad, este sistema puede ser utilizado para la expresión de fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla específicos a *H. pylori* para el desarrollo de inmunodiagnósticos.

Material y métodos. Identificación de monoclonales reactivos contra *H. pylori* cepas ATCC 49396, N2 y J99 a partir de una biblioteca ScFv, caracterización de las clonas seleccionadas y subclonación del gen que codifica para dichos fragmentos de anticuerpo en un vector de expresión de la levadura *Pichia pastoris*. Inducción y cuantificación de la expresión de anticuerpo.

Resultados y discusión. De 96 clonas posibles se seleccionaron 10 con la mejor reactividad y especificidad contra *H. pylori*, de éstas se seleccionó la clona 9D para aislar el ScFv y clonarlo en el vector de expresión de la levadura. Los ensayos de cuantificación de expresión mostraron altos rendimientos lográndose a obtener

50 µg/ml de proteína recombinante a las 72 horas de inducción.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, ScFv, *Pichia pastoris*.

SUMMARY

Expression of single chain antibody fragments (ScFv) against *Helicobacter pylori* in the yeast *Pichia pastoris*

Introduction. *Helicobacter pylori* is one of the most important causal agents of gastric diseases around the world, the opportune detection of the bacterium would avoid the development of gastritis and in some cases gastric cancer. The use of specific antibodies against *H. pylori* allows the detection of this pathogen in the microbial population of samples; unfortunately the expression of antibodies in some bacterial vectors reduces the efficient expression of high amount of functional protein. The yeast *Pichia pastoris* allows the expression of great amounts of recombinant protein with high quality; this system can be used for the expression of single chain antibodies against *H. pylori* for the development of immunodiagnosics.

Material and methods. Identification of reactive clones against *H. pylori* strains ATCC 49396, N2 and J99 isolated from a ScFv library, characterization of selected clones and isolation of the ScFv gene coding for the fragment of antibody, and construction of the ScFv in the expression vector

Solicitud de sobretiros: César Pedroza-Roldán. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas (Nueva Sede), Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70228, C.P. 04510, México, D. F. E-mail: cpedroza46@gmail.com

Recibido: el 18 de junio de 2007. **Aceptado para publicación:** el 2 de octubre de 2007.

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb071835.pdf>

Pichia pastoris. Induction and quantification of expression of the antibody.

Results and discussion. Ninety six clones were isolated and only 10 clones with the best reactivity and specificity against *H. pylori* were selected. From these 10 clones we isolate the ScFv from the clone 9D to express its ScFv in the yeast expression vector. The quantification tests showed high levels of protein expression (50 µg/ml) of the recombinant protein at the 72 hours of induction.

Key words: *Helicobacter pylori*, ScFv, *Pichia pastoris*.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es uno de los principales patógenos causantes de enfermedades gástricas alrededor del mundo (1). Esta bacteria gram-negativa tiene la capacidad de colonizar la mucosa gástrica y está relacionada con la generación de gastritis y, en los casos más graves, su presencia en humanos se asocia al desarrollo de úlceras gástricas en aproximadamente el 10% de los casos y carcinoma gástrico en el 1% de los individuos infectados (2). Se estima que el 50% de la población mundial presenta esta infección (3), la cual aparece con mayor frecuencia en los países en desarrollo, con una prevalencia que llega a ser del 90% en comparación al 20% en países desarrollados (4-6). El diagnóstico temprano ha permitido que el uso de terapias disminuya o erradique al microorganismo, disminuyendo la posibilidad de generar las complicaciones previamente mencionadas. Desafortunadamente algunos de estos métodos diagnósticos son invasivos y algunos de ellos sólo son utilizados en países en desarrollo (7).

La tecnología de despliegue de anticuerpos en la superficie de fagos filamentosos ha permitido la selección de anticuerpos monoclonales con alto grado de especificidad y sensibilidad para la detección de algún antígeno o patógeno en particular (8,9). Esta tecnología se basa en la expresión de anticuerpos monoclonales en la superficie de

dichos fagos (fusionado a las proteínas de cubierta pIII o pVIII) los cuales pueden ser seleccionados contra un antígeno de interés (10,11). La ventaja de utilizar esta técnica radica en que es un sistema de selección eficaz y económico; que además permite que los anticuerpos seleccionados con interés terapéutico o de inmunodiagnóstico sean elaborados en otros modelos para mejorar los rendimientos de obtención del anticuerpo.

La levadura *Pichia pastoris* ha sido uno de los microorganismos de importancia que ha permitido la expresión de proteínas heterólogas (12). Este modelo de expresión permite la obtención de miligramos y hasta gramos de proteína recombinante funcionalmente activa, la cual es utilizada tanto en la investigación básica como para administración terapéutica (13). Esta levadura tiene la capacidad de desarrollarse en metanol como única fuente de carbono (14). Por otro lado, algunos vectores de expresión de proteínas permiten la introducción de genes foráneos bajo un promotor de metanol, el cual puede ser inducido mediante la adición de éste al medio. En este trabajo nosotros presentamos la subclonación y expresión de anticuerpos de cadena sencilla (ScFv) en la levadura *Pichia pastoris* los cuales pudieran ser de utilidad para la investigación biomédica básica y/o el desarrollo de un nuevo inmunodiagnóstico y/o inmunoterapias contra *H. pylori*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de clonas

Se utilizó una biblioteca de fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla transformada en *E. coli* (18) para seleccionar 96 clonas al azar, se sembraron en una microplaca de ELISA con medio Super Broth (SB) y carbenicilina 50 µg/ml (CB); esta placa funcionó como preinóculo incubándola toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se utilizó el preinóculo para subcultivar las clonas en otra microplaca con 150 µl de SB + CB e inducir la expresión de los anticuerpos mediante la adición de 5 µl de IPTG 0.5 M, los cultivos se incubaron por

Expresión de fragmentos de anticuerpos

22 horas y los sobrenadantes fueron preservados a -20°C para ser utilizados posteriormente en ensayos inmunoenzimáticos de selección de clonas por reactividad contra *H. pylori*.

Ensayos inmunoenzimáticos

Para la selección de clonas reactivas contra *H. pylori* y para las pruebas de especificidad de los anticuerpos, inducidos previamente, se realizaron ensayos inmunoenzimáticos de la siguiente manera: se sensibilizaron microplacas (Costar, USA) con dos microgramos del antígeno (*H. pylori* cepas ATCC 49396, N2 y J99; *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp, *Lactobacillus* sp, *Salmonella* sp) en buffer de carbonatos toda la noche a 4°C . Se realizaron 2 lavados con PBS/tween 0.05% y la placa fue bloqueada con PBS/BSA 3% por una hora a temperatura ambiente. De la expresión de las clonas se adicionaron $100\ \mu\text{l}$ del sobrenadante a la microplaca y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 2 lavados con PBS/tween 0.05% y se adicionó el anticuerpo HRP anti HA (Roche Diagnostics, USA) 1:1000 en PBS/BSA 1% por 1 hora. Se realizaron tres lavados finales y se reveló la reacción con ABTS. Se leyó la absorbancia a 405 nm.

Extracción de plásmido, amplificación del ScFv

A las clonas seleccionadas previamente se les extrajo el ADN plasmídico mediante lisis alcalina como se ha descrito previamente (15). El plásmido fue utilizado para amplificar el inserto por PCR utilizando los oligonucleótidos g-back y ompseq descritos previamente (16). En corto, en un tubo fueron mezclados $5\ \mu\text{l}$ del ADN plasmídico purificado, $5\ \mu\text{l}$ de buffer de PCR 10 x, $5\ \mu\text{l}$ de dNTP's, 5 pmol de cada uno de los oligos y $1\ \mu\text{l}$ de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, USA). Las condiciones de amplificación fueron desnaturalización a 94°C por 5 min, amplificación 30 ciclos: 94°C por 15 sec, 56°C por 30 sec, 72°C por 30 sec; se realizó una extensión de 10 min a 72°C .

Clonación y transformación en el vector pPiczaA

Para la clonación direccional del inserto se utilizaron los oligonucleótidos F5-5'-GAATTCGGCCTGACTCAGCCG-3' y R3-5'-TCCGGCCGGTCCGCCGGCG-3'. Estos oligos introducen los sitios de restricción *Eco* RI y *Not* I necesarios para la clonación en el vector de levadura pPiczaA (Invitrogen, USA). La reacción se realizó de la misma manera previamente descrita excepto por las condiciones del termociclador que fueron: 94°C por 5 min, 30 ciclos de amplificación a 94°C 30 sec, 57°C 30 sec y 72°C 90 sec, una extensión final a 72°C por 10 min. Los productos fueron separados en un gel de agarosa al 1.2%. Se utilizó el Kit TOPO® XL PCR Cloning (Invitrogen, USA) para realizar la clonación del inserto amplificado siguiendo las instrucciones del fabricante; para la obtención del plásmido se transformaron con esta construcción células competentes TOP 10F' por lisis alcalina. Estas construcciones y el vector de expresión en levaduras fueron utilizados para realizar la digestión con las enzimas *Eco* RI y *Not* I como sigue: Buffer O+ (10 x) $5\ \mu\text{l}$, BSA (100 x) $1\ \mu\text{l}$, *Not* I (10 U/ μl) $1\ \mu\text{l}$, *Eco* RI (10 U/ μl) $1\ \mu\text{l}$ y $1\ \mu\text{g}$ de inserto o vector pPiczaA, esta reacción fue llevada a un volumen final de $50\ \mu\text{l}$ y se incubó a 37°C toda la noche. Los productos de la digestión fueron separados en un gel de agarosa al 1.2 % y purificados con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA). Los productos de la digestión fueron utilizados para realizar la ligación de inserto con el vector de expresión pPicza como sigue: $5\ \mu\text{l}$ de buffer T4 (10 x), $5\ \mu\text{l}$ de inserto ScFv ($50\ \text{ng}/\mu\text{l}$), $5\ \mu\text{l}$ de vector pPicza ($100\ \text{ng}/\mu\text{l}$) y llevado a un volumen final de $50\ \mu\text{l}$ con H_2O . La reacción se incubó toda la noche a temperatura ambiente y se inactivó por 10 min a 65°C . Se transformaron células TOP 10 F' con las construcciones para realizar la extracción de plásmido por lisis alcalina. El plásmido purificado fue linearizado con la enzima *Sac* I previo a la transformación de las células X-33 de *Pichia pastoris* como sigue: $5\ \mu\text{l}$

Alonso-Ochoa *et al.*

de buffer Sac I (10 x), 10 μ l de la construcción en pPicza (1 μ g), 3 μ l de la enzimas Sac I (3 U/ μ l) y llevado a un volumen final de 50 μ l con H₂O. La reacción se incubó toda la noche a temperatura ambiente. El producto de la digestión fue separado y purificado de un gel de agarosa al 1%. Se realizó la transformación de las células X-33 de *Pichia pastoris* utilizando el kit *Pichia* Easycomp (Invitrogen, USA) conforme al método marcado por el proveedor. Las células transformadas fueron sembradas en placas con agar YPD y zeocina (25 μ g/ml) e incubadas a 30°C hasta la aparición de colonias. Se seleccionaron colonias para la extracción de ADN cromosómico para realizar la confirmación de la presencia del inserto por PCR como sigue: en un tubo de 50 ml se agregaron 10 ml de medio YPD y se inoculó una colonia de la levadura transformada. Se dejó por 12 hrs. a 30°C con agitación constante de 250 rpm, se centrifugaron los cultivos y el paquete celular fue resuspendido con 1 ml de solución "grinding" compuesta de 290 μ l de H₂O, 100 μ l de EDTA 0.5M, Tris 0.1 M pH 8, 50 μ l de SDS 10% y proteinasa K (20 mg/ml), se agregaron 20 μ l de NaCl 5 M y un volumen igual de fenol equilibrado, se centrifugó por 5 min a 14 000 rpm, al sobrenadante se le agregó un volumen igual de cloroformo y se centrifugó por 5 min a 14 000 rpm, se realizaron lavados consecutivos con etanol absoluto y al 70%. El paquete fue resuspendido en 100 μ l de agua bidestilada estéril. Las muestras se almacenaron a -20°C. La confirmación del inserto fue realizada por PCR utilizando los oligonucleótidos F5 y F3 descritos anteriormente.

Inducción del anticuerpo, purificación y cuantificación

Se realizó un preinóculo en un matraz con 100 ml de medio BMGY (Buffer Glicerol-complex Medium), se inoculó una colonia y se dejó toda la noche a 30°C en agitación a 250 rpm, se centrifugó el cultivo y el paquete se resuspendió en 100 ml de medio BMMY (Buffer Metanol-complex Medium) y se incubó toda la noche a 30°C en

agitación a 250 rpm. Se tomaron muestras de 10 ml cada 24 horas hasta las 120 horas para realizar la purificación del anticuerpo mediante el uso de Ni-NTA agarosa por afinidad con poli-histidinas. Los sobrenadantes fueron utilizados para realizar separaciones en geles de SDS-PAGE al 10% y cuantificación por el método de Bradford como se ha descrito anteriormente (17).

RESULTADOS

Selección de clonas

Previamente se realizó la construcción de una biblioteca de fragmentos de anticuerpos de gallina de cadena sencilla (ScFv) contra *Helicobacter pylori* (18). Esta biblioteca fue utilizada para la selección de clonas que expresan anticuerpos específicos contra *H. pylori* realizando la selección de 96 clonas al azar y realizando pruebas inmunoenzimáticas o ELISA contra las cepas de *H. pylori* ATCC 49396, J99 y N2. De estas pruebas se seleccionaron 3 clonas que reconocen a la cepa ATCC 49396 (8H, 2D, 9D), para la cepa N2 se seleccionaron 5 clonas (10G, 4B, 2D, 3C, 6C) y para la cepa J99 se seleccionaron 3 clonas (10G, 6B, 7H). Estas 11 clonas se utilizaron para realizar inmunoensayos de especificidad, en la prueba se incluyeron cepas de *E. coli*, *Staphylococcus* sp, *Lactobacillus* sp y *Salmonella* sp. Posteriormente a la realización de este inmunoensayo, se seleccionaron las clonas 9D y 3H de ATCC 49396, 10G de N2 y 1G de J99 (**Cuadro 1**).

Construcción del ScFv en el vector de expresión de levadura

Con base en las pruebas anteriores, se seleccionó la clona 9D para su subclonación en el vector pPiczaA y expresión en levadura, ya que esta clona presentó el mayor reconocimiento sobre *H. pylori* y una de las mejores especificidades (**Cuadro 1**). El inserto ScFv de esta clona fue amplificado por PCR, el producto fue ligado al vector XL y se transformaron células TOP 10 F', se extrajo el plásmido de estas células y se

Expresión de fragmentos de anticuerpos

Cuadro 1

Cepa de bacteria	Identificación de clona*			
	9D ATCC	8H ATCC	10G N2	1G J99
HP ATCC 49396	0.505	0.151	0.168	0.148
HP N2	0.43	0.291	0.265	0.258
HP J99	0.41	0.332	0.28	0.297
<i>E. coli</i>	0.166	0.253	0.233	0.146
<i>Staphylococcus</i> sp	0.169	0.12	0.127	0.144
<i>Lactobacillus</i> sp	0.142	0.155	0.175	0.135
<i>Salmonella</i> sp	0.187	1.204	0.21	0.179

*Los valores se presentan en densidades ópticas a 405 nm

utilizó para digerir con las enzimas *Eco* RI y *Not* I, el inserto liberado de aproximadamente 800 pb correspondiente al ScFv fue purificado y ligado al vector de expresión en levadura pPiczaA. La construcción (9D-pPiczaA) fue transformada en células TOP 10 F' y sembradas en placas con zeocina. Se escogieron al azar 3 clonas para realizar la extracción del plásmido y confirmar la presencia del ScFv en las bacterias transformadas, las 3 clonas presentaron el inserto de tamaño esperado. El plásmido de las clonas fue utilizado para digerir con la enzima *Sac* I, esto nos permitió la transformación de la cepa de *Pichia pastoris* X-33 con la construcción como se describe en materiales y métodos. Las células transformadas con la construcción fueron sembradas en placas de agar YPD y zeocina por 3 días. Se seleccionaron 3 clonas al azar (9D-A1, 9D-A2 y 9D-A3) y se les realizó extracción de ADN cromosómico, éste fue utilizado para realizar una confirmación por PCR de la construcción. Las 3 clonas seleccionadas fueron positivas para el tamaño de inserto esperado.

Expresión del anticuerpo y cuantificación

Una de las clonas de levadura seleccionadas con la construcción 9D-pPiczaA fue utilizada para realizar la inducción del anticuerpo. Para esto se realizó un preinóculo en medio rico en

glicerol para mantener reprimida la expresión. Este preinóculo fue colocado al día siguiente en 100 ml de medio con 5% de metanol para inducir la expresión del anticuerpo. Se tomaron muestras cada 24 horas hasta las 120 horas totales del experimento. Cada 24 horas se tomaron 10 ml de medio, éste fue utilizado para realizar purificación por afinidad con Ni-NTA agarosa. Las muestras fueron analizadas en geles de SDS-PAGE. La expresión del anticuerpo purificado por este sistema muestra que inicia a las 48 horas después de adicionar el inóculo al medio con metanol, esta expresión aumenta a las 72 horas y culmina con una intensa banda de proteína a las 120 horas; por otro lado un lisado de las levaduras muestra como la proteína se acumula en el interior de la célula. Mientras se realizaba el proceso de purificación del anticuerpo, encontramos que durante los lavados existía una pérdida considerable de proteína por lo que decidimos utilizar el sistema de diálisis y observar diferencias. Con este método encontramos que a las 24 horas de expresión apareció una banda importante de proteína lo que previamente no encontramos con el sistema de purificación por afinidad con Ni⁺, desafortunadamente encontramos que existían proteínas no relacionadas con nuestro anticuerpo por lo que el sistema de diálisis no fue viable en este caso en particular.

Las 3 clonas previamente confirmadas de

levadura (9D-A1, 9D-A2 y 9D-A3) se utilizaron para realizar una expresión del anticuerpo y ensayos de cuantificación por el método de Bradford (17). De manera similar a los parámetros anteriores, se tomaron 10 ml de medio cada 24 horas hasta las 120 horas, para este experimento se purificó por afinidad con Ni-NTA agarosa. Las 3 clonas se comportaron de manera similar con rendimientos de proteína de hasta 50 $\mu\text{g/ml}$. Se puede observar que a las 72 horas se alcanzó un máximo en la concentración detectable de la proteína expresada (Figura 1).

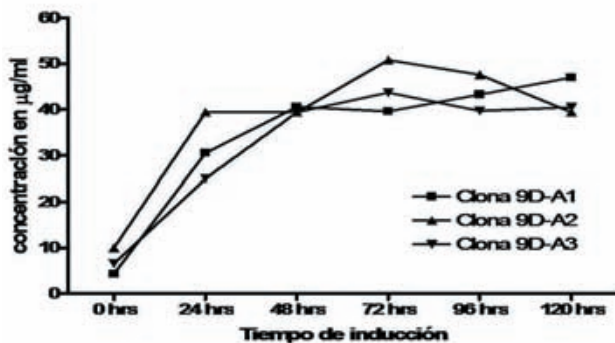


Figura 1

DISCUSIÓN

En el presente trabajo presentamos la selección de un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla (ScFv) el cual fue clonado y expresado en un vector de expresión de levaduras. Debido a que los rendimientos en la producción de proteínas de interés se ven reducidos en sistemas de expresión basados en células procariontas (19), el sistema de expresión en levaduras permite una mayor producción de proteína funcional para posteriores análisis o ensayos de importancia (20,21). La clona 9D fue seleccionada debido a su alta reactividad contra las 3 cepas de *H. pylori* además de presentar una especificidad considerable. Estas características son importantes ya que para utilizar un anticuerpo monoclonal para inmunodiagnóstico se requiere de una alta sensibilidad y especificidad para la detección de la bacteria (22). Una detección oportuna de la bacteria puede marcar la diferencia en el

desarrollo de úlceras gástricas y cáncer (23-25) por lo que el mejoramiento de métodos de detección es de vital importancia en el área de salud pública de los países en desarrollo (26). La producción de anticuerpos monoclonales para este propósito ha sido importante para la detección de otros patógenos o enfermedades (27-30), pero los altos costos de producción de hibridomas lo hace una tarea difícil. Los sistemas de expresión de anticuerpos en levadura disminuyen considerablemente los costos de manejo y producción, además de mejorar los rendimientos de proteína funcional. Las concentraciones de anticuerpo inducido en este trabajo fueron considerables llegando a obtener rendimientos de 40 microgramos por ml de medio. Por otro lado este sistema puede ser escalado con mayor facilidad a plantas piloto para la producción masiva del anticuerpo. Yang y colaboradores (31) demostraron que optimizando las condiciones de expresión se pueden obtener rendimientos de hasta 302 microgramos por mililitro al modificar algunas condiciones tales como el tipo de medio, pH y concentración de sales que afectan la expresión del anticuerpo (32), lo que indica que es un sistema que puede ser mejorado.

REFERENCIAS

1. Hsu PI, Lai KH, Hsu PN, Lo GH, Yu HC, Chen WC, *et al.* *Helicobacter pylori* Infection and the Risk of Gastric Malignancy. *Am J Gastroenterol* 2007; 4:725-30.
2. Beswick EJ, Suarez G, Reyes VE. *Helicobacter pylori* and host interactions that influence pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2006; 35:5599-605.
3. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 2006; 3:449-90.
4. Ahuja V, Sharma MP. High recurrence rate of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. *Gastroenterology* 2002; 123:653-4.
5. Alborzi A, Soltani J, Pourabbas B, Oboodi B, Haghighat M, Hayati M, *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children (south of Iran). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 54:259-61.
6. Ashbolt NJ. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology* 2004; 198:229-38.
7. Ahuja V, Sharma MP. High recurrence rate of *Helicobacter pylori* infection in developing countries.

Expresión de fragmentos de anticuerpos

- Gastroenterology 2002; 123:653-4.
8. **Hoogenboom HR.** Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* 2005;23: 1105-16.
 9. **Hoogenboom HR.** Overview of antibody phage-display technology and its applications. *Methods Mol Biol* 2002; 178:1-37.
 10. **Holzem A, Nahring JM, Fischer R.** Rapid identification of a tobacco mosaic virus epitope by using a coat protein gene-fragment-pVIII fusion library. *J Gen Virol* 2001; 82(Pt 1):9-15.
 11. **Mersmann M, Schmidt A, Tesar M, Schoneberg A, Welschof M, Kipriyanov S, et al.** Monitoring of scFv selected by phage display using detection of scFv-pIII fusion proteins in a microtiter scale assay. *J Immunol Methods* 1998; 220:51-8.
 12. **Austin AJ, Jones CE, Heeke GV.** Production of human tissue factor using the *Pichia pastoris* expression system. *Protein Expr Purif* 1998; 13:136-42.
 13. **Feng MQ, Cai QS, Song DX, Dong JB, Zhou P.** High yield and secretion of recombinant human apolipoprotein AI in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2006; 46:337-42.
 14. **Tolner B, Smith L, Begent RH, Chester KA.** Production of recombinant protein in *Pichia pastoris* by fermentation. *Nat Protoc* 2006; 1:1006-21.
 15. **Birnboim HC, Doly J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7:1513-23.
 16. **Andris-Widhopf J, Rader C, Steinberger P, Fuller R, Barbas CF, III.** Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. *J Immunol Methods* 2000; 242:159-81.
 17. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
 18. **Pedroza-Roldán C., Zavala-Tapia Ó y Álvarez-Araujo L.** Generación y caracterización de anticuerpos de gallina de cadena sencilla (ScFv) contra antígenos de membrana de *Helicobacter pylori* cepas J99 y N2. *Memorias del Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Genética, A. C. Ixtapan de la Sal, Edo de México; 2004.* p. 10.
 19. **Rogelj B, Strukelj B, Bosch D, Jongsma MA.** Expression, purification, and characterization of equistatin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2000; 19:329-34.
 20. **Austin AJ, Jones CE, Heeke GV.** Production of human tissue factor using the *Pichia pastoris* expression system. *Protein Expr Purif* 1998; 13:136-42.
 21. **Ciaccio C, Gambacurta A, De SG, Spagnolo D, Sakarikou C, Petrella G, et al.** rhEPO (recombinant human eosinophil peroxidase): expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization. *Biochem J* 2006; 395:295-301.
 22. **Dewan R, Sachdev GK.** Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in primary and tertiary care centers. *Indian J Gastroenterol* 2000; 19 Suppl 1:S11-S14.
 23. **Ahmeed M.** *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: is there a role for eradication therapy? *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2:344-5.
 24. **Ando T, Goto Y, Maeda O, Watanabe O, Ishiguro K, Goto H.** Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12:181-6.
 25. **Arora S, Czinn SJ.** Vaccination as a method of preventing *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14:1890-1.
 26. **Ahuja V, Sharma MP.** High recurrence rate of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. *Gastroenterology* 2002; 123:653-4.
 27. **Asfeldt AM, Lochen ML, Straume B, Steigen SE, Florholmen J, Goll R, et al.** Accuracy of a monoclonal antibody-based stool antigen test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39:1073-7.
 28. **Chauhan SC, Jain M, Moore ED, Wittel UA, Li J, Gwilt PR, et al.** Pharmacokinetics and biodistribution of 177Lu-labeled multivalent single-chain Fv construct of the pancarcinoma monoclonal antibody CC49. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32:264-73.
 29. **Chen DX, He A, Zhan XM, Yu MH, Lei ZG, Meng JX, et al.** *Schistosoma japonicum*: construction of phage display antibody library and its application in the immunodiagnosis of infection. *Chin Med J* 2004; 117:1697-703.
 30. **Crone J, Symonds E, Campbell F, Butler R.** Evaluation of a monoclonal antibody-based test for detection of *Helicobacter pylori*-specific antigen in stool samples from mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11:799-800.
 31. **Yang Y, Zhang M, Yuan L, Zhang XH, Dai HP.** Expression of single chain fragment variable P1D3 antibody against shrimp white spot syndrome virus in *Pichia pastoris*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 2006; 22:973-8.
 32. **Shi X, Karkut T, Chamankhah M, ting-Mees M, Hemmingsen SM, Hegedus D.** Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2003; 28:321-30.