
DESARROLLO DE UN NUEVO GENOSENSOR AMPEROMÉTRICO DE MEMBRANAS RECAMBIABLES BASADO EN UN SISTEMA DE MARCACIÓN ENZIMÁTICA ACOPLADA A UNA REACCIÓN INMUNOLÓGICA

7.1 INTRODUCCIÓN

La inmunoquímica es la disciplina que combina conceptos y técnicas de la inmunología y de la química. El inmunoensayo se ha convertido en una de las técnicas más habituales en química clínica, utilizada sobre todo con propósito de diagnóstico ^{1,2}.

El principal componente de un inmunoensayo es el anticuerpo. Los anticuerpos son glucoproteínas sintetizadas por los linfocitos B en respuesta al estímulo antigénico que tienen la propiedad de unirse específicamente al antígeno que indujo su formación. Esta reacción es específica.

La unión antígeno-anticuerpo tiene lugar a través de la formación de enlaces múltiples de naturaleza no covalente entre los aminoácidos que constituyen los sitios de enlace denominados determinantes antigénicos o epitopos. La naturaleza de las fuerzas de atracción son puentes de hidrógeno, fuerzas de naturaleza electrostática, de van der Waals e hidrofóbicas. Estas fuerzas son individualmente débiles en comparación con las uniones covalentes, pero la multiplicidad de los enlaces conduce a una elevada energía de unión. Esto hace que los valores de las constantes de equilibrio de la reacción de un par antígeno-anticuerpo oscilen entre 10^4 y 10^{10} . La elevada afinidad del anticuerpo por el antígeno implica un efecto positivo en la sensibilidad de un inmunoensayo.

Las especies inmunológicas pueden conjugarse con una marca. El tipo de marca determina la técnica de detección instrumental necesaria para el seguimiento de la interacción inmunoquímica.

Así, el par antígeno-anticuerpo se puede detectar mediante grupos cromóforos, luminiscentes o electroactivos, isótopos radioactivos, enzimas, sustratos y cofactores.

Los inmunoensayos se utilizan para la detección de numerosas moléculas de interés analítico en diversos campos. Pero también –aunque de manera menos frecuente– una reacción inmunológica se puede utilizar como sistema de marcación.

Roche Molecular Biochemicals ha desarrollado un sistema de marcación basado en una reacción antígeno-anticuerpo, que ha ido reemplazando al basado en la reacción biotina-estreptavidina. Este sistema utiliza una molécula de naturaleza esteroidea que se comporta, desde el punto de vista inmunológico, como un hapteno y se encuentra exclusivamente en las plantas *Digitalis*: la digoxigenina.

El uso de esta reacción inmunológica se ha difundido extensamente en los laboratorios de análisis genéticos, debido a sus características que lo hacen idóneo para la marcación enzimática.

La principal ventaja de la utilización de la digoxigenina por sobre la biotina es que esta última está presente en mayores o menores cantidades en la mayoría de los organismos vivos (células humanas, bacterias) por lo que su presencia puede interferir en un análisis fiable. En cambio, la digoxigenina sólo se encuentra en un tipo específico de plantas, por lo que no puede provocar ningún tipo de interferencia.

Los fabricantes aseguran que la marcación basada en el sistema de la digoxigenina posee la misma sensibilidad –con detección quimioluminiscente– que los sistemas basados en radioisótopos. Además, las sondas funcionalizadas con digoxigenina son estables por más de un año.

La hibridación con las sondas funcionalizadas con digoxigenina se puede realizar efectivamente en Southern y Northern blots, dot o slot-blots, e hibridaciones *in situ*, en placas o en colonias. Las condiciones de hibridación son las habitualmente utilizadas en los protocolos más comunes.

La detección de los híbridos funcionalizados con digoxigenina (DIG) se puede realizar utilizando un conjugado antiDIG-fosfatasa alcalina (fragmentos Fab), y la detección posterior de la enzima se puede realizar utilizando sustratos quimioluminiscentes o cromogénicos. Asimismo, existen conjugados antiDIG-HRP con los mismos sistemas de detección. Para hibridaciones *in situ* la marcación puede ser fluorescente o con oro.

En cuanto a los límites de detección, los fabricantes aseguran que se puede detectar una única copia de DNA de mamífero en formato Southern blot o dot-blot, y en colonias o placas. Asimismo, pueden detectarse transcritos de RNA.

Las sondas funcionalizadas con digoxigenina han sido utilizadas en numerosos formatos y para la detección de distintas secuencias de DNA o de RNA, como por ejemplo para la detección de DNA inmovilizado covalentemente en pocillos³ o en membranas de nylon⁴, para la hibridación en gel⁵ o *in situ*^{6,7}, y para la evaluación de colonias bacterianas⁸. También han sido utilizada con éxito en protocolos Northern blot para la detección de transcritos de RNA⁹. Un diseño ingenioso hace uso de una doble funcionalización: con biotina para la inmovilización, y con digoxigenina para la marcación basada en una reacción inmunológica, otorgando versatilidad al ensayo. Este diseño se ha utilizado en distintos formatos y con diferentes objetivos analíticos¹⁰⁻¹⁶.

En el modelo que se presenta en este trabajo, la sonda de DNA complementaria al analito se encuentra funcionalizada con digoxigenina. Esta funcionalización primaria será evidenciada a través de una reacción antígeno-anticuerpo, utilizando un anticuerpo específico antiDIG conjugado con una enzima, la peroxidasa de rábano picante (HRP).

En la Figura 7.1 se muestra esquemáticamente los pasos del formato dot-blot que se utilizó en el trabajo descrito en el presente capítulo. Como puede observarse, la principal diferencia con los esquemas utilizados anteriormente en el presente trabajo radica en la reacción utilizada para lograr la marcación enzimática. Hasta el momento, la marcación se basaba en la reacción biotina-estreptavidina, mientras que en este caso en la reacción antígeno-anticuerpo, pero con el mismo último fin: conseguir marcar los híbridos formados en la membrana con la enzima peroxidasa, para la obtención de la señal analítica.

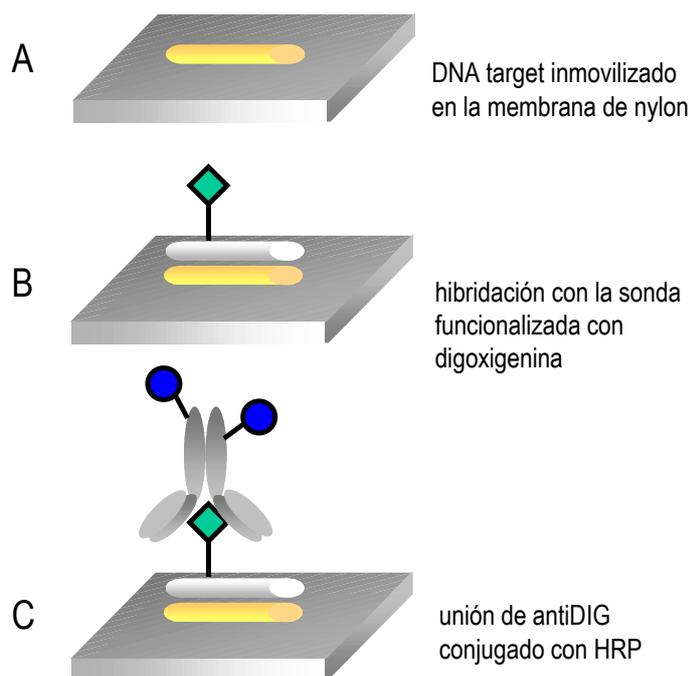


Figura 7.1. Esquema en el que se muestran los pasos de un formato dot-blot basado en una marcación inmunológica.

En el presente capítulo se ha adaptado por primera vez este tipo de marcación enzimática basado en una reacción inmunológica –ampliamente utilizado en análisis genéticos clásicos– a un genosensor electroquímico.

Para tal fin, se escogió el mismo formato del dispositivo genosensor que en el Capítulo 6 que se basa en el reconocimiento múltiple, y que hace uso de poli(dA) como analito y como sonda funcionalizada, dT(20)-DIG.

En el presente capítulo se evalúa la utilidad de este tipo de marcación y sus ventajas –o desventajas– respecto a la marcación basada en el sistema biotina-estreptavidina para un genosensor amperométrico de membranas recambiables. Se pretende así aumentar las posibilidades de marcación en función del problema analítico que se tenga, de manera de en un futuro poder incrementar las posibilidades de análisis en caso de que se encuentre interferencia por la presencia de biotina en la muestra real.

7.2 EXPERIMENTAL

7.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS

7.2.1.1 Equipamiento

Las medidas amperométricas se realizaron con la misma instrumentación analítica y electrodos descritos en § 2.2.2.

Las incubaciones a temperatura controlada se realizaron en el eppendorf Thermomixer modelo 5436.

7.2.1.2 Reactivos y materiales

Los composites se prepararon con grafito en polvo de tamaño de partícula de 50 μm (BDH), resina epoxi Epo-Tek H77 (Epoxy Technology, USA).

Las membranas de nylon integradas al composite grafito-epoxi fueron HYBOND™ N(+) (Amersham)¹⁷.

Los pulidos de las superficies de los composites se realizaron con papel de alúmina de 3 μm (polishing strips 301044-001, Orion).

Los calibrados se realizaron con peróxido de hidrógeno (Merck) y se utilizó como mediador hidroquinona (Sigma).

El conjugado inmunológico utilizado (Roche Molecular Biochemicals) es el fragmento Fab de un anticuerpo antiDIG de oveja conjugado con HRP (peroxidasa de rábano picante). El anticuerpo se obtuvo por inmunización de una oveja con digoxigenina. La fracción IgG fue purificada por cromatografía de intercambio iónico, y la IgG específica fue aislada por inmunosorción. Los fragmentos Fab se obtuvieron por digestión por papaína y posteriormente conjugados con HRP.

El poli(dA) (sal sódica del ácido poliadenílico) (5 U, PM 91900 g/mol, aproximadamente 260 mer) fue suministrado por Sigma.

Se encargó la síntesis de la siguiente sonda de DNA a MWG-BIOTECH (Alemania):

- dT(20)-digoxigenina [dT(20)-DIG]

DIG 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT -3'

Características del producto:

$T_m = 36.8^\circ\text{C}$; GC = 0 %; cantidad de DNA: 16.7 OD, 612 μg , 90.8 nmol; P.M.: 6745 g/mol; purificación: HPSF (high purified salt free); longitud = 50 mer.

Las composiciones de las soluciones de prehibridación e hibridación seleccionadas fueron:

- Solución de prehibridación (Sigma): 10 X SSC, 10 X reactivo de Denhardt, 200 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de esperma de salmón (extraído con fenol y cloroformo).
- Solución de hibridación (Sigma): 10 X SSC, 2 X reactivo de Denhardt, 200 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de esperma de salmón (extraído con fenol y cloroformo).

La proteína BSA es de BDH. Otros reactivos utilizados tales como formamida, SDS, Tween 20 fueron adquiridos en Sigma.

En § 4.2.3.1, se describen las distintas metodologías de inmovilización sobre una membrana de nylon¹⁷⁻²¹. En el presente capítulo, al igual que en el formato desarrollado en el capítulo 4, se utiliza también la inmovilización por calor seco^{17,21-23}.

La preparación del DNA que será inmovilizado, en este caso poli(dA) se realiza de manera idéntica que en § 4.2.3.2.

7.2.2.2 Tratamiento de prehibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el analito

El objetivo de este tratamiento de prehibridación consiste en la utilización de moléculas de alto peso molecular para bloquear los sitios libres de la membrana de nylon, de manera de favorecer la hibridación y no la adsorción inespecífica de la sonda que lleva la funcionalización con digoxigenina.

En § 4.2.4 se discuten en detalle y se seleccionan las variables del tratamiento de prehibridación, tales como:

- tipo de solución de prehibridación: reactivos bloqueantes^{17,19,21-26}, uso de formamida^{19,21,22,24,26} y SDS^{17,21-27}.
- temperatura y tiempo de prehibridación^{18,21,26}.
- agitación durante el tratamiento de prehibridación^{17,21,28}.
- volumen utilizado durante el tratamiento de prehibridación^{21,26}.

En el presente capítulo se utilizó la misma solución de prehibridación que en § 4.2.4.2, cuya composición final fue:

5 X SSC;
5 X de reactivo de Denhardt;
100 µg/ml de DNA de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado;
0.5 % p/v de SDS;
50 % v/v de formamida.

Las variables utilizadas en el tratamiento de prehibridación fueron:

- temperatura y tiempo de prehibridación: 42 °C, 4 h.
- agitación durante la prehibridación: suave.
- volumen de prehibridación: 450 µl.

El protocolo del tratamiento de prehibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas fue el mismo que el utilizado en § 4.2.4.6, y consistió en:

- 1.- Se colocan las membranas, luego de la fijación del ssDNA (véase protocolo de inmovilización, § 7.2.2.1), en tubos eppendorf con la cara en la que ha sido adsorbido el DNA del lado de la luz del tubo de manera que quede en contacto con la solución.
- 2.- Se agregan 450 µl de solución de prehibridación.
- 3.- Se colocan los tubos eppendorf en el incubador, con agitación suave y a 42 ° C, durante 4 h.

7.2.2.3 Hibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el analito con una sonda complementaria funcionalizada con digoxigenina

Este es el paso más importante del procedimiento de construcción del sensor, ya que aquí ocurre la hibridación de la sonda funcionalizada con digoxigenina con el poli(dA) inmovilizado en la membrana.

Selección de la solución de hibridación

En § 4.2.5 se discuten en detalle y se seleccionan las variables del procedimiento de hibridación, tales como:

- tipo de solución de hibridación: reactivos bloqueantes ^{17,19,21-26}, uso de formamida ^{19,21,22,24,26} y SDS ²¹⁻²⁷, fuerza iónica ^{19,22}, uso de dextrans ^{22,23,25} o polietilenglicol ^{19,24,27}.
- temperatura y tiempo de hibridación ^{18,21,26}.
- agitación durante la hibridación ^{17,21,28}.
- volumen de hibridación ^{21, 26}.

En el presente capítulo se utiliza la misma solución de hibridación que en § 4.2.5.2, cuya composición final es:

5 X SSC;
 1 X de reactivo de Denhardt;
 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado;
 0.5 % p/v de SDS;
 50 % v/v de formamida.

VARIABLES UTILIZADAS EN EL PROCEDIMIENTO DE HIBRIDACIÓN

Las variables utilizadas en el procedimiento de hibridación con una sonda funcionalizada con digoxigenina fueron básicamente las mismas que cuando se utiliza biotina como funcionalización, ya que el procedimiento de hibridación en este caso no depende de la naturaleza de la funcionalización sino más bien de la composición de bases nitrogenadas de la sonda. Dichas variables fueron:

- temperatura y tiempo de hibridación: 42 ° C, durante toda la noche.
- agitación durante la hibridación: suave.
- volumen de hibridación: 450 µl.

Preparación de la sonda funcionalizada con digoxigenina

Se tomó un volumen de solución acuosa de DNA (en este caso, dT(20)-DIG) y se calentó a 95 °C durante 5 min. Luego del calentamiento, se colocó dicha solución inmediatamente en hielo. Este enfriamiento rápido permite que las secuencias queden como ssDNA.

HIBRIDACIÓN DEL ANALITO SOPORTADO EN LAS MEMBRANAS DE NYLON HYBOND™

El protocolo de hibridación de las membranas de nylon HYBOND™ para el formato de reconocimiento múltiple utilizando una sonda funcionalizada con digoxigenina, fue el mismo que el

utilizado en § 6.2.2.4 en cuanto a la metodología, con la única diferencia en la funcionalización de la sonda complementaria al analito.

El protocolo de hibridación de las membranas de nylon HYBOND™ en formato de reconocimiento múltiple consistió en:

- 1.- Inmediatamente después del tratamiento de prehibridación (§ 7.2.2.2), se quita la solución de prehibridación de los tubos eppendorf, sin mover las membranas, y se agregan 450 µl de solución de hibridación, preparada según § 4.2.5.2.
- 2.- Se dejan los tubos eppendorf en el incubador con agitación suave y a 42 °C, durante 10 minutos (para que la solución de hibridación tome esta temperatura).
- 3.- Se adiciona un volumen (en µl) de sonda funcionalizada en 5' con digoxigenina (dT(20)-DIG).
- 4.- Se dejan las membranas en hibridación con agitación suave y a 42 °C, durante toda la noche.
- 5.- Luego de la hibridación, se procede a los lavados posthibridación de las membranas, de la siguiente manera:
 - 1.- 10 minutos, en 40 ml de 2 X SSC-0.1 % SDS, con agitación suave, a 20 °C
 - 2.- 10 minutos, en 40 ml de 0.2 X SSC-0.1 % SDS, con agitación suave, a 50 °C
 - 3.- Se remojan las membranas en 2 X SSC dos veces a 20 °C, para quitar el SDS.

7.2.2.4 Marcación enzimática posthibridación

Una vez formado el híbrido múltiple de poli(dA) funcionalizado con digoxigenina, la presencia de dicha funcionalización debe revelarse mediante un esquema compuesto, que involucra la reacción inmunológica del dúplex formado a través de la digoxigenina, con el conjugado anticuerpo antiDIG-HRP (Figura 7.2).

La peroxidasa será quien genere la señal analítica amperométrica luego de la reacción con un sustrato adecuado, tal cual ocurriera en los formatos en los que se ha utilizado el sistema de marcación basado en la reacción biotina-estreptavidina.

Es importante destacar que la afinidad de la reacción biotina-estreptavidina es mayor que la del par antígeno-anticuerpo.

Se han descrito varios métodos para la reacción del híbrido de DNA con el anticuerpo antiDIG-HRP. Estos métodos difieren en el uso o no de reactivos bloqueantes, en la solución amortiguadora utilizada, en el tiempo de marcación y agitación.

En las secciones siguientes se detalla la metodología seguida para la marcación enzimática en el presente trabajo.

Selección de la solución bloqueante para la marcación enzimática basada en una reacción inmunológica

Durante las marcaciones inmunológicas es bastante común utilizar reactivos bloqueantes. En la bibliografía se describe la utilización de BSA conjuntamente con Tween 20 para reducir las adsorciones debidas al carácter hidrofóbico del material inmunológico.

Formato de reconocimiento múltiple

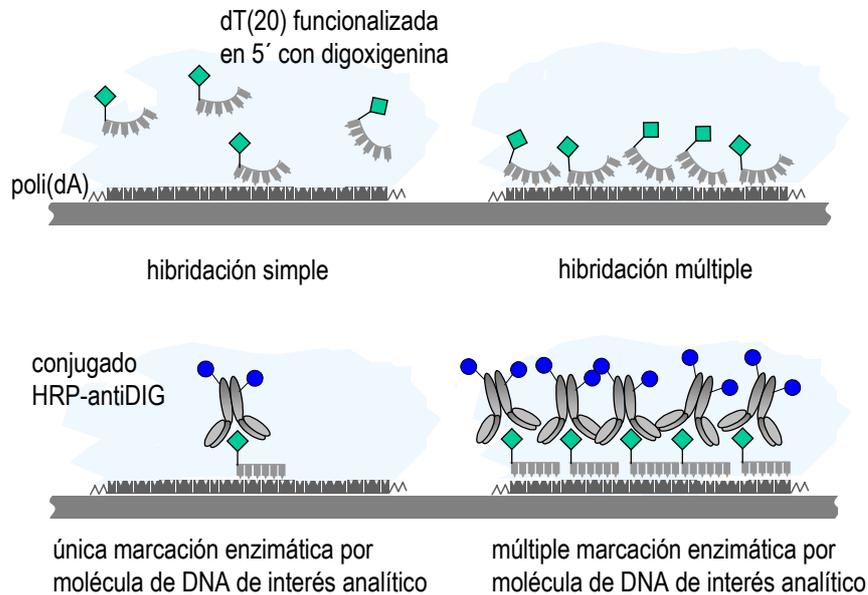


Figura 7.2. Dibujo esquemático que muestra las posibilidades de hibridación y de marcación inmunológica en el formato dot-blot de reconocimiento múltiple. Dependiendo de la disponibilidad de las bases del analito –poli(dA)–, la sonda funcionalizada con digoxigenina –dT(20)-DIG– puede hibridarse –y posteriormente marcarse– con una única marca o con varias (hasta 13) marcas. En la figura se muestran los casos extremos.

La BSA es una proteína inerte que se utiliza habitualmente para asegurar la selectividad de la reacción inmunológica porque minimiza los enlaces no específicos indeseables. Esto se consigue porque la BSA satura estos puntos de anclaje.

El Tween 20 es un detergente no iónico que normalmente se utiliza para bloquear el antígeno del soporte sólido que no ha interactuado con el anticuerpo. Además, debido a su comportamiento como tensioactivo, ayuda a eliminar el anticuerpo marcado adsorbido inespecíficamente.

El medio iónico y el pH de la solución bloqueante de marcación se consiguió con una solución de tris-HCl 0.1 M, 0.15 M de NaCl, pH 7.5, según lo recomendado por los suministradores. Además, se adicionó EDTA para una mejor conservación, desde el punto de vista microbiológico, de la solución bloqueante para la marcación.

Composición de la solución bloqueante utilizada para la marcación enzimática

La solución bloqueante se preparó de manera que su composición fuese:

Buffer TRIS pH 7.5 2 % p/v BSA 0.1 % p/v Tween 20 5 mM EDTA
--

Temperatura y tiempo de premarcación con solución bloqueante

En un primer paso y luego de la hibridación, se dejaron reaccionar las membranas en la solución bloqueante durante 30 min. a 37 °C, con agitación suave ¹⁹.

Este paso favorecería la interacción de la BSA sobre la membrana, antes de la adición de la enzima.

Temperatura y tiempo de marcación enzimática basada en una reacción inmunológica

La temperatura de marcación con el anticuerpo conjugado con la enzima es de 37 °C. El tiempo de marcación para este protocolo fue de 1 h ¹⁹.

Agitación durante la premarcación con solución bloqueante y marcación enzimática

El objeto de la agitación consiste en aumentar la cinética de interacción de los reactantes cuando uno de los reactivos se encuentra inmovilizado, facilitando el transporte del material que se encuentra en solución –en este caso, antiDIG-HRP– hacia la superficie de la membrana en donde se encuentra el híbrido funcionalizado con digoxigenina.

La agitación tiene un doble efecto que presenta una situación de compromiso. Un aumento de la agitación favorecería el acercamiento de los reactantes pero, además, favorecería su desorción. Teniendo en cuenta que la interacción antígeno-anticuerpo tiene una mayor fuerza que una interacción de tipo inespecífica, regulando la velocidad de agitación se puede conseguir la desorción únicamente del material adsorbido de manera inespecífica.

El incubador que se utilizó en el presente trabajo permite aplicar, además de una temperatura constante, una agitación suave, que fue la utilizada en los procedimientos de premarcación con solución bloqueante y marcación enzimática. Se aplicó la misma agitación que la utilizada durante el tratamiento de prehibridación y durante la hibridación.

Volumen de premarcación con solución bloqueante y de marcación enzimática

Si se disminuye el volumen de reacción aumenta la concentración efectiva del anticuerpo marcado y aumenta también la relación entre el área superficial y el volumen, hechos que favorecen la cinética de la reacción digoxigenina–antiDIG-HRP.

En este caso, las reacciones se llevaron a cabo en tubos eppendorf de 1.5 ml de capacidad, colocándose en su interior 450 µl de solución bloqueante. Con este volumen, las membranas circulares de 7 mm de diámetro se encontraban cubiertas con la mínima cantidad de solución.

Las membranas se dispusieron en los tubos eppendorf de manera que la cara en la que se ha formado el híbrido quede hacia la luz del tubo y en íntimo contacto con la solución bloqueante y con el anticuerpo conjugado con la enzima.

Lavados postmarcación

Este paso es importante ya que permitiría eliminar de manera selectiva los anticuerpos adsorbidos de manera inespecífica. Sin embargo, si los lavados son muy intensos, se corre el riesgo de desestabilizar los híbridos y complejos formados y, por tanto, de disminuir la señal analítica.

En este caso, se utilizó como solución de lavado el buffer TRIS.

Se ha seleccionado la siguiente secuencia de lavados:

Lavados postmarcación enzimática

- 1.- 10 min, en 40 ml de solución de lavado, con agitación suave, a 20 °C.
- 2.- Se repite 2 veces más.

Preparación del anticuerpo antiDIG-HRP

Se tomó un volumen de solución acuosa concentrada del anticuerpo y se realizó la dilución que se considere conveniente en la solución bloqueante utilizada en la marcación enzimática.

Protocolo de marcación enzimática basada en una reacción inmunológica

En este protocolo se han incluido las variables seleccionadas en los apartados anteriores (solución bloqueante, volumen de reacción, tiempo y temperatura). El protocolo que se sigue es el que se detalla a continuación:

- 1.- Inmediatamente después de la hibridación en formato dot-blot de reconocimiento múltiple (§ 7.2.2.3) y de los lavados de posthibridación, se colocan las membranas en los tubos eppendorf con la cara en la que se ha adsorbido el DNA hacia la luz del tubo, y se agregan 450 µl de solución bloqueante.
- 2.- Se dejan los tubos eppendorf en el incubador con agitación suave y a 37 °C, durante 30 minutos (procedimiento de premarcación con solución bloqueante).
- 3.- Se adiciona un volumen (en µl) de conjugado enzimático.
- 4.- Durante la marcación, se dejan las membranas con agitación suave y a 37 °C, durante 1 h.
- 5.- Luego de la marcación, se procede a los lavados postmarcación de las membranas, de la siguiente manera:
 - 1.- 10 minutos, en 40 ml de solución de lavado, con agitación suave, a 20 °C
 - 2.- Se repite 2 veces más

7.2.3 INTEGRACIÓN AL TRANSDUCTOR DE LAS MEMBRANAS MODIFICADAS

Una vez se preparan las membranas, están listas para incorporarse al transductor amperométrico. En § 2.3.5.1 se seleccionó como transductor el composite rígido grafito-epoxi. Para todas las determinaciones se utilizó el mismo sensor. Antes de integrar la membrana al transductor, éste fue sometido al procedimiento de pulido (§ 2.2.4.3), cuya reproducibilidad fue evaluada en § 2.3.5.4. Este procedimiento se repitió entre calibrados con el objeto de obtener superficies frescas ya que, en caso contrario, el transductor sufre de pasivación (§ 3.2.2.5).

El procedimiento de integración de las membranas modificadas al transductor grafito-epoxi fue el mismo que el descrito en § 6.2.3 y Figura 6.3, basado en un sistema de sujeción más robusto que el utilizado en capítulos anteriores.

7.2.4 EVALUACIÓN DE LOS GENOSENSORES

La evaluación de los sensores preparados se realizó basándose en la señal generada, finalmente, por la enzima peroxidasa, ya que a pesar de haber utilizado otro mecanismo de marcación –anteriormente la marcación se basaba en la reacción biotina-estreptavidina-HRP mientras que en este caso se utiliza una reacción inmunológica– el marcador enzimático es el mismo. La señal analítica amperométrica está relacionada con la cantidad de enzima (HRP) que se haya unido a las membranas.

Para tal fin, la evaluación se llevó a cabo con el sistema amperométrico descrito en § 2.2.2. La celda de medida fue una solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0, utilizándose como electrodo de trabajo el genosensor construido en § 7.2.3. La concentración de hidroquinona en el medio fue de 1.8 mM. A este sistema, se le aplicó el potencial de reducción de la hidroquinona (-0.1 V, vs Ag/AgCl), que fuera optimizado en § 3.3.1.1.

Para la evaluación de los genosensores directamente se agregó una alícuota de sustrato enzimático (H₂O₂) al medio de calibración, tal que con una adición se consiga la saturación de la enzima (la concentración de sustrato empleada fue de 1.06 mM). De esta forma, la información analítica que se obtuvo fue correspondiente a la $I_{m\acute{a}x}$, la cual es proporcional a la actividad enzimática en la superficie del transductor. Los tiempos de respuesta fueron de 2 minutos, que es el tiempo de respuesta del sistema para la obtención de la lectura correspondiente a la $I_{m\acute{a}x}$.

7.2.5 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PREPARACIÓN DEL GENOSENSOR

Numerosísimas variables pueden optimizarse en este formato, aunque los efectos de algunas de éstas fueron tratadas en apartados anteriores.

Entre algunas de las variables optimizadas se encuentran la fuerza de agitación en los lavados de postmarcación enzimática, la integración de la membrana al transductor, la evaluación de las membranas (calibrados o una adición simple de sustrato), entre otras.

Las variables más importantes son:

- cantidad de poli(dA) inmovilizada en la membrana
- cantidad de dT(20)-DIG en la solución de hibridación
- cantidad de anticuerpo antiDIG-HRP en la solución bloqueante durante la marcación enzimática

En este formato dot-blot de reconocimiento múltiple con un nuevo sistema de marcación enzimática se adaptaron las cantidades de reactivos que fueran optimizadas en el capítulo 6, ya que el formato de hibridación es básicamente el mismo, pero la naturaleza del material genético que se utiliza es distinta. Entre algunas de las variables ya optimizadas, y cuyas cantidades se adaptaron para el presente capítulo se encuentran la cantidad de poli(dA) inmovilizada en la membrana y la cantidad de sonda funcionalizada de la solución de hibridación.

En cuanto a la cantidad de poli(dA) inmovilizada en la membrana, se ha utilizado la misma cantidad de analito que la utilizada en § 6.2.5.4, es decir, 11.4 pmoles.

La cantidad de dT(20)-DIG fue de 113.5 pmoles, ya que se ha teniendo en cuenta la posibilidad de hibridación múltiple con el analito (Figura 7.2). Es el doble que lo que se ha colocado en el formato dot-blot de reconocimiento múltiple del capítulo 6 (§ 6.2.5.4). Esta cantidad se ha agregado teniendo en cuenta que el analito es de 260 mer aproximadamente, mientras que la sonda tiene 20 mer. En el capítulo 6 la sonda utilizada, en cambio, era de 50 mer.

En este capítulo se ha optimizado la cantidad del nuevo reactivo de marcación enzimática basada en una reacción inmunológica, es decir, de anticuerpo antiDIG-HRP en la solución bloqueante para la marcación enzimática.

Para evaluar la señal debida a la hibridación múltiple, se realizó un lote de membranas llamadas “genosensoras”, que evaluaron el proceso de reconocimiento múltiple mediante la sonda funcionalizada con digoxigenina en 5'. Con el objeto de evaluar su adsorción inespecífica, se realizó en paralelo un lote de membranas “blanco”, –en las que se adicionaron los mismos reactivos que en las membranas “genosensoras” excepto el analito–. Por cada lote se procesan normalmente triplicados de las membranas.

La adsorción inespecífica se utilizó para detectar la verdadera señal de fondo del dispositivo, ya que por diferencia entre la señal de las membranas “genosensoras” y las membranas “blanco” se obtuvo la respuesta analítica debido al proceso de hibridación en formato dot-blot de reconocimiento múltiple.

En los apartados siguientes se explica el protocolo de preparación de las membranas “genosensoras” y “blanco”.

En la Figura 7.3, se muestra esquemáticamente cada uno de los pasos involucrados en la preparación de los genosensores y el fundamento de la obtención de la señal analítica en un formato de reconocimiento múltiple con un nuevo sistema de marcación enzimática basado en una reacción inmunológica.

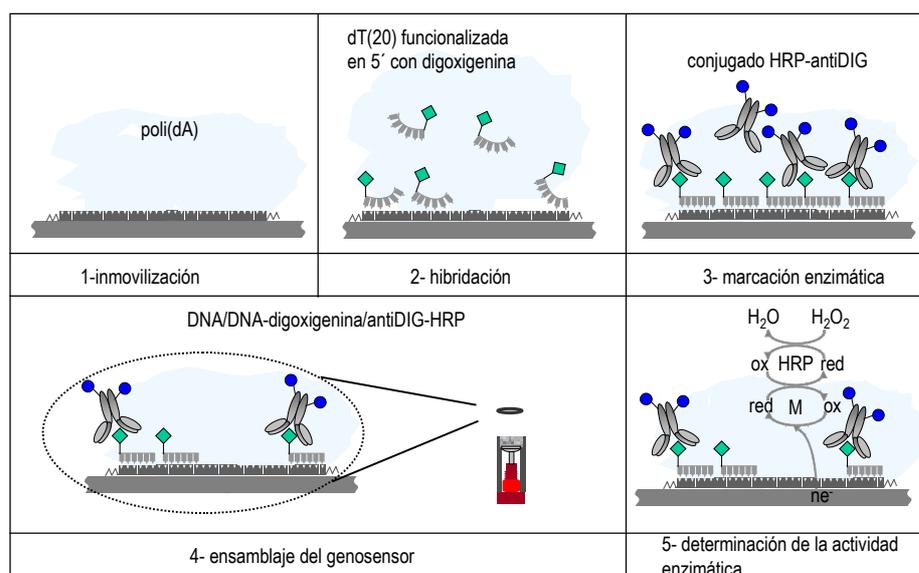


Figura 7.3. Representación esquemática del procedimiento experimental seguido en la preparación y evaluación de los genosensores en formato dot-blot de reconocimiento múltiple con un sistema de marcación basado en una reacción inmunológica.

7.2.5.1 Protocolo de preparación de las membranas “genosensoras” en formato dot-blot de reconocimiento múltiple con un sistema de marcación enzimática basada en una reacción inmunológica

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización del poli(dA) –analito– descrito en § 7.2.2.1.
- 2.- Se sigue con el tratamiento de prehibridación, descrito en § 7.2.2.2.
- 3.- Se sigue con el protocolo de hibridación en formato dot-blot de reconocimiento múltiple, descrito en § 7.2.2.3.
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática basada en una reacción inmunológica, descrito en § 7.2.2.4.

7.2.5.2 Protocolo de preparación de las membranas “blanco” en formato dot-blot de reconocimiento múltiple con un sistema de marcación enzimática basada en una reacción inmunológica

Este lote se realizó de manera idéntica al de las membranas “genosensoras” en formato de reconocimiento múltiple (§ 7.2.5.1) pero obviando el paso de adición de ssDNA (analito), es decir, no hay analito –poli(dA)– sobre la membrana.

Como el resto de los reactivos fue el mismo, en estas membranas se evaluaron todos los procesos de adsorción, pero no el proceso de hibridación sobre la membrana.

El protocolo que se siguió para su preparación fue:

- 1.- Se sigue el protocolo de preparación de las membranas, descrito en § 7.2.2.1, con la única diferencia que no se adiciona ssDNA –poli(dA) –, es decir, no hay analito sobre la membrana (se obvia el paso 2 del protocolo).
- 2.- Se colocan estas membranas en tubos eppendorf y sigue con el paso 2 del tratamiento de prehibridación, descrito en § 7.2.2.2.
- 3.- Se continúa con el protocolo de hibridación, descrito en § 7.2.2.3. En este caso, al no haber analito en la membrana, no va a haber hibridación, y sí sólo adsorción inespecífica de la sonda funcionalizada.
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática basada en una reacción inmunológica, descrito en § 7.2.2.4.

En § 4.2.13, se explicó de manera exhaustiva las posibilidades de adsorción inespecífica en el formato descrito en el capítulo 4. En este caso, hay dos diferencias. La primera, es que la funcionalización de la sonda es digoxigenina, aunque ya se ha visto en capítulos anteriores que la adsorción inespecífica de la sonda funcionalizada no es significativa. La segunda y más importante es la naturaleza del reactivo que se utiliza para la marcación enzimática. En este caso se utiliza un anticuerpo –de naturaleza glucoproteica– conjugado con la enzima. Este reactivo es distinto al utilizado en los capítulos anteriores, por lo que es lógico pensar que la naturaleza y magnitud de la adsorción inespecífica podrían ser distintas.

Las posibilidades de adsorción inespecífica en este caso son similares a las del formato dot-blot descrito en el capítulo 4 y en el capítulo 6. Durante el proceso de hibridación puede adsorberse de manera inespecífica la sonda funcionalizada. Este mecanismo de adsorción inespecífica contribuye de manera indirecta, ya que por sí solo no aumenta la señal analítica inespecífica.

Durante el procedimiento de marcación enzimática en el formato dot-blot de reconocimiento múltiple, el anticuerpo conjugado con la enzima tiene dos posibilidades de adsorción inespecífica:

- unirse a la sonda funcionalizada adsorbida inespecíficamente;
- adsorberse directamente en la membrana.

Estas posibilidades de adsorción, que contribuyen a aumentar la señal analítica de manera inespecífica, se evaluaron en las membranas “blanco”.

7.2.5.3 Integración al transductor de las membranas modificadas y evaluación de los genosensores

Una vez preparadas las membranas “genosensoras” y las membranas “blanco”, se integraron al transductor amperométrico, como se explicara en § 7.2.3.

La evaluación de los sensores preparados se realizó basándose en la señal generada, finalmente, por la enzima peroxidasa conjugada al anticuerpo antiDIG, según se explicara en § 7.2.4.

De esta forma, la información analítica que se obtuvo –normalmente por triplicado– fue correspondiente a la $I_{máx}$, la cual es proporcional a la actividad enzimática de los blancos y de los genosensores.

El dato analítico de mayor interés es la señal de hibridación propiamente dicha, que se obtiene por la siguiente expresión:

$$\text{Señal de hibridación} = \bar{x} I_{máx} \text{ genosensor} - \bar{x} I_{máx} \text{ blanco}$$

Con esta expresión se elimina el efecto de la adsorción inespecífica.

Esta señal de hibridación está en relación con la cantidad de enzima presente en la membrana pero que se encuentra únicamente unida al híbrido formado en la superficie y directamente relacionada con la cantidad de analito en la membrana (Figura 7.3).

Así, estos híbridos en el formato dot-blot de reconocimiento múltiple se forman entre el analito inmovilizado en la membrana y la sonda funcionalizada con digoxigenina. Luego, la funcionalización de los híbridos con digoxigenina se evidencia a través de la reacción inmunológica con el anticuerpo antiDIG-HRP. Cabe destacar que, a pesar de haber utilizado otro mecanismo de marcación –anteriormente la marcación se basaba en la reacción biotina-estreptavidina-HRP mientras que en este caso se utiliza una reacción inmunológica– el marcador enzimático es el mismo, por lo que las condiciones de evaluación de la enzima es la misma.

7.2.5.4 Diseño del experimento. Variación de las cantidades de antiDIG-HRP en la solución bloqueante durante la marcación enzimática

Para evaluar la utilidad del formato dot-blot de reconocimiento múltiple con un nuevo sistema de marcación enzimática se realizaron –para cada cantidad de anticuerpo evaluada– dos lotes de membranas, como se explicara en § 7.2.5, denominadas membranas “genosensoras” y membranas

“blanco”. La Tabla 7.1 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.

Tabla 7.1. *Diseño del experimento de evaluación del formato dot-blot de reconocimiento múltiple con un nuevo sistema de marcación enzimática. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización por adsorción, hibridación y marcación enzimática.*

REACTIVOS	Lote 1 “blanco” n=3	Lote 1 “genosensor” n=4	Lote 2 “blanco” n=2	Lote 2 “genosensor” n=3
protocolo de inmovilización Poli(dA) -analito-	No se adiciona (-)	11.4 pmoles	No se adiciona (-)	11.4 pmoles
protocolo de hibridación dT(20)-DIG	113.5 pmoles	113.5 pmoles	113.5 pmoles	113.5 pmoles
protocolo de marcación enzimática antiDIG-HRP	1.3 µg	1.3 µg	3.3 µg	3.3 µg

REACTIVOS	Lote 3 “blanco” n=3	Lote 3 “genosensor” n=3	Lote 4 “blanco” n=3	Lote 4 “genosensor” n=3
protocolo de inmovilización Poli(dA) -analito-	No se adiciona (-)	11.4 pmoles	No se adiciona (-)	11.4 pmoles
protocolo de hibridación dT(20)-DIG	113.5 pmoles	113.5 pmoles	113.5 pmoles	113.5 pmoles
protocolo de marcación enzimática antiDIG-HRP	11.8 µg	11.8 µg	16.3 µg	16.3 µg

En este apartado en particular se mantuvieron constante las cantidades de analito poli(dA) inmovilizado en la membrana y de sonda funcionalizada con digoxigenina, mientras que se modificaron las cantidades de antiDIG-HRP.

Cabe destacar que por cada lote se han evaluado replicados de las membranas “blanco” y de las membranas “genosensoras”.

7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 7.4 se muestran los resultados del experimento realizado en § 7.2.5.4. Este experimento se realizó mediante un formato dot-blot de reconocimiento múltiple acoplado a un sistema de marcación enzimática basada en una reacción inmunológica y se basa en la optimización

de antiDIG-HRP. Para tal fin, se modificaron las cantidades de éste, manteniendo constante las cantidades de poli(dA) y de dT(20)-DIG.

En la Figura 7.4 se observa los resultados obtenidos con distintas cantidades de anticuerpo antiDIG-HRP, según el diseño de experimento explicado en § 7.2.5.4. Cada barra muestra el valor medio de los replicados de cada lote de membranas, y el error de la barra representa la desviación estándar de los replicados de cada lote (ec. 1, § 4B.1.1).

Se observa una respuesta amperométrica creciente para cantidades crecientes de antiDIG-HRP. Asimismo, se observa un aumento creciente de la adsorción inespecífica a medida que aumenta la concentración de anticuerpo.

La Tabla 7.2 muestra los resultados de las pruebas estadísticas, realizadas con un 95 % de confianza, para la comparación de cada uno de los lotes de membranas “blanco” y “genosensoras” con distintas cantidades de antiDIG-HRP. Como puede observarse, la diferencia de señal amperométrica que existe entre los genosensores y los blancos –para todos los lotes con diferentes cantidades de anticuerpo marcado– es significativamente diferente (prueba *t*). Estos resultados permiten afirmar que la hibridación del analito de 260 mer con una sonda funcionalizada de 20 mer ocurre con efectividad y, lo que es más importante, que el procedimiento de marcación enzimática basada en una reacción inmunológica funciona correctamente.

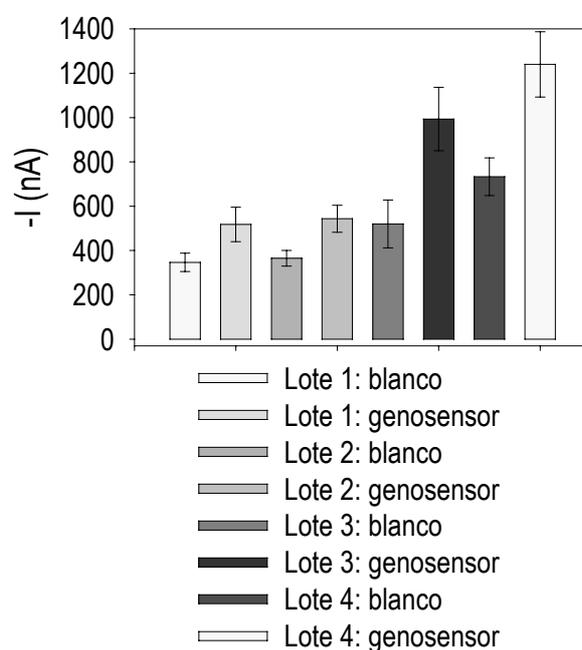


Figura 7.4. Resultados obtenidos en la evaluación del diseño del formato dot-blot de reconocimiento múltiple con un sistema de marcación basado en una reacción inmunológica mediante hibridación con una sonda de 20 mer funcionalizada en 5' con digoxigenina. DNA analito 260 mer [poli(dA)] inmovilizado en la membrana: 11.4 pmoles. dT(20)-DIG: 113.5 pmoles. antiDIG-HRP: Lote 1 (1.3 µg), Lote 2 (3.3 µg), Lote 3 (11.8 µg), Lote 4 (16.3 µg). Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H₂O₂ 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/Ag/Cl). Electrodo de trabajo grafito-epoxi-membrana HYBOND™ modificada según § 7.2.5.4.

Las desviaciones estándar relativas (ec. 2, § 4B.1.2) son del orden del 12 % y menores si se utiliza este sistema de marcación inmunológica respecto al formato dot-blot de reconocimiento múltiple que utiliza la marcación biotina-estreptavidina (con desviaciones estándar relativas del 17 %).

Tabla 7.2. Resultados de las pruebas estadísticas P y t, en las que se comparan las varianzas y los valores medios, respectivamente, de los blancos y los genosensores para cada lote de membranas.

ESTADÍSTICOS	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Lote 4	
	s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_b=41.6$	$s_g=78.1$	$s_b=35.4$	$s_g=61.1$	$s_b=108.2$	$s_g=142.9$	$s_b=85.0$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{calc} = 3.51$ $F_{3,2} (crítico) = 39.17$		$F_{calc} = 2.99$ $F_{2,1} (crítico) = 799.5$		$F_{calc} = 1.75$ $F_{2,2} (crítico) = 39.00$		$F_{calc} = 3$ $F_{2,2} (crítico) = 39.00$	
S_p (ec. 4B, § 4B.1.4.1)	65.9		53.9		126.8		120.3	
grados libertad (ec. 6B, § 4B.1.4.3)	5		3		4		4	
Prueba t (unilateral) (ec. 5B, § 4B.1.4.2)	$t_{calc} = 3.39$ $t_{(v=5)} = 2.02$		$t_{calc} = 3.62$ $t_{(v=3)} = 2.35$		$t_{calc} = 4.57$ $t_{(v=4)} = 2.13$		$t_{calc} = 5.16$ $t_{(v=4)} = 2.13$	

Pese a que la señal de hibridación es significativa para cualquier valor de anticuerpo conjugado con enzima, cabe destacar que, como se observa en la Figura 7.4, hasta una cantidad de 11.8 μg de anticuerpo se observa un aumento de la señal de hibridación y de la relación S/R.

En la Figura 7.5 se muestra como se modifica la relación S/R con el aumento de la cantidad de anticuerpo conjugado con enzima. La relación S/R se calcula mediante el cociente entre el valor medio de la señal de los genosensores y de los blancos. Se puede observar que hasta el nivel de antiDIG-HRP de 11.8 μg este parámetro aumenta, mientras que por encima de este valor la relación S/R disminuye.

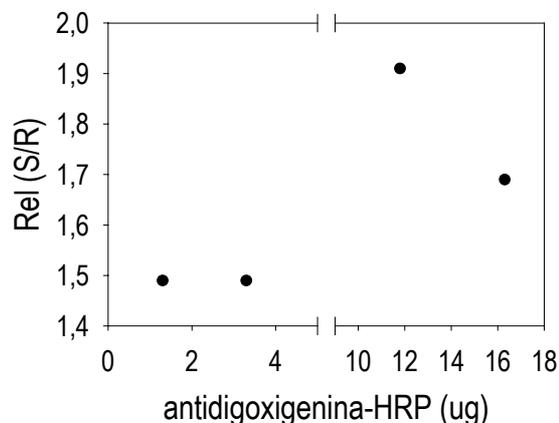


Figura 7.5. Relación entre el aumento de la concentración de antiDIG-HRP y el parámetro S/R.

Una mayor relación S/R implica que existe una mayor proporción de reacción inmunológica con el híbrido funcionalizado respecto al fenómeno de adsorción inespecífica, hecho que ocurre hasta un nivel aproximado de 11.8 μg .

Sin embargo, a partir de esta cantidad de anticuerpo, la señal amperométrica aumenta de manera lineal tanto en el sensor blanco como en el genosensor o, dicho de otra manera, la señal de hibridación permanece constante, tal como se muestra en la Figura 7.6. En la misma se muestra sólo la señal de hibridación de los genosensores con distintas cantidades de antiDIG-HRP, obtenida mediante la siguiente expresión:

$$\text{Señal de hibridación} = \bar{x} I_{\text{máx}} \text{ genosensor} - \bar{x} I_{\text{máx}} \text{ blanco}$$

El error de las barras representa la desviación estándar de la diferencia de los valores medios de los genosensores y de los blancos para cada lote (ec. 11, § 4B.2.1).

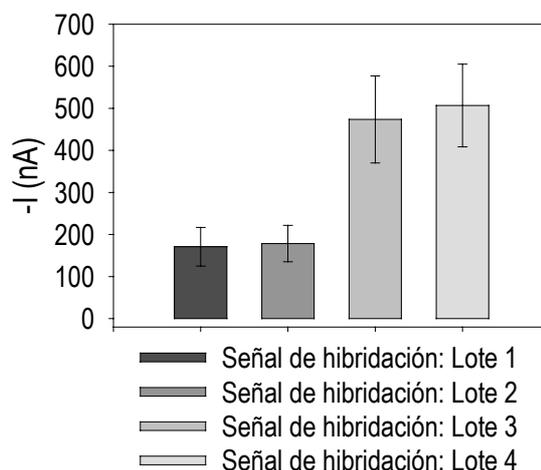


Figura 7.6. Comparación de la señal de hibridación de los genosensores en formato de reconocimiento múltiple con un nuevo sistema de marcación enzimática basada en una reacción inmunológica. Las condiciones experimentales son las que se muestran en la Figura 7.4.

Así, y a partir de una cantidad de anticuerpo marcado de 11.8 μg , los híbridos formados en la membrana se saturarían y la señal del genosensor aumentaría a expensas del aumento de la adsorción inespecífica del anticuerpo conjugado antiDIG-HRP más que por su reacción con los híbridos funcionalizados.

Pese a que el sistema de marcación inmunológico parece funcionar correctamente, si se comparan los valores de relación S/R óptimos (o cerca del óptimo) para los sistemas basados en la reacción inmunológica respecto a los obtenidos con la reacción biotina-estreptavidina (§ 6.3.1), en el primer caso son sensiblemente menores (1.9 vs 2.5 respectivamente, para este formato dot-blot de reconocimiento múltiple).

La relación S/R puede disminuir por un aumento del denominador de dicho cociente (es decir, de la adsorción inespecífica) o por la disminución del numerador (es decir, de la señal debida a la hibridación).

Como se están utilizando las mismas cantidades de DNA implicado en la hibridación para ambos casos (§§ 6.2.5.4 y 7.2.5.4), es lógico pensar que en este nuevo sistema de marcación inmunológica la relación S/R disminuye respecto al sistema de marcación basado en el sistema biotina-estreptavidina por un aumento de la adsorción inespecífica sobre la membrana de nylon.

7.4 CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un nuevo dispositivo genosensor amperométrico en formato dot-blot de reconocimiento múltiple, con un sistema de marcación enzimática basada en una reacción inmunológica.
2. La desviación estándar relativa es menor (del orden del 12 %) si se utiliza este sistema de marcación inmunológica respecto al formato dot-blot de reconocimiento múltiple que utiliza la marcación biotina-estreptavidina (con desviaciones estándar relativas del orden del 17 %).
3. La cantidad de anticuerpo conjugado con enzima que se encuentra como óptimo para el formato dot-blot de reconocimiento múltiple es de 11.8 μg , para estas condiciones experimentales.
4. Se observa una mayor adsorción inespecífica del anticuerpo conjugado con HRP sobre la membrana de nylon que del conjugado HRP-estreptavidina.
5. Este nuevo sistema de marcación desarrollado permite una mayor versatilidad, ya que si existe una interferencia por la biotina se puede utilizar la funcionalización con digoxigenina.
6. Con este nuevo sistema de marcación inmunológica se observa también que la adsorción inespecífica es controlada y reproducible. Puede evitarse el hecho de preparar "ensayos blanco" para evaluarla si esta señal se mantiene, su magnitud es conocida y no se cambia de producto comercial de antiDIG-HRP.

7.5 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Marta Santandreu i Vilajosana. *Tesis Doctoral*. Universitat Autònoma de Barcelona, 1998.
- ² Silvia Solé. *Tesis Doctoral*. Universitat Autònoma de Barcelona, 2000.
- ³ H. Kohsaka, A. Taniguchi, D. D. Richman, D. A. Carson. *Nucleic Acids Res.* 1993, 21, 3469-3472.
- ⁴ A. K. Lockley, C. G. Jones, J. S. Bruce, S. J. Franklin, R. G. Bardsley. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 1313-1314.
- ⁵ S. A. Khan, M. S. Nawaz, A. A. Khan, C. E. Cerniglia. *Mol. Cell. Probes* 1999, 13, 233-237.
- ⁶ D. J. Stone, J. Walsh, F. M. Benes. *Mol. Brain Res.* 1999, 71, 201-209.
- ⁷ E. Basyuk, E. Bertrand, L. Journot. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, e46.
- ⁸ K. B. Register, R. M. Lee, C. Thomson. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 3342-3346.
- ⁹ M. Solanas, R. Moral, E. Escrich. *Biotechnol. Lett.* 2001, 23, 263-266.
- ¹⁰ C. M. Elie, T. J. Lott, E. Reiss, C. J. Morrison. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 3260-3265.
- ¹¹ K. Povlsen, J. S. Jensen, I. Lind. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 3211-3216.
- ¹² T. Cherian, M. K. Latitha, A. Manoharan, K. Thomas, R. H. Yolken, M. C. Steinhoff. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 3605-3608.
- ¹³ H. De Beenhouwer, Z. Liang, P. de Rijk, C. van Eekeren, F. Portaels. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 2994-2998.
- ¹⁴ E. Luneberg, J. S. Jensen, M. Frosch. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 31, 1088-1094.
- ¹⁵ C. A. Jantos, R. Roggendorf, F. N. Wuppermann, J. H. Hegemann. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 1890-1894.
- ¹⁶ A. Lishanski, N. Kurn, E. F. Ullman. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, e42.
- ¹⁷ K. C. Reed, D. A. Mann. *Nucleic Acids Res.* 1985, 13, 7207-7221.
- ¹⁸ R. K. Saiki, P. S. Walsh, C. H. Levenson, H. A. Erlich. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 6230-6234.
- ¹⁹ L. J. Kricka. *Nonisotopic DNA Probe Techniques*; Academic Press, Inc.: San Diego, 1992.
- ²⁰ G. M. Church, W. Gilbert. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 1991-1995.
- ²¹ J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2th ed.*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989.
- ²² J. Meinkoth, G. Wahl. *Anal. Biochem.* 1984, 138, 267-284.
- ²³ T. R. Gingeras, D. Y. Kwok, G. R. Davis. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 5373-5390.
- ²⁴ M. Renz, C. Kurz. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 3435-3444.
- ²⁵ L. Singh, K. W. Jones. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 5627-2638.
- ²⁶ L. T. Kirby. *DNA Fingerprinting*; Stockton Press: New York, 1990.
- ²⁷ A. C. Syvanen, M. Laaksonen, H. Soderlund. *Nucleic Acids Res.* 1986, 14, 5037-5048.
- ²⁸ S. F. Wolf, L. Haines, J. Fisch, J. N. Kremsky, J. P. Dougherty, K. Jacobs. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 2911-2926.

APLICACIÓN DEL GENOSENSOR AMPEROMÉTRICO DE MEMBRANAS RECAMBIABLES EN FORMATO DOT-BLOT A UNA MUESTRA REAL

DETERMINACIÓN DE *SALMONELLA* sp

8.1 INTRODUCCIÓN

Las salmonelas son bacterias gramnegativas, móviles y no esporuladas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Existen sólo tres especies: *Salmonella typhi*, *S. cholerae-suis* y *S. enteritidis*. Casi todas son patógenas tanto para los hombres como para los animales, pero algunos serotipos muestran determinada preferencia de huésped y, en concreto, *S. typhi* sólo produce patología en el ser humano. Tanto la *S. typhi* como la *S. cholerae-suis* constan de un solo serotipo; en cambio, la *S. enteritidis* posee más de 1700. Aunque la designación correcta de los serotipos debería hacerse refiriendo primero la especie y luego la caracterización de cada uno de acuerdo con su composición antigénica, en la práctica se las denomina como si fueran especies, y así se habla de la *S. thyphimurium*, *S. newport*, etc.

Originan los siguientes tipos de síndromes clínicos: a) síndrome tifoparatífico; b) síndrome gastroenterítico o salmonelosis gastroentérica; c) bacteriemia; y d) infecciones localizadas, que pueden mostrar localizaciones muy variadas ¹.

Otro problema asociado a las salmonelas se refiere a la incidencia que las mismas tienen en contaminación alimentaria. *Salmonella typhimurium* y *S. enteritidis* son los patógenos más frecuentemente asociados a brotes de contaminación de alimentos tales como leche en polvo, quesos, huevos y derivados, entre otros ², que afecta la seguridad alimentaria de los consumidores.

La aparición cada vez más frecuente de brotes de contaminaciones alimentarias, algunas causantes de infecciones mortales, ha llevado al desarrollo de numerosas técnicas de diagnóstico,

cada vez con ventajas adicionales respecto a las precedentes en términos de rapidez, sensibilidad, especificidad, bajo costo y facilidad en el uso ³.

Las técnicas microbiológicas clásicas basadas en el cultivo bacteriano para la detección de las salmonelas requieren 3 a 4 días para la obtención de un resultado presuntivo y 1 o 2 días más para la confirmación bioquímica.

Requieren los siguientes pasos ⁴:

- toma de muestra
- preenriquecimiento
- enriquecimiento selectivo
- cultivo selectivo en placas
- pruebas bioquímicas
- investigación serológica

La recuperación de *Salmonella* sp de los alimentos es difícil, ya que se requiere detectar muy pocos organismos en una gran cantidad de producto. De ahí la importancia de una buena toma de muestra.

El preenriquecimiento es el paso inicial durante el cual la muestra se cultiva en un medio no selectivo para restablecer las células dañadas a condiciones fisiológicas estables. Los medios más utilizados son agua de peptona tamponada o caldo de lactosa. Este paso se realiza usualmente durante 16 a 20 horas a 37 °C.

En el paso de enriquecimiento selectivo la muestra se cultiva adicionalmente en un medio promotor del crecimiento que contiene agentes inhibidores selectivos. Estos medios permiten el continuo aumento de las salmonelas mientras que simultáneamente restringen la proliferación de la gran mayoría de bacterias. Los cultivos de las muestras previamente preenriquecidos se inoculan en dos medios selectivos, usualmente caldo de cistina-manitol-selenito (la cistina incrementa el crecimiento de las salmonelas, mientras que el selenito inhibe el crecimiento de la flora acompañante), y medio Rappaport-Vassiliadis (que posee como agentes inhibidores verde de malaquita y MgCl₂). Este paso se realiza a 37 y 42 °C respectivamente durante 24 horas.

Durante el paso de cultivo selectivo en placas se utilizan medios selectivos sólidos que restringen el crecimiento de cualquier bacteria excepto el de las salmonelas. Estos medios también son diferenciales, ya que las colonias de *Salmonella* aparecen con características distintivas. Los medios más utilizados son agar xilosa-lisina-desoxicolato y agar bismuto-sulfito (medio Wilson & Blair modificado).

. Para una recuperación más amplia de las salmonelas es necesario, luego del enriquecimiento selectivo, repicar en más de un medio (estos dos suelen ser óptimos), e incubar a 37 °C por 24-48 horas, para detectar la presencia-ausencia de colonias presuntivas de las *Salmonella* ².

Las colonias presuntivamente de *Salmonella* finalmente se confirman y se clasifican tentativamente en especies mediante métodos bioquímicos. Las pruebas bioquímicas más utilizadas para la identificación de colonias de *Salmonella* son: TSI (triple azúcar hierro, que caracteriza el patrón de fermentación de azúcares), LI (lisina hierro), junto con las pruebas de la ureasa y del indol.

Para la clasificación en serotipos se utilizan métodos serológicos. Estos métodos sí dan una identificación específica de las colonias y se basan en el análisis de los antígenos somáticos (O) y flagelares (H). Usualmente se realizan por métodos de aglutinación.

El desarrollo reciente de metodologías inmunológicas ha permitido la creación de inmunoensayos comercialmente disponibles tales como ⁴:

- ensayos de aglutinación en látex: Oxoid *Salmonella* Latex Test; MicroScreen®, Spectate®, Bactigen®
- ELISAs (del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*): Assurance®, *Salmonella*Tek.
- inmunodifusión: *Salmonella* 1-2 Test™.
- Inmunoseparación –que elimina el paso de enriquecimiento selectivo–: Tecra®Unique™ *Salmonella*, Path-Stik.

La especificidad de estos métodos inmunológicos depende de la eliminación de reactividad cruzada de los anticuerpos utilizados en los *kits* diagnósticos.

Más recientemente, se han desarrollado ensayos basados en el análisis del genoma bacteriano basados en sondas de DNA y en la hibridación con el analito. Hasta hace poco, el mayor inconveniente de las metodologías en las que se utilizaban sondas de DNA para la detección de una secuencia génica consistía en que los genes de interés debían haber sido clonados y/o secuenciados. Sin embargo, los avances obtenidos en los métodos de secuenciación clásicos y basados en chips de DNA (§ 1.3.1) hacen que en la actualidad la secuenciación no sea un problema y se realice con mayor eficiencia y rapidez. Por ejemplo, se ha presentado el genoma completo de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* LT2 ⁵.

La utilización de sondas génicas se asocia con la necesidad de cultivar las bacterias hasta la obtención de un nivel detectable. Las metodologías que impliquen hibridación requieren, al menos, la presencia de 10⁵-10⁶ bacterias en la muestra para obtener una señal positiva. Por lo tanto, las metodologías basadas en la hibridación no tienen la sensibilidad suficiente para detectar directamente las *Salmonella* en una muestra sin un paso previo de preenriquecimiento.

La aparición de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se ha convertido en una herramienta importante para la microbiología de los alimentos, ya que amplifica el material genético *in vitro*, suplantando el paso de preenriquecimiento selectivo *in vivo*. El mayor obstáculo en el uso de la PCR para la detección de microorganismos desde fuentes ambientales, alimentos o muestras clínicas es la presencia de compuestos que inhiben la PCR. Así, antes de la PCR es necesario realizar una extracción del DNA.

Han sido descritas en la bibliografía numerosos pares de *primers* para la amplificación por PCR de diferentes secuencias genéticas de *Salmonella* con diferentes métodos de identificación del amplicón obtenido ^{3,4,6-20}.

La secuencia de inserción IS200 es un elemento transposable de aproximadamente 700 pb ²¹⁻²⁴. Un estudio de la presencia de IS200 entre las bacterias entéricas revela que más del 90 % de los aislamientos de *Salmonella* sp examinados contiene una o más copias de la secuencia de inserción IS200 (véase Tabla 8.1), con la excepción del subgénero I serotipo *S. agona* en la cual IS200 no se encuentra presente. Aunque la secuencia de inserción IS200 primero se consideró un elemento específico de las *Salmonella*, también existe en algunos aislamientos de *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri*, pero no en *Shigella dysenteriae*.

Con fines prácticos, IS200 puede ser utilizado para una identificación de aislamientos clínicos con elevada exactitud (más del 90 % de los aislamientos clasificados como *Salmonella* según otros criterios poseen esta secuencia). Como la secuencia IS200 se encuentra en algunas cepas de

Shigella, para una identificación certera se podría utilizar una segunda sonda (IS630) que existe en *Shigella* pero no en *Salmonella* ²³. La secuencia IS200 ha sido utilizada en numerosos trabajos para la caracterización de *Salmonella* sp ²⁵⁻³⁴.

Tabla 8.1. Distribución de la secuencia de inserción IS200 entre aislamientos naturales de *Salmonella*. *X (Y): X es el número de copias de la secuencia, mientras que Y es el número de aislamientos que llevan esa cantidad de copias ²³.

Organismo	Nº de aislamientos probados	Nº de copias de IS200*
<i>S. typhimurium</i>	25	1 (1), 4 (3), 6 (6), 7 (3), 10 (5), 11 (5), 12 (2)
<i>S. typhi</i>	15	10 (2), 14 (3), 15 (1), 17 (4), 20 (4), 25 (1)
<i>S. paratyphi A</i>	5	4 (1), 6 (1), 11 (3)
<i>S. schottmuelleri</i>	5	2 (3), 6 (1), 7 (1)
<i>S. enteritidis</i>	18	1 (8), 2 (1), 3 (6), 4 (3)
<i>S. hirschfeldii</i>	2	4 (1), 8 (1)
<i>S. pullorum</i>	2	2 (2)
<i>S. arizonae</i>	26	0 (3), 2 (4), 7 (7), 8 (1), 9 (2), 10 (1), 12 (3), 13 (1), 14 (4)
<i>S. choleraesuis</i>	2	2 (2)
<i>S. gallinarum</i>	6	1 (1), 2 (2), 4 (3)
<i>S. abony</i>	1	2 (1)
<i>S. azteca</i>	1	1 (1)
<i>S. derby</i>	2	5 (2)
<i>S. essen</i>	1	3 (1)
<i>S. fyris</i>	1	2 (1)
<i>S. grampian</i>	1	4 (1)
<i>S. kentucky</i>	1	11 (1)
<i>S. montevideo</i>	4	2 (1), 3 (3)
<i>S. panama</i>	2	3 (1), 5 (1)
<i>S. tilburg</i>	2	2 (2)
<i>S. salamae</i>	2	4 (2)
<i>S. virchow</i>	2	1 (1), 2 (1)
<i>S. agona</i>	14	0 (14)
<i>S. houtenae</i>	2	3 (2)

En el trabajo presentado en este capítulo se describe el desarrollo de un método rápido de detección de *Salmonella* sp mediante la utilización de PCR y de un genosensor amperométrico de membrana recambiable.

Este nuevo método requiere los siguientes pasos:

- extracción del DNA cromosómico,
- amplificación por PCR de la secuencia IS200, y
- detección del amplicón obtenido por PCR mediante un genosensor amperométrico de membranas recambiables.

Se ha seleccionado un formato dot-blot de reconocimiento simple por ser el procedimiento de análisis más sencillo y económico de los previamente desarrollados en el presente trabajo. Se escogió la hibridación mediante una única sonda funcionalizada –frente a la utilización de dos sondas biotiniladas, como ocurre en el formato de reconocimiento doble– porque la especificidad total del

procedimiento depende del reconocimiento de tres secuencias distintas. Estos tres reconocimientos están determinados por el uso de los dos oligonucleótidos *primers* (de 23 mer cada uno) durante la amplificación por PCR de la secuencia IS200 y por la utilización de la sonda biotinilada (de 30 mer) durante la hibridación del amplicón en el genosensor de membranas recambiables. Así, en total se reconocen 76 bases nitrogenadas de la secuencia IS200.

Además, cabe destacar que la secuencia de interés analítico se amplifica hasta niveles superiores al límite de detección del genosensor en formato dot-blot de reconocimiento simple.

8.2 EXPERIMENTAL

8.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS

8.2.1.1 Equipamiento

Las medidas amperométricas se realizaron con la misma instrumentación analítica y electrodos descritos en § 2.2.2.

Las incubaciones a temperatura controlada se realizaron en el eppendorf Thermomixer modelo 5436.

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler 480.

Las liofilizaciones se realizaron en Speed Vac DNA 110 Savant. Las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas Biorad, y las bandas se visualizaron en un transiluminador UVP.

8.2.1.2 Reactivos y materiales

Los composites se prepararon con grafito en polvo de tamaño de partícula de 50 μm (BDH), resina epoxi Epo-Tek H77 (Epoxy Technology, USA).

Las membranas de nylon integradas al composite grafito-epoxi fueron HYBOND™ N(+) (Amersham) ³⁵.

Los pulidos de las superficies de los composites se realizaron con papel de alúmina de 3 μm (polishing strips 301044-001, Orion).

Los calibrados se realizaron con peróxido de hidrógeno (Merck) y se utilizó como mediador hidroquinona (Sigma).

La enzima utilizada fue el conjugado estreptavidina-peroxidasa (HRP, 1.11.1.7) (Roche Molecular Biochemicals). La estreptavidina del conjugado se obtiene de *Streptomyces avidinii*, que se conjuga a β -peroxidasa de rábano picante utilizando el método del periodato.

La cepa utilizada para este estudio es *Salmonella* ATCC 15038 (*wild type*).

La secuencia IS200 –obtenida del banco de genes NCBI (National Center for Biotechnology Information)– es la que se describe en la Figura 8.1.

```

1      CTTAATAAG GCATGAGTGT GTCCTCTGGG CGGGTCCCCT GCGGCCCTTT GTCTATGGAA
61     AACCCCAGC TAGGCTGGGG GTTCCGGAAA GCTTTCAGCT TTAAGCCAGT TATTA AACCC
121    CCTTTTGATT TGTTAAAACA TCTTGCGGTC TGGCAACTGC AAAAGTTCAA CAAGAAATCA
181    AAAGGGGGTC CCAATGGGGG ACGAAAAGAG CTTAGCGCAC ACCCGATGGA ACTGTAAATA
241    TCACATAGTT TTCGCGCCCA AATACCGAAG ACAAGCGTTC TATGGAGAGA AGCGTAGGGC
301    AGTAGGCAGC ATATTAAGAA AATTGTGTGA ATGGAAAAAC GTACGAATTC TGGGAAGCAGA
361    ATGTTGTGCA GATCATATTC ACATGCTTCT GGAGATCCCG CCGAAGATGA GTGTGTCGAG
421    TTTCATGGGA TATCTGAAGG GTAAAAGTAG TCTGATGCTT TACGAGCAGT TTGGGGATCT
481    AAAATTCAAA TACAGGAACA GGGAGTCTG GTGCAGAGGG TACTATGTCG ATACGGTGGG
541    TAAGAACACG GCGAAGATAC AGGACTACAT AAAGCACCAG CTTGAAGAGG ATAAATGGG
601    TGAGCAATTA TCGATCCCGT ATCCGGGCAG CCCGTTTACG GGCCGTAAGT AACGAAGTTT
661    GATGCAAATG TCAGATCGTA TGCGCCTGTT AGGGCCGCGC TGGTAAGAGA GCCTTATAGG
721    CGCATCTGAA AAACCTCCGG CTATGCCGGA GGATATTTAT TTATGCGCCG CTGGGCTTCG
781    CCATGGCATG AAAGGCTCGG GTGGGGCTAT TCTGGAACCT GT

```

Figura 8.1. Secuencia obtenida de la base de datos NCBI (Nº acepción AF AF025380), en la que se muestra la posición de los dos primers escogidos para la amplificación de parte de la secuencia IS200. El amplicón debe tener 229 pb. En la figura se muestra también la secuencia del amplicón que se escogió para identificar mediante el oligonucleótido biotinilado (en negrita)

Los primers para la amplificación de un fragmento de 229 bp de IS200 por PCR fueron encargados a GENSET SA (Francia), y su secuencia es:

- IS200UP
5'-ATG GGG GAC GAA AAG AGC TTA GC-3'
- IS200DOWN
5'-AAC TCG ACA CAC TCA TCT TCG GC-3'

Se encargó la síntesis de la siguiente sonda de DNA a MWG-BIOTECH (Alemania):

- Sonda complementaria al amplicón IS200.
Biotina 5'-TTT CTT AAT ATG CTG CCT ACT GCC CTA CGC-3'

Características del producto:

T_m = 66.8 ° C; GC = 46.7 %; cantidad de DNA: 22.5 OD, 710 µg, 75.0 nmol; P.M.: 9464 g/mol; purificación: HPSF (high purified salt free); longitud = 30 mer.

Las composiciones de las soluciones de prehibridación e hibridación seleccionadas fueron:

- Solución de prehibridación (Sigma): 10 X SSC, 10 X reactivo de Denhardt, 200 µg/ml de DNA de esperma de salmón (extraído con fenol y cloroformo).
- Solución de hibridación (Sigma): 10 X SSC, 2 X reactivo de Denhardt, 200 µg/ml de DNA de esperma de salmón (extraído con fenol y cloroformo).

La proteína BSA es de BDH. Otros reactivos utilizados tales como formamida, SDS, Tween 20 fueron adquiridos en Sigma.

Se agregaron 700 μl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se agitó vigorosamente por inversión. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos.

Se recuperó el sobrenadante acuoso y se procedió a su limpieza: tres veces con 700 μl de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1) (inversión y centrifugación para recuperar el sobrenadante acuoso) y una vez con 700 μl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1).

El DNA en fase acuosa se precipitó con 500 μl de isopropanol y se agitó hasta aparición de la telilla blanca (DNA cromosómico). Se centrifugó durante 5 minutos a 14000 rpm. Se aspiró el sobrenadante y se liofilizó (en este punto, el DNA cromosómico se puede conservar en la nevera).

Cuando se quiera utilizar, se agregan 100 μl de agua MiliQ y se incuba a 37 °C hasta disolución.

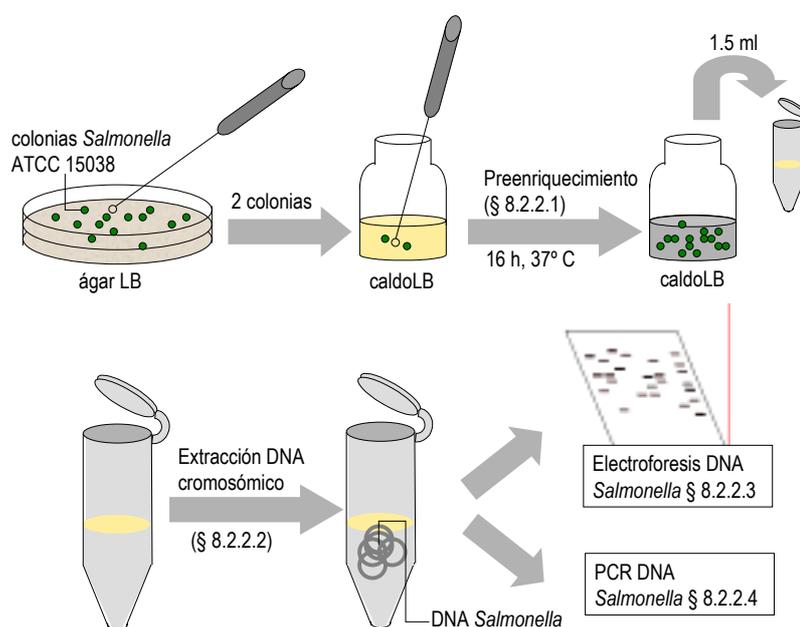


Figura 8.2. Pasos implicados en el procedimiento de amplificación de la secuencia génica IS200.

8.2.2.3 Electroforesis del DNA cromosómico

Este paso se realiza para verificar si la extracción del DNA ha sido exitosa y para comprobar su estado y su concentración aproximada, para la realización posterior de la PCR.

Para tal fin, se tomó 1 μl de DNA cromosómico y se adicionó 9 μl de solución transportadora 1 X.

Se prepara la agarosa para la placa al 0.4 % p/v en buffer TAE con una concentración de bromuro de etidio de 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Se realizó la electroforesis utilizando TAE como solución portadora.

Las bandas de DNA se observaron con un transiluminador UV.

8.2.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La Figura 8.3 muestra esquemáticamente el procedimiento de amplificación de la secuencia IS200 por PCR.

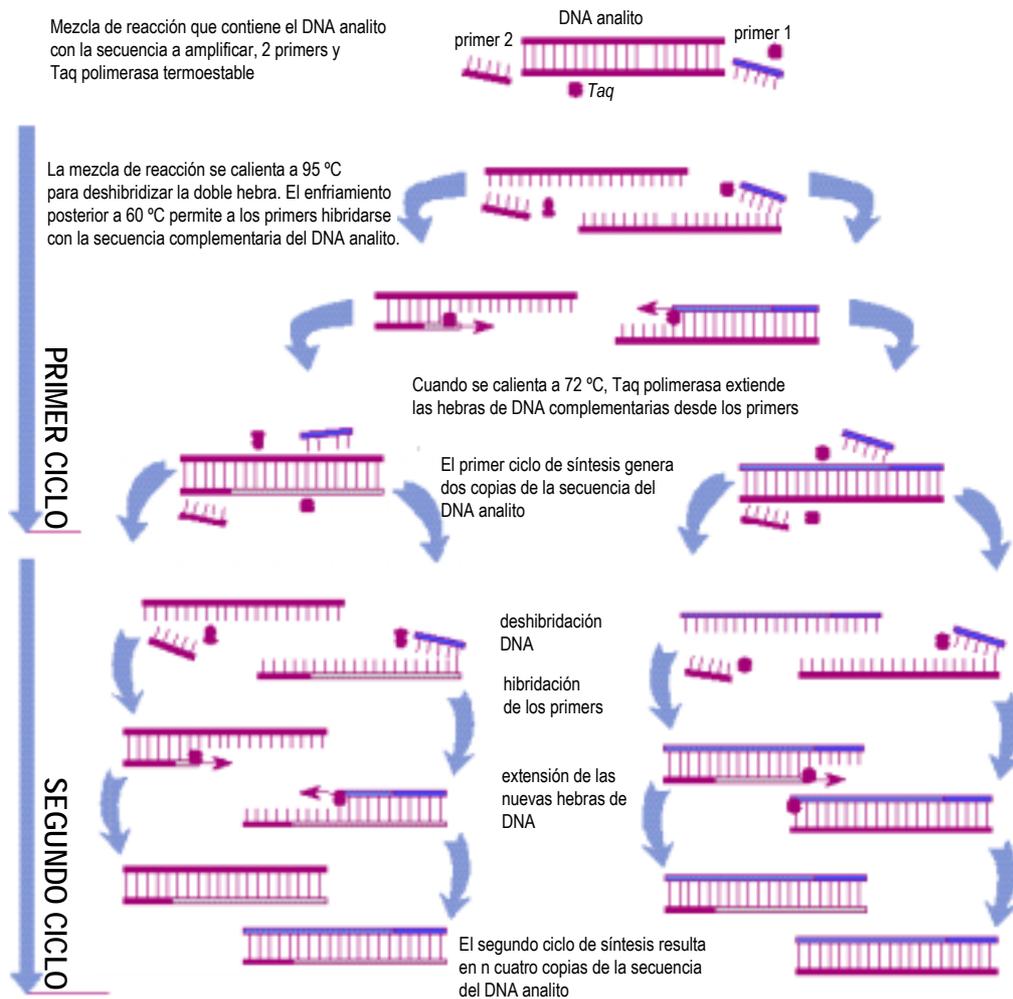


Figura 8.3. Procedimiento de amplificación de la secuencia génica IS200 mediante PCR.

La amplificación fue llevada a cabo con el *kit* Expand High Fidelity PCR System de Roche Biochemicals Diagnostics, en un volumen final de 25 μ l, con buffer Expand HF, con 1.5 mM MgCl₂, 0.500 μ M de cada primer, 2.6 U de mezcla enzimática, 200 μ M de dATP, dGTP, dCTP, dTTP, y un volumen en μ l de resuspensión de DNA cromosómico (que contenga aproximadamente 400 ng).

Cada amplificación fue realizada con un blanco, el cual contenía todos los reactivos excepto el DNA target.

Las mezclas de amplificación fueron sometidas a 1 ciclo inicial de 2 min a 95 °C (deshidratación inicial del DNA target); 30 ciclos de: 1 minuto a 95 °C (deshidratación), 1 minuto a 60 °C (hibridación con el primer) y 2 minutos a 72 °C (elongación); y un ciclo final de 7 minutos a 72 °C.

8.2.2.5 Electroforesis del amplicón

El producto de la amplificación fue evaluado por electroforesis en gel de agarosa al 3 % en solución TAE con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) y fotografiado en un transiluminador de luz UV. Al

mismo tiempo se realizó la electroforesis del marcador de peso molecular Φ X174 DNA/*Hinf I* Markers (0.1 μ g/ μ l). El marcador se obtiene por digestión completa del gen Φ X174 con la enzima de restricción *Hinf I*. Los 20 fragmentos obtenidos se encuentran entre los 24 y 726 pb.

8.2.2.6 Purificación de la banda obtenida

Se cortó la banda de agarosa y se colocó en un eppendorf con dos volúmenes (respecto al peso de la banda) de NaI 6M y se realizó una digestión a 55 °C hasta que la agarosa se disolvió completamente. Se agregó 1 ml de resina Wizard® PCR Preps (tierras diatomeas) para la purificación del DNA. Se dejó en reposo durante 5 minutos.

El producto se pasó por una minicolumna Wizard®, se lavó la columna con isopropanol 80 %, se centrifugó 2 minutos y se eliminó completamente el isopropanol.

Se agregó a la columna 20 μ l de agua milliQ a 60 °C, se dejó reposar 2 minutos, y se centrifugó. En este punto se recuperó el sobrenadante acuoso, que contiene el amplicón purificado.

Se realiza una electroforesis con 1 μ l de amplicón purificado para comprobar que se ha recuperado la banda purificada.

8.2.2.7 Preparación del amplicón purificado para su utilización en el genosensor amperométrico de membranas recambiables

Se tomó un volumen del resto del amplicón purificado y se agregó un volumen idéntico de 20 X SSC, de manera que el DNA se diluyó al medio en una solución de 10 X SSC. Esta solución se calentó a 95 °C durante 5 minutos³⁶. Este tratamiento provoca la deshibridación de la doble hebra del amplicón de manera que se genera ssDNA capaz de hibridarse con el oligonucleótido biotinilado. Luego del calentamiento, se colocó esta solución inmediatamente en hielo. Este enfriamiento rápido permite que las secuencias queden como ssDNA.

En este punto el amplicón está listo para ser inmovilizado en las membranas de nylon HYBOND™.

8.2.3 MODIFICACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE NYLON HYBOND™: HIBRIDACIÓN Y MARCACIÓN

Las membranas de nylon se prepararon mediante un protocolo que constó de 4 pasos:

- 1.- Inmovilización del amplicón en la membrana de nylon HYBOND™.
- 2.- Tratamiento de prehibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el amplicón (bloqueo de los sitios libres de la membrana).
- 3.- Hibridación del amplicón soportado de las membranas de nylon HYBOND™ utilizando un oligonucleótido biotinilado complementario al amplicón de la secuencia IS200.
- 4.- Marcación enzimática posthibridación de los híbridos formados en la membrana.

Una vez preparadas, las membranas se integraron al transductor y, posteriormente, se las procedió a evaluar amperométricamente. En las secciones siguientes se trata cada uno de estos pasos.

8.2.3.1 Inmovilización del amplicón en la membrana de nylon HYBOND™

En § 4.2.3.1, se describen las distintas metodologías de inmovilización sobre una membrana de nylon ³⁵⁻³⁹. En el presente capítulo, al igual que en el formato desarrollado en el capítulo 4, se utiliza también la inmovilización por calor seco ^{35,36,40,41}.

La preparación del DNA que será inmovilizado, en este caso el amplicón, se realiza según se ha explicado en § 8.2.2.7.

El protocolo de inmovilización del amplicón en las membranas de nylon fue el siguiente:

- 1.- Se prehumedecen las membranas de nylon en 10 X SSC.
- 2.- Se agregan 2 µl (de la solución final obtenida del procedimiento de preparación del DNA, § 8.2.2.7) sobre las membranas de nylon prehumedecidas. Para cada nueva adición, se espera que la alícuota anterior se seque completamente a temperatura ambiente. Se repite tantas veces como amplicón se desee inmovilizar.
- 3.- Se humedecen las membranas con solución deshibridizante durante 5 min. Este procedimiento facilita la ruptura de los puentes de hidrógeno, asegurando que todo el material genético se encuentre como ssDNA y sea susceptible a hibridarse con su secuencia complementaria.
- 4.- Se transfieren las membranas a solución neutralizadora por 1 minuto.
- 5.- Se colocan las membranas sobre papel absorbente durante 30 minutos.
- 6.- Se procede a la fijación del DNA al soporte. Se envuelven las membranas con papel de filtro y se transfieren a una estufa, a 80 °C durante 2 horas.

Si no van a ser utilizadas inmediatamente, en este punto las membranas modificadas pueden conservarse envueltas en papel de aluminio a 4 ° C (§ 6.3.2).

8.2.3.2 Tratamiento de prehibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el amplicón

El objetivo del tratamiento de prehibridación consiste en la utilización de moléculas de alto peso molecular para bloquear los sitios libres de la membrana de nylon, de manera de favorecer la hibridación y no la adsorción inespecífica de la sonda que lleva la biotina. En § 4.2.4 se discuten en detalle y se seleccionan las variables del tratamiento de prehibridación, tales como:

- tipo de solución de prehibridación: reactivos bloqueantes ^{35,36,38,40-44} uso de formamida ^{36,38,40,42,44} y SDS ^{35,36,40-45}.
- temperatura y tiempo del tratamiento de prehibridación ^{36, 38, 44}.
- agitación durante el tratamiento de prehibridación ^{35,36, 46}.
- volumen utilizado durante el tratamiento de prehibridación ^{36,44}.

En el presente capítulo se utilizó la misma solución de prehibridación que en § 4.2.4.2, cuya composición final fue:

- 5 X SSC;
- 5 X de reactivo de Denhardt;
- 100 µg/ml de DNA de espermatozoos de salmón fragmentado y desnaturalizado;

0.5 % p/v de SDS;
50 % v/v de formamida.

Las variables utilizadas en el tratamiento de prehibridación fueron:

- temperatura y tiempo del tratamiento de prehibridación: 42 °C, 4 h.
- agitación durante el tratamiento de prehibridación: suave.
- volumen utilizado durante el tratamiento de prehibridación: 450 µl.

El protocolo del tratamiento de prehibridación de las membranas de nylon HYBOND™ fue el mismo que el utilizado en § 4.2.4.6, y consistió en:

- 1.- Se colocan las membranas, luego de la fijación del ssDNA (véase protocolo de inmovilización, § 8.2.3.1), en tubos eppendorf con la cara en la que ha sido adsorbido el DNA del lado de la luz del tubo de manera que quede en contacto con la solución.
- 2.- Se agregan 450 µl de solución de prehibridación.
- 3.- Se colocan los tubos eppendorf en el incubador, con agitación suave y a 42 ° C, durante 4 h.

8.2.3.3 Hibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el amplicón

Este es el paso más importante del procedimiento de construcción del sensor, ya que en este punto ocurre la hibridación de la sonda funcionalizada con biotina y el amplicón IS200 inmovilizado en la membrana. En § 4.2.5 se discuten en detalle y se seleccionan las variables del procedimiento de hibridación, tales como:

- tipo de solución de hibridación: reactivos bloqueantes ^{35,36,38,40-44}, uso de formamida ^{36,38,40,42,44} y SDS ^{36,40-45}, fuerza iónica ^{38,40}, uso de dextranos ^{40,41,43} o polietilenglicol ^{38,42,45}.
- temperatura y tiempo de hibridación ^{36,38,44}.
- agitación durante la hibridación ^{35,36,46}.
- volumen de hibridación ^{36,44}.

En el presente capítulo se utiliza la misma solución de hibridación que en § 4.2.5.2, cuya composición final es:

5 X SSC;
1 X de reactivo de Denhardt;
100 µg/ml de DNA de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado;
0.5 % p/v de SDS;
50 % v/v de formamida.

Las variables utilizadas en el procedimiento de hibridación fueron:

- temperatura y tiempo de hibridación: 42 ° C, durante toda la noche.
- agitación durante la hibridación: suave.
- volumen de hibridación: 450 µl.

La preparación de la sonda funcionalizada con biotina se realizó como se describiera en § 4.2.5.7.

El protocolo de hibridación de las membranas de nylon HYBOND™ fue el mismo que el utilizado en § 4.2.5.8 y consistió en:

- 1.- Inmediatamente después del tratamiento de prehibridación (§ 8.2.3.2), se quita la solución de prehibridación de los tubos eppendorf, sin mover las membranas, y se agregan 450 µl de solución de hibridación, preparada según § 4.2.5.2.
- 2.- Se dejan los tubos eppendorf en el incubador con agitación suave y a 42 °C, durante 10 minutos (para que la solución de hibridación tome esta temperatura).
- 3.- Se adiciona un volumen (en µl) de sonda biotinilada en 5', complementaria a IS200.
- 4.- Se dejan las membranas en hibridación con agitación suave y a 42 °C, durante toda la noche.
- 5.- Luego de la hibridación, se procede a los lavados posthibridación de las membranas, de la siguiente manera:
 - 1.- 10 minutos, en 40 ml de 2 X SSC-0.1 % SDS, con agitación suave, a 20 °C
 - 2.- 10 minutos, en 40 ml de 0.2 X SSC-0.1 % SDS, con agitación suave, a 50 °C
 - 3.- Se remojan las membranas en 2 X SSC dos veces a 20 °C, para quitar el SDS.

8.2.3.4 Marcación enzimática posthibridación

Una vez formado el híbrido entre el producto de la PCR –el amplicón- y la sonda complementaria funcionalizada con biotina, éstos deben evidenciarse mediante su reacción con el conjugado estreptavidina-HRP. La peroxidasa es quien genera la señal analítica amperométrica luego de la reacción con el sustrato adecuado.

En § 4.2.6 se discuten en detalle y se seleccionan las variables del procedimiento de marcación enzimática, tales como:

- tipo de solución de marcación enzimática ³⁸
- temperatura y tiempo de premarcación con solución bloqueante ³⁸
- temperatura y tiempo de marcación ³⁸
- agitación durante la marcación ^{35, 36, 38, 46}
- volumen de marcación ^{36, 44}

En el presente capítulo se utilizó la misma solución bloqueante para la marcación enzimática que en § 4.2.6.2, cuya composición fue:

1 X PBS
 2 % p/v BSA
 0.1 % p/v Tween 20
 5 mM EDTA

Las variables utilizadas en el procedimiento de marcación enzimática fueron:

- temperatura y tiempo de premarcación con solución bloqueante: 37 °C, 30 min
- temperatura y tiempo de marcación: 37 °C, 1h

- agitación durante la premarcación y marcación enzimática: suave
- volumen de marcación enzimática: 450 μ l

La preparación del complejo estreptavidina-HRP se realizó de manera idéntica que en § 4.2.6.8.

El protocolo de marcación enzimática de las membranas de nylon HYBOND™ posthibridación para el formato dot-blot ha sido descrito en § 4.2.6.9. Consistió en:

- 1.- Inmediatamente después de la hibridación en el formato dot-blot (§ 8.2.3.3) y de los lavados de posthibridación, se colocan las membranas en los tubos eppendorf con la cara en la que se ha adsorbido el DNA hacia la luz del tubo, y se agregan 450 μ l de solución bloqueante.
- 2.- Se dejan los tubos eppendorf en el incubador con agitación suave y a 37 °C, durante 30 minutos (procedimiento de premarcación con solución bloqueante).
- 3.- Se adiciona un volumen (en μ l) de conjugado enzimático.
- 4.- Durante la marcación enzimática, se dejan las membranas en agitación suave y a 37 °C, durante 1 h.
- 5.- Luego de la marcación, se procede a los lavados postmarcación de las membranas, de la siguiente manera:
 - 1.- 10 minutos, en 40 ml de solución de lavado, con agitación suave, a 20 °C
 - 2.- Se repite 2 veces más

En este caso, se utilizó la misma solución de lavado que en § 4.2.6.7, de la siguiente composición:

- 10 mM fosfato potásico, pH 6.5
- 0.5 M NaCl
- 0.05 % p/v Tween 20
- 0.1 % p/v BSA
- 1 mM EDTA

La importancia de los lavados postmarcación enzimática se trata con detalle en § 4.2.6.7.

8.2.4 INTEGRACIÓN AL TRANSDUCTOR DE LAS MEMBRANAS MODIFICADAS

Una vez se preparan las membranas, están listas para incorporarse al transductor amperométrico. En § 2.3.5.1 se seleccionó como transductor el composite rígido grafito-epoxi. Para todas las determinaciones se utilizó el mismo sensor. Antes de integrar la membrana al transductor, éste fue sometido al procedimiento de pulido (§ 2.2.4.3), cuya reproducibilidad fue evaluada en § 2.3.5.4. Este procedimiento se repitió entre calibrados con el objeto de obtener superficies frescas ya que, en caso contrario, el transductor sufre de pasivación (§ 3.2.2.5).

El procedimiento de integración de las membranas modificadas al transductor grafito-epoxi fue el mismo que el descrito en § 6.2.3 y Figura 6.3, basado en un sistema de sujeción más robusto que el utilizado en capítulos anteriores.

8.2.5 EVALUACIÓN DE LOS GENOSENSORES

La señal analítica amperométrica está relacionada con la cantidad de enzima (HRP) que se haya unido a los híbridos de DNA preformados en las membranas. Así, en el formato dot-blot, éstos híbridos se forman entre el amplicón inmovilizado en la membrana y la sonda complementaria a la secuencia IS200 funcionalizada con biotina. Luego, la funcionalización de los híbridos con biotina se evidencia a través de la reacción con el conjugado estreptavidina-HRP.

La evaluación se llevó a cabo con el sistema amperométrico descrito en § 2.2.2. La celda de medida fue una solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0, utilizándose como electrodo de trabajo el genosensor construido en § 8.2.4. La concentración de hidroquinona en el medio fue de 1.8 mM. A este sistema, se le aplicó el potencial de reducción de la hidroquinona (-0.1 V, vs Ag/AgCl), que fuera optimizado en § 3.3.1.1.

Para la evaluación de los genosensores directamente se agregó una alícuota de sustrato enzimático (H_2O_2) al medio de calibración, tal que con una adición se consiga la saturación de la enzima (la concentración de sustrato empleada fue de 1.06 mM). De esta forma, la información analítica que se obtuvo fue correspondiente a la $I_{m\acute{a}x}$, la cual es proporcional a la actividad enzimática en la superficie del transductor. Los tiempos de respuesta fueron de 2 minutos, que es el tiempo de respuesta del sistema para la obtención de la lectura correspondiente a la $I_{m\acute{a}x}$.

8.2.6 OPTIMIZACIÓN DE LOS GENOSENSORES DE MEMBRANAS RECAMBIABLES PARA LA DETECCIÓN DEL AMPLICÓN IS200

Numerosísimas variables pueden optimizarse en este formato, aunque los efectos de algunas de estas variables fueron tratadas en apartados anteriores.

Las variables más importantes son:

- cantidad de amplicón inmovilizado en la membrana
- cantidad de sonda biotinilada en la solución de hibridación
- cantidad de conjugado estreptavidina-peroxidasa en la solución bloqueante durante la marcación enzimática

marcación enzimática

En cuanto a la cantidad de amplicón inmovilizado en la membrana, se ha utilizado la cantidad recuperada luego de la electroforesis (§ 8.2.2.6) (aproximadamente 10 pmoles).

La cantidad de sonda funcionalizada con biotina fue de 60 pmoles.

Por otro lado, como se ha utilizado el mismo conjugado enzimático que el optimizado en el capítulo 6, se han utilizado 0.49 μ g de HRP-estreptavidina.

Para evaluar la señal debida al amplicón, se prepararon en todos los casos un lote de membranas "blanco" para la evaluación de la adsorción inespecífica, y un lote de membranas "genosensoras" para evaluar la hibridación. Por cada lote se procesan normalmente tres membranas.

La adsorción inespecífica se utilizó para detectar la verdadera señal de fondo del dispositivo, ya que por diferencia entre la señal de las membranas “genosensoras” y las membranas “blanco”, se obtuvo la respuesta analítica debida al proceso de hibridación.

En los apartados siguientes se explica el protocolo de preparación de las membranas “genosensoras” y “blanco”.

En la Figura 8.4 se muestra esquemáticamente cada uno de los pasos involucrados en la preparación de los genosensores y el fundamento de la obtención de la señal analítica.

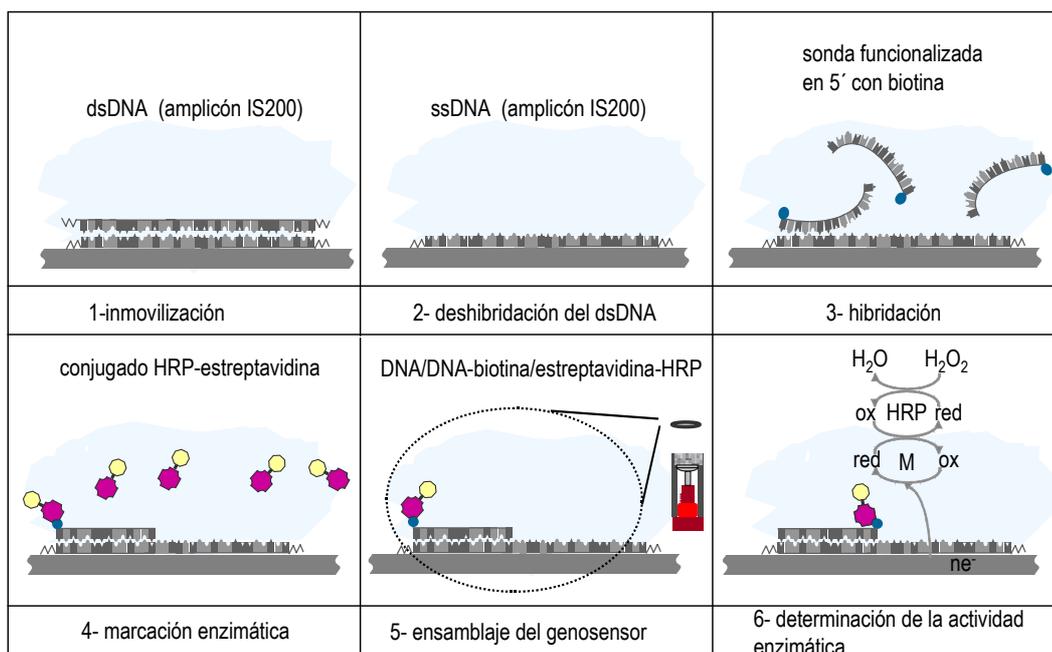


Figura 8.4. Representación esquemática del procedimiento experimental seguido en la preparación y evaluación de los genosensores para la determinación del amplicón IS200.

8.2.6.1 Protocolo de preparación de las membranas “genosensoras” en formato dot-blot

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización del amplicón, descrito en § 8.2.3.1.
- 2.- Se continúa con el tratamiento de prehibridación, descrito en § 8.2.3.2.
- 3.- Se sigue con el protocolo de hibridación en formato dot-blot descrito en § 8.2.3.3
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática descrito en § 8.2.3.4.

8.2.6.2 Protocolo de preparación de las membranas “blanco” en formato dot-blot

Este lote se realizó de manera idéntica al de las membranas “genosensoras” (§ 8.2.6.1), pero obviando el paso de adición del amplicón IS200, es decir, no hay analito sobre la membrana.

Como el resto de los reactivos fue el mismo, en estas membranas se evaluaron todos los procesos de adsorción, pero no el proceso de hibridación sobre la membrana.

En § 4.2.13, se explicó de manera exhaustiva las posibilidades de adsorción inespecífica en el formato descrito en el capítulo 4.

Las posibilidades de adsorción inespecífica en este caso son similares a las descritas en el formato dot-blot del capítulo 4. Durante el proceso de hibridación, puede adsorberse de manera inespecífica la sonda biotinilada. Este mecanismo de adsorción inespecífica contribuye de manera indirecta, ya que por sí solo no aumenta la señal analítica inespecífica.

Durante el procedimiento de marcación enzimática en el formato dot-blot, el conjugado enzimático tiene dos posibilidades de adsorción inespecífica:

- unirse a la sonda biotinilada adsorbida inespecíficamente;
- adsorberse directamente en la membrana.

Estas posibilidades de adsorción, que contribuyen a aumentar la señal analítica de manera inespecífica, se evaluaron en las membranas “blanco”.

El protocolo que se siguió para su preparación fue:

- 1.- Se sigue el protocolo de preparación de las membranas, descrito en § 8.2.3.1, con la única diferencia que no se adiciona amplicón IS200, es decir, no hay analito sobre la membrana (se obvia el paso 2 del protocolo).
- 2.- Se colocan estas membranas en tubos eppendorf y sigue con el paso 2 del tratamiento de prehibridación, descrito en § 8.2.3.2.
- 3.- Se continúa con el protocolo de hibridación, descrito en § 8.2.3.3. En este caso, al no haber analito en la membrana, no va a haber hibridación y sí sólo adsorción inespecífica de la sonda biotinilada.
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática descrito en § 8.2.3.4.

8.2.6.3 Integración al transductor de las membranas modificadas y evaluación de los genosensores

Una vez preparadas las membranas “genosensoras” y las membranas “blanco”, se integraron al transductor amperométrico, como se explicara en § 8.2.4.

La evaluación de los sensores preparados se realizó basándose en la señal generada, finalmente, por la enzima peroxidasa, según se explicara en § 8.2.5.

De esta forma, la información analítica que se obtuvo –procesando replicados– fue correspondiente a la $I_{m\acute{a}x}$, la cual es proporcional a la actividad enzimática de los blancos y de los genosensores.

El dato analítico de mayor interés es la señal de hibridación propiamente dicha, que se obtiene por la siguiente expresión:

$$\text{Señal de hibridación} = \bar{x} I_{m\acute{a}x} \text{ genosensor} - \bar{x} I_{m\acute{a}x} \text{ blanco}$$

Con esta expresión se elimina el efecto de la adsorción inespecífica.

Esta señal de hibridación está en relación con la cantidad de enzima presente en la membrana pero que se encuentra únicamente unida al híbrido formado en la superficie y directamente relacionada con la cantidad de amplicón inmovilizado en la membrana (Figura 8.4).

8.2.6.4 Diseño del experimento de detección del amplicón IS200

La Tabla 8.2 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.

Tabla 8.2. *Diseño del experimento del formato dot-blot para la evaluación del amplicón IS200. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización por adsorción, hibridación y marcación enzimática.*

REACTIVOS	Lote 1 "blanco" n=2	Lote 1 "genosensor" n=1	Lote 2 "blanco" n=3	Lote 2 "genosensor" n=2
amplicón IS200 -analito- protocolo de adsorción	No se adiciona (-)	5.9 pmoles	No se adiciona (-)	9.9 pmoles
sonda biotinilada protocolo de hibridación	60.0 pmoles	60.0 pmoles	60.0 pmoles	60.0 pmoles
HRP-estreptavidina protocolo de marcación enzimática	0.49 µg	0.49 µg	0.49 µg	0.49 µg

Para evaluar la utilidad de los genosensores de membranas recambiables en la determinación de amplicón, se realizaron dos procedimientos de amplificación de la secuencia IS200 distintos (§ 8.2.2).

Por cada experimento se procesaron dos lotes de membranas, como se explicara en § 8.2.6, denominadas membranas "genosensoras" y membranas "blanco".

En las membranas "genosensoras" del lote 1 se inmovilizaron 5.9 pmoles de amplicón, mientras que en las del lote 2 se inmovilizaron 9.9 pmoles del producto de PCR.

Cabe destacar que las cantidades de amplicón son aproximadas y sólo orientativas, ya que se calcularon de manera estimativa observando la intensidad de las bandas obtenidas mediante la electroforesis del amplicón (§ 8.2.2.5).

En este apartado en particular se mantuvieron constantes las cantidades de sonda funcionalizada con biotina en la solución de hibridación y de conjugado enzimático en la solución bloqueante.

8.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.3.1 EXTRACCIÓN DEL DNA CROMOSÓMICO DE LA BACTERIA SALMONELLA

Para poder comprobar la efectividad de la extracción del DNA cromosómico se realizó una electroforesis en agarosa con una porción del extracto y con tinción de bromuro de etidio (§ 8.2.2.3). Mediante la observación de la placa con una transiluminador UV se comprobó que se había obtenido una banda correspondiente al DNA bacteriano (resultados no mostrados), por lo que el procedimiento descrito en § 8.2.2.2 fue efectivo.

8.3.2 PROCEDIMIENTO DE AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA GÉNICA IS200 MEDIANTE PCR

Para poder comprobar la efectividad de la amplificación por PCR del fragmento previsto de la secuencia IS200, luego de la PCR se realizó con una electroforesis en agarosa con de bromuro de etidio y se sembró al mismo tiempo el marcador de PM Φ X174 DNA/Hinf I Markers (§ 8.2.2.5). El objeto de la electroforesis es triple. El primero es comprobar si hubo amplificación, es decir, si la PCR funcionó correctamente (ausencia de inhibidores, funcionamiento correcto del par de *primers*, de los reactivos y de las condiciones experimentales de la PCR) y si la banda es única (selección correcta del par de *primers* desde el punto de vista de la especificidad). El segundo, y mediante la utilización del marcador, es la comprobación del peso molecular del amplicón, que debería tener 229 pb (véase Figura 8.1). El tercero es separar la banda de otros componentes de la PCR.

Mediante la observación de la placa con una transiluminador UV se comprobó que se había obtenido una única banda del peso molecular aproximado al del amplicón, por lo que el procedimiento de PCR descrito en § 8.2.2.4 fue efectivo (Figura 8.5), y el par de *primers* seleccionado mostró una buena especificidad.

8.3.3 PURIFICACIÓN DEL AMPLICÓN

Para poder comprobar la efectividad del procedimiento de purificación de la banda del amplicón (§ 8.2.2.6) se realizó una electroforesis en agarosa con una porción del extracto purificado y con tinción de bromuro de etidio. Mediante la observación de la placa con una transiluminador UV se comprobó que se había recuperado la banda con el procedimiento de purificación (resultados no mostrados) y que, por tanto, el procedimiento de purificación fue efectivo. El producto del procedimiento de purificación (§ 8.2.2.7) fue el utilizado para la inmovilización en el genosensor (§ 8.2.3.1).

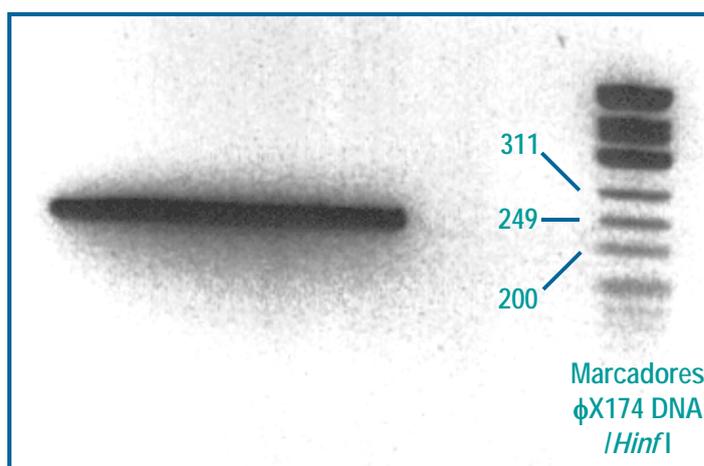


Figura 8.5. Electroforesis del amplicón y comparación con el marcador de peso molecular ϕ X174 DNA/Hinf I

8.3.4 GENOSENSOR PARA LA DETECCIÓN DEL AMPLICÓN IS200

En la Figura 8.6 se muestran los resultados del experimento realizado en § 8.2.6.4. Este experimento se basa en el diseño de un formato dot-blot para la detección de un producto de PCR mediante un genosensor amperométrico de membranas recambiables. En la figura, cada barra muestra el valor medio de cada lote de membranas (“blanco” y “genosensoras”), y el error de la barra representa la desviación estándar (ec. 1, § 4B.1.1) de los replicados de cada lote.

En el lote 1 se ha podido realizar un único ensayo genosensor (debido a problemas prácticos durante la purificación de la banda del amplicón), por lo cual las pruebas estadísticas se realizaron con los resultados obtenidos con el lote 2, y se muestran en la Tabla 8.3.

La diferencia significativa de señal amperométrica que existe entre los genosensores y los blancos (prueba *t*) permite afirmar que el procedimiento de detección del amplicón IS200 ha funcionado correctamente, y que la hibridación del analito de 229 pb con una sonda biotinilada de 30 mer ocurre con efectividad.

En la Figura 8.6 puede observarse que la desviación estándar relativa (ec. 2, § 4B.1.2) para los genosensores es del orden del 13 %.

Parecería que existe una disminución de la señal amperométrica entre los sensores del lote 1 (con 6 pmoles de amplicón) y del lote 2 (con 10 pmoles de amplicón inmovilizado en la membrana).

Es necesario puntualizar que las cantidades en pmoles de amplicón inmovilizado son sólo estimadas por la densidad óptica observada en la electroforesis realizada en § 8.2.2.5.

Además, en el lote 1 sólo se ha podido realiza un único ensayo debido a problemas prácticos durante la purificación de la banda del amplicón.

En caso de que las cantidades inmovilizadas fuesen las estimadas, esta pequeña disminución con el aumento de amplicón inmovilizado en la membrana se correspondería a las conclusiones de § 4.3.1. La membrana estaría saturada de material genético, por lo que un aumento en la cantidad de analito no se corresponde a un aumento de la señal amperométrica.

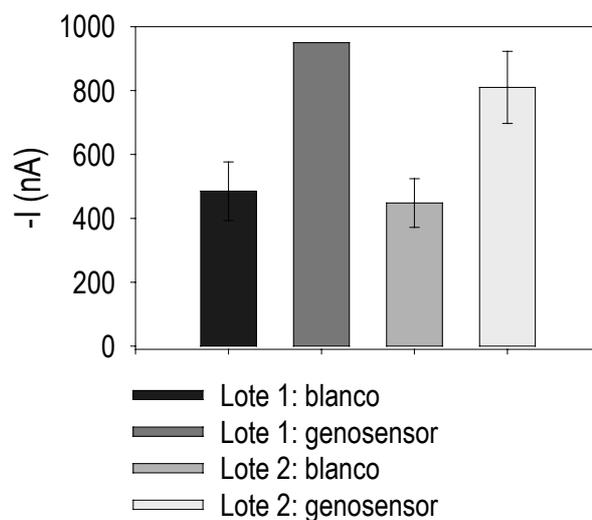


Figura 8.6. Resultados obtenidos en la evaluación del amplicón IS200 mediante un formato dot-blot de mediante hibridación con una sonda de 30 mer funcionalizada en 5' con biotina. DNA analito (amplicón) 229 mer inmovilizado en la membrana: Lote 1 (5.9 pmoles); Lote 2 (9.9 pmoles). Sonda biotinilada 30 mer: 60.0 pmoles. HRP-estreptavidina: 0.49 μ g. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Electrodo de trabajo grafito-epoxi-membrana HYBOND™ modificada según § 8.2.6.4.

Tabla 8.3. Pruebas estadísticas para la comparación de las varianzas (prueba F) y de los valores medios (prueba t) de las señales de los genosensores y de los blancos, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	blanco (n=3)	genosensor (n=2)
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_1 = 76.2$	$s_2 = 113.1$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{calc} (2.2) < F_{1,2} (38.5)$	
S_p (ec. 4B, § 4B.1.4.1)	$S_p = 90.2$	
grados libertad (ec. 6B, § 4B.1.4.3)	3	
Prueba t (unilateral) (ec. 5B, § 4B.1.4.2)	$t_{calc} (4.39) > t_3 (2.35)$	

8.4 CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un método alternativo para la detección de *Salmonella* sp mediante el análisis de su genotipo. El procedimiento combina la amplificación por PCR de la secuencia

de inserción IS200 y la detección del amplicón mediante un genosensor amperométrico de membranas recambiables en formato dot-blot con un sistema de marcación enzimática.

2. Los tiempos de análisis respecto a un método microbiológico clásico de detección de *Salmonella* sp se han reducido desde 4 a 5 días a 36 horas.

3. La desviación estándar relativa es del orden del 13 % mediante este formato dot-blot que utiliza la marcación biotina-estreptavidina-HRP.

4. La especificidad total del procedimiento depende del reconocimiento de tres secuencias distintas. Estos tres reconocimientos están determinados por el uso de los dos oligonucleótidos *primers* (de 23 mer cada uno) durante la amplificación por PCR de la secuencia IS200 y por la utilización de la sonda biotinilada (de 30 mer) durante la hibridación del amplicón en el genosensor de membranas recambiables. Así, en total se reconocen 76 bases nitrogenadas de la secuencia IS200.

5. Los protocolos de extracción del DNA cromosómico, de PCR, y de purificación del amplicón utilizados han dado resultados satisfactorios.

6. Al aumentar la cantidad de amplicón inmovilizado en el genosensor no se observa un aumento correspondiente de señal amperométrica, por lo que la membrana podría estar saturada con material genético. Sin embargo, el método permite afirmar –con una confianza del 95 %– la presencia del amplicón IS200 a unos niveles de pocas pmoles de analito.

7. El método se puede simplificar aún más, mediante el acortamiento de procedimientos tales como extracción del DNA y eliminando el procedimiento de purificación de la banda.

8.5 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ P. Farreras Valentí, C. Rozman. *Medicina Interna volumen II, 11 ed.*; Mosby Doyma Libros: Barcelona, 1992.
- ² J. Wan, K. King, H. Craven, C. McAuley, S. E. Tan, M. J. Coventry. *Lett. Applied Microbiol.* 2000, 30, 267-271.
- ³ C. M. Gooding, P. V. Choudary. *Mol. Cell. Probes* 1999, 13, 341-347.
- ⁴ M. Tietjen, D. Y. C. Fung. *Crit. Rev. Microbiol.* 1995, 21, 53-83.
- ⁵ M. McClelland et al. *Nature* 2001, 413, 852-856.
- ⁶ S. Aabo, O. F. Rasmussen, L. Rossen, P. D. Sorensen, J. E. Olsen, S. Aabo, J. K. Andersen, J. E. Olsen. *Mol. Cell. Probes* 1993, 7, 171-178.
- ⁷ A. C. Fluit, M. N. Widjoatmodjo, A. T. A. Box, R. Torensma, J. Verhoef. *App. Environ. Microbiol.* 1993, 59, 1342-1346.
- ⁸ G. G. Stone, R. D. Oberst, M. P. Hays, D. S. McVey, M. M. Chengappa. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 1742-1749.
- ⁹ S. Jitrapakdee, A. Tassanakajon, V. Boonsaeng, S. Piankijagum, S. Panyim. *Mol. Cell. Probes* 1995, 9, 375-382.
- ¹⁰ J. Kwang, E. T. Littledike, J. E. Keen. *Lett. App. Microbiol.* 1996, 22, 46-51.
- ¹¹ C. Soumet, G. Ermel, V. Rose, N. Rose, P. Drouin, G. Salvat, P. Colin. *Lett. App. Microbiol.* 1999, 29, 1-6.
- ¹² C. Lagatolla, L. Dolzani, E. Tonin, A. Lavenia, M. Di Michele, T. Tommasini, C. Monti-Bragadin. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 33, 775-777.
- ¹³ Y. Hashimoto, Y. Itho, Y. Fujinaga, A. Q. Khan, F. Sultana, M. Miyake, K. Hirose, H. Yamamoto, T. Ezaki. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 34, 2440-2443.
- ¹⁴ A. J. Bäumlér, F. Heffron, R. Reissbrodt. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 1224-1230.
- ¹⁵ G. G. Stone, R. D. Oberst, M. P. Hays, D. S. McVey, M. M. Chengappa. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 2888-2893.
- ¹⁶ W. Beyer, F. M. Mukendi, P. Kimmig, R. Böhm. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 1549-1554.
- ¹⁷ A. A. Fadl, A. V. Nguyen, M. I. Khan. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 987-989.
- ¹⁸ G. G. Stone, R. D. Oberst, M. P. Hays, S. McVey, J. C. Galland, R. Curtiss, S. M. Kelly, M. M. Chengappa. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 1292-1295.
- ¹⁹ C. H. Chiu, J. T. Ou. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 2619-1622.
- ²⁰ J. M. Luk, U. Kongmuang, R. S. W. Tsang, A. A. Lindberg. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 714-718.
- ²¹ S. Lam, J. R. Roth. *Cell* 1983, 34, 951-960.
- ²² S. Lam, J. R. Roth. *Genetics* 1983, 105, 801-811.
- ²³ I. Gibert, J. Barbé, J. Casadesús. *J. Gen. Microbiol.* 1990, 136, 2555-2560
- ²⁴ I. Gibert, K. Carroll, D. R. Hillyard, J. Barbé, J. Casadesús. *Nucleic Acids Res.* 1991, 19, 1343.
- ²⁵ Y. Millemann, M. C. Lesage, E. C. Dancla, J. P. Lafont. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 173-179.
- ²⁶ J. Stanley, N. Baquar, A. Burnens. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 1206-1211.
- ²⁷ B. Liebisch, S. Schwarz. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 641-646.
- ²⁸ P. W. M. Hermans, S. K. Saha, W. J. Van Leeuwen, H. A. Verbrugh, A. Van Belkum, W. H. F. Goessens. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 1373-1379.
- ²⁹ A. Schiaffino, C. R. Beuzón, S. Uzzau, G. Leori, P. Cappuccinelli, J. Casadesús, S. Rubino. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 2375-2380.
- ³⁰ A. P. Burnens, J. Stanley, I. Sechter, J. Nicolet. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 1641-1645.
- ³¹ M. Odaert, P. Berche, M. Simonet. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 2231-2235.
- ³² F. Navarro, T. Llovet, M. A. Echeita, P. Coll, A. Aladueña, M. A. Usera, G. Prats. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 2831-2834.

- ³³ C. R. Beuzón, A. Schiaffino, G. Leori, P. Cappuccinelli, S. Rubino, J. Casadesús, *App. Environ. Microbiol.* 1997, 63, 2082-2085.
- ³⁴ E. Calva, L. G. Ordoñez, M. F. Mora, F. J. Santana, M. Bobadilla, J. L. Puente, *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 3048-3053.
- ³⁵ K. C. Reed y D. A. Mann, *Nucleic Acids Res.* 1985, 13, 7207.
- ³⁶ J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2th ed.*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989.
- ³⁷ R. K. Saiki, P. S. Walsh, C. H. Levenson, H. A. Erlich. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 6230-6234.
- ³⁸ L. J. Kricka. *Nonisotopic DNA Probe Techniques*; Academic Press, Inc.: San Diego, 1992.
- ³⁹ G. M. Church, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 1991-1995.
- ⁴⁰ J. Meinkoth, G. Wahl, *Anal. Biochem.* 1984, 138, 267-284.
- ⁴¹ T. R. Gingeras, D. Y. Kwoh, G. R. Davis, *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 5373-5390.
- ⁴² M. Renz, C. Kurz, *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 3435-3444.
- ⁴³ L. Singh, K. W. Jones. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 5627-2638.
- ⁴⁴ L. T. Kirby. *DNA Fingerprinting*; Stockton Press: New York, 1990.
- ⁴⁵ A. C. Syvanen, M. Laaksonen, H. Soderlund, *Nucleic Acids Res.* 1986, 14, 5037-5048.
- ⁴⁶ S. F. Wolf, L. Haines, J. Fisch, J. N. Kremsky, J. P. Dougherty, K. Jacobs, *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 2911-2926.

INMOVILIZACIÓN DE DNA SOBRE SUPERFICIES GRAFITO-POLÍMERO

DESARROLLO DE UN GENOSENSOR AMPEROMÉTRICO DE RECONOCIMIENTO MÚLTIPLE

9.1 INTRODUCCIÓN

En el trabajo desarrollado en los capítulos anteriores, se describe la utilización como transductor de un composite grafito-epoxi con una membrana de nylon HYBOND integrada al mismo (capítulos 4 a 8). Se seleccionó la membrana de nylon HYBOND ya que es muy conocida su utilidad para los análisis de DNA mediante dot-blot clásicos basados en detecciones ópticas. Además, los protocolos de inmovilización de material genético, prehibridación, hibridación y marcación enzimática utilizando dichas membranas se encuentran descritos en la bibliografía y son ampliamente utilizados en los laboratorios de análisis genéticos.

En el trabajo descrito en los capítulos anteriores se ha demostrado la utilidad de integrar dicha membrana a un transductor con un sistema de detección electroquímico, lo cual otorga ventajas tales como sencillez y robustez de equipamiento, a coste de alargar el procedimiento experimental de preparación del genosensor y, por lo tanto, el tiempo de análisis. Dicho genosensor de membranas intercambiables se basa en la detección final del marcador enzimático (peroxidasa) mediante la técnica amperométrica. Además, se seleccionó como transductor electroquímico para integrar la membrana modificada un composite rígido grafito-epoxi frente a otros transductores tales como otros composites rígidos (grafito-metacrilato), carbono vitrificado o pasta de carbono (§ 2.3.5.1). Esta selección se basó en propiedades físicas –tal como robustez del material del transductor– y electroquímicas. El composite grafito-epoxi posee unas buenas propiedades de conducción y una mayor sensibilidad de las determinaciones; las propiedades físicas de este material pueden permitir su implementación en distintas configuraciones.

Pese a que los distintos formatos de análisis desarrollados en el trabajo descrito en los capítulos anteriores han demostrado su utilidad y sus ventajas respecto a los formatos clásicos en cuanto a la detección del evento de hibridación, obviamente es importante para un análisis genético la rapidez en la obtención de resultados.

El hecho de utilizar una membrana integrada a un transductor amperométrico implica la disminución de la sensibilidad en la detección. Una membrana colocada en la interfase entre el transductor electroquímico y la solución –donde se generan las especies electroactivas a ser detectadas– opera como una barrera difusional que hace que las especies electroactivas lleguen en menor medida al transductor para ser detectadas (véase Figura 9.1), a la vez que se retarda el establecimiento del estado estacionario o, lo que es lo mismo, aumenta el tiempo de respuesta (Figura 2.19, § 2.3.5.1).

Así, el hecho de poder suprimir la membrana y de inmovilizar el DNA directamente sobre el transductor traería asociado un aumento de señal electroquímica y, sobre todo, la reducción de los tiempos empleados en el procedimiento total de análisis.

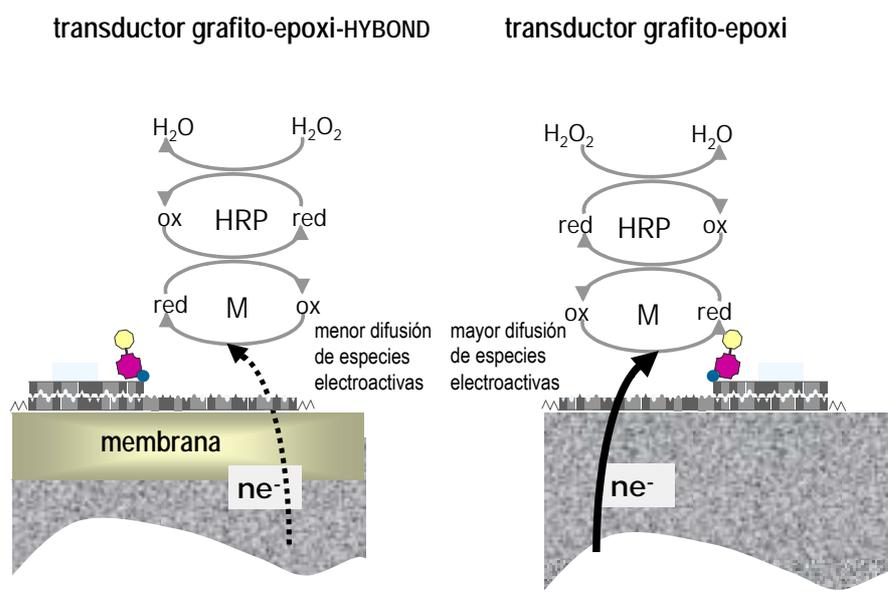


Figura 9.1. Dibujo esquemático en el que se muestra el efecto difusional de la membrana de nylon HYBOND integrada al composite grafito epoxi, comparativamente con el transductor desnudo.

La adsorción es el método más simple de inmovilización de ácidos nucleicos a superficies, debido a que no requiere reactivos especiales ni utilización de DNA funcionalizados.

Existen varios ejemplos en la bibliografía que reportan la adsorción directa de DNA sobre materiales electródicos utilizados como transductores en biosensores electroquímicos, pero con esquemas de detección diferentes al que propone el presente trabajo.

Para la adsorción electroquímica de DNA (a potencial controlado) (véase § 1.4.5.1) se utilizó como material transductor carbono o pasta de carbono ¹⁻⁵. Para la adsorción física del DNA (véase § 1.4.5.1) se utilizaron como materiales transductores carbono vitrificado ⁶⁻⁸, grafito pirolítico ⁹, oro ¹⁰, mercurio ^{11,12}, y transductores modificados superficialmente con polímeros conductores (polipirrol electropolimerizado) ¹³.

Un composite es un material de naturaleza mixta. El DNA podría interactuar con el grafito a través de su esqueleto fosfato azúcar mediante uniones de tipo electrostáticas. Por otro lado, la matriz polimérica de tipo epoxi –de naturaleza fundamentalmente no polar– podría estabilizar el DNA por interacciones hidrofóbicas con las bases nitrogenadas.

Por otro lado, el carácter dual de la superficie del composite, compuesta de partículas de grafito en un medio polimérico ¹⁴, augura unos fenómenos de superficie más ricos en comparación con lo que acontece sobre una malla de nylon cargada positivamente (como es el caso de los genosensores de membranas recambiables descritos en los capítulos anteriores), o con superficies continuas de materiales conductores, tales como grafito, oro o polipirrol. Esto se puede explicar por el fenómeno de microelectrodos. Si la superficie de un macroelectrodo se reduce, la señal y el ruido asociado disminuye. En los microelectrodos, se establece una difusión no lineal que aumenta la calidad de la señal ^{15,16}. Este efecto se traduce por una mejora de la relación señal/ruido, y en menores límites de detección, aunque las bajas corrientes producidas por los microelectrodos requieren instrumentación costosa. Una alternativa es la construcción de arreglos de microelectrodos separados por una matriz aislante y conectados en paralelo ¹⁷. La señal producida por el macroelectrodo así construido es la suma de las señales de cada microelectrodo, y con las mejoras de la relación señal/ruido que otorga el uso de varios microelectrodos. La construcción de un arreglo de microelectrodos es costoso y dificultoso, pero una aproximación a este dispositivo se consigue con los composites ^{14,18}, formados de partículas conductoras dispersas en una matriz polimérica, que muestran las mismas propiedades electroquímicas que un arreglo de microelectrodos.

Los antecedentes más próximos a la utilización de composites grafito-epoxi son las pastas de carbono ¹⁹, descritas con anterioridad en la literatura en la preparación de genosensores electroquímicos; estos genosensores se basan en la adsorción del DNA y en técnicas de transducción diferentes a las utilizadas en el presente trabajo. Sin embargo, las pastas de carbono poseen propiedades físicas y mecánicas poco deseables en cuanto a la preparación de genosensores robustos y en distintas configuraciones, y su estabilidad en solventes no polares es escasa.

En el trabajo desarrollado en el presente capítulo se evalúa la inmovilización por adsorción física de material genético directamente sobre la superficie de un transductor electroquímico basado en un composite grafito-epoxi –debido a las ventajas que este material ha demostrado respecto a otros transductores electroquímicos–, y la posibilidad de llevar a cabo directamente sobre dicho transductor la hibridación utilizando una sonda biotinilada y la reacción de marcación enzimática utilizando HRP-estreptavidina.

En primera instancia, se validará este nuevo dispositivo genosensor basado en la adsorción sobre el composite grafito-epoxi, mediante la utilización de un formato de reconocimiento múltiple –descrito en el capítulo 6 para un genosensor de membranas recambiables– con el objeto de comparar los resultados obtenidos con los del genosensor de membrana recambiable, observando si se obtienen las ventajas sustanciales que se esperan respecto al diseño del genosensor anterior. Para el formato de reconocimiento múltiple se ha escogido como analito poli(dA) –cuya longitud es de 260 mer aproximadamente– y como sonda funcionalizada dT(50)-biotina.

Posteriormente, se evaluará como influyen cada una de las variables implicadas en el análisis: tiempo de los procedimientos (inmovilización por adsorción, hibridación y marcación

enzimática), concentración de los reactivos (analito, sonda biotinilada, HRP-estreptavidina) y utilidad de los tratamientos de prehibridación y de premarcación.

9.2 EXPERIMENTAL

9.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS

9.2.1.1 Equipamiento

Las medidas amperométricas se realizaron con la misma instrumentación analítica y electrodos descritos en § 2.2.2.

Las incubaciones a temperatura controlada se realizaron en el eppendorf Thermomixer modelo 5436.

9.2.1.2 Reactivos y materiales

Los composites se prepararon con grafito en polvo de tamaño de partícula de 50 μm (BDH), resina epoxi Epo-Tek H77 (Epoxy Technology, USA).

Los pulidos de las superficies de los composites se realizaron con papel de alúmina de 3 μm (polishing strips 301044-001, Orion).

Los calibrados se realizaron con peróxido de hidrógeno (Merck) y se utilizó como mediador hidroquinona (Sigma).

La enzima utilizada fue el conjugado estreptavidina-peroxidasa (HRP, 1.11.1.7) (Roche Biochemicals Diagnostics). La estreptavidina del conjugado se obtiene de *Streptomyces avidinii*, que se conjuga a β -peroxidasa de rábano picante utilizando el método del periodato.

El poli(dA) (sal sódica del ácido poliadenílico) (5 U, PM 91900 g/mol, aproximadamente 260 mer) fue suministrado por Sigma.

Se encargó la síntesis del siguiente oligonucleótido biotinilado a MWG-BIOTECH (Alemania):

- dT(50)-biotina

biotina 5'-TTT TTT TT-3'

Características del producto:

$T_m = 56.3^\circ\text{C}$; GC = 0 %; cantidad de DNA: 21.1 OD, 713 μg , 45.9 nmol; P.M.: 15553 g/mol; purificación: HPSF (high purified salt free); longitud = 50 mer.

Las composiciones de las soluciones de prehibridación e hibridación seleccionadas fueron:

- Solución de prehibridación (Sigma): 10 X SSC, 10 X reactivo de Denhardt, 200 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de espermatozoos de salmón (extraído con fenol y cloroformo).
- Solución de hibridación (Sigma): 10 X SSC, 2 X reactivo de Denhardt, 200 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de espermatozoos de salmón (extraído con fenol y cloroformo).

La proteína BSA es de BDH. Otros reactivos utilizados tales como formamida, SDS, Tween 20 fueron adquiridos en Sigma.

Protocolo de inmovilización

El protocolo de inmovilización de poli(dA) en un transductor basado en un composite grafito-epoxi fue el siguiente:

- 1.- Se tratan los electrodos con papel abrasivo fino (de 800), y luego con papel de alúmina de $3\ \mu\text{m}$. Se colocan los electrodos en ultrasonidos durante 5 minutos, con agua bidestilada.
- 2.- Luego de este tratamiento, se colocan los genosensores de manera de que la superficie del transductor quede hacia arriba, según se observa en Figura 9.2 (A).
- 3.- Se agregan $20\ \mu\text{l}$ (de la solución final obtenida del procedimiento de preparación del DNA) sobre la superficie de los sensores grafito-epoxi.
- 4.- Se procede a la adsorción del DNA al transductor grafito-epoxi. Se colocan los sensores en una estufa a $80\ ^\circ\text{C}$ durante un tiempo que se ha variado desde 45 a 90 minutos (tiempo que se ha optimizado, § 9.3.7).

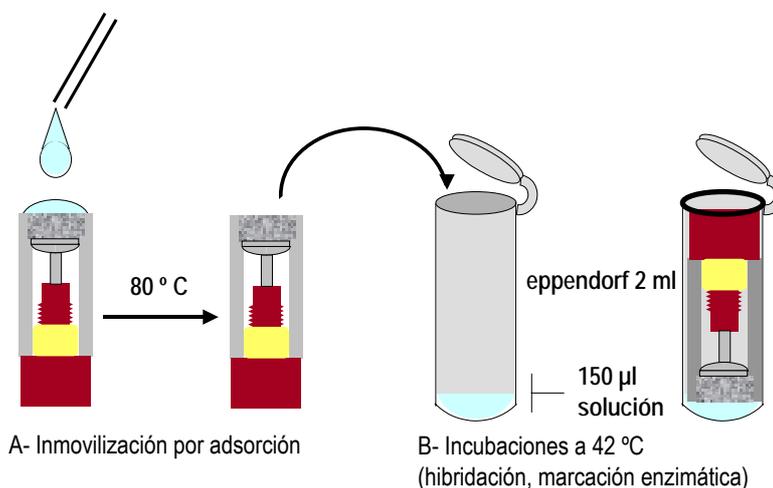


Figura 9.2. Dibujo esquemático en el que se muestra la disposición de los sensores en los pasos de adsorción física –en seco– y de incubación –protocolos de hibridación y de marcación enzimática–.

9.2.2.2 Tratamiento de prehibridación del transductor grafito-epoxi modificado con el analito

El principal objeto del tratamiento de prehibridación es bloquear, mediante moléculas de alto peso molecular, los sitios libres de la superficie en la que se ha inmovilizado el DNA, de manera de favorecer la hibridación y no la adsorción inespecífica de la sonda biotinilada.

En el trabajo desarrollado en capítulos anteriores se ha probado la eficacia de este tratamiento –ampliamente utilizado en la bibliografía para superficies de nylon cargada positivamente– en los genosensores de membranas recambiables, en cuanto a la prevención de la adsorción inespecífica de la sonda marcada, pero como ya se vio su uso no evita completamente la adsorción del conjugado enzimático.

En este caso la superficie es de naturaleza diferente, por lo que es necesario probar la eficacia de este tratamiento sobre un composite grafito-epoxi, ya que no se cuenta con referencias bibliografía al respecto.

Para tal fin, se estudió el efecto del tratamiento de prehibridación evaluándose un tiempo de 60 minutos y el beneficio obtenido con este procedimiento respecto al procedimiento llevado a cabo sin tratamiento de prehibridación.

En § 4.2.4 se discuten en detalle y se seleccionan las variables del tratamiento de prehibridación, tales como:

- tipo de solución de prehibridación: reactivos bloqueantes ^{20,21,23-28} , uso de formamida ^{21,23,24,26,28} y SDS ^{20,23-29}.
- temperatura y tiempo del tratamiento de prehibridación ^{21,23,28}
- agitación durante el tratamiento de prehibridación ^{20,23,30}
- volumen de prehibridación ^{23,28}

En el presente capítulo se utilizó para el bloqueo de la superficie grafito-epoxi la misma solución de prehibridación usada para las membranas de nylon (§ 4.2.4.2) cuya composición final fue:

5 X SSC;
 5 X de reactivo de Denhardt;
 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado;
 0.5 % p/v de SDS;
 50 % v/v de formamida.

Las variables utilizadas en el tratamiento de prehibridación fueron:

- temperatura y tiempo de prehibridación: 42 °C, 1 h.
- agitación durante el tratamiento de prehibridación: suave
- volumen utilizado en el tratamiento de prehibridación: 150 µl (en eppendorf de 2.0 ml)

El tratamiento de prehibridación de los genosensores consistió en:

- 1.- Se enjuagan brevemente los genosensores en solución 5 X SSC hasta eliminación de las sales adsorbidas durante el procedimiento de inmovilización (§ 9.2.2.1).
- 2.- Se colocan 150 µl de solución de prehibridación en tubos eppendorf de 2.0 ml y se colocan los genosensores invertidos en los mismos (Figura 9.2, B).
- 3.- Se colocan los tubos eppendorf en el incubador, con agitación suave y a 42 °C, durante 1 h.

9.2.2.3 Hibridación del transductor grafito-epoxi modificado con el analito

Este es el paso más importante del procedimiento de construcción del sensor, ya que aquí ocurre la hibridación de la sonda biotinilada con el poli(dA) inmovilizado en la superficie del transductor grafito-epoxi.

En § 4.2.5 se discuten en detalle y se seleccionan las variables del procedimiento de hibridación, tales como:

- tipo de solución de hibridación: reactivos bloqueantes^{20,21,23-28}, uso de formamida^{21,23,24,26,28} y SDS^{20,23-29}, fuerza iónica^{21,24}, uso de dextranos^{24,25,27} o polietilenglicol^{21,26,29}
- temperatura y tiempo de hibridación^{21,23,28}
- agitación durante la hibridación^{20,23,30}
- volumen de hibridación^{23,28}

En el presente capítulo se utiliza la misma solución de hibridación que en los capítulos precedentes, cuya composición final es:

5 X SSC;
1 X de reactivo de Denhardt;
100 µg/ml de DNA de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado;
0.5 % p/v de SDS;
50 % v/v de formamida.

Las variables utilizadas en el procedimiento de hibridación fueron:

- temperatura de hibridación: 42 ° C
- agitación durante la hibridación: suave
- volumen de hibridación: 150 µl

El tiempo de hibridación fue optimizado en el presente trabajo, y para ver su efecto se varió entre 45 a 240 minutos. La preparación de la sonda biotinilada en 5' [dT(50)-biotina] se realizó como se describiera en § 4.2.5.7.

Protocolo de hibridación de los transductores grafito-epoxi

El protocolo de hibridación de los genosensores (seguido en la mayoría de los casos, excepto en § 9.2.5.1) consistió en:

- 1.- Se adiciona un volumen (en µl) de solución de hibridación en tubos eppendorf de 2.0 ml en el incubador con agitación suave y a 42 °C, durante 10 minutos (para que la solución de hibridación tome esta temperatura).
- 2.- Se adiciona un volumen (en µl) de sonda biotinilada en 5' (dT(50)-biotina), de manera que el volumen final sea 150 µl.
- 3.- Se enjuagan brevemente los genosensores en solución 5 X SSC hasta eliminación de las sales adsorbidas durante el procedimiento de inmovilización (§ 9.2.2.1).
- 4.- Se colocan los genosensores invertidos en la solución de hibridación (Figura 9.2, B), y se dejan los genosensores en agitación suave y a 42 °C, durante un tiempo que fue desde 45 a 240 minutos (tiempo que se ha optimizado).
- 5.- Se colocan 150 µl de solución de lavado (2 X SSC - 0.1 % SDS) en tubos eppendorf, para los lavados posthibridación de los genosensores: 10 minutos, con agitación suave, a 42 °C.
- 6.- Se remojan los genosensores en 2 X SSC a 20 °C, para eliminar el SDS, con movimientos circulares.

Protocolo de hibridación de los transductores grafito-epoxi, si se realiza previamente el tratamiento de prehibridación

El protocolo de hibridación de los genosensores (seguido en § 9.2.5.1) en el que se realizó previamente el tratamiento de prehibridación (§ 9.2.2.2) consistió en:

- 1.- Se realizan los pasos 1 y 2 del protocolo de hibridación.
- 2.- Se quitan los genosensores de los eppendorf que contienen la solución de prehibridación.
- 3.- Se continúa con los pasos 4, 5 y 6 del protocolo de hibridación.

9.2.2.4 Marcación enzimática posthibridación

Luego del procedimiento de hibridación y de los lavados posthibridación, se han formado los híbridos entre el poli(dA) inmovilizado en el composite grafito-epoxi y la sonda funcionalizada con biotina. Una vez formados estos híbridos funcionalizados con biotina, éstos deben evidenciarse –tal como se ha efectuado en los capítulos anteriores– con el conjugado enzimático estreptavidina-peroxidasa, mediante la reacción entre la biotina del dúplex y la estreptavidina del conjugado enzimático.

En § 4.2.6, se discuten en detalle y se seleccionan las variables del procedimiento de marcación enzimática, tales como:

- tipo de solución de marcación enzimática ²¹
- temperatura y tiempo de marcación enzimática ²¹
- agitación durante la marcación enzimática ^{20,21,23,30}
- volumen de marcación enzimática ^{23,28}

En el presente capítulo se utilizó una solución bloqueante para la marcación enzimática cuya composición fue:

- 1 X PBS
- 2 % p/v BSA
- 0.1 % p/v Tween 20
- 5 mM EDTA

Las variables utilizadas en el procedimiento de marcación enzimática fueron:

- temperatura de marcación enzimática: 42 °C
- agitación durante la marcación enzimática: suave
- volumen de marcación enzimática: 150 µl

El tiempo de marcación enzimática fue optimizado en el presente trabajo, y para ver su efecto se varió entre 15 a 60 minutos.

La preparación del complejo estreptavidina-HRP se realizó de manera idéntica que en § 4.2.6.8.

Protocolo de marcación enzimática

El protocolo de marcación enzimática de los genosensores (seguido en la mayoría de los casos, excepto en § 9.2.5.1) consistió en:

- 1.- Se adiciona 150 μ l de solución de conjugado enzimático en solución bloqueante en tubos eppendorf de 2.0 ml en el incubador con agitación suave y a 42 °C, durante 10 minutos (para que la solución de marcación enzimática tome esta temperatura).
- 2.- Se introducen los genosensores en los tubos eppendorf que contienen la solución anterior.
- 3.- Se dejan los genosensores en agitación suave y a 42 °C, durante un tiempo de marcación enzimática que va desde 15 a 60 minutos (tiempo que se ha optimizado en el presente capítulo).
- 4.- Luego de la marcación enzimática, se procede a los lavados postmarcación enzimática de los genosensores, de la siguiente manera:
 - a.- Enjuague (con movimientos circulares) de los genosensores con solución de lavado, a 20 °C
 - b.- Conservación –hasta el momento de la evaluación– en tubos eppendorf con 150 μ l de solución de lavado, a 20 °C

En este caso, se utilizó la misma solución de lavado que en § 4.2.6.7, de la siguiente composición:

- 10 mM fosfato potásico, pH 6.5
- 0.5 M NaCl
- 0.05 % p/v Tween 20
- 0.1 % p/v BSA
- 1 mM EDTA

La importancia de los lavados de postmarcación enzimática se trata con detalle en § 4.2.6.7.

Protocolo de premarcación con solución bloqueante y de marcación enzimática

El efecto del procedimiento de premarcación con solución bloqueante fue estudiado, evaluándose un tiempo de 30 minutos, a una temperatura de 42 °C en agitación suave.

Asimismo, fue evaluado el beneficio obtenido con este procedimiento respecto al procedimiento llevado a cabo sin premarcación con solución bloqueante.

El protocolo de marcación enzimática de los genosensores (seguido en § 9.2.5.1) en el que se realizó previamente el tratamiento de premarcación con solución bloqueante consistió en:

- 1.- Luego de la hibridación y de los lavados posthibridación, se colocan los genosensores en tubos eppendorf con solución bloqueante en el incubador con agitación suave y a 42 °C, durante 30 minutos (procedimiento de premarcación con solución bloqueante).
- 2.- Se sigue con el paso 1 del protocolo de marcación enzimática.
- 3.- Se quitan los genosensores de la solución bloqueante, y se colocan en los tubos eppendorf con los 150 μ l de solución de conjugado enzimático en solución bloqueante.
- 4.- Se continúa con los pasos 3 y 4 del protocolo de marcación enzimática.

9.2.3 EVALUACIÓN DE LOS GENOSENSORES

La evaluación de los sensores modificados se realizó basándose en la señal generada, finalmente, por la enzima peroxidasa. La señal analítica amperométrica está relacionada con la cantidad de enzima (HRP) que se haya unido al transductor grafito epoxi.

Para tal fin, la evaluación se llevó a cabo con el sistema amperométrico descrito en § 2.2.2. La celda de medida fue una solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0, utilizándose como electrodo de trabajo el genosensor construido. La concentración de hidroquinona en el medio fue de 1.8 mM. A este sistema, se le aplicó el potencial de reducción de la hidroquinona (-0.1 V, vs Ag/AgCl), que fuera optimizado en § 3.3.1.1.

Para la evaluación de los genosensores directamente se agregó una alícuota de sustrato enzimático (H_2O_2) al medio de calibración, tal que con una adición se consiga la saturación de la enzima (la concentración de sustrato empleada fue de 1.06 mM). De esta forma, la información analítica que se obtuvo fue correspondiente a la $I_{m\acute{a}x}$, la cual es proporcional a la actividad enzimática en la superficie del transductor. Los tiempos de respuesta fueron de 30 segundos, que es el tiempo de respuesta del sistema para la obtención de la lectura correspondiente a la $I_{m\acute{a}x}$.

9.2.4 PREPARACIÓN DE LOS GENOSENSORES BASADOS EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI

En la Figura 9.3 se muestra esquemáticamente cada uno de los pasos involucrados en la preparación de los genosensores y el fundamento de la obtención de la señal analítica

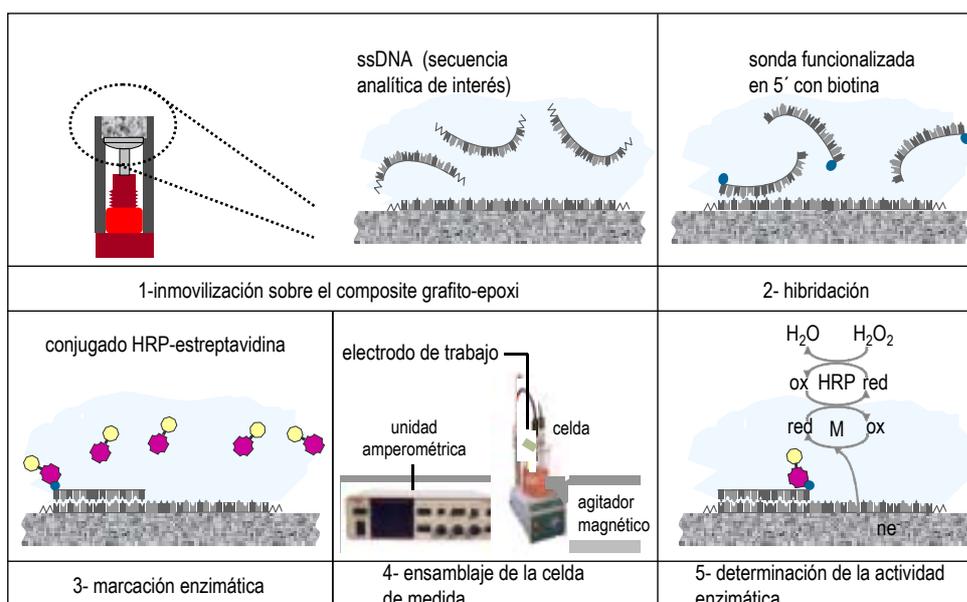


Figura 9.3. Dibujo esquemático en el que se muestran las etapas de análisis con un genosensor en el que el DNA analito se inmoviliza por adsorción sobre el composite grafito-epoxi.

Para evaluar la señal debida a la hibridación, se realizó en todos los casos un lote de genosensores, que evaluaron el proceso de reconocimiento múltiple mediante la sonda funcionalizada con biotina en 5'. Con el objeto de evaluar su adsorción inespecífica sobre el composite grafito-epoxi, se realizó en paralelo un lote de sensores blanco, –en las que se adicionaron los mismos reactivos que en los genosensores excepto el analito–. Por cada lote se procesan normalmente triplicados de los sensores.

La adsorción inespecífica se utilizó para detectar la verdadera señal de fondo del dispositivo, ya que por diferencia entre la señal de los genosensores y de los sensores blanco se obtuvo la respuesta analítica debido al proceso de hibridación en formato de reconocimiento múltiple.

En los apartados siguientes se explica el protocolo de preparación de los genosensores y de los sensores blancos.

9.2.4.1 Protocolo de preparación de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización sobre el composite grafito-epoxi del poli(dA), descrito en § 9.2.2.1.
- 2.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 9.2.2.3.
- 3.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 9.2.2.4.

En el caso de la evaluación del efecto del tratamiento de prehibridación y de premarcación con solución bloqueante (§ 9.2.5.1), el protocolo seguido fue:

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización sobre el composite grafito-epoxi del poli(dA), descrito en § 9.2.2.1.
- 2.- Se continúa con el tratamiento de prehibridación, descrito en § 9.2.2.2.
- 3.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 9.2.2.3.
- 4.- Se termina con el protocolo de premarcación con solución bloqueante y de marcación enzimática, descrito en § 9.2.2.4.

9.2.4.2 Protocolo de preparación de los sensores blanco basados en un composite grafito-epoxi

Este lote de sensores se realizó de manera idéntica al de los genosensores en formato de reconocimiento múltiple (§ 9.2.4.1), pero obviando el paso de adición de ssDNA (analito), es decir, no hay analito –poli(dA)– sobre el transductor grafito-epoxi.

Como el resto de los reactivos fue el mismo, en los blancos se evaluaron todos los procesos de adsorción, pero no el proceso de hibridación sobre el composite grafito-epoxi.

En § 4.2.13 se explicó de manera exhaustiva las posibilidades de adsorción inespecífica en el formato descrito en el capítulo 4, y las mismas consideraciones son válidas para este formato de reconocimiento múltiple, ya que su fundamento es básicamente el mismo que el descrito en el capítulo 4.

La evaluación del fenómeno de adsorción inespecífica en este caso es muy importante, ya que al cambiar la superficie utilizada desde una membrana de nylon HYBOND cargada positivamente a un composite grafito-epoxi de naturaleza mixta (no polar-polar), es lógico pensar que las adsorciones inespecíficas se modifiquen, es decir, o bien que aumenten o disminuyan.

En este caso, al igual que en el formato descrito en el capítulo 4, durante el proceso de hibridación puede adsorberse de manera inespecífica la sonda biotinilada, pero en este caso este fenómeno ocurriría sobre una superficie de naturaleza distinta, por lo cual el fundamento de la adsorción puede ser distinto. Este mecanismo de adsorción inespecífica contribuye de manera indirecta ya que por sí solo no aumenta la señal analítica inespecífica.

Durante la marcación con el conjugado enzimático, la HRP-estreptavidina tiene dos posibilidades de adsorción inespecífica:

- unirse a la sonda biotinilada adsorbida inespecíficamente;
- adsorberse directamente sobre el composite grafito-epoxi.

Estas posibilidades de adsorción, que contribuyen a aumentar la señal analítica de manera inespecífica, se evaluaron en los sensores blanco.

El protocolo que se siguió para su preparación fue:

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización descrito en § 9.2.2.1, con la única diferencia que no se adiciona ssDNA –poli(dA)–, es decir, no hay analito sobre el transductor. En su lugar, en el paso 3 se adicionan 20 μ l de 10 X SSC.
- 2.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 9.2.2.3. En este caso, al no haber analito en la superficie, no va a haber hibridación, y si sólo adsorción inespecífica de la sonda biotinilada.
- 3.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 9.2.2.4.

En el caso de la evaluación del efecto del tratamiento de prehibridación y de premarcación con solución bloqueante (§ 9.2.5.1), el protocolo seguido fue:

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización descrito en § 9.2.2.1, con la única diferencia que no se adiciona ssDNA –poli(dA)–, es decir, no hay analito sobre el transductor. En su lugar, en el paso 3 se adicionan 20 μ l de 10 X SSC.
- 2.- Se continua con el tratamiento de prehibridación, descrito en § 9.2.2.2.
- 3.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 9.2.2.3.
- 4.- Se termina con el protocolo de premarcación con solución bloqueante y de marcación enzimática, descrito en § 9.2.2.4.

9.2.4.3 Evaluación de los genosensores

Una vez modificados los genosensores y los sensores blanco, la evaluación de los mismos se realizó basándose en la señal generada, finalmente, por la enzima peroxidasa, según se explicara en § 9.2.3.

De esta forma, la información analítica que se obtuvo –en este caso por triplicado– fue correspondiente a la $I_{m\acute{a}x}$, la cual es proporcional a la actividad enzimática de los blancos y de los genosensores.

El dato analítico de mayor interés es la señal de hibridación propiamente dicha, que se obtiene por la siguiente expresión:

$$\text{Señal de hibridación} = \bar{x} I_{m\acute{a}x} \text{ genosensor} - \bar{x} I_{m\acute{a}x} \text{ blanco}$$

Con esta expresión se elimina el efecto de la adsorción inespecífica.

Esta señal de hibridación está en relación con la cantidad de enzima presente en el transductor grafito-epoxi pero que se encuentra únicamente unida al híbrido formado en la superficie y directamente relacionada con la cantidad de analito en el composite (Figura 9.3).

9.2.5 OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES IMPLICADAS EN LA PREPARACIÓN DE LOS GENOSENSORES BASADOS EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI

Existen numerosísimas variables que se pueden optimizar en el dispositivo creado, y muchas de ellas escapan del objeto del presente trabajo. Algunas de estas variables, tales como fuerza de agitación en los procesos de hibridación y de marcación enzimática, y la evaluación de los genosensores, fueron las mismas que las optimizadas en el capítulo 4. Asimismo, las soluciones utilizadas fueron adaptadas del formato descrito para genosensor de membranas recambiables, ya que se demostró su utilidad en los capítulos anteriores.

Se utilizó para validar este nuevo dispositivo genosensor el formato de reconocimiento múltiple descrito en el capítulo 6 para un genosensor de membranas recambiables, pero en este caso el DNA se inmovilizó directamente en el composite grafito-epoxi.

En los apartados siguientes se muestran los resultados de las optimizaciones más importantes, debido a que no se disponía de bibliografía que mostrara sus efectos para este nuevo dispositivo creado, y porque se preveía que podían tener una influencia importante al cambiar la superficie del transductor.

Estas optimizaciones son:

- eficacia del tratamiento de prehibridación
- eficacia del procedimiento de premarcación con solución bloqueante
- tiempo de hibridación
- cantidad de analito inmovilizado en el transductor grafito-epoxi
- cantidad de peroxidasa-estreptavidina durante la marcación enzimática
- tiempo de marcación enzimática
- tiempo de procedimiento de inmovilización
- cantidad de sonda funcionalizada con biotina de la solución de hibridación

9.2.5.1 Eficacia del tratamiento de prehibridación y de premarcación con solución bloqueante. Diseño del experimento

El objeto de esta experiencia es evaluar la utilidad del tratamiento de prehibridación en el protocolo de preparación del genosensor, es decir, si la realización de un paso de prehibridación previo a la hibridación minimiza la adsorción inespecífica y produce, por tanto, el aumento de la relación S/R. El mismo efecto se pretendió evaluar con el procedimiento de premarcación con solución bloqueante previo a la marcación enzimática.

Para evaluar la eficacia del tratamiento de prehibridación y de premarcación con solución bloqueante sobre el transductor grafito-epoxi, se realizaron tres experiencias distintas. En el Experimento N° 1, se llevó a cabo el protocolo de preparación de los genosensores sin tratamiento de prehibridación y sin premarcación con solución bloqueante como se explicara en § 9.2.4, procesando dos lotes de sensores: genosensores y sensores blanco. En el Experimento N° 2 se llevó a cabo el protocolo de preparación de los genosensores sin tratamiento de prehibridación y con tratamiento de premarcación con solución bloqueante durante un tiempo de 30 minutos previo a la marcación enzimática, como se explicara en § 9.2.2.4, procesando también dos lotes de sensores: genosensores y sensores blanco. Por último, en el Experimento N° 3 se llevó a cabo el protocolo de preparación de los genosensores con tratamiento de prehibridación durante un tiempo de 60 minutos, como se explicara en § 9.2.2.2, y sin protocolo de premarcación con solución bloqueante, procesando también dos lotes de sensores: genosensores y sensores blanco.

Las Tabla 9.1, Tabla 9.2, y Tabla 9.3 resumen las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática para los experimentos 1, 2 y 3.

Cabe destacar que por cada lote (genosensores y sensores blanco) se han evaluado replicados.

Tabla 9.1. Diseño del experimento N° 1, en el que se llevó a cabo el formato de reconocimiento múltiple en un genosensor grafito-epoxi, sin tratamiento de prehibridación y sin premarcación con solución bloqueante. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.

REACTIVOS	Experimento 1 blanco n=2	Experimento 1 genosensor n=3
protocolo de inmovilización: Poli(dA) -analito- tiempo: 90 min	No se adiciona (-)	11.4 pmoles
protocolo de hibridación: dT(50)-biotina tiempo de prehibridación: 0 min tiempo de hibridación: 240 min	61.2 pmoles	61.2 pmoles
protocolo de marcación enzimática: HRP-estreptavidina tiempo de premarcación: 0 min tiempo de marcación: 60 min	0.49 µg	0.49 µg

Tabla 9.2. *Diseño del Experimento N° 2, en el que se evaluó el efecto del procedimiento de premarcación con solución bloqueante en el formato de reconocimiento múltiple en un genosensor grafito-epoxi. Tratamiento de prehibridación: 0 minutos. Procedimiento de premarcación con solución bloqueante: 30 minutos. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.*

REACTIVOS	Experimento 2 blanco n=2	Experimento 2 genosensor n=3
protocolo de inmovilización: Poli(dA)-analito- tiempo: 90 min	No se adiciona (-)	11.4 pmoles
protocolo de hibridación: dT(50)-biotina tiempo de prehibridación: 0 min tiempo de hibridación: 240 min	61.2 pmoles	61.2 pmoles
protocolo de marcación enzimática: HRP-estreptavidina tiempo de premarcación: 30 min tiempo de marcación: 60 min	0.49 µg	0.49 µg

Tabla 9.3. *Diseño del Experimento N° 3, en el que se evaluó el efecto del tratamiento de prehibridación en el formato de reconocimiento múltiple en un genosensor grafito-epoxi. Tratamiento de prehibridación: 60 minutos. Procedimiento de premarcación con solución bloqueante: 0 minutos. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.*

REACTIVOS	Experimento 3 blanco n=2	Experimento 3 genosensor n=3
protocolo de inmovilización: Poli(dA)-analito- tiempo: 90 min	No se adiciona (-)	11.4 pmoles
protocolo de hibridación. dT(50)-biotina tiempo de prehibridación: 60 min tiempo de hibridación: 240 min	61.2 pmoles	61.2 pmoles
protocolo de marcación enzimática: HRP-estreptavidina tiempo de premarcación: 0 min tiempo de marcación: 60 min	0.49 µg	0.49 µg

Las cantidades de poli(dA), dT(50)-biotina y HRP-estreptavidina fueron las optimizadas para el genosensor de membranas recambiables desarrollado en el capítulo 6. Los tiempos iniciales utilizados (previo a su optimización) del protocolo de inmovilización (§ 9.2.2.1), hibridación (§ 9.2.2.3), y marcación enzimática (§ 9.2.2.4) fueron, respectivamente, 90, 240 y 60 minutos.

9.2.5.2 Tiempo de hibridación. Diseño del experimento

El objeto de esta experiencia es evaluar el efecto de la variación del tiempo de hibridación en el protocolo de preparación del genosensor amperométrico, de manera de conseguir acortar el procedimiento total de preparación del mismo.

Para evaluar el efecto del tiempo de hibridación en el formato de reconocimiento múltiple se realizaron cuatro experiencias distintas, las cuales sólo variaron en el tiempo de hibridación de la sonda funcionalizada con biotina con el analito inmovilizado en el transductor grafito-epoxi. En todos los experimentos se procesaron dos lotes de sensores: genosensores y sensores blanco. Cabe destacar que por cada lote (genosensores y sensores blanco) se han evaluado tres sensores, es decir, por cada experimento se evaluaron en total seis sensores.

En el Experimento N° 1, se llevó a cabo el protocolo de preparación de los genosensores con un tiempo de hibridación de 45 minutos; en el Experimento N° 2, el tiempo de hibridación fue de 90 minutos; en el Experimento N° 3, el tiempo de hibridación fue de 150 minutos; y, por último, en el experimento N° 4, el tiempo de hibridación fue de 240 minutos.

En todos los casos, y debido a los resultados obtenidos en § 9.3.2, los experimentos se llevaron a cabo sin el tratamiento de prehibridación y sin premarcación con solución bloqueante, para conseguir acortar aún más el tiempo total de preparación de los genosensores.

Las cantidades de poli(dA), dT(50)-biotina y HRP-estreptavidina fueron las optimizadas para el genosensor de membranas recambiables desarrollado en el capítulo 6. Los tiempos iniciales utilizados (previo a su optimización) del protocolo de inmovilización (§ 9.2.2.1), y marcación enzimática (§ 9.2.2.4) fueron, respectivamente, 90 y 60 minutos.

La Tabla 9.4 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática para los experimentos 1, 2, 3 y 4.

Tabla 9.4. Diseño de los Experimentos N° 1, 2, 3 y 4 en los que se evaluó el efecto del tiempo de hibridación en el formato de reconocimiento múltiple en un genosensor grafito-epoxi. Tiempo de hibridación del Experimento N° 1: 45 minutos; Experimento N° 2: 90 minutos; Experimento N° 3: 150 minutos; Experimento N° 4: 240 minutos. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización por adsorción, hibridación y marcación enzimática.

REACTIVOS	blanco n=3	genosensor n=3
protocolo de inmovilización: Poli(dA) -analito- tiempo: 90 min	No se adiciona (-)	11.4 pmoles
protocolo de hibridación: dT(50)-biotina tiempo de hibridación: de 45 a 240 min	61.2 pmoles	61.2 pmoles
protocolo de marcación enzimática: HRP-estreptavidina tiempo de marcación: 60 min	0.49 µg	0.49 µg

9.2.5.3 Cantidad de analito inmovilizado en el transductor grafito-epoxi. Diseño del experimento

El objeto de esta experiencia es evaluar el efecto de la variación de la cantidad de analito [poli(dA)] inmovilizado sobre el composite grafito-epoxi en el protocolo de inmovilización del genosensor amperométrico.

Para evaluar el efecto de la cantidad de analito inmovilizado en el formato de reconocimiento múltiple, se realizaron ocho genosensores y un blanco. Estos genosensores sólo se diferenciaron en la cantidad de poli(dA) inmovilizado en el transductor grafito-epoxi, las cuales fueron: 0 pmoles (blanco), 1.1, 1.4, 2.0, 2.2, 4.3, 6.5, y 11.4 pmoles de poli(dA).

En todos los casos, y debido a los resultados obtenidos en § 9.3.2, los experimentos se llevaron a cabo sin tratamiento de prehibridación y sin premarcación con solución bloqueante.

Las cantidades de dT(50)-biotina y HRP-estreptavidina fueron las optimizadas para el genosensor de membranas recambiables desarrollado en el capítulo 6. Los tiempos iniciales utilizados (previo a su optimización) del protocolo de inmovilización (§ 9.2.2.1), y marcación enzimática (§ 9.2.2.4) fueron, respectivamente, 90 y 60 minutos. El tiempo de hibridación utilizado fue de 90 minutos.

La Tabla 9.5 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.

Tabla 9.5. *Diseño del experimento de evaluación del efecto de la cantidad de poli(dA) inmovilizado en el transductor grafito-epoxi en un formato de reconocimiento múltiple. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización por adsorción, hibridación y marcación enzimática.*

Sensor Nº:	Proc. de inmovilización: Poli(dA) -analito- (tiempo: 90 min)	Proc de hibridación: dT(50)-biotina (tiempo: 90 min)	Proc. de marcación enzimática: HRP-estreptavidina (tiempo: 60 min)
1 (blanco)	No se adiciona (-)	61.2 pmoles	0.49 µg
2	0.3 pmoles	61.2 pmoles	0.49 µg
3	1.1 pmoles	61.2 pmoles	0.49 µg
4	1.4 pmoles	61.2 pmoles	0.49 µg
5	2.0 pmoles	61.2 pmoles	0.49 µg
6	2.2 pmoles	61.2 pmoles	0.49 µg
7	4.3 pmoles	61.2 pmoles	0.49 µg
8	6.5 pmoles	61.2 pmoles	0.49 µg
9	11.4 pmoles	61.2 pmoles	0.49 µg

9.2.5.4 Cantidad de conjugado enzimático en la solución bloqueante durante la marcación enzimática. Diseño del experimento

El objeto de esta experiencia es evaluar el efecto de la variación de la cantidad de conjugado enzimático en la solución bloqueante durante el protocolo de marcación enzimática.

Para evaluar el efecto de la cantidad de conjugado enzimático en un formato de reconocimiento múltiple se realizaron tres experiencias distintas, las cuales sólo variaron en la

cantidad de conjugado enzimático en la solución bloqueante. En todos los experimentos, se procesaron dos lotes de sensores: genosensores y sensores blanco.

En el Experimento N° 1 se llevó a cabo el protocolo de marcación enzimática con una cantidad de conjugado enzimático de 0.49 μg ; en el Experimento N° 2, se utilizó una cantidad de conjugado enzimático de 0.99 μg ; por último, en el Experimento N° 3, se llevó a cabo el protocolo de marcación enzimática con una cantidad de conjugado enzimático de 1.98 μg .

En todos los casos, y debido a los resultados obtenidos en § 9.3.2, los experimentos se llevaron a cabo sin el tratamiento de prehibridación y sin premarcación con solución bloqueante.

Las cantidades de dT(50)-biotina fueron las optimizadas para el genosensor de membranas recambiables desarrollado en el capítulo 6. La cantidad de poli(dA) fue de 2.2 pmoles. Los tiempos iniciales utilizados (previo a su optimización) del protocolo de inmovilización (§ 9.2.2.1), y marcación enzimática (§ 9.2.2.4) fueron, respectivamente, 90 y 60 minutos. El tiempo de hibridación utilizado fue de 90 minutos.

La Tabla 9.6 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.

Tabla 9.6. *Diseño del experimento de evaluación del efecto de la cantidad de conjugado enzimático en la solución de marcación enzimática en el formato de reconocimiento múltiple. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.*

Experimento N°:	Proc. de inmovilización: Poli(dA) -analito- (tiempo: 90 minutos)	Proc de hibridación: dT(50)-biotina (tiempo: 90 minutos)	Proc. de marcación enzimática: HRP-estreptavidina (tiempo: 60 minutos)
Exp.1 (blanco)	No se adiciona (-)	61.2 pmoles	0.49 μg
Exp.1 (genosensor)	2.2 pmoles	61.2 pmoles	0.49 μg
Exp.2 (blanco)	No se adiciona (-)	61.2 pmoles	0.99 μg
Exp.2 (genosensor)	2.2 pmoles	61.2 pmoles	0.99 μg
Exp.3 (blanco)	No se adiciona (-)	61.2 pmoles	1.98 μg
Exp.3 (genosensor)	2.2 pmoles	61.2 pmoles	1.98 μg

9.2.5.5 Tiempo del procedimiento de marcación enzimática. Diseño del experimento

El objeto de esta experiencia es evaluar el efecto de la variación del tiempo de marcación enzimática en el protocolo de preparación del genosensor amperométrico, de manera de conseguir acortar el procedimiento total de preparación del mismo.

Para evaluar el efecto del tiempo de marcación enzimática en el formato de reconocimiento múltiple, se realizaron cinco experiencias distintas, las cuales sólo variaron en el tiempo de marcación enzimática del dúplex poli(dA) / dT(50)-biotina preformado en el transductor grafito-epoxi con el conjugado HRP-estreptavidina en la solución bloqueante. En todos los experimentos, se procesaron dos lotes de sensores: genosensores y sensores blanco.

En el Experimento N° 1, se llevó a cabo el protocolo de preparación de los genosensores con un tiempo de marcación enzimática de 15 minutos; en el Experimento N° 2, el tiempo de marcación

enzimática fue de 20 minutos; en el Experimento N° 3, de 30 minutos; en el Experimento N° 4, de 40 minutos y, por último, en el experimento N° 5, el tiempo de marcación enzimática fue de 60 minutos.

En todos los casos, y debido a los resultados obtenidos en § 9.3.2, los experimentos se llevaron a cabo sin tratamiento de prehibridación y sin premarcación con solución bloqueante.

Las cantidades de dT(50)-biotina fueron las optimizadas para el genosensor de membranas recambiables desarrollado en el capítulo 6. Las cantidades de poli(dA) y HRP-estreptavidina fueron, respectivamente, 2.2 pmoles y 0.99 µg. El tiempo utilizado (previo a su optimización) para el protocolo de inmovilización (§ 9.2.2.1) fue de 90 minutos. El tiempo de hibridación fue de 45 minutos.

La Tabla 9.7 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática para los experimentos 1, 2, 3, 4 y 5.

Tabla 9.7. Diseño de los Experimentos N° 1, 2, 3, 4 y 5 en los que se evaluó el efecto del tiempo de marcación enzimática en un formato de reconocimiento múltiple en un genosensor grafito-epoxi. Tiempo de marcación enzimática del Experimento N° 1: 15 minutos; Experimento N° 2: 20 minutos; Experimento N° 3: 30 minutos; Experimento N° 4: 40 minutos; Experimento N° 5: 60 minutos. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.

REACTIVOS	blanco	genosensor
protocolo de inmovilización: Poli(dA) -analito- tiempo: 90 minutos	No se adiciona (-)	2.2 pmoles
protocolo de hibridación: dT(50)-biotina tiempo de hibridación: 45 minutos	61.2 pmoles	61.2 pmoles
protocolo de marcación enzimática: HRP-estreptavidina tiempo de marcación: de 15 a 60 min	0.99 µg	0.99 µg

9.2.5.6 Tiempo del procedimiento de inmovilización. Diseño del experimento

El objeto de esta experiencia es evaluar el efecto de la variación del tiempo de inmovilización del DNA analito en el protocolo de preparación del genosensor amperométrico, de manera de conseguir acortar el procedimiento total de preparación del mismo.

Para evaluar el efecto del tiempo de inmovilización del analito en el formato de reconocimiento múltiple, se realizaron dos experiencias distintas, las cuales sólo variaron en el tiempo de inmovilización del DNA en el transductor grafito-epoxi. En todos los experimentos se procesaron dos lotes de sensores: genosensores y sensores blanco. Por cada lote (genosensores y sensores blanco) se evaluaron replicados de los sensores.

En el Experimento N° 1 se llevó a cabo el protocolo de preparación de los genosensores con un tiempo de inmovilización del DNA de 45 minutos. Este tiempo es el mínimo requerido para que el DNA se adsorba, ya que con tiempos menores no se consigue que la solución depositada en el composite grafito-epoxi se seque completamente; por último, en el Experimento N° 2, el tiempo de inmovilización del DNA fue de 90 minutos.

En todos los casos, y debido a los resultados obtenidos en § 9.3.2, los experimentos se llevaron a cabo sin tratamiento de prehibridación y sin premarcación con solución bloqueante.

La cantidad de dT(50)-biotina fue de 379 fmoles. Las cantidades de poli(dA) y HRP-estreptavidina fueron, respectivamente, 531 fmoles y 0.99 µg.

Los tiempos utilizados para el protocolo de hibridación y de marcación enzimática fueron, respectivamente de 45 minutos y 30 minutos.

La Tabla 9.8 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática para los experimentos 1 y 2.

Tabla 9.8. *Diseño de los Experimentos N° 1 y 2 en los que se evaluó el efecto del tiempo de inmovilización del DNA en un formato de reconocimiento múltiple en un genosensor grafito-epoxi. Tiempo de inmovilización del DNA del Experimento N° 1: 45 minutos; Experimento N° 2: 90 minutos. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.*

REACTIVOS	blanco	genosensor
protocolo de inmovilización: Poli(dA) -analito- tiempo: 45 y 90 minutos	No se adiciona (-)	531 fmoles
protocolo de hibridación: dT(50)-biotina tiempo de hibridación: 45 minutos	379 fmoles	379 fmoles
protocolo de marcación enzimática: HRP-estreptavidina tiempo de marcación: 30 minutos	0.99 µg	0.99 µg

9.2.5.7 Cantidad de sonda funcionalizada con biotina en la solución de hibridación. Diseño del experimento

El objeto de esta experiencia es evaluar el efecto de la variación de la cantidad de sonda biotinilada en la solución de hibridación.

Para evaluar el efecto de la cantidad de sonda funcionalizada con biotina en la solución de hibridación en un formato de reconocimiento múltiple, se realizaron siete genosensores. Estos genosensores sólo se diferenciaron en la cantidad de dT(50)-biotina, las cuales fueron: 0 fmoles (blanco de hibridación), 23.7, 47.3, 94.6, 379.0 y 757.0 y 946 fmoles de dT(50)-biotina.

En todos los casos, y debido a los resultados obtenidos en § 9.3.2, los experimentos se llevaron a cabo sin tratamiento de prehibridación y sin premarcación con solución bloqueante.

Las cantidades de poli(dA) y HRP-estreptavidina fueron, respectivamente, 531.0 fmoles y 0.99 µg.

Los tiempos utilizados para el protocolo de inmovilización, hibridación y marcación enzimática utilizados fueron, respectivamente, de 45 minutos, 45 minutos y 30 minutos.

La Tabla 9.9 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.

Tabla 9.9. *Diseño del experimento de evaluación del efecto de la cantidad de dT(50)-biotina de la solución de hibridación en el formato de reconocimiento múltiple. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.*

Sensor N°:	Proc. de inmovilización: Poli(dA) -analito- (tiempo: 45 minutos)	Proc de hibridación: dT(50)-biotina (tiempo: 45 minutos)	Proc. de marcación enzimática: HRP-estreptavidina (tiempo: 30 minutos)
1 (blanco hibrid)	531 fmoles	0 fmoles	0.99 µg
2	531 fmoles	23.7 fmoles	0.99 µg
3	531 fmoles	47.3 fmoles	0.99 µg
4	531 fmoles	94.6 fmoles	0.99 µg
5	531 fmoles	379.0 fmoles	0.99 µg
6	531 fmoles	757.0 fmoles	0.99 µg
7	531 fmoles	946.0 fmoles	0.99 µg

9.2.5.8 Evaluación de interferencias: estudio de las interacciones del conjugado enzimático (HRP-estreptavidina) con el composite grafito-epoxi modificado con DNA de distinto origen. Diseño del experimento

El objeto de esta experiencia es asegurar que la señal observada en las experiencias anteriores se debe a hibridación y no a interacciones inespecíficas entre el DNA adsorbido en la superficie del composite grafito-epoxi y el conjugado enzimático HRP-estreptavidina, de manera directa, es decir, sin intervención de la sonda funcionalizada con biotina.

La Tabla 9.10 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.

Tabla 9.10. *Evaluación de las interacciones inespecíficas entre el conjugado enzimático (HRP-estreptavidina) y DNA de distinto origen. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.*

EXPER N°:	Proc. de inmovilización: DNA inmovilizado (tiempo: 90 minutos)	Proc de hibridación: dT(50)-biotina (tiempo: 90 minutos)	Proc. marcación enzimática: HRP-estreptavidina (tiempo: 60 minutos)
1	0 pmoles	61.2 pmoles	0.49 µg
2	poli(dA): 2.2 pmoles (0.20 µg)	61.2 pmoles	0.49 µg
3	poli(dA): 2.2 pmoles (0.20 µg)	0 pmoles	0.49 µg
4	DNA esperma salmón: 0.20 µg	0 pmoles	0.49 µg
5	Oligonucleótido 50 mer: 0.35 µg	0 pmoles	0.49 µg

Para evaluar este fenómeno de interacciones inespecíficas, se realizaron cinco experimentos distintos, como puede observarse en la Tabla 9.10. El experimento N° 1 es un blanco, y evalúa la señal amperométrica obtenida debido a la adsorción inespecífica de la sonda biotinilada y del conjugado enzimático sobre el composite grafito-epoxi. El experimento N° 2 es un control de hibridación y evalúa la señal de hibridación propiamente dicha (genosensor). El experimento N° 3 evalúa la adsorción o interacciones inespecíficas del conjugado enzimático sobre el transductor grafito-epoxi modificado por adsorción con poli(dA). El experimento N° 4 evalúa la adsorción o

interacciones inespecíficas del conjugado enzimático sobre el transductor grafito-epoxi modificado por adsorción con un DNA de distinto origen, en este caso de esperma de salmón. El experimento N° 5 evalúa la adsorción o interacciones inespecíficas del conjugado enzimático sobre el transductor grafito-epoxi modificado por adsorción con un oligonucleótido de 50 mer.

En todos los casos, y debido a los resultados obtenidos en § 9.3.2, los experimentos se llevaron a cabo sin tratamiento de prehibridación y sin premarcación con solución bloqueante.

Los tiempos utilizados para el protocolo de inmovilización, hibridación y marcación enzimática utilizados fueron, respectivamente, de 90, 90 y 60 minutos.

9.2.5.9 Evaluación de interferencias: estudio de la hibridación inespecífica entre DNA de distinto origen inmovilizado en el composite grafito-epoxi y sonda funcionalizada con biotina. Diseño del experimento

El objeto de esta experiencia es asegurar que la señal observada en las experiencias anteriores se debe a hibridación entre DNA complementario (es decir, que la hibridación sea específica) y no a interacciones inespecíficas entre DNA adsorbido en la superficie del composite grafito-epoxi de distinto origen y la sonda funcionalizada con biotina. Dicho de otra manera, se pretende confirmar que un tiempo de hibridación de 45 minutos en las condiciones especificadas es suficiente para generar una señal amperométrica debido a hibridación específica.

Para evaluar este fenómeno, se realizaron cuatro experimentos distintos. El experimento N° 1 es un blanco, y evalúa la señal amperométrica obtenida debido a la adsorción inespecífica de la sonda biotinilada y del conjugado enzimático sobre el composite grafito-epoxi. El experimento N° 2 es un control de hibridación que evalúa la señal de hibridación propiamente dicha (genosensor). El experimento N° 3 evalúa la hibridación inespecífica –o interacción– existente entre la sonda dT(50)-biotina, y un DNA inespecífico de esperma de salmón. El experimento N° 4 evalúa la hibridación inespecífica –o interacción– existente entre la sonda dT(50)-biotina, y un oligonucleótido de 50 mer no complementario. En todos los casos, y debido a los resultados obtenidos en § 9.3.2, los experimentos se llevaron a cabo sin tratamiento de prehibridación y sin premarcación con solución bloqueante.

Los tiempos utilizados para el protocolo de inmovilización, hibridación y marcación enzimática utilizados fueron, respectivamente, de 45 minutos, 45 minutos y 30 minutos.

La Tabla 9.11 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.

Tabla 9.11. Evaluación de la hibridación de la sonda dT(50)-biotina con DNA inespecífico (DNA de distinto origen). En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización por adsorción, hibridación y marcación enzimática.

EXP N°:	Proc. de inmovilización: DNA inmovilizado (tiempo: 45 minutos)	Proc de hibridación: dT(50)-biotina (tiempo: 45 minutos)	Proc. marcación enzimática: HRP-estreptavidina (tiempo: 30 minutos)
1	0 pmoles	757 fmoles	0.99 µg
2	Poli(dA): 531 fmoles	757 fmoles	0.99 µg
3	Oligonucleótido 50 mer: 0.28 µg	757 fmoles	0.99 µg
4	DNA esperma salmón: 0.99 µg	757 fmoles	0.99 µg

9.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.3.1 COMPARACIÓN DE GENOSENSORES DE MEMBRANAS RECAMIABLES Y GENOSENSORES BASADOS EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI EN UN FORMATO DE RECONOCIMIENTO MÚLTIPLE

En la Figura 9.4 se muestran comparativamente los resultados obtenidos con un genosensor de membranas recambiables (Figura 9.4, A) (modificadas según § 6.2.5.4) y con un genosensor basado en la inmovilización del DNA analito sobre el composite grafito-epoxi (Figura 9.4, B), que fue preparado siguiendo el protocolo descrito en la Tabla 9.1.

El análisis se basa en un formato de reconocimiento múltiple y para ambos procedimientos se utilizaron las mismas cantidades de reactivos (analito –poli(dA)–, sonda biotinilada –dT(50)-biotina– y conjugado enzimático).

En la figura cada barra muestra el valor medio de los replicados de cada lote de sensores (blanco y genosensor –grafito-epoxi-HYBOND–, y blanco y genosensor –grafito-epoxi–), y el error de las barras representa la desviación estándar de los replicados de cada lote (ec. 1, § 4B.1.1).

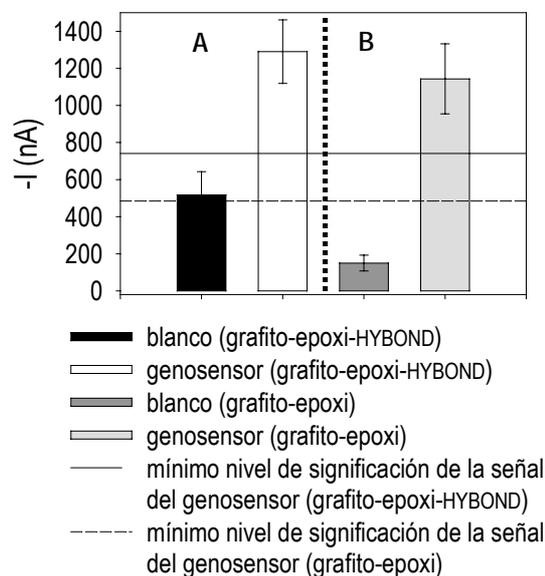


Figura 9.4. Comparación de los resultados obtenidos en la evaluación del formato de reconocimiento múltiple mediante un genosensor de membranas recambiables (Figura 9.4, A), y un genosensor basado en la inmovilización del DNA sobre un composite grafito-epoxi (Figura 9.4, B). DNA analito 260 mer [poli(dA)] inmovilizado: 11.4 pmoles. Sonda funcionalizada con biotina [dT(50)-biotina]: 61.2 pmoles. HRP-estreptavidina: 0.49 µg. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H₂O₂ 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Para la Figura 9.4, A, el electrodo de trabajo fue grafito-epoxi-membrana HYBOND™ modificada según § 6.2.5.4. Para la Figura 9.4, B, los electrodos de trabajo fueron genosensores modificados según Tabla 9.1.

La Tabla 6.4 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación de las señales de los blancos y de los genosensores de membranas recambiables, mientras que la Tabla 9.12, muestra los mismos parámetros para los genosensores basados en un composite grafito-epoxi.

La diferencia de los valores medios (prueba t) de la determinación de los genosensores y de los blancos es significativamente diferente. En la Figura 9.4 se muestra el nivel a partir del cual la señal de los genosensor de membranas recambiables y de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi son significativamente superiores a la señal de sus respectivos blancos, para estas mismas condiciones experimentales (ec. 7, § 4B.1.4.4).

La diferencia de señal amperométrica que existe entre los genosensores y los blancos permite afirmar que el procedimiento funciona correctamente, y que la hibridación del analito de 260 mer con una sonda biotilada de 50 mer ocurre con efectividad sobre el transductor grafito-epoxi.

Tabla 9.12. Pruebas estadísticas para la comparación de las varianzas (prueba F) y de los valores medios (prueba t) de las señales de los genosensores y de los blancos de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	blanco n=2	genosensor n=3
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_1 = 42.4$	$s_2 = 189.0$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (19.9) < F_{2,1} (799.5)$	
S_p (ec. 4B, § 4B.1.4.1)	$S_p = 156.3$	
grados libertad (ec. 6B, § 4B.1.4.3)	3	
Prueba t (unilateral) (ec. 5B, § 4B.1.4.2)	$t_{\text{calc}} (6.96) > t_3 (2.35)$	

El tiempo total de preparación y evaluación de los genosensores de membranas recambiables fue de aproximadamente 24 horas mientras que, para el caso de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi, fue de 6 h 50 min. Cabe destacar que, en este último caso, el procedimiento total se llegó a reducir a 2 h 30 min (véase más adelante).

A pesar de que se ha acortado el tiempo del procedimiento total desde 24 horas (para el genosensor de membranas recambiables) a aproximadamente 7 horas (para los genosensores grafito-epoxi) las señales de hibridación no son significativamente diferentes entre ambos procedimientos.

En la Figura 9.5 se muestra sólo la señal de hibridación de los genosensores de membranas recambiables y de los genosensores basados en un transductor grafito-epoxi, obtenida de la siguiente manera:

$$\text{Señal de hibridación} = \bar{x} \text{ I}_{\text{máx}} \text{ genosensor} - \bar{x} \text{ I}_{\text{máx}} \text{ blanco}$$

El error de las barras representa la desviación estándar de la diferencia de los valores medios de los genosensores y de los blancos para cada lote (ec. 11, § 4B.2.1).

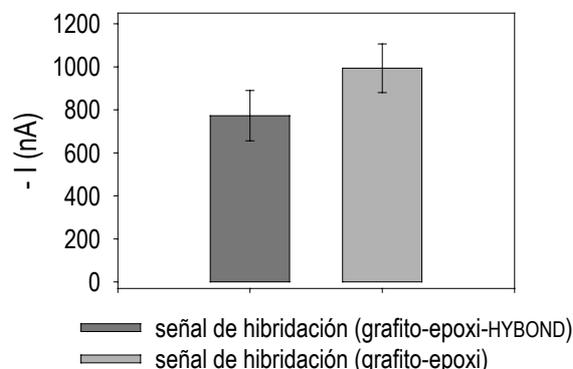


Figura 9.5. Comparación de las señales de hibridación de los genosensores de membranas recambiables y de los genosensores basados en la inmovilización del DNA sobre un composite grafito-epoxi. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 9.4.

La Tabla 9.13 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación entre las señales de hibridación de los genosensores de membranas recambiables y basados en un composite grafito-epoxi. Se supuso varianzas comparables. La diferencia de los valores medios (prueba t) no es significativamente diferente con un 95 % de confianza.

Tabla 9.13. Pruebas estadísticas para la comparación de los valores medios de la señal de hibridación (prueba t) de los genosensores de membranas recambiables y basados en un composite grafito-epoxi, realizadas con un 95 % de confianza.

ESTADÍSTICOS	Comparación de las señales de hibridación de los genosensores de membranas recambiables y de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi
S_p (ec. 12, § 4B.2.2.1)	$S_p = 149.6$
Grados libertad (ec. 16, § 4B.2.2.3)	8
Prueba t (bilateral) (ec. 14, § 4B.2.2.2)	$t_{\text{calc}} (1.24) < t_b (2.31)$

Estos resultados hacen suponer que la hipótesis inicial del efecto negativo de la membrana HYBOND en cuanto a la limitación de la difusión de las especies electroactivas en la interface del transductor es verdadera. Dicho de otra manera, se consigue obtener con los genosensores basados en composites grafito-epoxi señales amperométricas de la misma magnitud (incluso mayores) utilizando tiempos manifiestamente menores debido a que aumenta la sensibilidad de la detección electroquímica al eliminar la membrana HYBOND de la superficie del transductor.

La disminución en el tiempo del procedimiento se debe, principalmente, a la disminución del tiempo de hibridación de 15-16 horas a 4 horas, ya que el resto de los procedimientos previo a su

optimización (véase más adelante) llevan aproximadamente el mismo tiempo que en los genosensores de membranas recambiables.

Otro hecho destacable es la disminución significativa de la adsorción inespecífica al eliminar de la interfase del transductor grafito-epoxi la membrana de nylon HYBOND, siendo el tiempo de marcación enzimática el mismo para ambos procedimientos. Pese a la mayor sensibilidad de la detección de los sensores basados en el composite grafito-epoxi, la señal inespecífica es significativamente inferior respecto a los sensores de membranas recambiables. Esto se confirma con los resultados estadísticos que se muestran en la Tabla 9.14

Tabla 9.14. Pruebas estadísticas para la comparación de las varianzas (prueba F) y de los valores medios (prueba t) de las señales de los blancos de membranas recambiables y basados en un composite grafito-epoxi, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	“blanco membranas recambiables” n=4	“blanco grafito-epoxi” n=2
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_1 = 125.3$	$s_2 = 42.4$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (8.72) < F_{3,1} (864.2)$	
S_p (ec. 4A, § 4B.1.4.1)	$S_p = 110.5$	
grados libertad (ec. 6A, § 4B.1.4.3)	4	
Prueba t (bilateral) (ec. 5A, § 4B.1.4.2)	$t_{\text{calc}} (3.84) > t_4 (2.78)$	

Estos resultados hacen suponer que la adsorción inespecífica, que se debe fundamentalmente a la adsorción del conjugado enzimático como se viera en § 4.3.4 para el caso de la membrana HYBOND, es notablemente mayor para esta superficie que para el caso del composite grafito-epoxi.

Como ya se discutiera, la membrana HYBOND es de naturaleza hidrofílica y presenta potencial Z positivo entre pH 2.0 y 12.0. Es lógico pensar que las interacciones que presenta el conjugado enzimático con la membrana cargada positivamente son de tipo electrostático debido a cargas negativas de la enzima al pH de trabajo (7.2). Cabe destacar, sin embargo, que en este efecto interviene poco el residuo de estreptavidina, ya que su punto isoeléctrico es de 7.2-7.4 por la ausencia de carbohidratos.

La naturaleza del composite grafito-epoxi es mixta, ya que la matriz polimérica es de tipo no polar (y constituye un 80 % de la composición del composite), mientras que el grafito presenta naturaleza polar. Esta naturaleza mixta, pero principalmente no polar, podría ser las causa de que la adsorción inespecífica del conjugado enzimático sea menor en comparación con la membrana de nylon HYBOND.

Otro punto a discutir además del efecto de la naturaleza química de los transductores sobre la adsorción inespecífica es el efecto de la porosidad y permeabilidad de ambos soportes sobre dicho

fenómeno. Ya se ha visto que el composite grafito-epoxi muestra una cierta porosidad (Figura 2.16, § 2.3.5.2).

Sin embargo, las membranas de nylon son, además de más porosas que el composite grafito-epoxi, permeables ³¹, a diferencia de éste. Este hecho implica que el líquido puede penetrar en su interior y difundirse entre los poros, junto con los solutos que contiene. Así, el conjugado enzimático puede penetrar dentro de las membranas y retenerse en ellas inespecíficamente. Este fenómeno es notablemente inferior en el transductor rígido e impermeable basado en un composite grafito-epoxi.

La disminución de la señal amperométrica debido a la adsorción inespecífica aumenta notablemente la relación S/R al disminuir el denominador de este cociente para el caso de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi ($S/R = 7.6$) respecto a los genosensores de membranas recambiables ($S/R = 2.7$).

La Figura 9.6 muestra comparativamente la señal de los blancos basados en un composite grafito-epoxi (idem que Figura 9.4), y el ruido de fondo instrumental. Este ruido de fondo instrumental se determinó con los mismos transductores grafito-epoxi utilizados para los blancos, pero pulidos y ultrasonicados, es decir, presentando sólo la superficie fresca del composite grafito-epoxi y, por supuesto, sin enzima adsorbida inespecíficamente. La evaluación de estos transductores grafito-epoxi se realizó de manera idéntica a los blancos, es decir, con el mismo sistema amperométrico, solución amortiguadora, concentración de hidroquinona y de H_2O_2 y aplicando el mismo potencial.

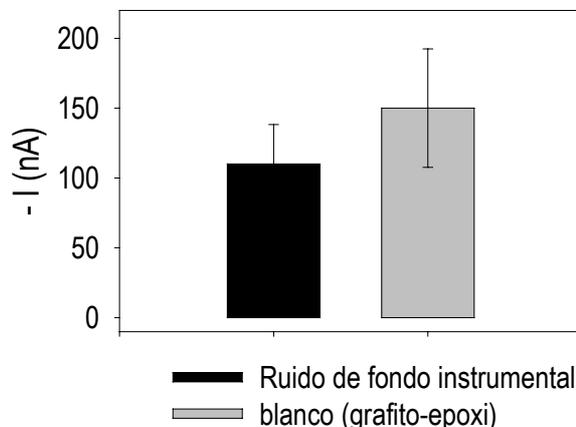


Figura 9.6. Comparación del ruido de fondo instrumental y los sensores blanco basados en un composite grafito-epoxi (véase Figura 9.4, B). Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl).

Los resultados estadísticos que se muestran en la Tabla 9.15 implican que la señal de los blancos basados en un composite grafito-epoxi es estadísticamente similar al ruido de fondo instrumental del sistema, es decir, que la adsorción inespecífica es ínfima.

Sin embargo, experimentalmente se observó durante la evaluación de los blancos comportamiento enzimático, por lo que hay algo de adsorción inespecífica debido a la enzima.

Teniendo en cuenta que la adsorción inespecífica es tan baja, se puede pensar en aumentar la cantidad de conjugado enzimático, y disminuir aún más los tiempos de los procedimientos de hibridación y de marcación enzimática.

Tabla 9.15. Pruebas estadísticas para la comparación de las varianzas (prueba F) y de los valores medios (prueba t) de las señales de los blancos basados en un composite grafito-epoxi y del ruido de fondo instrumental, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	“ruido de fondo instrumental” n=2	“blanco grafito-epoxi” n=2
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_1 = 28.3$	$s_2 = 42.4$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (2.25) < F_{1,1} (647.8)$	
S_p (ec. 4A, § 4B.1.4.1)	$S_p = 36.1$	
grados libertad (ec. 6A, § 4B.1.4.3)	2	
Prueba t (bilateral) (ec. 5A, § 4B.1.4.2)	$t_{\text{calc}} (1.1) < t_2 (4.3)$	

9.3.2 ULIDAD DEL TRATAMIENTO DE PREHIBRIDACIÓN Y DE PREMARCACIÓN CON SOLUCIÓN BLOQUEANTE

En vista de los resultados que se muestran en la Figura 9.6, es fácil anticipar que poco efecto pueden tener los tratamientos de prehibridación y de premarcación con solución bloqueante en cuanto a la disminución de la adsorción inespecífica, al ser esta tan baja y casi igual al ruido de fondo instrumental.

En la Figura 9.7 se muestran los resultados del experimento realizado en § 9.2.5.1. El objeto de esta experiencia es evaluar la efectividad del tratamiento de prehibridación (de 60 minutos) y de premarcación con solución bloqueante (de 30 minutos) en cuanto a la disminución de la adsorción inespecífica y al aumento, por tanto, de la relación S/R.

En el Experimento N° 1, se llevó a cabo el protocolo de preparación de los genosensores sin tratamiento de prehibridación y sin premarcación con solución bloqueante según la Tabla 9.1. En el Experimento N° 2 se llevó a cabo el protocolo de preparación de los genosensores sin tratamiento de prehibridación y con una premarcación con solución bloqueante de 30 minutos, como se muestra en la Tabla 9.2. Por último, en el Experimento N° 3 se llevó a cabo el protocolo de preparación de los genosensores con un tratamiento de prehibridación de 60 minutos y sin premarcación con solución bloqueante, según la Tabla 9.3.

Como puede observarse en la Figura 9.7, tanto las señales amperométricas de hibridación como las señales debida a la adsorción inespecífica no presentan un cambio significativo si se utilizan dichos procedimientos.

Esto puede deberse al hecho de que el nuevo transductor utilizado (grafito-epoxi) presente escasa adsorción inespecífica tanto de la sonda biotinilada como del conjugado enzimático, y por eso la utilización de estos procedimientos no favorece un aumento sustancial de la relación S/R que justifique su implementación.

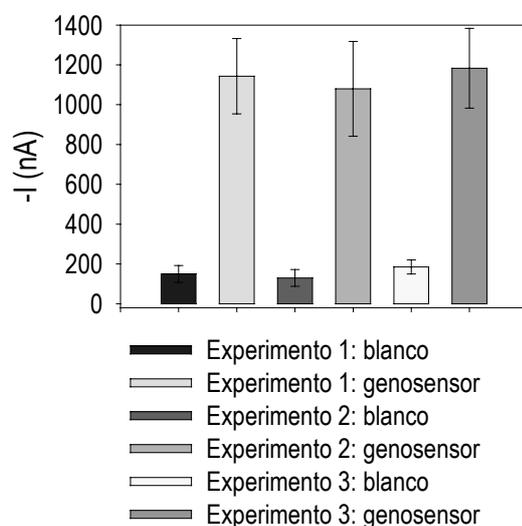


Figura 9.7. Evaluación del efecto del uso del tratamiento de prehibridación y de premarcación con solución bloqueante en un formato de reconocimiento múltiple mediante un genosensor basado en un composite grafito-epoxi. DNA analito 260 mer [poli(dA)] inmovilizado: 11.4 pmoles. Sonda funcionalizada con biotina dT(50-biotina): 61.2 pmoles. HRP-estreptavidina: 0.49 μg . Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Experimento 1: sin tratamiento de prehibridación y sin premarcación con solución bloqueante (Tabla 9.1). Experimento 2: sin tratamiento de prehibridación y con premarcación con solución bloqueante (Tabla 9.2). Experimento 3: con tratamiento de prehibridación y sin premarcación con solución bloqueante (Tabla 9.3). Los electrodos de trabajo fueron genosensores modificados según § 9.2.5.1. ($n=3$).

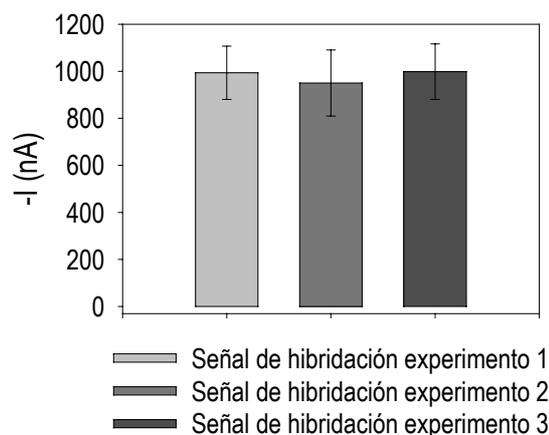


Figura 9.8. Señales de hibridación en la evaluación del efecto del uso del tratamiento de prehibridación y de premarcación con solución bloqueante en un formato de reconocimiento múltiple mediante un genosensor basado en la inmovilización del DNA sobre un composite grafito-epoxi. Los detalles experimentales son idénticos a los detallados para la Figura 9.7.

En la Figura 9.8 se muestra sólo la señal de hibridación para estos experimentos, obtenida con la siguiente expresión:

$$\text{Señal de hibridación} = \bar{x} I_{\text{máx}} \text{ genosensor} - \bar{x} I_{\text{máx}} \text{ blanco}$$

El error de las barras representa la desviación estándar de la diferencia de los valores medios de los genosensores y de los blancos para cada lote (ec. 11, § 4B.2.1).

En esta figura se puede observar mejor como la señal de los genosensores se mantiene invariable tanto como si se aplican o como si no se utilizan el tratamiento de prehibridación y de premarcación con solución bloqueante.

Es por eso que en todas las siguientes evaluaciones no se han utilizado, ya que sólo contribuyen a alargar el procedimiento y a aumentar su complejidad, sin aportar beneficios sustanciales.

9.3.3 TIEMPO DE HIBRIDACIÓN

En la Figura 9.9 se muestran los resultados de la experiencia que se describe en § 9.2.5.2. El objeto de esta experiencia es evaluar el efecto de la variación del tiempo de hibridación en el protocolo de preparación del genosensor amperométrico, de manera de conseguir acortar el procedimiento total de preparación del mismo.

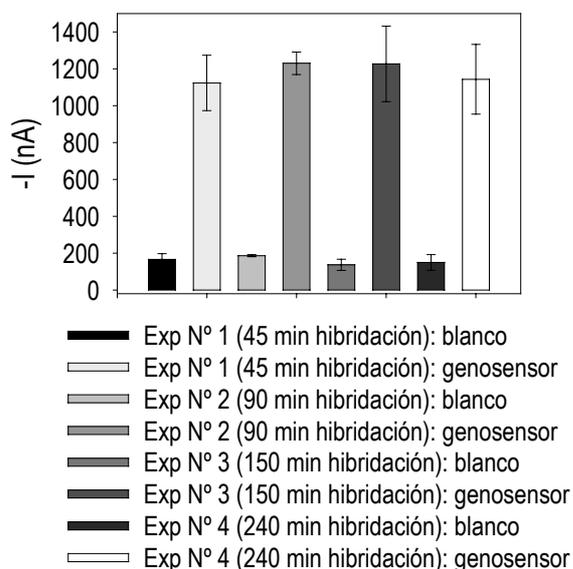


Figura 9.9. Evaluación del tiempo de hibridación en un formato de reconocimiento múltiple mediante un genosensor basado en la inmovilización del DNA sobre un composite grafito-epoxi. DNA analito 260 mer [poli(dA)] inmovilizado: 11.4 pmoles. Sonda funcionalizada con biotina dT(50-biotina): 61.2 pmoles. HRP-estreptavidina: 0.49 µg. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H₂O₂ 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Los electrodos de trabajo fueron genosensores modificados según § 9.2.5.2. n=3.

Para evaluar el efecto del tiempo de hibridación en el formato de reconocimiento múltiple se realizaron cuatro experiencias distintas, las cuales sólo variaron en el tiempo de hibridación de la sonda funcionalizada con biotina con el analito inmovilizado en el transductor grafito-epoxi. Se evaluaron tiempos de hibridación de 45, 90, 150 y 240 minutos.

Como puede observarse en la gráfica, con tiempos de hibridación de 45 minutos se alcanza una señal de hibridación similar a tiempos de hibridación mayores (de hasta cuatro horas).

Estos resultados son coincidentes con otros presentados en la bibliografía ²⁵. En este caso se plantea que la hibridación de oligonucleótidos de 80 pb es rápida, y requiere no más de 5 minutos para alcanzar una eficiencia de un 75 %, mientras que la hibridación de DNA de mayor longitud requiere un tiempo de 60 a 120 minutos para alcanzar una máxima eficiencia del 50 %.

Con estos resultados, los tiempos del procedimiento total de preparación de los genosensores se reducirían en 3 h 15 min. respecto a la sección anterior, y en 14 horas, respecto al genosensor de membranas recambiables.

Al igual que la disminución marcada de la adsorción inespecífica en los transductores grafito-epoxi, una cinética de hibridación tan rápida respecto a los genosensores de membranas recambiables puede explicarse por el hecho de que el transductor grafito-epoxi sea impermeable y rígido a diferencia de las membranas de nylon. Como el líquido no puede penetrar en la superficie del soporte, la sonda de DNA tiene acceso inmediato al DNA analito, sin necesidad de difundir dentro de los poros. Esto aumenta el grado de hibridación, aunque la agitación es importante para obtener el máximo grado de hibridación aún con soportes impermeables ³¹. Por otro lado, el hecho de inmovilizar el DNA directamente sobre el grafito-epoxi trae asociado un aumento de la señal electroquímica, al ser este transductor más sensible que el transductor grafito-epoxi-HYBOND (véase § 2.3.6.2), lo que implica la posibilidad de obtener mayores señales electroquímicas con menores tiempos de hibridación.

9.3.4 CANTIDAD DE ANALITO INMOVILIZADO EN EL TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI

En la Figura 9.10 se muestran los resultados de la experiencia llevada a cabo según § 9.2.5.3. El objeto de esta experiencia es evaluar el efecto de la variación de la cantidad de analito [poli(dA)] inmovilizado sobre el composite grafito-epoxi sobre la señal amperométrica de hibridación. Para tal fin, se realizaron genosensores los cuales sólo se diferenciaron en la cantidad de poli(dA) inmovilizado en el transductor grafito-epoxi.

Según se muestra en la figura, la disminución de la cantidad de DNA desde 11.4 pmoles a una cantidad 10 veces inferior aumenta la señal de hibridación a casi el doble. Este hecho podría deberse a dos causas fundamentales: la primera, a que cantidades menores de DNA inmovilizado sobre el composite harían que las bases nitrogenadas se encuentren más disponibles para hibridarse con la sonda complementaria biotilada [este mismo efecto se observaba en los genosensores de membranas recambiables (véase § 4.3.1)]; la segunda causa puede deberse a que cantidades mayores de DNA actuarían como una interfase que disminuiría –como si de una membrana se tratara– la conducción del composite, y perjudicaría la sensibilidad de los ensayos. Sea cual fuere el efecto, es claro que no es posible la cuantificación de analito inmovilizado sobre el transductor grafito-

epoxi, aunque este formato pueda utilizarse para ensayos cualitativos. En ensayos cualitativos, se puede detectar –mediante este procedimiento– la presencia de al menos 300 fmoles de analito.

Por otro lado, el hecho de que la cantidad óptima de DNA inmovilizada en el transductor grafito-epoxi sea al menos 10 veces inferior que para el caso del transductor grafito-epoxi-HYBOND, puede explicarse también por el hecho de que el primero sea impermeable y rígido a diferencia de las membranas de nylon. Durante la inmovilización del DNA sobre el transductor grafito-epoxi, el líquido no puede penetrar en la superficie del soporte y el DNA, por tanto, sólo queda adsorbido en la superficie del transductor y más disponible para la hibridación (como ya se ha visto en § 9.3.3). Lo contrario ocurre en las membranas de nylon, consumiéndose parte del DNA en difundir dentro de los poros. La cinética de hibridación en este último caso se ve dificultada por la difusión del solvente y los solutos dentro de los poros, por lo que la sonda de DNA no tiene acceso inmediato al DNA analito.

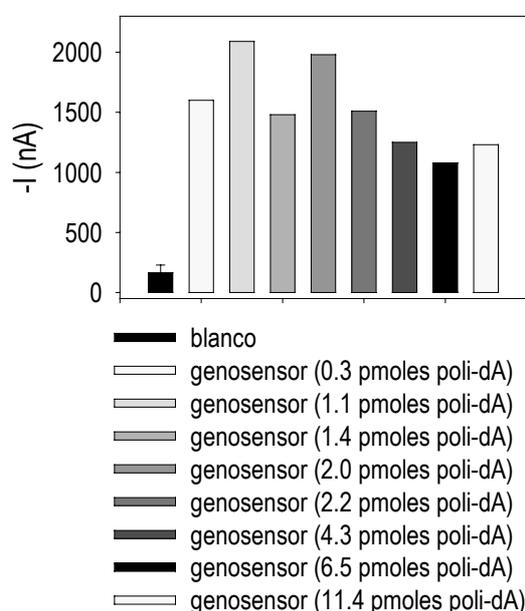


Figura 9.10. Evaluación del efecto de la variación de poli(dA) inmovilizado en el composite grafito-epoxi en un formato de reconocimiento múltiple. DNA analito 260 mer [poli(dA)] inmovilizado: desde 300 fmoles a 11.4 pmoles. Sonda funcionalizada con biotina dT(50-biotina): 61.2 pmoles. HRP-estreptavidina: 0.49 μ g. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Los electrodos de trabajo fueron genosensores modificados según § 9.2.5.3.

9.3.5 CANTIDAD DE HRP-ESTREPTAVIDINA EN LA SOLUCIÓN BLOQUEANTE DURANTE LA MARCACIÓN ENZIMÁTICA

En la Figura 9.11 se muestran los resultados de la experiencia llevada a cabo según § 9.2.5.4. El objeto de esta experiencia es evaluar el efecto de la variación de la cantidad de conjugado enzimático de la solución bloqueante durante la marcación enzimática. Para tal fin, se llevaron a cabo

distintas experiencias en las cuales sólo variaron en la cantidad de conjugado enzimático de la solución bloqueante desde 0.49 μg a 1.98 μg .

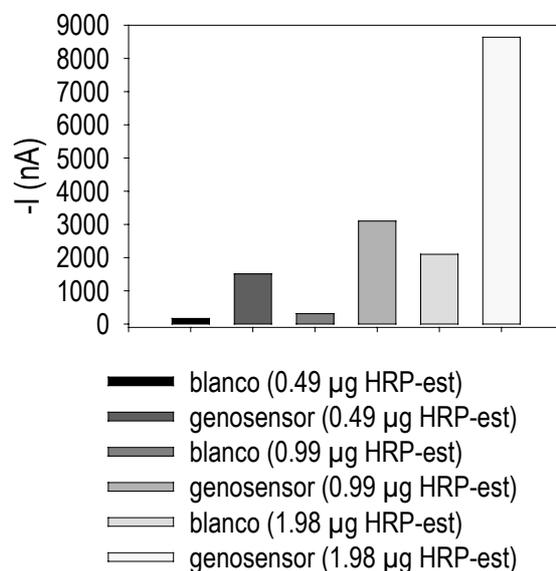


Figura 9.11. Evaluación del efecto de la variación de la cantidad de conjugado enzimático (HRP-estreptavidina) en un formato de reconocimiento múltiple. DNA analito 260 mer [poli(dA)] inmovilizado: 2.2 pmoles. Sonda funcionalizada con biotina dT(50)-biotina: 61.2 pmoles. HRP-estreptavidina: 0.49, 0.99 y 1.98 μg . Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Los electrodos de trabajo fueron genosensores modificados según § 9.2.5.4. ($n=3$).

Como puede observarse en la figura, un aumento de la cantidad de conjugado enzimático del doble en la solución bloqueante (de 0.49 μg a 0.99 μg) incrementa notablemente la señal de hibridación (a casi el doble), pero no así la señal de la adsorción inespecífica. Sin embargo, a partir de este valor, un aumento del doble del conjugado enzimático (de 0.99 a 1.98 μg), aumenta a más del doble la señal de hibridación, pero también se incrementa de manera muy notable la señal de la adsorción inespecífica. Dicho de otra manera, este aumento de más del doble se realiza a expensas del aumento de la señal inespecífica.

En la Figura 9.12 se grafica la relación S/R, es decir el cociente entre la señal del genosensor y la señal del blanco, en la que se puede observar como este indicador disminuye drásticamente desde 0.99 μg a 1.98 μg , por lo que se escoge, para los estudios posteriores, una cantidad de 0.99 μg de conjugado enzimático.

Sin embargo, si se comparan los valores de este indicador respecto a los calculados para los genosensores de membranas recambiables (§ 4.3.3), se ve que los valores del parámetro S/R son notablemente superiores para el caso de los genosensores basados en composites grafito-epoxi, debido fundamentalmente a que los denominadores de la relación (es decir, la adsorción inespecífica) son sensiblemente menores.

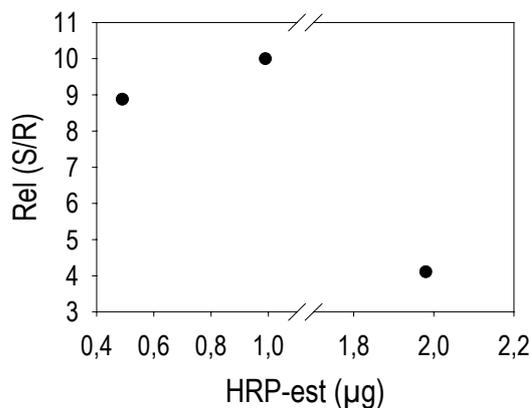


Figura 9.12. Relación S/R obtenida con la variación de la cantidad de conjugado enzimático (HRP-estreptavidina) en un formato de reconocimiento múltiple. Las condiciones experimentales son las mismas que los detallados para la Figura 9.11.

9.3.6 TIEMPO DEL PROCEDIMIENTO DE MARCACIÓN ENZIMÁTICA

En la Figura 9.13 se muestran los resultados de la experiencia llevada a cabo según § 9.2.5.5, en la que se evaluó el efecto de la variación del tiempo de marcación enzimática, de manera de conseguir acortar el procedimiento total de preparación de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi.

Como puede observarse en la Figura, con un tiempo de 30 minutos se consigue que la reacción del conjugado enzimático con el dúplex funcionalizado con biotina formado en la superficie del transductor grafito-epoxi sea casi completa, obteniéndose una muy buena señal de hibridación. Es importante destacar que, así como se observa un aumento notable en la señal de los genosensores en el período de tiempo comprendido entre 15 minutos a 30 minutos de reacción, esto mismo no ocurre con la adsorción inespecífica, la cual se mantiene relativamente constante a lo largo del período de tiempo evaluado. Esto permite concluir (teniendo también en cuenta los resultados que se muestran en § 9.3.5) que el aumento de la adsorción inespecífica depende más de la cantidad de conjugado enzimático que del tiempo de la reacción de marcación.

En la Figura 9.14 se observan las señales de hibridación, es decir, la diferencia entre las señales de los genosensores y los blancos. Teniendo en cuenta el valor de hibridación y suponiendo que la reacción es completa a la hora de marcación enzimática, se puede calcular que el 70 % de la reacción se lleva a cabo a los 15 minutos, a los 20 minutos ocurre el 80 % de la reacción, a los 30 minutos se forman el 92 % de los híbridos marcados con la enzima, mientras que a los 40 minutos la reacción es casi completa (98 %), por lo que creemos que un tiempo de reacción de 30 minutos es adecuada.

Teniendo en cuenta que estos resultados se obtuvieron con las condiciones optimizadas en los apartados anteriores, el protocolo completo de preparación de los genosensores se consigue en un tiempo total de unas 3 horas (90 minutos de inmovilización, 45 minutos de hibridación, 30 minutos de marcación enzimática, 15 minutos de lavados y detección amperométrica).

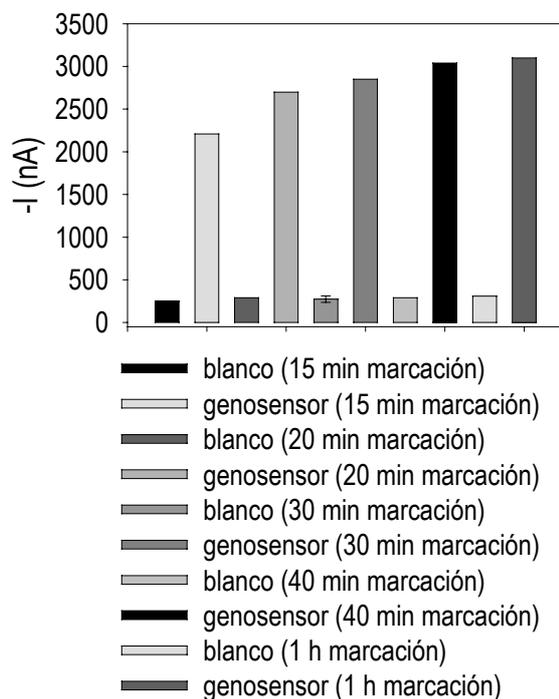


Figura 9.13. Evaluación del efecto de la variación del tiempo de marcación enzimática en un formato de reconocimiento múltiple. DNA analito 260 mer [poli(dA)] inmovilizado: 2.2 pmoles. Sonda funcionalizada con biotina dT(50-biotina): 61.2 pmoles. HRP-estreptavidina: 0.99 μ g. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Los electrodos de trabajo fueron genosensores modificados según § 9.2.5.5.

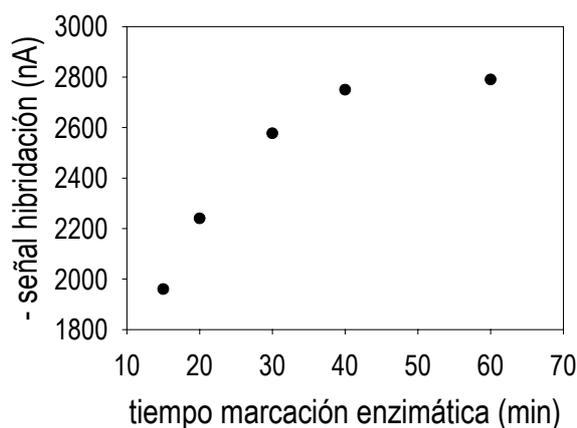


Figura 9.14. Señales de hibridación obtenidas con la variación del tiempo de marcación enzimática en un formato de reconocimiento múltiple. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 9.13.

9.3.7 TIEMPO DEL PROCEDIMIENTO DE INMOVILIZACIÓN

En la Figura 9.15 se muestran los resultados de la experiencia llevada a cabo según § 9.2.5.6, en la que se evaluó el efecto de la variación del tiempo de inmovilización del DNA (analito) en un composite grafito-epoxi de manera de conseguir acortar el procedimiento total de preparación de los genosensores.

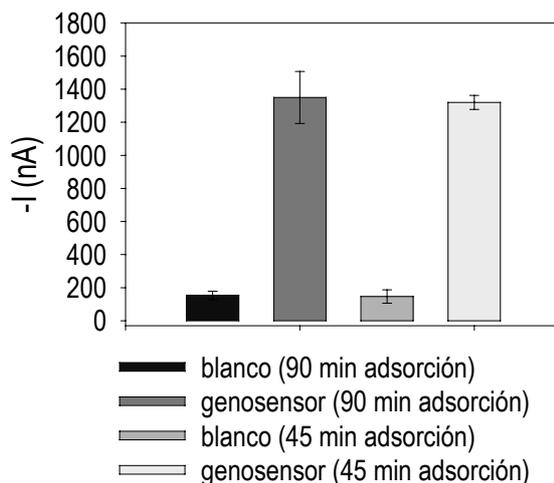


Figura 9.15. Evaluación del efecto de la variación del tiempo de inmovilización en un formato de reconocimiento múltiple. DNA analito 260 mer [poli(dA)] inmovilizado: 531 fmoles. Sonda funcionalizada con biotina dT(50-biotina): 379 fmoles. HRP-estreptavidina: 0.99 μ g. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H₂O₂ 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Los electrodos de trabajo fueron genosensores modificados según § 9.2.5.6. (n=3).

Para evaluar el efecto del tiempo de inmovilización del DNA en el formato de reconocimiento múltiple, se realizaron genosensores en los cuales sólo se varió el tiempo de inmovilización del DNA en el transductor grafito-epoxi entre 45 y 90 minutos.

Un tiempo de 45 minutos es el mínimo requerido para que el DNA se adsorba, ya que con tiempos menores la solución depositada en el composite grafito-epoxi no se seca completamente.

Como puede observarse, no hay diferencias significativas en los resultados obtenidos entre un tiempo de inmovilización de 45 minutos y 1 h 30 min.

Teniendo en cuenta que estos resultados se obtuvieron con las condiciones optimizadas en los apartados anteriores, el protocolo completo –ya optimizado en cuanto a tiempo de preparación de los genosensores– se consigue en un tiempo total de 2 h 30 min.

Este tiempo puede desglosarse en:

- 5 minutos para el tratamiento del transductor,
- 45 minutos de inmovilización,
- 45 minutos de hibridación,
- 10 minutos de lavados posthibridación,
- 30 minutos de marcación enzimática,
- 15 minutos para la detección amperométrica.

9.3.8 CANTIDAD DE SONDA FUNCIONALIZADA CON BIOTINA EN LA SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN

En la Figura 9.16 se muestran los resultados de la experiencia llevada a cabo según § 9.2.5.7, en la que se evaluó el efecto de la variación de la cantidad de sonda funcionalizada con biotina de la solución de hibridación, para una cantidad de DNA analito inmovilizado de 531 fmoles.

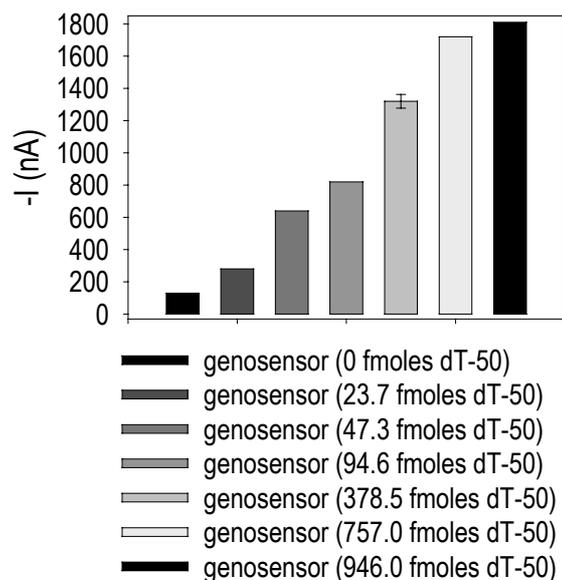


Figura 9.16. Evaluación del efecto de la variación de la cantidad de dT(50)-biotina en la solución de hibridación en un formato de reconocimiento múltiple. DNA analito 260 mer [poli(dA)] inmovilizado: 531 fmoles. Sonda funcionalizada con biotina dT(50)-biotina: de 0 a 946.0 fmoles. HRP-estreptavidina: 0.99 μ g. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H₂O₂ 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Los electrodos de trabajo fueron genosensores modificados según § 9.2.5.7.

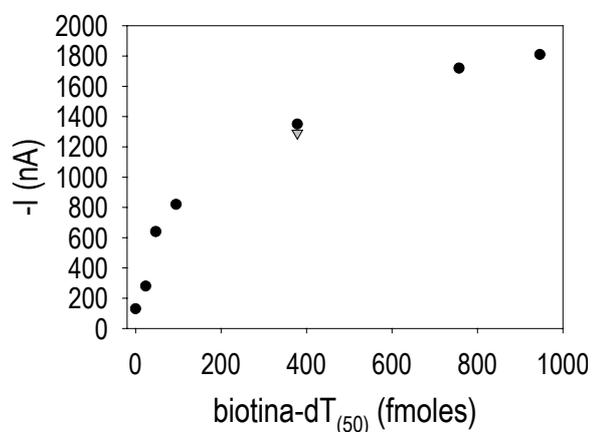


Figura 9.17. Evaluación del efecto de la variación de la cantidad de dT(50)-biotina en la solución de hibridación en un formato de reconocimiento múltiple. Las condiciones experimentales son las mismas que para Figura 9.16.

Para evaluar el efecto de la cantidad de sonda funcionalizada con biotina de la solución de hibridación en el formato de reconocimiento múltiple, se realizaron genosensores en los cuales se varió la cantidad de dT(50)-biotina, desde 23.7 a 757.0 fmoles.

Como se pueden observar mejor en la Figura 9.17, para una cantidad de analito de 531 fmoles se obtiene una excelente señal de hibridación con una cantidad de sonda biotinilada de aproximadamente 750 fmoles, y a partir de este valor se observa una tendencia a la saturación de la señal, para un tiempo de hibridación de 45 minutos.

9.3.9 EVALUACIÓN DE INTERFERENCIAS: ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DEL CONJUGADO ENZIMÁTICO (HRP-ESTREPTAVIDINA) CON EL COMPOSITE GRAFITO-EPOXI MODIFICADO CON DNA DE DISTINTO ORIGEN

En la Figura 9.18 se muestran los resultados de la experiencia descrita en § 9.2.5.8 para la evaluación del fenómeno de interacciones inespecíficas entre el conjugado enzimático y el composite grafito-epoxi modificado con DNA.

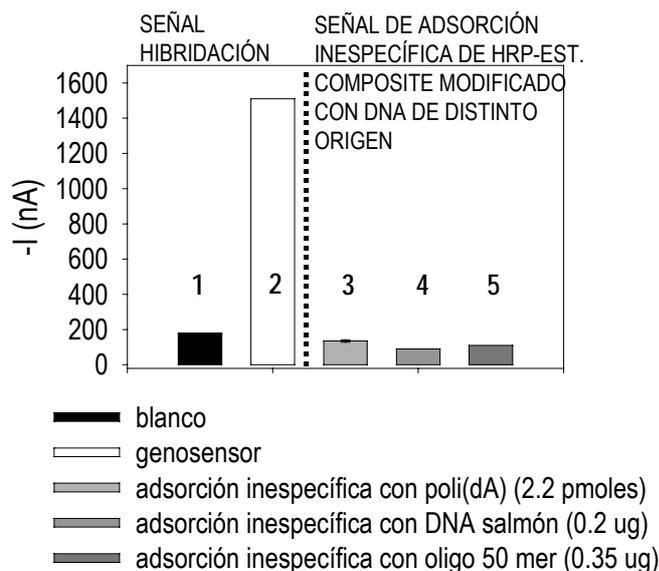


Figura 9.18. Evaluación de la adsorción inespecífica del conjugado enzimático sobre el composite grafito-epoxi modificado con DNA de distinto origen. DNA analito 260 mer [poli(dA)] inmovilizado: 2.2 pmoles (sólo en experimentos 2 y 3). Sonda funcionalizada con biotina dT(50-biotina): 61.2 pmoles (sólo en experimentos 1 y 2). HRP-estreptavidina: 0.49 μ g (experimentos 1 a 5). DNA esperma de salmón: 0.2 μ g (experimento 4). Oligonucleótido 50 mer: 0.35 μ g (experimento 5). Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H₂O₂ 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Los electrodos de trabajo fueron genosensores modificados según § 9.2.5.8.

El objeto de esta experiencia es asegurar que la señal observada en las experiencias anteriores se debe puramente a hibridación y no a interacciones inespecíficas entre el DNA adsorbido en la superficie del composite grafito-epoxi y el conjugado enzimático HRP-estreptavidina.

Esta evaluación responde al hecho de que el blanco genosensor evalúa la adsorción del conjugado enzimático sobre el transductor grafito-epoxi, pero en los genosensores esta superficie se encuentra modificada con DNA, por lo que las interacciones con el conjugado enzimático podrían ser distintas.

Para tal fin, se realizaron cinco experimentos distintos. El experimento N° 1, evalúa la señal amperométrica obtenida debido a la adsorción inespecífica de la sonda biotinilada y del conjugado enzimático sobre el composite grafito-epoxi. El experimento N° 2 evalúa la señal de hibridación propiamente dicha (genosensor). El experimento N° 3 evalúa la adsorción o interacciones inespecíficas del conjugado enzimático sobre el transductor grafito-epoxi modificado por adsorción con poli(dA). El experimento N° 4 evalúa la adsorción o interacciones inespecíficas del conjugado enzimático sobre el transductor grafito-epoxi modificado por adsorción con un DNA de distinto origen, en este caso de esperma de salmón. El experimento N° 5 evalúa la adsorción o interacciones inespecíficas del conjugado enzimático sobre el transductor grafito-epoxi modificado por adsorción con un oligonucleótido de 50 mer.

Como puede observarse en la Figura 9.18, la señal de los sensores que evalúan la interacción inespecífica es similar a la del blanco del genosensor, por lo cual la adsorción inespecífica del conjugado enzimático es independiente de la modificación del composite grafito epoxi con DNA de distinto origen.

9.3.10 EVALUACIÓN DE INTERFERENCIAS: ESTUDIO DE LA HIBRIDACIÓN INESPECÍFICA ENTRE DNA DE DISTINTO ORIGEN INMOVILIZADO EN EL COMPOSITE GRAFITO-EPOXI Y SONDA FUNCIONALIZADA CON BIOTINA

El objeto de esta experiencia es confirmar que la señal observada en las experiencias anteriores se debe a hibridación entre DNA complementario (es decir, que la hibridación sea específica) y no a interacciones inespecíficas entre DNA adsorbido en la superficie del composite grafito-epoxi de distinto origen y la sonda funcionalizada con biotina. Dicho de otra manera, se pretende confirmar que un tiempo de hibridación de 45 minutos en las condiciones especificadas es suficiente para generar una señal amperométrica debido a hibridación específica.

Para evaluar este fenómeno, se realizaron cuatro experimentos distintos, según § 9.2.5.9. El experimento N° 1, evalúa la señal amperométrica obtenida debido a la adsorción inespecífica de la sonda biotinilada y del conjugado enzimático sobre el composite grafito-epoxi. El experimento N° 2 evalúa la señal de hibridación propiamente dicha (genosensor). El experimento N° 3 evalúa la hibridación inespecífica existente entre la sonda dT(50)-biotina, y un DNA inespecífico de esperma de salmón. El experimento N° 4 evalúa la hibridación inespecífica existente entre la sonda dT(50)-biotina, y un oligonucleótido de 50 mer no complementario.

Como puede observarse en la Figura, un tiempo de hibridación de 45 minutos a una temperatura de 42° C es suficiente para generar una señal de hibridación considerable. A estas condiciones de hibridación, no existe interacciones inespecíficas entre la sonda funcionalizada con biotina y DNA de distinto origen, por lo que se puede asegurar que la señal de hibridación obtenida es específica.

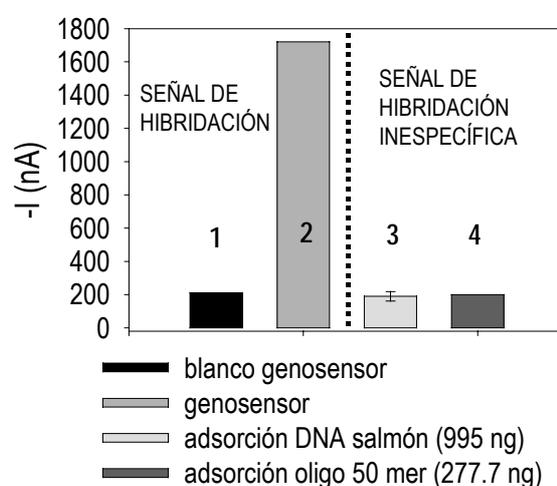


Figura 9.19. Evaluación de la hibridación inespecífica sobre el composite grafito-epoxi modificado con DNA de distinto origen. DNA analito 260 mer [poli(dA)] inmovilizado: 531 fmoles (sólo en experimento 2). Sonda funcionalizada con biotina dT(50-biotina): 757 fmoles (experimentos 1 a 4). HRP-estreptavidina: 0.99 μg (experimentos 1 a 4). DNA esperma de salmón: 995 ng (experimento 3). Oligonucleótido 50 mer: 277.7 ng (experimento 4). Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Los electrodos de trabajo fueron genosensores modificados según § 9.2.5.9. (n=3).

9.4 CONCLUSIONES

1. Se ha conseguido optimizar un nuevo dispositivo genosensor de hibridación amperométrico en el que se inmoviliza por adsorción el DNA analito sobre un composite rígido grafito-epoxi, en un formato de reconocimiento múltiple.
2. Se ha observado que la eliminación de la membrana HYBOND de la superficie del transductor grafito-epoxi aumenta la sensibilidad de los ensayos. Así, se consigue reducir el tiempo de preparación de los genosensores de 24 horas a 2 h 30 min., respecto a un genosensor de membranas recambiables.
3. Pese a la mayor sensibilidad en la detección para el nuevo dispositivo genosensor desarrollado, se ha observado una disminución notable de la señal debida a la adsorción inespecífica (sobre el composite grafito-epoxi), respecto al genosensor de membranas recambiables (sobre la membrana de nylon HYBOND).
4. Debido a la escasa señal de adsorción inespecífica, no se justifica la utilización del tratamiento de prehibridación ni de premarcación con solución bloqueante, ya que con su implementación no se observa una mejora sustancial de la relación S/R. La eliminación de estos pasos (respecto al genosensor de membranas recambiables) contribuye a acortar el procedimiento total en 4 h 30 min.
5. Con el nuevo dispositivo creado se consigue disminuir el tiempo del procedimiento de hibridación de 15 horas (para el genosensor de membranas recambiables), a 45 minutos.

Este es el paso que consigue acortar considerablemente el tiempo de procedimiento total de preparación del genosensor.

6. El aumento de la cantidad de analito inmovilizado en el composite grafito-epoxi provoca la disminución de la señal amperométrica de hibridación. Este efecto puede deberse a impedimentos estéricos de las bases nitrogenadas del DNA o bien a la creación de una interfase que disminuye –como si de una membrana se tratara– la conducción del transductor.

7. Este nuevo formato permite la detección cualitativa de al menos 300 fmoles de analito.

8. El hecho de que el transductor grafito-epoxi sea rígido e impermeable, justifica observaciones tales como la menor adsorción inespecífica, el menor tiempo de hibridación, y la menor cantidad de analito necesario, respecto a los genosensores de membrana recambiables basados en la inmovilización en una membrana de nylon.

9. Se observó que con un tiempo de marcación enzimática de 30 minutos se consigue que la reacción del conjugado enzimático con el dúplex preformado sobre el composite se complete en un 92 %.

10. La adsorción inespecífica no aumenta sustancialmente con el tiempo de reacción de marcación, sino que depende más bien de la cantidad de conjugado en la solución bloqueante.

11. Un tiempo de inmovilización de 45 minutos es suficiente para conseguir una inmovilización efectiva del analito sobre el composite grafito-epoxi.

12. Las señales amperométricas que se observan se deben a hibridación específica, y no a interacciones DNA(analito)/HRP-estreptavidina, o por la formación de dúplex de DNA no complementarios, para un tiempo de hibridación de 45 minutos.

13. La adsorción inespecífica sobre el composite grafito-epoxi es controlada y reproducible. Puede evitarse el hecho de preparar “ensayos blanco” para evaluarla, si esta señal se mantiene, su magnitud es conocida y no se cambia de producto comercial de conjugado enzimático.

14. El protocolo final de preparación de genosensores basados en un composite grafito-epoxi consiste en: adsorción del analito (45 minutos), hibridación (45 minutos), y marcación enzimática (30 minutos), lavados y determinación del sensor (30 minutos), siendo innecesarios los pasos de prehibridación y de premarcación con solución bloqueante.

9.5 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ G. Marrazza, I. Chianella, M. Mascini. *Biosens. Bioelectron.* 1999, 14, 43-51.
- ² J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi. *Anal. Chim. Acta* 1996, 326, 141-147.
- ³ J. Wang, X. Cai, C. Jonsson, M. Balakrishnan. *Electroanalysis* 1996, 8, 20-24.
- ⁴ J. Wang, X. Cai, J. R. Fernandes, D. H. Grant, M. Ozsoz. *Anal. Chem.* 1997, 69, 4056-4059.
- ⁵ J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, N. Dontha. *Biosens. Bioelectron.* 1997, 12, 587-599.
- ⁶ J. Labuda, M. Bucková, M. Vanicková, J. Mattusch, R. Wennrich. *Electroanalysis* 1999, 11, 101-107.
- ⁷ A. M. Oliveira Brett, S. H. P. Serrano, I. Gutz, M. A. La-Scalea, M. L. Cruz. *Electroanalysis* 1997, 9, 1132-1137.
- ⁸ A. M. Oliveira Brett, T. R. A. Macedo, D. Raimundo, M. H. Marques, S. H. P. Serrano. *Biosens. Bioelectron.* 1998, 13, 861-867.
- ⁹ K. Hashimoto, K. Ito, Y. Ishimori. *Anal. Chim. Acta* 1994, 286, 219-224.
- ¹⁰ D-W. Pang, H. D. Abruña. *Anal. Chem.* 1998, 70, 3162-3169.
- ¹¹ E. Palacek. *Electroanalysis* 1996, 8, 7-14.
- ¹² M. Fojta, E. Palacek. *Anal. Chim. Acta* 1997, 342, 1-12.
- ¹³ Z. Li, H. Wang, S. Dong, E. Wang. *Analytical Sciences* 1997, 13, 305-310.
- ¹⁴ S. Alegret. *Analyst* 1996, 121, 1751-1758.
- ¹⁵ K. B. Oldham. *J. Electroanal. Chem.* 1981, 122, 1-17.
- ¹⁶ D. E. Tallman, S. L. Petersen. *Electroanalysis* 1990, 2, 499-510.
- ¹⁷ K. E. Creasy, B. R. Shawn. *Anal. Chem.* 1989, 61, 1460-1465.
- ¹⁸ F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret. *Trends Anal. Chem.* 1996, 15, 296-304.
- ¹⁹ R. N. Adams. *Anal. Chem.* 1958, 30, 1576.
- ²⁰ K. C. Reed, D. A. Mann. *Nucleic Acids Res.* 1985, 13, 7207-7221.
- ²¹ L. J. Kricka. *Nonisotopic DNA Probe Techniques*; Academic Press, Inc.: San Diego, 1992.
- ²² G. M. Church, W. Gilbert. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 1991-1995.
- ²³ J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2th ed.*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989.
- ²⁴ J. Meinkoth, G. Wahl. *Anal. Biochem.* 1984, 138, 267-284.
- ²⁵ T. R. Gingeras, D. Y. Kwok, G. R. Davis. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 5373-5390.
- ²⁶ M. Renz, C. Kurz. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 3435-3444.
- ²⁷ L. Singh, K. W. Jones. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 5627-2638.
- ²⁸ L. T. Kirby. *DNA Fingerprinting*; Stockton Press: New York, 1990.
- ²⁹ A. C. Syvanen, M. Laaksonen, H. Soderlund. *Nucleic Acids Res.* 1986, 14, 5037-5048.
- ³⁰ S. F. Wolf, L. Haines, J. Fisch, J. N. Kremsky, J. P. Dougherty, K. Jacobs. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 2911-2926.
- ³¹ E. Southern, K. Mir, M. Shchepinov. *Nature Genetics Sup.* 1999, 21, 5-9.