



Universidad de Barcelona

Facultad de Farmacia

Departamento de Físicoquímica

**APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE FLUORESCENCIA Y
MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA AL ESTUDIO DE
LA INTERACCIÓN LÍPIDO-PROTEÍNA EN MODELOS
DE MEMBRANA**

Sandra Merino Montero

Barcelona, 2005

DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

PROGRAMA DE DOCTORADO: MEDICAMENTOS, ALIMENTACIÓN Y SALUD

TÍTULO DE LA TESIS:

**APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE FLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA DE
FUERZA ATÓMICA AL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN LÍPIDO-
PROTEÍNA EN MODELOS DE MEMBRANA**

NOMBRE DE LOS DIRECTORES: Dra. M^a TERESA MONTERO BARRIENTOS
Dr. JORDI HERNÁNDEZ BORRELL



Universidad de Barcelona

Facultad de Farmacia

Departamento de Físicoquímica

Memoria que presenta la Licenciada en Farmacia **Sandra Merino Montero** para optar al grado de Doctora en Farmacia por el Departamento de Físicoquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

El presente trabajo ha sido realizado bajo la dirección de la **Dra. M^a Teresa Montero Barrientos** y del **Dr. Jordi Hernández Borrell**, Profesores Titulares del Departamento de Físicoquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, en los laboratorios de dicho Departamento.

V^oB^o de los Directores de la Tesis

Dra. M^a Teresa Montero Barrientos

Dr. Jordi Hernández Borrell

La Doctoranda

Sandra Merino Montero

Barcelona, 2005

A mi madre y a la memoria de mi padre

AGRADECIMIENTOS

Una vez finalizado este trabajo, me gustaría expresar mi agradecimiento a todas las personas que de una manera u otra han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral. Gracias a todos, y especialmente:

A la Dra. M^a Teresa Montero Barrientos y al Dr. Jordi Hernández Borrell por haberme acogido en su grupo de investigación y permitirme realizar la presente Tesis Doctoral. Su apoyo, así como su crítica, siempre objetiva, han permitido superar los obstáculos encontrados y llevar a cabo este trabajo con el mayor rigor científico. Sus enseñanzas marcarán, sin duda alguna, mi futuro profesional y personal.

A la Dra. M^a Asunción Alsina Esteller por permitirme la integración en el departamento de Fisicoquímica y hacer posible las condiciones necesarias para la realización de este trabajo.

Al Dr. Miquel Viñas Ciordia por permitirme la utilización del Laboratorio de Microbiología del Campus de Bellvitge, así como por el apoyo recibido de su parte.

Al Dr. Juan Tomás Magaña y la Dra. Susana Merino Montero por permitirme la utilización de las instalaciones del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología, sin las cuales habría sido realmente difícil la realización de este trabajo.

Al Dr. Fausto Sanz Carrasco por facilitarme el uso del microscopio de fuerza atómica situado en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona, así como las instalaciones del Parque Científico de Barcelona. Sus consejos y el apoyo recibido han sido fundamentales para el desarrollo de esta Tesis. Gracias asimismo al Dr. Pau Gorostiza, a Ismael Díez y al Dr. Albert Verdaguer por su inestimable ayuda, sin la cual habría sido imposible la realización del apartado de AFM.

Al Dr. José Luis Vázquez, mi “maestro”, por su impulso inicial y por su apoyo incondicional recibido desde el primer día. Por sus enseñanzas y críticas, sin las cuales habría sido muy difícil si no imposible la realización de este trabajo.

A la Dra. Neus Ruiz, compañera y amiga, por su inestimable ayuda en referencia a las porinas de *Serratia marcescens*, así como por su gran optimismo, buen humor y ayuda brindada desde el primer día. Tantas horas de trabajo finalmente dieron sus frutos.

Gracias también a todos los compañeros y amigos que me han apoyado durante la realización de la Tesis tanto en el Departamento de Microbiología del Campus de Bellvitge, especialmente a Blanca con la que inicié esta andadura y a los compañeros del C.B.E.N. Quisiera hacer una mención especial a María y a Víctor del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, con quienes he compartido grandes momentos durante estos años, y que me han recordado que las alegrías y las penas, compartidas se pasan mejor.

Quisiera realizar una mención especial y destacada a todas aquellas personas que han estado a mi lado todo este tiempo, apoyándome y animándome a seguir adelante y a luchar por lo que yo creo. Por supuesto me estoy refiriendo a mi familia, a quienes, sencillamente, les debo todo, especialmente a mi madre, a mi hermana y a Toni, sin olvidar a mi padre, quién siempre quiso que hiciera una Tesis Doctoral. Aquí está.

Finalmente, quisiera dar las gracias a Òscar por haber estado siempre ahí, en los buenos y malos momentos, por soportar tanto mis momentos de ánimo como mis desalientos, sin abandonar en ningún momento.

ÍNDICE

| | |
|--|-------------|
| Índice | i |
| Abreviaturas | viii |
| 1. PRESENTACIÓN | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 7 |
| 2.1. La membrana celular | 9 |
| 2.1.1. Composición | 10 |
| 2.1.1.i. Fosfolípidos | 11 |
| 2.1.1.ii. Esteroles | 13 |
| 2.1.1.iii. Glucolípidos | 14 |
| 2.1.1.iv. Lipopolisacárido | 14 |
| 2.1.1.v. Proteínas | 15 |
| 2.1.2. Estructura | 16 |
| 2.1.2.i. Fluidez de la bicapa | 16 |
| 2.1.2.ii. Propiedades dinámicas | 18 |
| 2.1.2.iii. Ordenación | 19 |
| 2.1.2.iv. Membranas eucariotas y procariontas | 21 |
| 2.2. Proteínas de membrana | 23 |
| 2.2.1. Citocromo c | 25 |
| 2.2.2. Melitina | 27 |
| 2.2.3. Porina Omp1 de <i>Serratia marcescens</i> | 29 |
| 2.2.4. Lactosa permeasa de <i>Escherichia coli</i> | 31 |
| 2.3. Reconstitución de las proteínas de membrana | 36 |
| 2.3.1. Liposomas | 36 |
| 2.3.2. Surfactantes | 39 |
| 2.3.3. Micelas | 40 |
| 2.3.3.i. Concentración micelar crítica | 42 |
| 2.3.4. Micelas mixtas | 43 |
| 2.3.4.i. Micelas formadas por surfactante y fosfolípido | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.4.ii. Micelas formadas por surfactante y proteína..... | 46 |
| 2.3.5. Proteoliposomas | 47 |
| 2.3.5.i. Formación | 47 |
| 2.3.5.ii. Estructura..... | 49 |
| 2.3.5.iii. Aplicaciones | 50 |
| 2.3.6. Bicapas planas..... | 51 |
| 2.3.6.i. Formación | 52 |
| 2.3.6.ii. Aplicaciones | 54 |
| 2.3.7. Cristalización 2D de proteínas de membrana | 54 |
| 2.3.7.i. Formación de cristales 2D | 55 |
| 2.3.7.ii. Cristalización con lípidos funcionalizados | 58 |
| 2.3.7.iii. Parámetros de cristalización | 58 |
| 2.3.7.iv. Tipos de cristales 2D..... | 60 |
| | |
| 2.4. Microscopía de fuerza atómica | 62 |
| 2.4.1. Microscopio de fuerza atómica..... | 63 |
| 2.4.2. Aplicaciones del microscopio de fuerza atómica..... | 64 |
| 2.4.2.i. Visualización de moléculas aisladas..... | 65 |
| 2.4.2.ii. Topografía de superficie | 65 |
| 2.4.2.iii. Estudios dinámicos en muestras biológicas..... | 66 |
| 2.4.2.iv. Medidas físicas moleculares | 66 |
| 2.4.2.v. Futuras aplicaciones..... | 67 |
| | |
| 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 69 |
| 3.1. Hipótesis de trabajo..... | 71 |
| 3.2. Objetivos | 72 |
| | |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS | 73 |
| 4.1. Productos..... | 75 |
| 4.1.1. Cultivo celular..... | 75 |
| 4.1.2. Obtención de proteínas | 75 |
| 4.1.3. Extracción de surfactantes | 75 |
| 4.1.4. Lípidos | 75 |

| | |
|---|----|
| 4.1.5. Sondas fluorescentes | 76 |
| 4.1.6. Microscopía de fuerza atómica | 76 |
| 4.1.6.i. Soportes para muestras | 76 |
| 4.1.6.ii. Palancas y puntas | 76 |
| 4.1.7. Material de uso frecuente | 78 |
| 4.1.7.i. Reactivos | 79 |
| 4.1.7.ii. Otros productos | 79 |
| 4.2. Medios de cultivo | 80 |
| 4.2.1. Caldo de triptona y soja | 80 |
| 4.2.2. Caldo de Luria Bertani modificado por Miller | 80 |
| 4.2.3. Agar de Luria Bertani modificado por Miller | 81 |
| 4.2.4. Medio de conservación | 81 |
| 4.2.4.i. Cepa codificante para Omp1 de <i>Serratia marcescens</i> | 81 |
| 4.2.4.ii. Cepas codificantes para lactosa permeasa de <i>Escherichia coli</i> | 82 |
| 4.3. Soluciones reguladoras de pH | 83 |
| 4.3.1. Soluciones generales | 83 |
| 4.3.2. Purificación de Omp1 de <i>Serratia marcescens</i> | 83 |
| 4.3.3. Purificación de lactosa permeasa de <i>Escherichia coli</i> | 84 |
| 4.3.3.i. Purificación en columna de avidina | 84 |
| 4.3.3.ii. Purificación en columna de níquel | 85 |
| 4.3.4. Soluciones para diálisis | 86 |
| 4.3.5. Soluciones para espectroscopia de absorción y fluorescencia | 86 |
| 4.3.6. Soluciones para microscopía de fuerza atómica | 87 |
| 4.4. Instrumentación y soporte informático | 88 |
| 4.4.1. Instrumentación | 88 |
| 4.4.2. Soporte informático | 89 |
| 4.5. Cepas bacterianas y plásmidos | 90 |
| 4.5.1. Cepas bacterianas | 90 |
| 4.5.2. Plásmidos | 90 |

| | |
|--|-----|
| 4.6. Aislamiento y purificación de Omp1 de <i>Serratia marcescens</i> | 92 |
| 4.6.1. Cultivo celular..... | 92 |
| 4.6.2. Aislamiento de membranas..... | 94 |
| 4.7. Aislamiento y purificación de lactosa permeasa de <i>Escherichia coli</i> | 96 |
| 4.7.1. Cultivo celular..... | 96 |
| 4.7.2. Aislamiento de membranas..... | 97 |
| 4.7.3. Purificación mediante columna de avidina | 98 |
| 4.7.4. Purificación mediante columna de níquel..... | 99 |
| 4.8. Concentración de proteínas..... | 101 |
| 4.9. Cuantificación de proteínas..... | 102 |
| 4.10. Electroforesis en gel de poliacrilamida..... | 103 |
| 4.10.1. Preparación del gel..... | 103 |
| 4.10.2. Soluciones para el gel | 104 |
| 4.10.3. Tinción del gel | 104 |
| 4.11. Formación de liposomas | 107 |
| 4.11.1. Fosfolípidos..... | 107 |
| 4.11.1.i. POPC | 108 |
| 4.11.1.ii. DMPC | 108 |
| 4.11.1.iii. POPE | 109 |
| 4.11.1.iv. POPG | 109 |
| 4.11.1.v. DOGS-NTA-Ni..... | 110 |
| 4.11.1.vi. Extracto lipídico de <i>Escherichia coli</i> | 110 |
| 4.12. Formación de proteoliposomas | 111 |
| 4.12.1. Cuantificación de fosfolípido..... | 111 |
| 4.12.2. Cuantificación de proteínas..... | 112 |
| 4.12.3. Cuantificación de surfactantes | 112 |

| | |
|--|-----|
| 4.13. Estudios de estabilidad..... | 114 |
| 4.13.1. Proceso de sonicación | 114 |
| 4.13.2. Adición de surfactantes..... | 115 |
| 4.13.3. Variaciones del pH de la solución | 115 |
| | |
| 4.14. Métodos espectrofotométricos | 116 |
| | |
| 4.15. Métodos de fluorescencia | 119 |
| 4.15.1. Potencial electrostático de superficie..... | 119 |
| 4.15.2. Anisotropía de fluorescencia..... | 122 |
| 4.15.2.i. Proceso de incorporación de proteínas de membrana..... | 124 |
| 4.15.2.ii. Proceso de cristalización 2D de proteínas de membrana..... | 125 |
| | |
| 4.16. Microscopía de fuerza atómica | 126 |
| 4.16.1. Microscopio de fuerza atómica..... | 126 |
| 4.16.1.i. Palanca y punta | 127 |
| 4.16.1.ii. Celda | 127 |
| 4.16.1.iii. Láser | 128 |
| 4.16.1.iv. Fotodiodo | 128 |
| 4.16.1.v. Piezoeléctrico | 129 |
| 4.16.1.vi. Sistema de retroalimentación..... | 129 |
| 4.16.1.vii. Registro de señal..... | 129 |
| 4.16.2. Modos de funcionamiento..... | 130 |
| 4.16.2.i. Modo de contacto..... | 130 |
| 4.16.2.ii. Modo de contacto intermitente | 131 |
| 4.16.2.iii. Modo de no contacto | 131 |
| 4.16.3. Curvas de fuerza | 132 |
| 4.16.4. Preparación del soporte..... | 133 |
| 4.16.4.i. Mica muscovita..... | 133 |
| 4.16.4.ii. Grafito..... | 134 |
| 4.16.5. Preparación de la muestra | 135 |
| 4.16.5.i. Proteínas de membrana | 135 |
| 4.16.5.ii. Extensión de liposomas | 137 |

| | |
|---|-----|
| 4.16.5.iii. Incorporación de proteínas en tiempo real | 138 |
| 4.16.6. Cristalización 2D de proteínas de membrana | 139 |
| 4.16.6.i. Cristalización 2D de Omp1 de <i>Serratia marcescens</i> | 139 |
| 4.16.6.ii. Cristalización 2D de lactosa permeasa de <i>Escherichia coli</i> . | 140 |
| 4.16.6.iii. Establecimiento de las condiciones de visualización | 141 |
| 5. RESULTADOS | 143 |
| 5.1. Caracterización de las proteínas de membrana | 145 |
| 5.1.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida | 145 |
| 5.1.2. Visualización de proteínas de membrana por AFM | 146 |
| 5.1.2.i. Citocromo c | 147 |
| 5.1.2.ii. Melitina | 149 |
| 5.1.2.iii. Porina Omp1 de <i>Serratia marcescens</i> | 151 |
| 5.1.2.iv. Lactosa permeasa de <i>Escherichia coli</i> | 154 |
| 5.2. Caracterización de las matrices lipídicas | 158 |
| 5.2.1. Estabilidad de los liposomas | 158 |
| 5.2.1.i. Sonicación | 158 |
| 5.2.1.ii. Adición de surfactantes | 159 |
| 5.2.1.iii. Variación del pH de la solución | 161 |
| 5.2.2. Potencial electrostático de superficie de los liposomas | 162 |
| 5.2.3. Estudio por AFM de la extensión de liposomas sobre mica | 163 |
| 5.2.3.i. Formación de una SPB con lípidos zwitteriónicos | 164 |
| 5.2.3.ii. Formación de una SPB con lípidos negativos | 166 |
| 5.2.4. Dominios lipídicos | 169 |
| 5.2.4.i. POPC | 169 |
| 5.2.4.ii. DMPC:POPC (1:1, mol:mol) | 170 |
| 5.2.4.iii. POPE:POPG (3:1, mol:mol) | 171 |
| 5.2.4.iv. Extracto lipídico de <i>Escherichia coli</i> | 174 |
| 5.2.5. Proceso de disrupción de liposomas con surfactantes | 176 |
| 5.2.5.i. n-octil- β -D-glucopiranosido | 177 |
| 5.2.5.ii. n-dodecil- β -D-maltósido | 183 |
| 5.2.6. Efecto de los surfactantes en la rigidez de la bicapa lipídica | 189 |

| | |
|--|-----|
| 5.3. Incorporación de proteínas en matrices lipídicas..... | 193 |
| 5.3.1. Potencial electrostático de superficie de los proteoliposomas..... | 193 |
| 5.3.1.i. Citocromo c..... | 194 |
| 5.3.1.ii. Melitina..... | 196 |
| 5.3.1.iii. Porina Omp1 de <i>Serratia marcescens</i> | 198 |
| 5.3.1.iv. Lactosa permeasa de <i>Escherichia coli</i> | 199 |
| 5.3.2. Variaciones de la anisotropía..... | 201 |
| 5.3.3. Adhesión <i>in situ</i> de proteínas de membrana sobre una SPB..... | 203 |
| 5.3.3.i. Citocromo c..... | 204 |
| 5.3.3.ii. Melitina..... | 205 |
| 5.3.3.iii. Lactosa permeasa de <i>Escherichia coli</i> | 206 |
| 5.4. Cristalización 2D de proteínas de membrana..... | 209 |
| 5.4.1. Variaciones de la fluidez de la bicapa durante la cristalización..... | 209 |
| 5.4.2. Estudio de cristales 2D mediante AFM..... | 210 |
| 5.4.2.i. Omp1 de <i>Serratia marcescens</i> | 212 |
| 5.4.2.ii. Lactosa permeasa de <i>Escherichia coli</i> | 215 |
| 6. DISCUSIÓN..... | 227 |
| 6.1. Caracterización de las proteínas de membrana..... | 229 |
| 6.2. Caracterización de las matrices lipídicas..... | 232 |
| 6.3. Incorporación de proteínas en matrices lipídicas..... | 239 |
| 6.4. Cristalización 2D de proteínas de membrana..... | 245 |
| 7. CONCLUSIONES..... | 253 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA..... | 257 |
| 9. APÉNDICE I..... | 279 |
| 9.1. Publicaciones en revistas de interés científico..... | 281 |
| 9.2. Contribuciones a congresos..... | 299 |
| 9.3. Financiación..... | 300 |

Abreviaturas

| | |
|----------------|--|
| α | Grado de disociación. |
| λ | Longitud de onda. |
| ψ | Potencial electrostático de superficie. |
| Å | Angstrom. |
| aa | Aminoácido. |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico. |
| ADP | Adenosina difosfato. |
| AFM | Microscopía / Microscopio de fuerza atómica. |
| ANS | Ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico. |
| ATP | Adenosina trifosfato. |
| Av | Avidina. |
| <i>B</i> | Cooperatividad. |
| BHK-21 | Línea celular de riñón de Hámster (<i>Syrian Hamster Kidney</i>). |
| BSA | Albúmina sérica bovina. |
| CB | Solución de la columna (<i>Column buffer</i>). |
| CHOL | Colesterol. |
| CMC | Concentración micelar crítica. |
| Cyt c | Citocromo c. |
| Da | Dalton. |
| DDM | n-dodecil- β -D-maltósido. |
| DMPC | 1,2-dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina. |
| DMSO | Dimetilsulfóxido. |
| DOGS-NTA-Ni | 1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-[succinil (ácido N-(5-amino-1-carboxypentil) iminodiacético)] funcionalizado con Ni ²⁺ . |
| DOPC | 1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina. |
| DPH | 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno. |
| DRM | Membrana resistente a surfactantes (<i>Detergent Resistant Membrane</i>). |
| DTT | Ditiotreitol. |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> . |
| EB | Solución de elución (<i>Elution buffer</i>). |

| | |
|--------------------------|---|
| EM | Microscopía electrónica. |
| Ext. lip. <i>E. coli</i> | Extracto lipídico total de <i>Escherichia coli</i> . |
| FFT | Transformada rápida de Fourier (<i>Fast Fourier Transformate</i>). |
| FPB | Solución de la Prensa de French (<i>French Press Buffer</i>). |
| GL | Glucolípidos. |
| HHC | 4-heptadecil-7-hidroxycumarina. |
| HOPG | Grafito pirolítico altamente ordenado. |
| IPTG | Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido. |
| K | Coefficiente de distribución del surfactante entre la bicapa y el medio acuoso. |
| KPi | Solución de fosfato potásico. |
| LacY | Lactosa permeasa de <i>Escherichia coli</i> . |
| LB Miller | Luria Bertani modificado por Miller. |
| LPR | Relación lípido-proteica (p/p) (<i>Lipid-to-Protein Ratio</i>). |
| LPS | Lipopolisacárido. |
| LS | Dispersión de la luz (<i>quasi-elastic light scattering</i>). |
| LUV | Liposomas unilaminares grandes (<i>large unilamellar vesicles</i>). |
| M | Masa molecular. |
| ME | Monocapa externa. |
| MI | Monocapa interna. |
| MLT | Melitina. |
| MLV | Liposomas multilaminares grandes (<i>multilamellar large vesicles</i>). |
| MWCO | Tamaño de poro limitante (<i>Molecular Weight cut-off</i>). |
| NAG | N-acetil-glucosamina. |
| NAM | Ácido N-acetil-murámico. |
| NaPi | Solución de fosfato sódico. |
| n_m | Número de monómeros. |
| NTA | ácido N-(5-amino-1-carboxypentil) iminodiacético. |
| NTA-Ni | NTA funcionalizado con Ni ²⁺ . |
| OG | n-octil- β -D-glucopiranosido. |
| Omp1 | Porina Omp1 de <i>Serratia marcescens</i> . |
| OTG | n-octil- β -D-tioglucopiranosido. |
| PBS | Solución salina de fosfatos. |

| | |
|--------------------------------|--|
| PC | Fosfatidilcolina. |
| PDB | <i>Protein Data Bank</i> . |
| PE | Fosfatidiletanolamina. |
| PI | Fosfatidilinositol. |
| POPC | 1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina. |
| POPE | 1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidiletanolamina. |
| POPG | 1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-[fosfo- <i>rac</i> -(1-glicerol)]. |
| PS | Fosfatidilserina. |
| RB | Solución de resuspensión (<i>Resuspension buffer</i>). |
| <i>Re</i> | Relación molar efectiva entre surfactante y lípido. |
| RMN | Resonancia magnética nuclear. |
| rpm | Revoluciones por minuto. |
| <i>S</i> | Concentración de surfactante. |
| <i>S. marcescens</i> | <i>Serratia marcescens</i> . |
| SB-Ni | Solución para muestra en columna de níquel (<i>Sample buffer</i>). |
| SDS | Dodecilsulfato sódico. |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. |
| Si ₃ N ₄ | Nitruro de silicio. |
| SLS | Dispersión estática de la radiación (<i>Static quasi-elastic light scattering</i>). |
| SMFS | Espectroscopia de fuerzas en moléculas “aisladas” (<i>single-molecule force spectroscopy</i>). |
| SML | Esfingomielina. |
| SPB | Bicapa plana (<i>Supported planar bilayer</i>). |
| SPM | Microscopía de sonda próxima. |
| SUV | Liposomas unilaminares pequeños (<i>small unilamellar vesicles</i>). |
| TDG | Tiodigalactósido. |
| TEM | Microscopía electrónica de transmisión. |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametiletildiamina. |
| THF | Tetrahidrofurano. |
| <i>T_m</i> | Temperatura de transición. |
| TMA-DPH | 1-(4-trimetilamonifenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno. |
| TSB | Caldo de triptona y soja. |

| | |
|-------|--|
| UFC | Unidades formadoras de colonias. |
| UW | Solución de lavado con urea (<i>Urea wash</i>). |
| VSV | Virus de la estomatitis vesicular. |
| WB-Ni | Solución de lavado de la columna (<i>Wash buffer</i>). |