
DISEÑO DE EXPERIMENTOS

DEFINICIÓN E INTERPRETACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL.
ESTUDIO DE LOS EFECTOS E INTERACCIONES DE LAS PRINCIPALES
VARIABLES IMPLICADAS EN LA CONSTRUCCIÓN DE GENOSENSORES
BASADOS EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI

9A.1 INTRODUCCIÓN

En el trabajo descrito en el capítulo 9 se ha desarrollado un nuevo dispositivo genosensor de hibridación con detección amperométrica, en el que por primera vez se inmoviliza por adsorción física el DNA analito sobre un transductor basado en un composite rígido grafito-epoxi.

El hecho de haber suprimido la membrana y de inmovilizar el DNA directamente sobre el transductor trajo asociado un aumento de señal electroquímica y la reducción de los tiempos empleados en el procedimiento total de análisis de 24 horas a 2 h 30 min., en comparación con los genosensores de membranas recambiables (capítulos 4 a 8).

La relación S/R con el nuevo dispositivo genosensor aumentó considerablemente, debido a que la adsorción inespecífica observada en el nuevo material utilizado como transductor –composite grafito-epoxi– es significativamente inferior a la observada con las membranas de nylon HYBOND. Debido a esta disminución en la adsorción inespecífica, se consiguió simplificar el proceso de preparación de los genosensores, al eliminar los pasos de bloqueo de la superficie del composite con macromoléculas –tratamiento de prehibridación y premarcación con solución bloqueante–.

En el trabajo descrito en el capítulo 9 se han optimizado variables tales como los tiempos de los procedimientos de inmovilización del DNA analito, de hibridación con la sonda biotinilada, y de marcación enzimática con el conjugado HRP-estreptavidina, obteniéndose un protocolo final que consiste en unos tiempos de 45, 45 y 30 minutos, respectivamente. Asimismo, se vio el efecto de variar las cantidades de reactivos implicados en la preparación del dispositivo genosensor, para poder tener un dominio experimental más acotado.

- solución de lavado postmarcación: 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

9A.2.2 DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Se ha programado un diseño 2^3 para estudiar los efectos de tres variables a dos niveles:

- Variable A: cantidad de poli(dA) inmovilizado en el transductor grafito-epoxi;
- Variable B: cantidad de sonda biotinilada dT(50)-biotina en la solución de hibridación;
- Variable C: cantidad de conjugado enzimático HRP-estreptavidina en la solución bloqueante, durante el paso de marcación enzimática.

El análisis de estas variables se realizará a través de un diseño factorial completo (DFC). Un DFC permite conocer y evaluar los efectos independientes de las variables sobre la respuesta y los efectos de la acción simultánea de dos o más de ellas (interacciones).

Se ha seleccionado como respuesta a analizar la señal de hibridación amperométrica (en nA), que se obtiene por la siguiente expresión:

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

Asimismo, para la evaluación de la señal debida a la adsorción inespecífica (en nA), se ha programado un diseño 2^2 para estudiar los efectos de dos variables a dos niveles:

- Variable B: cantidad de sonda biotinilada dT(50)-biotina en la solución de hibridación;
- Variable C: cantidad de conjugado enzimático HRP-estreptavidina en la solución bloqueante, durante el paso de marcación enzimática.

El análisis de estas variables se realizará también a través de un diseño factorial completo (DFC).

La respuesta a analizar (adsorción inespecífica) se obtiene por la siguiente expresión:

$$\text{Señal de adsorción inespecífica} = \bar{x} I_{\text{máx}} \text{ blancos}$$

Se denomina *efecto* al cambio en la respuesta al variar una variable de un nivel bajo a un nivel alto. Existe *interacción* cuando el efecto de la variable depende del nivel en que se encuentren las demás variables. Como se trabajará con un DFC, no existen efectos de variables principales confundidos con interacciones.

9A.2.2.1 Codificación y construcción del diseño. Determinación del dominio experimental de cada variable

Como se ha escogido para el estudio de la señal de hibridación un diseño factorial completo 2^3 , (3 factores a dos niveles), la Tabla 9A.1 muestra el valor de las tres variables escogidos como nivel bajo y nivel alto del diseño experimental. Para el caso del estudio de la señal debido a la adsorción

inespecífica, el diseño es 2^2 (dos factores a dos niveles). La Tabla 9A.2 muestra el valor de las dos variables B y C escogidos como nivel bajo y nivel alto del diseño experimental.

Tabla 9A.1. *Dominio experimental de las variables codificadas cuando se evalúa como respuesta la señal de hibridación mediante un diseño factorial completo 2^3 .*

VARIABLES	CODIFICACIÓN	
	NIVEL BAJO (-1)	NIVEL ALTO (+1)
protocolo de inmovilización: VARIABLE A: Poli(dA) -analito-	0.84 pmoles	10.88 pmoles
protocolo de hibridación: VARIABLE B: dT(50)-biotina	0.76 pmoles	9.97 pmoles
protocolo de marcación enzimática: VARIABLE C: HRP-estreptavidina	0.66 μ g	1.20 μ g

Tabla 9A.2. *Dominio experimental de las variables codificadas cuando se evalúa como respuesta la adsorción inespecífica mediante un diseño factorial completo 2^2 .*

VARIABLES	CODIFICACIÓN	
	NIVEL BAJO (-1)	NIVEL ALTO (+1)
protocolo de hibridación: VARIABLE B: dT(50)-biotina	0.76 pmoles	9.97 pmoles
protocolo de marcación enzimática: VARIABLE C: HRP-estreptavidina	0.66 μ g	1.20 μ g

9A.2.2.2 Construcción de la matriz del diseño de experimentos

La Tabla 9A.3 muestra la matriz del diseño de experimentos en la que se muestra los efectos principales y las interacciones, y los niveles de las variables codificadas para la evaluación de la señal de hibridación como respuesta.

Como existen 3 factores a dos niveles, se realizaron (como muestra la tabla) 8 experimentos ($2^{k(\text{factores})} = n^\circ$ de experimentos) y sus correspondientes triplicados.

Para el caso de la evaluación de la respuesta debido a la adsorción inespecífica, como existen 2 factores a dos niveles, se realizaron 4 experimentos ($2^{k(\text{factores})} = n^\circ$ de experimentos) tal como se muestra en la Tabla 9A.4 y sus correspondientes triplicados. En este caso habrá una única interacción secundaria entre ambos factores principales.

En la práctica, el orden en el que se realicen los experimentos debe ser aleatorio y no estar sistematizado según el orden preestablecido en la matriz del diseño. Esto impide arrastrar errores sistemáticos.

Tabla 9A.3. Matriz del diseño experimental cuando se evalúa como respuesta la señal de hibridación mediante un diseño factorial completo 2³.

NÚMERO DE EXPERIENCIA	FACTORES (principales)			INTERACCIONES			
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

Tabla 9A.4. Matriz del diseño experimental cuando se evalúa como respuesta la señal de la adsorción inespecífica mediante un diseño factorial completo 2².

NÚMERO DE EXPERIENCIA	FACTORES PRINCIPALES	
	B	C
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1

9A.2.3 REALIZACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS: MODIFICACIÓN DEL TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI Y EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA

Los genosensores se prepararon mediante un protocolo que constó de 3 pasos fundamentales:

- 1.-Inmovilización de poli(dA) en la superficie del genosensor basado en un transductor tipo composite rígido grafito-epoxi
- 2.-Hibridación del analito inmovilizado en el transductor grafito-epoxi
- 3.-Marcación enzimática posthibridación de los híbridos formados en el transductor grafito-epoxi.

Una vez preparados, los genosensores fueron evaluados amperométricamente.

En las secciones siguientes, se trata brevemente cada uno de estos pasos, que ya fueran descriptos en detalle en el capítulo 9.

9A.2.3.1 Inmovilización de poli(dA) en un composite grafito-epoxi

- 1.- Se tratan los electrodos con papel abrasivo fino (de 800) y luego con papel de alúmina de 3 μm . 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 μl (de la solución final obtenida del procedimiento de preparación del DNA, § 9.2.2.1) 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 °C durante 45 minutos (§ 9.3.7).

9A.2.3.2 Hibridación del transductor grafito-epoxi modificado con el analito

- 1.- Se adiciona un volumen (en μl) de solución de hibridación (§ 9.2.2.3) 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) (preparada según § 4.2.5.7), 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 (§ 9A.2.3.1).
- 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 de 45 minutos (§ 9.3.3).
- 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.

9A.2.3.3 Marcación enzimática posthibridación

- 1.- Se adiciona 150 μl de solución de conjugado enzimático (§ 4.2.6.8) en solución bloqueante (§ 9.2.2.4) 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 30 minutos (§ 9.3.6).

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 (§ 4.2.6.7), a 20 °C
- b.- Conservación –hasta el momento de la evaluación- en tubos eppendorf con 150 µl de solución de lavado, a 20 °C

9A.2.3.4 Preparación de los genosensores basados en un 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, se realizó en paralelo un lote de sensores blanco, en los que se adicionaron los mismos reactivos que en los genosensores excepto el analito. Por cada lote se procesan normalmente replicados 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 Figura 9A.1 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 los apartados siguientes se explica el protocolo de preparación de los genosensores y de los sensores blancos.

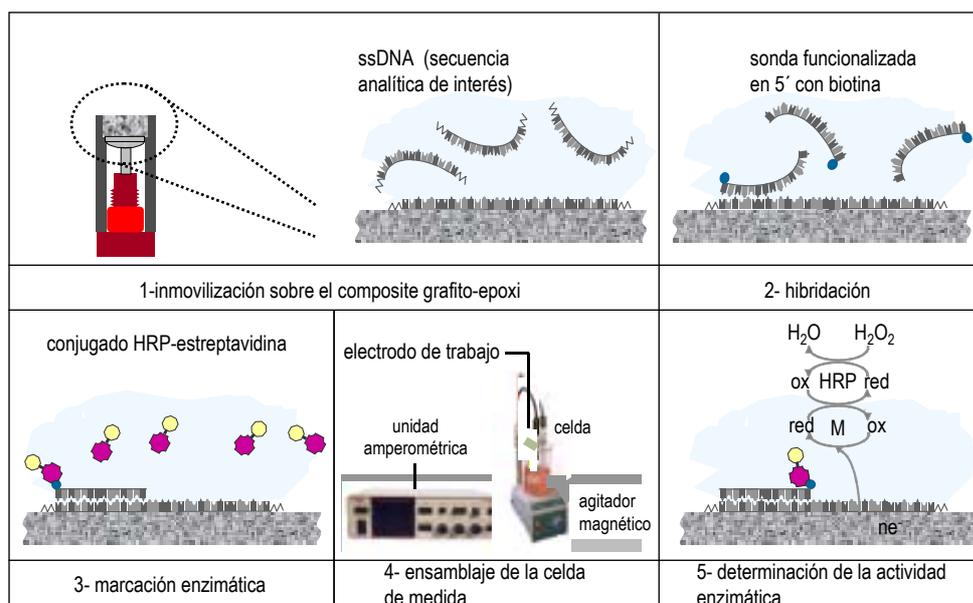


Figura 9A.1. Dibujo esquemático en el que se muestran las etapas de análisis con un genosensor en el que el DNA analito se inmoviliza por adsorción sobre el composite grafito-epoxi.

Protocolo de preparación de los genosensores

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización sobre el composite grafito-epoxi del poli(dA), descrito en § 9A.2.3.1.
- 2.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 9A.2.3.2.
- 3.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 9A.2.3.3.

Protocolo de preparación de los sensores blanco

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización descrito en § 9A.2.3.1, 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 μl de 10 X SSC.
- 2.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 9A.2.3.2. 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 § 9A.2.3.3.

9A.2.3.5 Evaluación de los genosensores

La evaluación de los sensores preparados 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 (o el blanco) 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 y de los blancos 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 –procesando replicados– fue correspondiente a la $I_{\text{máx}}$, la cual es proporcional a la actividad enzimática en la superficie del transductor (blancos y genosensores). 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 $I_{\text{máx}}$.

Para el caso del diseño de experimentos que evalúa la influencia de las variables seleccionadas sobre la señal de hibridación se realizaron 8 experimentos (Tabla 9A.3) con distintos niveles de las variables.

Cada experimento contó con cuatro genosensores y duplicados de los blancos.

La señal de hibridación (obtenida por cuatuplicado por cada experimento), se obtiene por la siguiente expresión:

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

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 9A.1).

Para el caso del diseño de experimentos que evalúa la influencia de las variables seleccionadas sobre la señal debida a la adsorción inespecífica se realizaron 4 experimentos con distintos niveles de las dos variables seleccionadas.

Cada experimento contó con cuatuplicados de los blancos.

La señal debida a la adsorción inespecífica (obtenida por cuatuplicado por cada experimento), se obtiene por la siguiente expresión:

$$\text{Señal de adsorción inespecífica} = I_{\text{máx}} \text{ blancos}$$

Esta señal de adsorción inespecífica está en relación con la cantidad de enzima presente en el transductor grafito-epoxi pero que no se encuentra unida al híbrido formado en la superficie.

9A.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9A.3.1 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES EN LA SEÑAL DE HIBRIDACIÓN

La Tabla 9A.5 muestra la matriz del diseño de experimentos en la que se muestran las respuestas amperométricas para los distintos niveles de las variables. La respuesta amperométrica de la señal de hibridación se obtiene según la expresión:

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

En la tabla se muestra también el orden en el que se han realizados las experiencias.

En la Tabla 9A.5 se muestran algunos valores discrepantes.

Se realizó la prueba Q de Dixon para estos valores discrepantes (con un 95 % de confianza) y se aceptaron todos los valores.

La Figura 9A.2 muestra el valor de los replicados de cada experimento. La Figura 9A.3 muestra las desviaciones estándar (ec. 1, § 4B.1.1) y el valor medio de las señales de hibridación. Como puede observarse en esta figura, las mayores desviaciones estándar se observan en las experiencias en las que la variable A [poli(dA)] se encuentra a nivel bajo.

Tabla 9A.5. Matriz experimental de las variables codificadas y sus correspondientes respuestas por cuatuplicado. Se muestran resaltados algunos valores dudosos.

NÚMERO DE EXPERIENCIA	ORDEN DE EXPERIENCIA	FACTORES (principales)			RESPUESTAS (nA, señal de hibridación)			
		A	B	C	$I_{\text{máx}} \text{ genosensor} - \bar{x} I_{\text{máx}} \text{ blancos}$			
1	2	-1	-1	-1	1560	1120	1560	1940
2	6	+1	-1	-1	1155	865	795	665
3	1	-1	+1	-1	1970	1820	2630	1610
4	5	+1	+1	-1	2375	1945	1265	1855
5	3	-1	-1	+1	2580	1700	3640	2460
6	8	+1	-1	+1	1335	1165	1405	1295
7	4	-1	+1	+1	2925	4375	3295	3455
8	7	+1	+1	+1	3125	3715	3405	3555

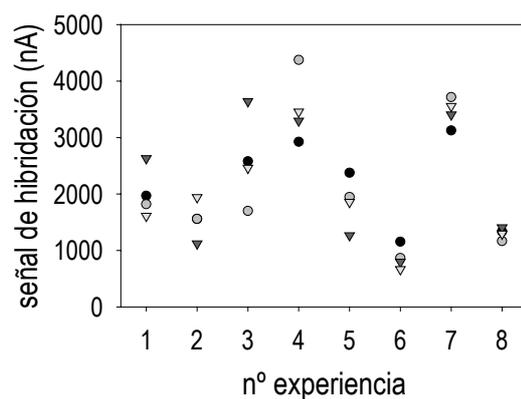


Figura 9A.2. Resultados obtenidos en el diseño de experimentos descrito en Tabla 9A.1 y Tabla 9A.3 para la evaluación de la señal de hibridación. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl).

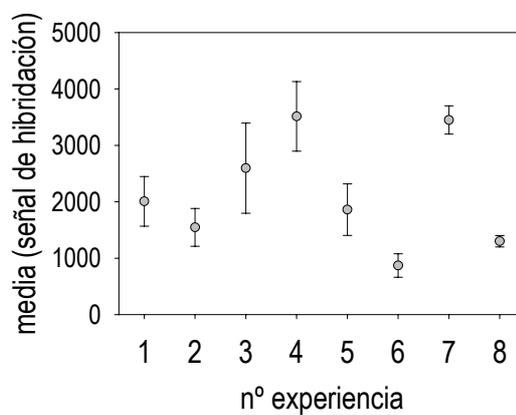


Figura 9A.3. Desviaciones estándar y valor medio de los resultados obtenidos en el diseño de experimentos descrito en Tabla 9A.1 y Tabla 9A.3. Condiciones experimentales idénticas a Figura 9A.2.

9A.3.1.1 Modelo 1

En el modelo 1 se tuvieron en cuenta los efectos principales, las interacciones secundarias y la interacción terciaria.

Se realizó su ajuste por regresión múltiple. Se tiene un modelo de 8 términos (una constante, tres términos lineales, tres términos de interacciones secundarias, y uno de interacción terciaria).

Como existen triplicados para cada experimento, existen 24 grados de libertad, lo que permite calcular el error estándar y el intervalo de confianza para cada determinación de los efectos (y coeficientes) y estimar el valor de los residuales.

Examen de los residuales

Observando el gráfico de los residuales (Figura 9A.4) se puede saber si los mismos siguen una distribución normal y si hay determinaciones dudosas (*outliers*) por fuera del rango de -4 a $+4$ de los residuales estudentizados.

Los residuales caen en una línea normal y se distribuyen entre -2 y $+3$ de los residuales estudentizados.

Se concluye que los residuales están distribuidos normalmente y sin valores dudosos.

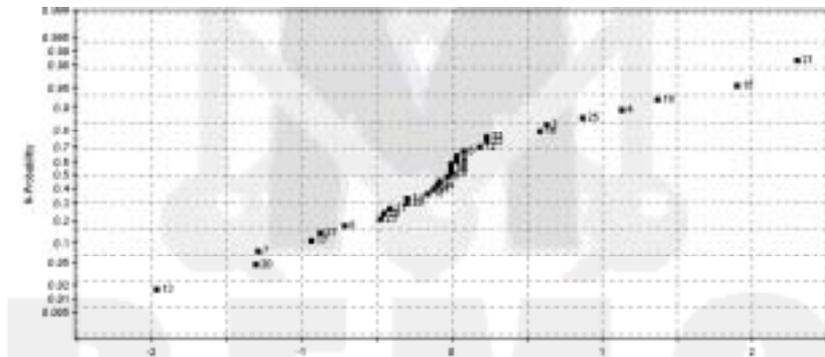


Figura 9A.4. Gráfico de probabilidad normal de los residuales estudentizados, para el modelo 1.

Interpretación del modelo. Análisis de la significación de los efectos e interacciones.

Para la interpretación del modelo, se examina el valor de los coeficientes. Cabe destacar que los coeficientes del modelo son iguales a la mitad del valor de los efectos. De la Figura 9A.5, se puede concluir que la variable con el mayor efecto positivo en la respuesta es la enzima (variable C), y de manera similar la sonda biotinilada (variable B). La siguiente variable en significación, aunque con efecto negativo en la respuesta, es la cantidad de analito (variable A).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en § 9.3.4, donde se observa que este efecto negativo en la respuesta puede deberse a impedimentos estéricos de las bases nitrogenadas del DNA afectando su disposición a la hibridación, o bien a la creación de una interfase que disminuye –como

si de una membrana se tratara— la conducción del transductor, al aumentar la cantidad de analito inmovilizado en el transductor.

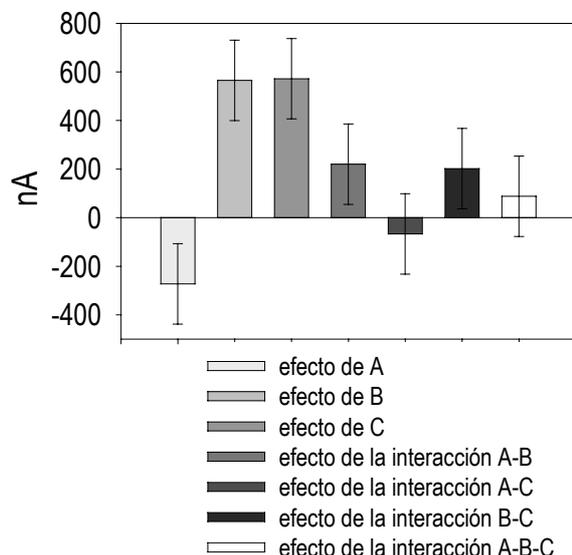


Figura 9A.5. Gráfico de los coeficientes y sus correspondientes intervalos de confianza, para el modelo 1.

La interacción secundaria más significativa es entre la variable A y B (analito y sonda biotinilada), seguida de la interacción secundaria entre la variable B y C (sonda biotinilada y conjugado enzimático), mientras que no son significativas las interacciones entre A y C (analito y conjugado enzimático) y la interacción terciaria. Estos resultados son lógicos, teniendo en cuenta las reacciones que ocurren entre el analito y la sonda biotinilada (que estaría representada por la interacción A-B), y luego entre la biotina de los dúplex formados en el transductor y el conjugado enzimático (que estaría representada por la interacción B-C). Dicho de otra manera, la interacción A-B representaría la reacción de hibridación, mientras que la interacción B-C representaría la reacción biotina-estreptavidina.

Además, el hecho de que la interacción entre el DNA inmovilizado en la superficie del transductor grafito-epoxi y el conjugado enzimático es poco significativa (interacción A-C) concuerda con los resultados obtenidos en § 9.3.9.

En una primera aproximación, la ecuación matemática del modelo propuesto es:

$$y = 2142.5 - 272.5 x_1 + 565 x_2 + 571.9 x_3 + 220 x_1 x_2 - 66.9 x_1 x_3 + 201.9 x_2 x_3 + 88.1 x_1 x_2 x_3$$

o, lo que es lo mismo:

$$\begin{aligned} \text{Señal de hibridación (nA)} = & 2142.5 - 272.5 [\text{poli(dA)}] + 565 [\text{dT(50)-biotina}] + 571.9 [\text{HRP-est}] + 220 [\text{poli(dA)}] \\ & [\text{dT(50)-biotina}] - 66.9 [\text{poli(dA)}] [\text{HRP-est}] + 201.9 [\text{dT(50)-biotina}] [\text{HRP-est}] + 88.1 [\text{poli(dA)}] [\text{dT(50)-biotina}] \\ & [\text{HRP-est}] \end{aligned}$$

En la Tabla 9A.6 se observa que las interacciones A-C y A-B-C tienen un valor de p mayor de 0.05, demostrando que no hay diferencias significativas entre estos y la aleatoriedad de los resultados.

Tabla 9A.6. Coeficientes (centrados y escalados), con sus correspondientes intervalos de confianza, y su valor de p, calculados con un nivel de confianza del 95 %. Se muestran resaltados los coeficientes que se deberían eliminar del modelo por ser poco significativos.

INTENSIDAD	COEFICIENTES	ERROR ESTÁNDAR	p	INTERVALO DE CONFIANZA
CONSTANTE	2142.5	80.24	2.33 e^{-19}	165.6
VARIABLE A	-272.5	80.24	2.38 e^{-3}	165.6
VARIABLE B	565	80.24	2.80 e^{-7}	165.6
VARIABLE C	571.9	80.24	2.29 e^{-7}	165.6
INTERACCIÓN AB	220	80.24	1.14 e^{-2}	165.6
INTERACCIÓN AC	-66.9	80.24	0.41	165.6
INTERACCIÓN BC	201.9	80.24	1.90 e^{-2}	165.6
INTERACCIÓN ABC	88.12	80.24	0.28	165.6

En la tabla se muestra el error estándar, que es igual a $\frac{s}{\sqrt{n}}$ y el intervalo de confianza, que es igual a $t \frac{s}{\sqrt{n}}$.

En el apartado siguiente, se quitan los términos que no tienen significación en el modelo (AC y ABC), y se vuelve a ajustar el mismo

9A.3.1.2 Modelo 2

En el modelo 2 se tuvieron en cuenta los efectos principales y las interacciones secundarias significativas entre las variables A-B y B-C, y se eliminaron la interacción secundaria A-C y la interacción terciaria, por ser poco significativas para el modelo.

Se realizó su ajuste por regresión múltiple. Se tiene un modelo de 6 términos (una constante, tres términos lineales y dos términos de interacciones secundarias).

Los grados de libertad son ahora de 26, lo que permite calcular el error estándar y el intervalo de confianza para cada determinación de los efectos y estimar el valor de los residuales. Además, se pueden obtener los datos sobre la falta de ajuste del modelo.

Examen de los residuales

Observando el gráfico de los residuales (Figura 9A.6) se puede observar que la mayoría de los mismos caen en una línea normal y se distribuyen entre -2 y $+3$ de los residuales estudentizados, excepto uno de los replicados (que corresponde al valor de 3640 nA, del nivel -1, -1 +1) que se aparta más de la distribución normal y que se acerca al límite de *outliers* de $+4$.

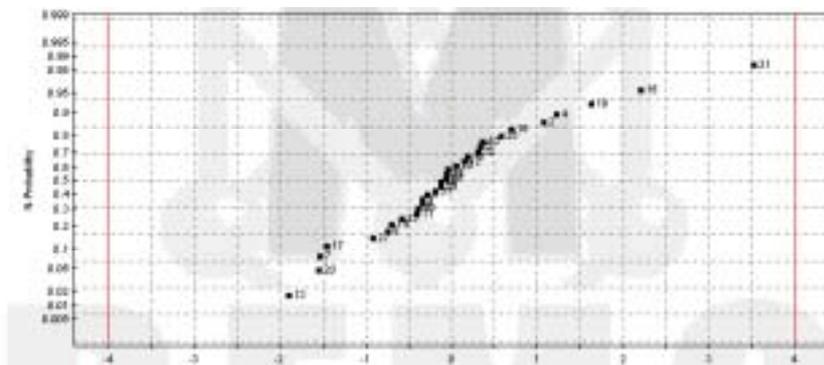


Figura 9A.6. Gráfico de probabilidad normal de los residuales estudentizados para el modelo 2.

Se concluye que los residuales están distribuidos normalmente, aunque existe un valor dudoso que se aleja más de la ecuación del modelo.

Interpretación del modelo. Análisis de la significación de los efectos e interacciones.

Para la interpretación del modelo, se examina el valor de los coeficientes. De la Figura 9A.7, se puede concluir que la variable con el mayor efecto positivo en la respuesta es la enzima (variable C), y de manera similar la sonda biotinilada (variable B). La siguiente variable en significación, aunque con efecto negativo en la respuesta, es la cantidad de analito poli(dA) (variable A).

Las conclusiones sobre la significación real de estos resultados son las mismas que las que se exponen en el modelo 1.

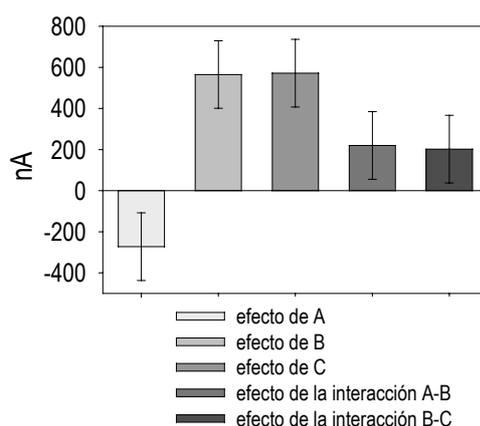


Figura 9A.7. Gráfico de los coeficientes y sus correspondientes intervalos de confianza, para el modelo 1.

Las interacciones secundarias son también significativas (entre las variables A y B y entre las variables B y C) (Tabla 9A.7).

La ecuación matemática del modelo propuesto es:

$$y = 2142.5 - 272.5 x_1 + 565 x_2 + 571.9 x_3 + 220 x_1 x_2 + 201.9 x_2 x_3$$

o, lo que es lo mismo:

$$\text{Señal de hibridación (nA)} = 2142.5 - 272.5 [\text{poli(dA)}] + 565 [\text{dT(50)-biotina}] + 571.9 [\text{HRP-est}] + 220 [\text{poli(dA)}] [\text{dT(50)-biotina}] + 201.9 [\text{dT(50)-biotina}] [\text{HRP-est}]$$

La Figura 9A.8 muestra la calidad del ajuste del modelo. R^2 es la fracción de la variación de la respuesta explicada por el modelo, mientras que Q^2 es la fracción de la variación de la respuesta que puede ser predicha por el modelo. R^2 y Q^2 cercanos a 1 indican un modelo excelente. Con un modelo mal ajustado, Q^2 puede ser negativo. Para este modelo se tiene un valor de R^2 de 0.829 y un valor de Q^2 de 0.741, con lo cual el modelo no es excelente, pero está correctamente ajustado.

Tabla 9A.7. Coeficientes (centrados y escalados), con sus correspondientes intervalos de confianza, y su valor de p , calculados con un nivel de confianza del 95 %.

INTENSIDAD	COEFICIENTES	ERROR ESTÁNDAR	p	INTERVALO DE CONFIANZA
CONSTANTE	2142.5	80.09	$1.90 e^{-20}$	164.6
VARIABLE A	-272.5	80.09	$2.17 e^{-3}$	164.6
VARIABLE B	565	80.09	$1.72 e^{-7}$	164.6
VARIABLE C	571.9	80.09	$1.39 e^{-7}$	164.6
INTERACCIÓN AB	220	80.09	$1.08 e^{-2}$	164.6
INTERACCIÓN BC	201.9	80.09	$1.82 e^{-2}$	164.6

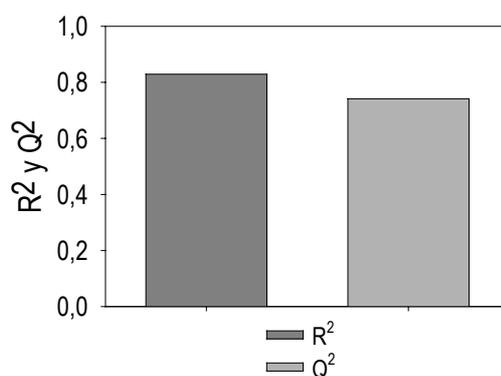


Figura 9A.8. Gráfico comparativo de los valores de R^2 y Q^2 , que muestra la calidad de ajuste del modelo 2.

Anova

La Figura 9A.9 compara la falta de ajuste (error debido al modelo) con el error puro (error experimental o de los replicados). La primera barra representa la desviación estándar debida a la falta de ajuste del modelo, mientras que la tercera barra representa la desviación estándar del error puro multiplicado por la raíz cuadrada de la $F_{\text{crítica}}$ (el valor de la distribución F sobre el cual la desviación

estándar de la falta de ajuste es significativa a un nivel de confianza del 95 %). Una primera barra mayor que la tercera indica que el modelo tiene una falta de ajuste significativa.

Como puede observarse entonces en la Figura 9A.9, el modelo no tiene falta de ajuste. Además, se obtuvo un valor de p para la falta de ajuste de 0.401, que es mayor a 0.05, con lo cual se confirma que el modelo se ajusta correctamente.

En el apartado siguiente, se quita el valor dudoso (que corresponde al valor de 3640 nA, del nivel $-1, -1 +1$) –que se aparta más de la distribución normal y que se acerca al límite de $+4$ – y se vuelve a ajustar el mismo

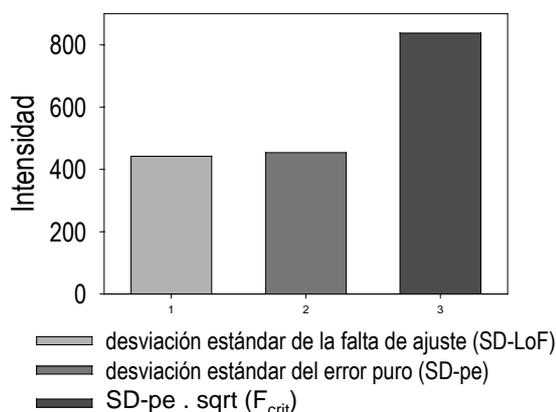


Figura 9A.9. Gráfico comparativo de la falta de ajuste (error del modelo 2) y del error puro (error experimental).

9A.3.1.3 Modelo 3

En el modelo 3, al igual que en el modelo 2, se tuvieron en cuenta los efectos principales y las interacciones secundarias significativas entre las variables A-B y B-C, y se eliminó el valor dudoso (que corresponde al valor de 3640 nA, del nivel $-1, -1 +1$) que se aparta más de la distribución normal y que se acerca al límite de *outliers* de $+4$.

Se realizó su ajuste por regresión múltiple. Se tiene un modelo de 6 términos (una constante, tres términos lineales y dos términos de interacciones secundarias).

Los grados de libertad son ahora de 25 –por haber un replicado menos–, lo que permite calcular el error estándar y el intervalo de confianza para cada determinación de los efectos y estimar el valor de los residuales. Además, se pueden obtener los datos sobre la falta de ajuste del modelo.

Examen de los residuales

Observando el gráfico de los residuales (Figura 9A.10) se puede observar que la mayoría de los mismos caen en una línea normal y se distribuyen entre -2 y $+3$ de los residuales estudentizados.

Se concluye que los residuales están distribuidos normalmente, y no existen valores dudosos que se alejen de la ecuación del modelo.

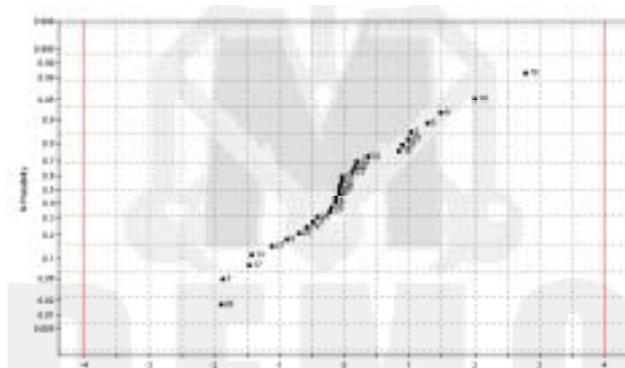


Figura 9A.10. Gráfico de probabilidad normal de los residuales estudentizados para el modelo 3.

Interpretación del modelo. Análisis de la significación de los efectos e interacciones.

Para la interpretación del modelo, se examina el valor de los coeficientes. De la Figura 9A.11, se puede concluir que la magnitud de la significación de los efectos en el modelo ha variado respecto al modelo 2. En este caso, la variable con el mayor efecto positivo en la respuesta es la sonda biotinilada (variable B), seguido por el efecto positivo de la enzima (variable C).

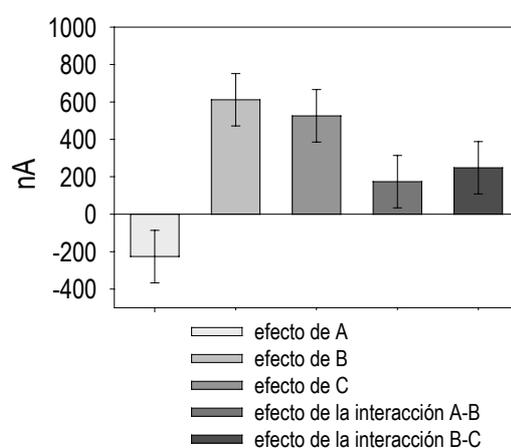


Figura 9A.11. Gráfico de los coeficientes y sus correspondientes intervalos de confianza, para el modelo 3.

La siguiente variable en significación es la interacción secundaria de las dos variables anteriores (B y C). La cantidad de analito poli(dA) (variable C), aunque con efecto negativo en la respuesta, es la siguiente variable en importancia de significación.

La variable con menor peso en el modelo es la interacción secundaria entre las variables A y B (Tabla 9A.8).

La ecuación matemática del modelo propuesto es:

$$y = 2096.4 - 226.4 x_1 + 611.2 x_2 + 525.7 x_3 + 173.8 x_1 x_2 + 248.0 x_2 x_3$$

o, lo que es lo mismo:

Señal de hibridación (nA) = 2096.4 – 226.4 [poli(dA)] + 611.2 [dT(50)-biotina] + 525.7 [HRP-est] + 173.8 [poli(dA)] [dT(50)-biotina] + 248.0 [dT(50)-biotina] [HRP-est]

Tabla 9A.8. Coeficientes (centrados y escalados), con sus correspondientes intervalos de confianza, y su valor de p , calculados con un nivel de confianza del 95 %.

INTENSIDAD	COEFICIENTES	ERROR ESTÁNDAR	p	INTERVALO DE CONFIANZA
CONSTANTE	2096.4	68.02	$2.07 e^{-21}$	140.1
VARIABLE A	-226.4	68.02	$2.71 e^{-3}$	140.1
VARIABLE B	611.2	68.02	$2.66 e^{-9}$	140.1
VARIABLE C	525.7	68.02	$4.38 e^{-8}$	140.1
INTERACCIÓN AB	173.8	68.02	$1.71 e^{-2}$	140.1
INTERACCIÓN BC	248.0	68.02	$1.22 e^{-3}$	140.1

La Figura 9A.12 muestra la calidad del ajuste del modelo. R^2 es la fracción de la variación de la respuesta explicada por el modelo, mientras que Q^2 es la fracción de la variación de la respuesta que puede ser predicha por el modelo. R^2 y Q^2 cercanos a 1 indican un modelo excelente. Para este modelo se tiene un valor de R^2 de 0.877 y un valor de Q^2 de 0.810, con lo cual el modelo no es excelente, pero está correctamente ajustado. Además, el ajuste es mejor que en el caso del modelo 2.

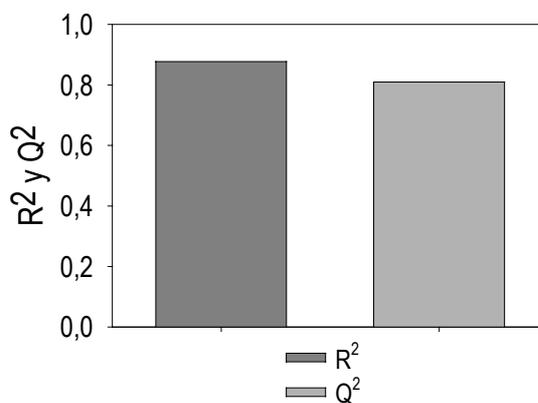


Figura 9A.12. Gráfico comparativo de los valores de R^2 y Q^2 , que muestra la calidad de ajuste del modelo 3.

Anova

La Figura 9A.13 compara la falta de ajuste (error debido al modelo) con el error puro (error experimental o de los replicados).

La primera barra representa la desviación estándar debida a la falta de ajuste del modelo, mientras que la tercera barra representa la desviación estándar del error puro multiplicado por la raíz cuadrada de la $F_{\text{crítica}}$ (el valor de la distribución F sobre el cual la desviación estándar de la falta de

ajuste es significativa a un nivel de confianza del 95 %). Una primera barra mayor que la tercera indicaría que el modelo tiene una falta de ajuste significativa.

Como puede observarse entonces en la Figura 9A.13, el modelo no tiene falta de ajuste. Además, se obtuvo un valor de p para la falta de ajuste de 0.782, que es mayor a 0.05, con lo cual se confirma que el modelo se ajusta correctamente.

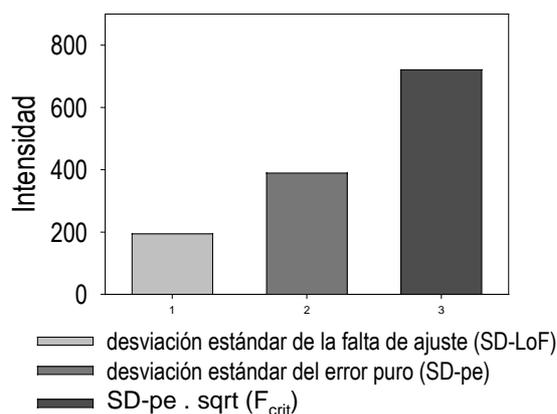


Figura 9A.13. Gráfico comparativo de la falta de ajuste (error del modelo 3) y del error puro (error experimental).

9A.3.2 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES EN LA SEÑAL DEBIDA A LA ADSORCIÓN INESPECÍFICA

La Tabla 9A.9 muestra la matriz del diseño de experimentos en la que se muestran las respuestas amperométricas para los distintos niveles de las variables.

La respuesta amperométrica de la señal debida a la adsorción inespecífica responde a la expresión:

$$\text{Señal de adsorción inespecífica} = I_{\text{máx}} \text{ blancos}$$

Tabla 9A.9. Matriz experimental de las variables codificadas y sus correspondientes respuestas y duplicados.

NÚMERO DE EXPERIENCIA	FACTORES (principales)		RESPUESTAS (nA, señal de adsorción inespecífica)			
	B	C	$I_{\text{máx}} \text{ blancos}$			
1	-1	-1	150	190	110	120
2	+1	-1	150	210	120	150
3	-1	+1	210	290	110	100
4	+1	+1	340	270	210	180

La Figura 9A.14 muestra el valor de los replicados para cada experimento. La Figura 9A.15 muestra las desviaciones estándar (ec. 1, § 4B.1.1) y el valor medio de las señales de adsorción inespecífica.

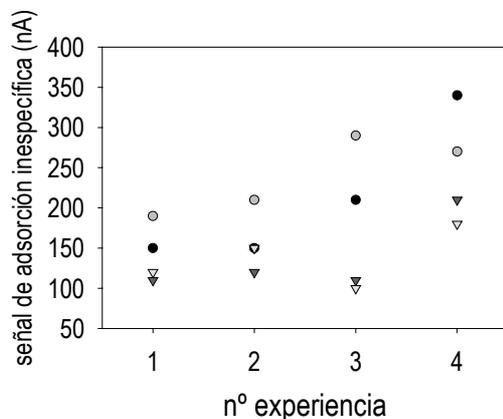


Figura 9A.14. Resultados obtenidos en el diseño de experimentos descritos en las Tabla 9A.2 y Tabla 9A.4 para la evaluación de la señal debido a la adsorción inespecífica. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl).

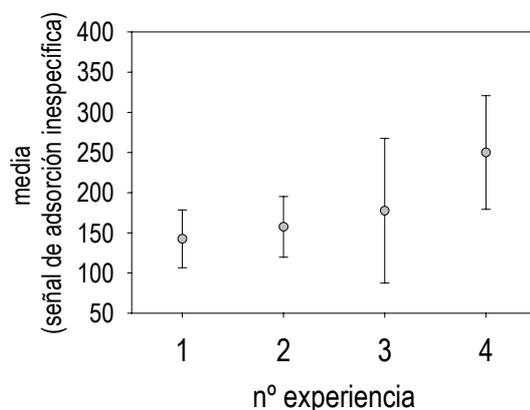


Figura 9A.15. Desviaciones estándar y valor medio de los resultados obtenidos en el diseño de experimentos descritos en las Tabla 9A.2 y Tabla 9A.4 para la evaluación de la señal debido a la adsorción inespecífica. Condiciones experimentales idénticas a Figura 9A.14.

9A.3.2.1 Modelo 1

En el modelo 1 se tuvieron en cuenta los efectos principales y la interacción secundaria.

Se realizó su ajuste por regresión múltiple. Se tiene un modelo de 4 términos (una constante, dos términos lineales y un término de interacción secundaria).

Como existen cuatuplicados para cada experimento, existen 12 grados de libertad, lo que permite calcular el error estándar y el intervalo de confianza para cada determinación de los efectos (y coeficientes) y estimar el valor de los residuales.

Examen de los residuales

Observando el gráfico de los residuales (Figura 9A.16) se puede saber si los mismos siguen una distribución normal y si hay determinaciones dudosas (*outliers*) por fuera del rango de -4 a $+4$ de los residuales estudentizados.

Los residuales caen en una línea normal y se distribuyen entre -1.2 y $+1.5$ de los residuales estudentizados. Se concluye que los residuales están distribuidos normalmente y sin valores dudosos.

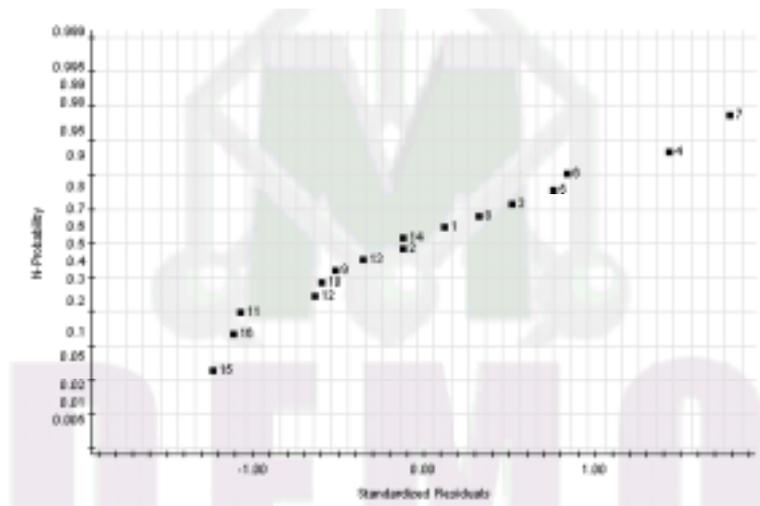


Figura 9A.16. Gráfico de probabilidad normal de los residuales estudentizados.

Interpretación del modelo. Análisis de la significación de los efectos e interacciones.

Para la interpretación del modelo, se examina el valor de los coeficientes. De la Figura 9A.17 se puede concluir que ninguna de las variables es significativa para este modelo, aunque existe una ligera tendencia a que la variable con el mayor efecto positivo sobre la respuesta es la enzima (variable C), y luego, aunque en menor medida, la sonda biotinilada (variable B). Sin embargo, la respuesta debido a la adsorción inespecífica no puede ser justificada por este modelo

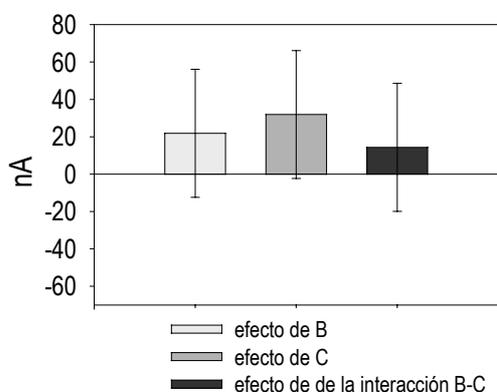


Figura 9A.17. Gráfico de los coeficientes y sus correspondientes intervalos de confianza, para el modelo 1.

Los resultados obtenidos son coherentes con las conclusiones extraídas en § 9.3.1, respecto al hecho de que la adsorción inespecífica es mínima cuando ocurre sobre el composite grafito-epoxi y es un fenómeno aleatorio y similar al ruido de fondo instrumental, por lo que no puede sistematizarse con ningún modelo. Este hecho representa una diferencia respecto a los genosensores de membranas recambiables, ya que en § 4.3.4 se probó que la adsorción inespecífica –que da una respuesta considerable– depende más de la adsorción del conjugado enzimático que de la sonda biotinilada en la membrana de nylon.

Debido a que ningún coeficiente muestra significación en el modelo, no se puede plantear una ecuación matemática que justifique la adsorción inespecífica.

En la Tabla 9A.10 se observa que los coeficientes y la interacción secundaria tienen un valor de p mayor de 0.05, demostrando que no hay diferencias significativas entre estos y la aleatoriedad de los resultados.

Tabla 9A.10. Coeficientes (centrados y escalados), con sus correspondientes intervalos de confianza, y su valor de p , calculados con un nivel de confianza del 95 %. Se muestran resaltados los coeficientes que se deberían eliminar del modelo por ser poco significativos.

INTENSIDAD	COEFICIENTES	ERROR ESTÁNDAR	p	INTERVALO DE CONFIANZA
CONSTANTE	181.9	15.7	7.2×10^{-8}	34.2
VARIABLE B	21.9	15.7	0.19	34.2
VARIABLE C	31.9	15.7	0.07	34.2
INTERACCIÓN BC	14.4	15.7	0.38	34.2

9A.4 CONCLUSIONES

1. Se ha realizado un diseño factorial completo 2^3 en la que se ha estudiado el efecto de tres variables (poli(dA) analito; sonda biotinilada y conjugado enzimático) a dos niveles, en el nuevo dispositivo genosensor de hibridación amperométrico desarrollado en el capítulo 9, en el que se inmoviliza por adsorción el DNA analito sobre un composite rígido grafito-epoxi, en un formato de reconocimiento múltiple.
- 2.- La respuesta seleccionada para observar el efecto de las variables es la señal de hibridación.
3. Se ha observado que el mejor modelo para la evaluación de la señal de hibridación es el N° 3 que se propone, que responde a la siguiente ecuación matemática:

$$\text{Señal de hibridación (nA)} = 2096.4 - 226.4 [\text{poli(dA)}] + 611.2 [\text{dT(50)-biotina}] + 525.7 [\text{HRP-est}] + 173.8 [\text{poli(dA)}] [\text{dT(50)-biotina}] + 248.0 [\text{dT(50)-biotina}] [\text{HRP-est}]$$

Con este modelo se puede predecir el valor de la respuesta (señal de hibridación) si se trabaja con los niveles de las respuestas comprendidas dentro del dominio experimental. Este

modelo se ajusta de manera correcta (R^2 de 0.877). Los residuales para este modelo están distribuidos normalmente, y no existen valores dudosos que se alejen de la ecuación del modelo.

4.- De esta ecuación se puede deducir que las variables que más influyen en una mayor respuesta del sistema (mayor señal de hibridación) son la cantidad de sonda biotinilada en la solución de hibridación y la cantidad de conjugado enzimático en la solución bloqueante durante la marcación enzimática. El aumento de la cantidad de analito inmovilizado en la superficie provoca la disminución de la señal de hibridación, resultados que concuerdan con los obtenidos en § 9.3.4.

5. Se ha observado que, para obtener la mayor respuesta de hibridación, conviene trabajar a nivel alto de sonda biotinilada (9.97 pmoles) y de conjugado enzimático (1.2 μ g). Sin embargo, es conveniente trabajar a nivel bajo de analito inmovilizado en el transductor grafito-epoxi (840 fmoles), aunque el hecho de utilizar un nivel bajo de poli(dA) trae aparejado una disminución en la reproducibilidad de la respuesta (§ 9A.3.1).

6. El hecho de que la interacción entre el DNA inmovilizado en la superficie del transductor grafito-epoxi y el conjugado enzimático es poco significativa concuerda con los resultados obtenidos en § 9.3.9.

7. Para la evaluación de la señal debida a la adsorción inespecífica, se ha realizado un diseño factorial completo 2^2 en la que se ha estudiado el efecto de dos variables (sonda biotinilada y conjugado enzimático) a dos niveles en el nuevo dispositivo genosensor de hibridación amperométrico desarrollado en el capítulo 9.

8. No se ha encontrado un modelo que justifique la adsorción inespecífica sobre el composite grafito-epoxi, por no mostrar ninguna de las variables seleccionadas (sonda biotinilada, conjugado enzimático) significación en el mismo. Este hecho se justifica teniendo en cuenta que la adsorción inespecífica es un fenómeno aleatorio, y además de mínima importancia sobre el composite grafito epoxi y estadísticamente comparable al ruido de fondo instrumental (§ 9.3.1). Pese a ser los coeficientes del modelo no significativos, se muestra como tendencia la mayor influencia de la adsorción de la enzima por sobre la adsorción de la sonda biotinilada.

9A.5 BIBLIOGRAFÍA

¹ J. L. Goupy. *Methods for experimental design. Principles and applications for physicists and chemist*, Elsevier: Londres, 1993.

² E. Morgan. *Chemometrics: Experimental design*, John Wiley & Son: Londres, 1991.

VALIDACIÓN DEL SISTEMA DE MARCACIÓN BASADO EN LA UNIÓN BIOTINA-ESTREPTAVIDINA

ESTUDIO DE LA INTERFERENCIA POR LA PRESENCIA DE BIOTINA EN LA MUESTRA DE DNA INMOVILIZADA SOBRE UNA SUPERFICIE GRAFITO-POLÍMERO

9B.1 INTRODUCCIÓN

En el trabajo desarrollado en los capítulos anteriores se describe la utilización como marcador del evento de hibridación del conjugado enzimático HRP-estreptavidina.

Como ciertas muestras biológicas procedentes de organismos vivos (células humanas, bacterias) pueden contener biotina, la presencia de la misma podría constituir un interferente para un formato dot-blot en el cual la muestra se inmoviliza directamente sobre el transductor.

Este hecho llevó a casas comerciales a elaborar un nuevo sistema de marcación basado en una molécula de origen vegetal que se encuentra en un tipo específico de plantas: la digoxigenina.

En el capítulo 7, por este motivo, se ha evaluado la utilidad del sistema de marcación basado en la digoxigenina para un genosensor de membranas recambiables.

Pese a las numerosas ventajas de este sistema de marcación citadas por los fabricantes (véase § 7.1) y a que ha sido ampliamente utilizado en análisis clásicos de DNA ¹⁻⁷, se ha observado una menor relación S/R con el sistema de marcación basado en la digoxigenina respecto al basado en la reacción biotina-estreptavidina (§ 7.3) para los genosensores de membranas recambiables (aunque el sistema funcione correctamente), debido a una mayor adsorción inespecífica del conjugado antiDIG-HRP que del conjugado HRP-estreptavidina sobre la membrana de nylon.

La Figura 9B.1 muestra el mecanismo de interferencia de la presencia de biotina en la muestra de DNA en un formato dot-blot en un transductor grafito-epoxi basado en la marcación con HRP-estreptavidina.

Durante la inmovilización de la muestra de DNA en presencia de biotina en la misma, en el composite grafito-epoxi se adsorbe tanto el DNA analito como la biotina (mecanismo 1). Esta adsorción inespecífica de la biotina (mecanismo 1) se da sólo en el genosensor y no en el sensor blanco. Durante la hibridación, se puede adsorber inespecíficamente la sonda biotilada (mecanismo 2). Esta adsorción inespecífica (mecanismo 2), se da tanto en el genosensor como en el sensor blanco.

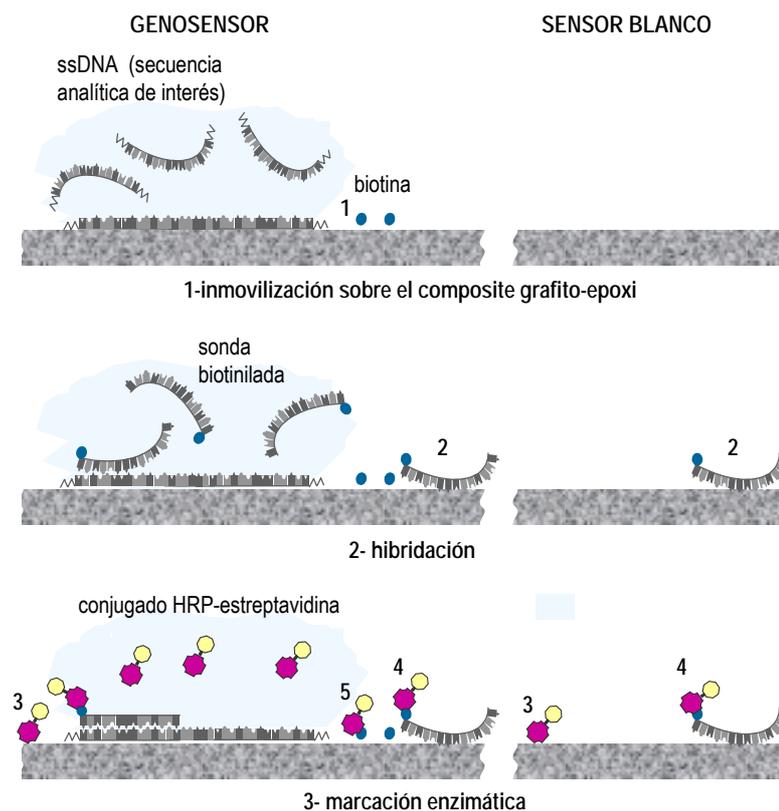


Figura 9B.1. Mecanismo de la posible interferencia con la presencia de biotina en la muestra de DNA en un dispositivo genosensor basado en un composite grafito-epoxi en formato dot-blot de reconocimiento múltiple y utilizando como sistema de marcación el conjugado HRP-estreptavidina.

Durante la marcación enzimática, el conjugado enzimático puede adsorberse inespecíficamente mediante adsorción directa del mismo sobre el composite grafito-epoxi (mecanismo 3), como mediante su reacción con la sonda biotilada adsorbida inespecíficamente durante la hibridación (mecanismo 4). Los mecanismos 3 y 4 ocurren tanto en el genosensor como en el sensor blanco.

Ambos tipos de adsorción inespecífica (mecanismos 3 y 4) que ocurren en el genosensor se pueden detectar, por tanto, procesando los sensores blanco, y su efecto se elimina mediante la siguiente expresión:

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

- solución de hibridación: 5 X SSC, 1 X reactivo de Denhardt, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón (extraído con fenol y cloroformo), 0.5 % p/v de SDS, 50 % v/v de formamida
- solución bloqueante: 1 X PBS, 2 % p/v BSA, 0.1 % p/v Tween 20, 5 mM EDTA
- solución de lavado postmarcación: 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

9B.2.2 MODIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI

Los genosensores se prepararon mediante un protocolo que constó de 3 pasos fundamentales:

- 1.-Inmovilización de poli(dA) en la superficie del genosensor basado en un transductor tipo composite rígido grafito-epoxi
- 2.-Hibridación del analito inmovilizado en el transductor grafito-epoxi
- 3.-Marcación enzimática posthibridación de los híbridos formados en el transductor grafito-epoxi.

Una vez modificados, los genosensores fueron evaluados amperométricamente.

En las secciones siguientes se trata brevemente cada uno de estos pasos, que ya fueran descritos en detalle en el capítulo 9.

9B.2.2.1 Inmovilización de poli(dA) en un composite grafito-epoxi

Protocolo de inmovilización en los genosensores

El protocolo de inmovilización de poli(dA) en un transductor basado en un composite grafito-epoxi para el caso de los genosensores y de sus correspondientes blancos fue el siguiente:

- 1.- Se tratan los electrodos con papel abrasivo fino (de 800) y luego con papel de alúmina de 3 µm. 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 µl (de la solución final obtenida del procedimiento de preparación del DNA, § 9.2.2.1) 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 °C durante 45 minutos (§ 9.3.7).

Protocolo de inmovilización en los genosensores con interferente

El protocolo de inmovilización de poli(dA) en un transductor basado en un composite grafito-epoxi para el caso de los genosensores con interferente y de sus correspondientes blancos fue el siguiente:

- 1.- Se tratan los electrodos con papel abrasivo fino (de 800), y luego con papel de alúmina de 3 μm . 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 μl (de la solución final obtenida del procedimiento de preparación del DNA, § 9.2.2.1) sobre la superficie de los sensores grafito-epoxi.
- 4.- Se agregan 5 μl de una solución de biotina (10 mg/ml en NaOH 0.1 mol/l) sobre la superficie de los sensores grafito-epoxi.
- 5.- Se procede a la adsorción del DNA (y eventualmente de la biotina) al transductor grafito-epoxi. Se colocan los sensores en una estufa a 80 °C durante 45 minutos (§ 9.3.7).

9B.2.2.2 Hibridación del transductor grafito-epoxi modificado con el analito

- 1.- Se adiciona un volumen (en μl) de solución de hibridación (§ 9.2.2.3) 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) (preparada según § 4.2.5.7), 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 (§ 9B.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 de 45 minutos (§ 9.3.3).
- 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.

9B.2.2.3 Marcación enzimática posthibridación

- 1.- Se adiciona 150 μl de solución de conjugado enzimático (§ 4.2.6.8) en solución bloqueante (§ 9.2.2.4) 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 30 minutos (§ 9.3.6).
- 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 (§ 4.2.6.7), 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

9B.2.2.4 Preparación de los genosensores basados en un 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, se realizó en paralelo un lote de sensores blanco, –en las que se adicionaron los mismos reactivos que en los genosensores excepto del 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 la Figura 9B.2 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 los apartados siguientes se explica el protocolo de preparación de los genosensores y de los sensores blanco, y de los genosensores con interferente y sus correspondientes sensores blanco.

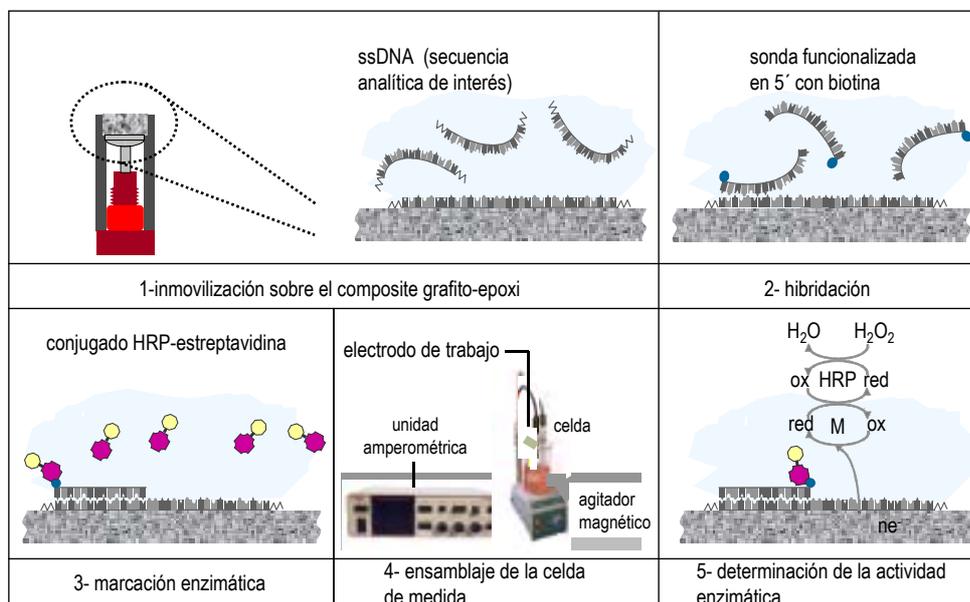


Figura 9B.2. Dibujo esquemático en el que se muestran las etapas de análisis con un genosensor en el que el DNA analito se inmoviliza por adsorción sobre el composite grafito-epoxi.

Protocolo de preparación de los genosensores sin y con interferente

El protocolo seguido para la preparación de los genosensores fue:

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización sobre el composite grafito-epoxi del poli(dA), descrito en § 9B.2.2.1.
- 2.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 9B.2.2.2.
- 3.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 9B.2.2.3.

En el caso de la evaluación del efecto de la biotina como interferente, el protocolo seguido para la preparación de los genosensores fue:

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización sobre el composite grafito-epoxi del poli(dA) y de la biotina, descrito en § 9B.2.2.1 para el caso de los genosensores con interferentes.
- 2.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 9B.2.2.2.
- 3.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 9B.2.2.3.

Protocolo de preparación de los sensores blanco sin y con interferente

El protocolo seguido para la preparación de los sensores blanco fue:

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización descrito § 9B.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 µl de 10 X SSC.
- 2.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 9B.2.2.2. 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 § 9B.2.2.3.

En el caso de la evaluación del efecto de la biotina como interferente, el protocolo seguido para la preparación de los sensores blanco fue:

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización descrito § 9B.2.2.1 para el caso de los genosensores con interferentes, con la única diferencia que no se adiciona poli(dA), es decir, no hay analito sobre el transductor, pero sí biotina. En su lugar, en el paso 3 se adicionan 20 µl de 10 X SSC.
- 2.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 9B.2.2.2. 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 § 9B.2.2.3.

9B.2.2.5 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 los sensores construidos. 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 30 segundos, que es el tiempo de respuesta del sistema para la obtención de la lectura correspondiente a la $I_{m\acute{a}x}$.

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 9B.2).

9B.2.3 EVALUACIÓN DE LA INTERFERENCIA DE LA BIOTINA EN LA MUESTRA DE DNA. DISEÑO DEL EXPERIMENTO

El objeto de esta experiencia es evaluar si la presencia de biotina en la muestra de DNA o, lo que es lo mismo, si la biotina inmovilizada en la superficie del transductor grafito-epoxi interfiere en los análisis de una secuencia génica cuando se utiliza como sistema marcador el conjugado HRP-estreptavidina.

Para dicha evaluación se realizaron dos experiencias distintas. En el Experimento N° 1 se llevó a cabo el protocolo de preparación de los genosensores en ausencia de biotina (es decir, sin interferencia), 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 en presencia de biotina (es decir, con interferencia), procesando también dos lotes de sensores: genosensores y sensores blanco.

Las Tabla 9B.1 y Tabla 9B.2 resumen las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática para los experimentos 1 y 2.

Tabla 9B.1. *Diseño del experimento N° 1, en el que se llevó a cabo el formato de reconocimiento múltiple en un genosensor grafito-epoxi en ausencia de biotina. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.*

REACTIVOS	Experimento 1 blanco n=3	Experimento 1 genosensor n=3
protocolo de inmovilización: Poli(dA) -analito-	No se adiciona (-)	0.84 pmoles
protocolo de inmovilización: biotina	No se adiciona (-)	No se adiciona (-)
protocolo de hibridación: dT(50)-biotina	9.97 pmoles	9.97 pmoles
protocolo de marcación enzimática: HRP-estreptavidina	1.2 µg	1.2 µg

Tabla 9B.2. *Diseño del experimento N° 2, en el que se llevó a cabo el formato de reconocimiento múltiple en un genosensor grafito-epoxi en presencia de biotina como interferente. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.*

REACTIVOS	Experimento 2 blanco n=3	Experimento 2 genosensor n=3
protocolo de inmovilización: Poli(dA) -analito-	No se adiciona (-)	0.84 pmoles
protocolo de inmovilización: biotina	50 µg- 204.7 nmoles	50 µg- 204.7 nmoles
protocolo de hibridación: dT(50)-biotina	9.97 pmoles	9.97 pmoles
protocolo de marcación enzimática: HRP-estreptavidina	1.2 µg	1.2 µg

Para la evaluación de la interferencia por la presencia de biotina en la muestra de DNA se utilizó el formato de reconocimiento múltiple descrito en el capítulo 9 y el apéndice A del capítulo 9 en el que el DNA se inmovilizó directamente en el composite grafito-epoxi.

En el capítulo 9 se optimizaron las siguientes variables en este formato de reconocimiento múltiple:

- eficacia del tratamiento de prehibridación
- eficacia del procedimiento de premarcación con solución bloqueante
- tiempo de hibridación
- tiempo de marcación enzimática
- tiempo del procedimiento de inmovilización

Las cantidades de reactivos adicionadas fueron las optimizadas en el apéndice A del capítulo 9, es decir:

- cantidad de analito inmovilizado en el transductor grafito-epoxi: 0.84 pmoles (nivel bajo)
- cantidad de sonda biotinilada de la solución de hibridación: 9.97 pmoles (nivel alto)
- cantidad de peroxidasa-estreptavidina durante la marcación enzimática: 1.20 µg (nivel alto)

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

9B.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 9B.3 se muestran comparativamente los resultados obtenidos con los genosensores en los cuales se ha inmovilizado DNA en el transductor grafito-epoxi en presencia y en ausencia de la biotina como interferente, y que fueron modificados según § 9B.2.3).

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 –sin interferente, experiencia N° 1–, y blanco y genosensor –con interferente, experiencia N° 2–), y el error de las barras representa la desviación estándar de los replicados de cada lote (ec. 1, § 4B.1.1).

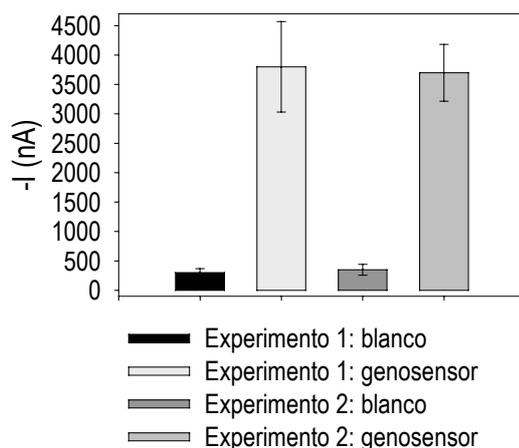


Figura 9B.3. Comparación de los resultados obtenidos en la evaluación del formato de reconocimiento múltiple mediante un genosensor basado en la inmovilización del DNA sobre un composite grafito-epoxi, con presencia de biotina y en ausencia de la misma. DNA analito 260 mer [poli(dA)] inmovilizado: 0.84 pmoles. Sonda funcionalizada con biotina [dT(50)-biotina]: 9.97 pmoles. HRP-estreptavidina: 1.2 µg. Biotina (sólo en experimento N° 2): 50 µg (204.7 nmoles). 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 § 9B.2.3.

Como puede observarse en la figura, no existe una diferencia significativa entre los genosensores en presencia y en ausencia de biotina como interferente. Las mismas conclusiones se pueden extraer para los sensores blancos.

Esto implica que la biotina adsorbida junto a la muestra sobre el transductor grafito-epoxi es efectivamente removida –en las condiciones experimentales del presente trabajo– con los pasos de lavado. Dicho de otra manera, mientras que el DNA se mantiene adsorbido físicamente sobre el

transductor grafito epoxi y puede hibridarse con la sonda biotinilada y posteriormente marcarse con el conjugado enzimático, la biotina no está presente y no puede interferir durante el paso de marcación enzimática. Esto se puede aseverar comparando los valores de ambos genosensores (con y sin biotina), y también con los sensores blanco.

9B.4 CONCLUSIONES

1. Se ha conseguido comprobar que la biotina adsorbida en la superficie grafito-epoxi no constituye una interferencia para el dispositivo genosensor desarrollado, basado en la adsorción del DNA sobre el transductor y en un sistema de marcación que utiliza HRP-estreptavidina.
2. Los pasos de lavado remueven efectivamente la biotina de la superficie del transductor basado en un composite grafito-epoxi, mientras que el DNA queda perfectamente adsorbido.
3. Como la presencia de biotina en la muestra no constituye un interferente, se puede concluir que el sistema de marcación basado en el conjugado enzimático HRP.estreptavidina puede ser utilizado con fiabilidad en análisis de muestras de DNA que contengan dicha molécula.

9B.5 BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ H. Kohsaka, A. Taniguchi, D. D. Richman, D. A. Carson. *Nucleic Acids Res.* 1993, 21, 3469-3472.
 - ² A. K. Lockley, C. G. Jones, J. S. Bruce, S. J. Franklin, R. G. Bardsley. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 1313-1314.
 - ³ S. A. Khan, M. S. Nawaz, A. A. Khan, C. E. Cerniglia. *Mol. Cell. Probes* 1999, 13, 233-237.
 - ⁴ D. J. Stone, J. Walsh, F. M. Benes. *Mol. Brain Res.* 1999, 71, 201-209.
 - ⁵ E. Basyuk, E. Bertrand, L. Journot, *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, e46.
 - ⁶ K. B. Register, R. M. Lee, C. Thomson. *J. Clin Microbiol.* 1998, 36, 3342-3346.
 - ⁷ M. Solanas, R. Moral, E. Escrich. *Biotechnol. Lett.* 2001, 23, 263-266.

DETECCIÓN DE LA SEÑAL DE HIBRIDACIÓN MEDIANTE UN AMPERÍMETRO PORTÁTIL

9C.1 INTRODUCCIÓN

En el trabajo desarrollado en los capítulos anteriores se utiliza –para las lecturas amperométricas– un potenciostato estándar, óptimo para medidas en el laboratorio.

Sin embargo, en el mercado existe equipamiento portátil (Figura 9C.1). Son numerosas las ventajas que presenta este tipo de dispositivo de lectura portátil. En primer lugar, el coste del mismo, que lo hace más accesible desde el punto de vista comercial que un amperímetro convencional. Por otro lado, sus dimensiones reducidas, su bajo peso y la posibilidad de alimentarlo con baterías lo hacen óptimo para medidas de campo debido a la facilidad de transporte y a su autonomía respecto a la fuente de alimentación.

En los capítulos anteriores se ha visto que la alta sensibilidad de los transductores electroquímicos, sumados al hecho de su compatibilidad con tecnologías de miniaturización y microfabricación, los convierten en dispositivos atractivos para el diagnóstico rápido y simple de DNA en campos tales como la industria ¹⁻³. Los bajos costes de la producción de los genosensores electroquímicos los hacen viables para su implimentación como dispositivos de un solo uso ⁴⁻⁹. Todas esas características, sumados al hecho de la posibilidad de conectarlos a equipamiento portátil, los hacen idóneos para su utilización como *kit* genosensor para medidas de campo, incrementando las ventajas comerciales de los genosensores basados en transducción electroquímica.

Otra característica interesante de este tipo de equipo es la posibilidad de conexión en serie de varios de ellos (los que se quiera) para el control simultáneo de numerosos electrodos de trabajo de manera independiente, utilizándose la misma celda. Esto permitiría la posibilidad de la construcción

de arreglos de genosensores multiparamétricos para la detección de numerosas secuencias de DNA simultáneamente.

En el trabajo que se describe en el presente apéndice se pretende validar un dispositivo genosensor –basado en la inmovilización del DNA sobre un transductor grafito-epoxi y utilizando un formato de reconocimiento múltiple–, cuyas lecturas se efectúen con un potencióstato portátil.

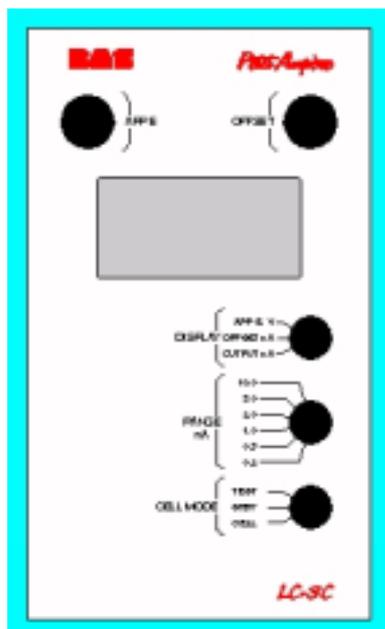


Figura 9C.1. *Figura de un potencióstato portátil de la casa BAS.*

9C.2 EXPERIMENTAL

9C.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS

9C.2.1.1 Equipamiento

Las medidas amperométricas se realizaron con la misma instrumentación analítica y electrodos descritos en § 2.2.2. La señal amperométrica se midió también con una unidad amperométrica portátil LC-3C de la firma comercial BAS (Bioanalytical Systems Inc, USA).

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

9C.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 reactivos tales como peróxido de hidrógeno, hidroquinona, estreptavidina-peroxidasa, poli(dA), dT(50)-biotina, solución de hibridación 2X, BSA, formamida, SDS, Tween 20, son los mismos que los utilizados en el capítulo 9. El resto de los reactivos utilizado fue de calidad proanálisis o similar.

Las soluciones acuosas se prepararon con agua bidestilada o agua bidestilada filtrada.

Las composiciones de las soluciones preparadas, fueron:

- 20 X SSC 3.0 M NaCl, 0.3 M citrato trisódico, pH 7.0
- 10 X PBS 1.3 M NaCl, 0.1 M de fosfato sódico, pH 7.2
- solución de hibridación: 5 X SSC, 1 X reactivo de Denhardt, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA de esperma de salmón (extraído con fenol y cloroformo), 0.5 % p/v de SDS, 50 % v/v de formamida
- solución bloqueante: 1 X PBS, 2 % p/v BSA, 0.1 % p/v Tween 20, 5 mM EDTA
- solución de lavado postmarcación: 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

9C.2.2 MODIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI

Los genosensores se prepararon mediante un protocolo que constó de 3 pasos fundamentales:

- 1.-Inmovilización de poli(dA) en la superficie del genosensor basado en un transductor tipo composite rígido grafito-epoxi
- 2.-Hibridación del analito inmovilizado en el transductor grafito-epoxi
- 3.-Marcación enzimática posthibridación de los híbridos formados en el transductor grafito-epoxi.

Una vez modificados, los genosensores fueron evaluados amperométricamente.

En las secciones siguientes se trata brevemente cada uno de estos pasos, que ya fueran descritos en detalle en el capítulo 9.

9C.2.2.1 Inmovilización de poli(dA) en un composite grafito-epoxi

- 1.- Se tratan los electrodos con papel abrasivo fino (de 800), y luego con papel de alúmina de 3 μm . 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 μl (de la solución final obtenida del procedimiento de preparación del DNA, § 9.2.2.1) 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 45 minutos (§ 9.3.7).

9C.2.2.2 Hibridación del transductor grafito-epoxi modificado con el analito

- 1.- Se adiciona un volumen (en μl) de solución de hibridación (§ 9.2.2.3) 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) (preparada según § 4.2.5.7), 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 (§ 9C.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 de 45 minutos (§ 9.3.3).
- 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.

9C.2.2.3 Marcación enzimática posthibridación

- 1.- Se adiciona 150 μl de solución de conjugado enzimático (§ 4.2.6.8) en solución bloqueante (§ 9.2.2.4) 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 30 minutos (§ 9.3.6).
- 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 (§ 4.2.6.7), a 20 °C
 - b.- Conservación –hasta el momento de la evaluación– en tubos eppendorf con 150 μl de solución de lavado, a 20 °C

9C.2.2.4 Preparación de los genosensores basados en un 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, 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 la Figura 9C.2 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 los apartados siguientes se explica el protocolo de preparación de los genosensores y de los sensores blanco.

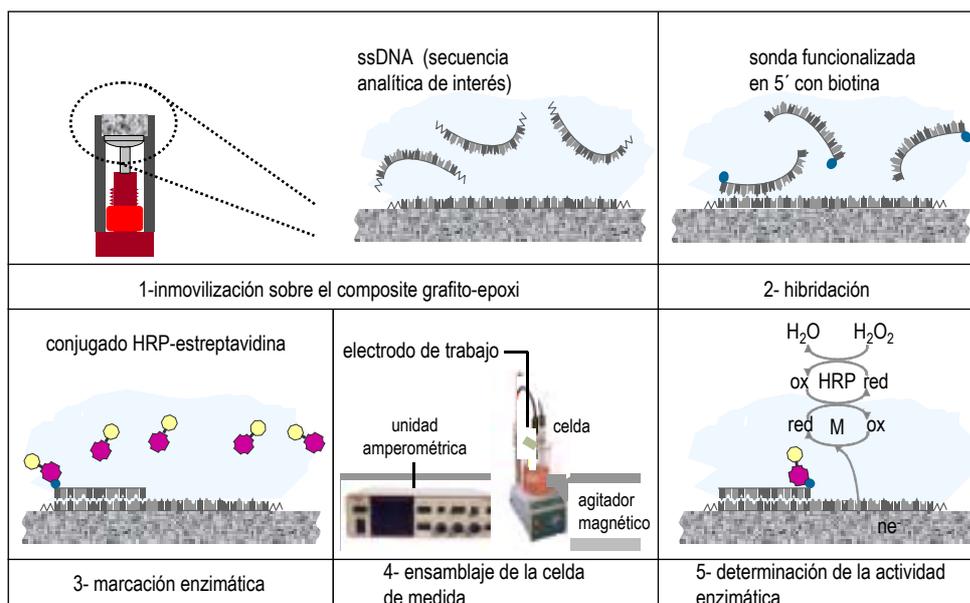


Figura 9C.2. Dibujo esquemático en el que se muestran las etapas de análisis con un genosensor en el que el DNA analito se inmoviliza por adsorción sobre el composite grafito-epoxi.

Protocolo de preparación de los genosensores

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización sobre el composite grafito-epoxi del poli(dA), descrito en § 9C.2.2.1.
- 2.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 9C.2.2.2.
- 3.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 9C.2.2.3.

Protocolo de preparación de los sensores blanco

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización descrito § 9C.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 µl de 10 X SSC.
- 2.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 9C.2.2.2. 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 § 9C.2.2.3.

9C.2.2.5 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 § 9C.2.1.1. 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 los sensores construidos. 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 30 segundos, que es el tiempo de respuesta del sistema para la obtención de la lectura correspondiente a la $I_{m\acute{a}x}$.

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 9C.2).

9C.2.3 EVALUACIÓN DE LA SEÑAL DE HIBRIDACIÓN MEDIANTE UN AMPERÍMETRO PORTÁTIL

El objeto de esta experiencia es evaluar la posibilidad de utilizar un potenciómetro portátil para la lectura de la señal amperométrica de los genosensores.

Para tal fin, se compararon las señales de hibridación medidas con una unidad amperométrica portátil y con una unidad amperométrica estándar (ambas de la misma casa comercial), para genosensores procesados de idéntica manera. Para dicha evaluación se realizaron dos experiencias distintas.

En el Experimento N° 1, se llevó a cabo el protocolo de preparación de los genosensores procesando dos lotes de sensores –genosensores y sensores blanco–, y midiendo la señal amperométrica con una unidad amperométrica estándar. En el Experimento N° 2, se llevó a cabo el protocolo de preparación de los genosensores procesando dos lotes de sensores –genosensores y sensores blanco–, y midiendo la señal amperométrica con una unidad amperométrica portátil.

Para esta evaluación se utilizó el formato de reconocimiento múltiple descrito en el capítulo 9 en el que el DNA se inmovilizó directamente en el composite grafito-epoxi.

En el capítulo 9 se optimizaron las siguientes variables en este formato de reconocimiento múltiple:

- eficacia del tratamiento de prehibridación
- eficacia del procedimiento de premarcación con solución bloqueante
- tiempo de hibridación
- tiempo de marcación enzimática
- tiempo de procedimiento de inmovilización

Las Tabla 9C.1 y Tabla 9C.2 resumen las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática para los experimentos 1 y 2.

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

Tabla 9C.1. *Diseño del experimento N° 1, en el que se llevó a cabo el formato de reconocimiento múltiple en un genosensor grafito-epoxi y cuyas medidas se realizaron con una unidad amperométrica estándar. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.*

REACTIVOS	Experimento 1 blanco n=3	Experimento 1 genosensor n=3
protocolo de inmovilización: Poli(dA) -analito-	No se adiciona (-)	2.18 pmoles
protocolo de hibridación: dT(50)-biotina	61.2 pmoles	61.2 pmoles
protocolo de marcación enzimática: HRP-estreptavidina	0.99 µg	0.99 µg

Tabla 9C.2. *Diseño del experimento N° 2, en el que se llevó a cabo el formato de reconocimiento múltiple en un genosensor grafito-epoxi y cuyas medidas se realizaron con una unidad amperométrica portátil. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.*

REACTIVOS	Experimento 1 blanco n=3	Experimento 1 genosensor n=3
protocolo de inmovilización: Poli(dA) -analito-	No se adiciona (-)	2.18 pmoles
protocolo de hibridación: dT(50)-biotina	61.2 pmoles	61.2 pmoles
protocolo de marcación enzimática: HRP-estreptavidina	0.99 µg	0.99 µg

9C.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 9C.3 se muestran comparativamente los resultados obtenidos con los genosensores cuyas señales amperométricas fueron obtenidas con una unidad amperométrica estándar y una portátil respectivamente, y que fueron modificados según § 9C.2.3.

El análisis se basa en un formato de reconocimiento múltiple y para ambos experimentos 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 –medidos con un amperímetro estándar, experimento N° 1–, y blanco y genosensor –medidos con un amperímetro portátil, experimento N° 2–), y el error de las barras representa la desviación estándar de los replicados de cada lote (ec. 1, § 4B.1.1).

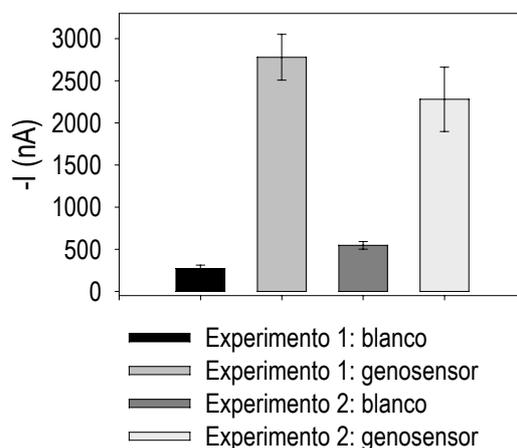


Figura 9C.3. Comparación de los resultados obtenidos en la evaluación de los genosensores utilizando una unidad amperométrica convencional (experimento N°1) y una portátil (experimento N° 2), en un formato de reconocimiento múltiple mediante un genosensor basado en la inmovilización del DNA sobre un composite grafito-epoxi. DNA analito 260 mer [poli(dA)] inmovilizado: 2.18 pmoles. Sonda funcionalizada con biotina [dT(50)-biotina]: 61.2 pmoles. HRP-estreptavidina: 0.99 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 § 9C.2.3.

En la Figura 9C.4 se muestra sólo la señal de hibridación de los genosensores medidos con una unidad amperométrica estándar y con una unidad amperométrica portátil, obtenida de la siguiente manera:

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

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 experimento (ec. 11, § 4B.2.1).

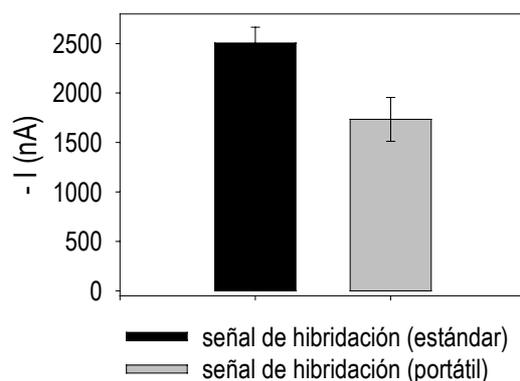


Figura 9C.4. Comparación de las señales de hibridación de los genosensores medidos con una unidad amperométrica estándar y con una unidad amperométrica portátil. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 9C.3.

La Tabla 9C.3 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación entre las señales de hibridación de los genosensores medidos con una unidad amperométrica estándar y una portátil. Se supuso varianzas comparables. La diferencia de los valores medios (prueba t) es significativamente diferente con un 95 % de confianza.

Dicho de otra manera, la señal de hibridación obtenida con una amperímetro portátil es, desde el punto de vista estadístico, significativamente inferior a la obtenida con un amperímetro estándar, ya que los genosensores y sus respectivos blancos fueron procesados de idéntica manera.

Tabla 9C.3. Pruebas estadísticas para la comparación de los valores medios de la señal de hibridación (prueba t) de los genosensores medidos con una unidad amperométrica estándar y portátil, realizadas con un 95 % de confianza.

ESTADÍSTICOS	Comparación de las señales de hibridación de los genosensores medidos con unidades amperométricas estándar y portátil
S_p (ec. 13, § 4B.2.2.1)	$S_p = 236.1$
Grados libertad (ec. 17, § 4B.2.2.3)	8
Prueba t (bilateral) (ec. 15, § 4B.2.2.2)	$t_{\text{calc}} (2.84) > t_b (2.31)$

Otro hecho destacable es que la señal del blanco medida con una amperímetro portátil es significativamente superior a si la misma se mide con un amperímetro estándar. Esto se confirma con los resultados estadísticos que se muestran en la Tabla 9C.4.

Como ambos lotes de sensores blancos fueron procesados de idéntica manera, la adsorción inespecífica es igual para la experiencia 1 y 2, por lo que esta diferencia en la señal amperométrica se debe atribuir a un mayor ruido instrumental cuando las lecturas se efectúan con el amperímetro portátil.

El aumento de la señal amperométrica de los sensores blanco cuando las medidas se efectúan con el amperímetro portátil provoca la disminución de la relación S/R ($S/R = 4.2$) respecto a cuando las mediciones se llevan a cabo con un amperímetro estándar ($S/R = 10.2$).

Tabla 9C.4. Pruebas estadísticas para la comparación de las varianzas (prueba F) y de los valores medios (prueba t) de las señales de los blancos medidos con una unidad amperométrica estándar y una portátil, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	“blanco” amperímetro estándar n=3	“blanco” amperímetro portátil n=3
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_1 = 37.9$	$s_2 = 45.1$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (1.41) < F_{2,2} (39.0)$	
S_p (ec. 4A, § 4B.1.4.1)	$S_p = 41.63$	
grados libertad (ec. 6A, § 4B.1.4.3)	4	
Prueba t (bilateral) (ec. 5A, § 4B.1.4.2)	$t_{\text{calc}} (8.04) > t_4 (2.78)$	

Pese a estos inconvenientes, y según se muestra en la Tabla 9C.5, existe una diferencia significativa entre los valores de los genosensores respecto a sus correspondientes sensores blanco cuando ambos se miden con una unidad amperométrica portátil, por lo que se puede afirmar que se pueden tener lecturas confiables con este tipo de equipamiento.

Tabla 9C.5. 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 medidos con una unidad amperométrica portátil, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	“blanco” amperímetro portátil n=3	“genosensor” amperímetro portátil n=3
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_1 = 45.1$	$s_2 = 381.6$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (71.6) > F_{2,2} (39.0)$	
grados libertad (ec. 9B, § 4B.1.5.2)	2	
Prueba t (unilateral) (ec. 8B, § 4B.1.5.1)	$t_{\text{calc}} (7.81) > t_2 (2.91)$	

9C.4 CONCLUSIONES

1. Se ha conseguido realizar un dispositivo genosensor que utiliza para las lecturas amperométricas un equipamiento portátil.
2. Se ha observado una menor señal de hibridación cuando se utiliza el amperímetro portátil respecto a si se utiliza un equipamiento convencional.
3. La señal amperométrica de los sensores blanco es mayor si se utiliza el amperímetro portátil respecto a si se utiliza un equipamiento convencional. Como los sensores se procesaron de idéntica manera, la adsorción inespecífica es la misma, por lo que ese aumento de señal se debe a un mayor ruido instrumental para el caso del equipamiento portátil.
4. El aumento de la señal amperométrica de los sensores blanco cuando las medidas se efectúan con el amperímetro portátil provoca la disminución de la relación S/R ($S/R = 4.2$) respecto a cuando las mediciones se llevan a cabo con un amperímetro estándar ($S/R = 10.2$).
5. El hecho de realizar las lecturas de los genosensores con un equipamiento portátil, de menor coste, dimensiones reducidas, bajo peso y alimentado con baterías posibilita las mediciones de campo, incrementando sus potencialidades comerciales si se utiliza un *kit* genosensor.
6. La posibilidad de conexión en serie de varios de ellos permitiría el control simultáneo de numerosos electrodos de trabajo de manera independiente y la construcción de arreglos de genosensores multiparaméricos para la detección de numerosas secuencias de DNA simultáneamente.

9C.5 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi. *Anal. Chim. Acta* 1996, 326, 141-147.
- ² J. Wang. *Biosens. Bioelectron.* 1998, 13, 757-762.
- ³ J. Wang, P. Gründler, G-U Flechsing, M. Jasinski, G. Rivas, E. Sahlin, J. L. Lopez Paz. *Anal. Chem.* 2000, 72, 3752-3756.
- ⁴ J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, N. Dontha. *Biosens. Bioelectron.* 1997, 12, 587-599.
- ⁵ J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, P. A. M. Farias, N. Dontha. *Anal. Chem.* 1996, 68, 2629-2634.
- ⁶ J. Wang, G. Rivas, C. Parrado, X. Cai, M. N. Flair. *Talanta* 1997, 44, 2003-2010.
- ⁷ G. Marrazza, I. Chianella, M. Mascini. *Anal. Chim. Acta* 1999, 387, 297-307.
- ⁸ G. Chiti, G. Marrazza, M. Mascini. *Anal. Chim. Acta* 2001, 427, 155-164.
- ⁹ M. Mascini, I. Palchetti, G. Marazza. *Fresenius J. Anal. Chem.* 2001, 369, 15-22.

CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE UN GENOSENSOR AMPEROMÉTRICO EN UN FORMATO DE CAPTURA

DETECCIÓN DE DNA INMOVILIZADO SOBRE UNA SUPERFICIE GRAFITO-POLÍMERO Y DETERMINACIÓN DE UN NUEVO DETERMINANTE DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

10.1 INTRODUCCIÓN

En el capítulo 5 se explicó en detalle la problemática de la generación de resistencia de las bacterias a los antimicrobianos y los problemas sanitarios que ello ocasiona ¹⁻⁸. Como se ha visto, las infecciones causadas por estos organismos resistentes a los antibióticos son cada vez más difíciles y caras de tratar ⁹⁻¹².

Con el objeto de solventar las desventajas de los métodos clásicos microbiológicos, en el capítulo 5 se propuso una detección alternativa de resistencia a antibióticos: la determinación de la información genética ¹³⁻¹⁵ que confiere resistencia, mediante el uso de un genosensor de membranas recambiables. El principal objetivo del desarrollo de este dispositivo genosensor fue la reducción del tiempo de análisis, factor que es crítico para una detección precoz de estos microorganismos resistentes. Dicha reducción se abordó mediante la utilización de un método de detección más robusto que en el caso de los métodos clásicos de hibridación de DNA.

Como puede observarse en la Figura 10.1, para determinar resistencia mediante un método microbiológico clásico se requiere un tiempo que puede ir desde 3 a 5 días. Con el dispositivo genosensor de membranas recambiables descrito en el capítulo 5, se consigue reducir los tiempos de análisis a 28-30 horas.

Pero, como ya se comentó, las ventajas de un dispositivo genosensor sobre los métodos microbiológicos clásicos no sólo radican en la reducción de los tiempos de análisis, sino también en el hecho de la determinación de información genética, ya que los métodos microbiológicos clásicos no siempre son capaces de detectar resistencia ¹⁶.

Detección de un nuevo determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *S. aureus*

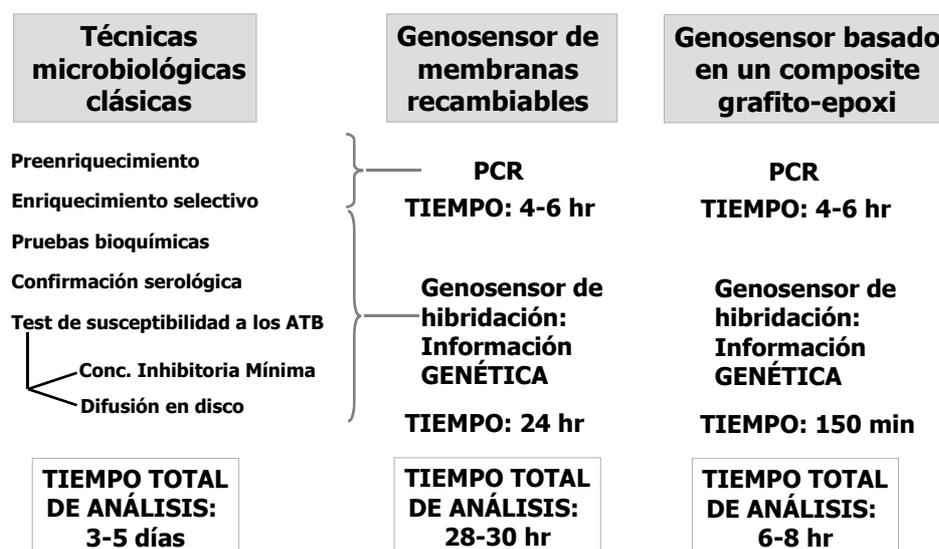


Figura 10.1. Esquema comparativo en el que se muestra la reducción del tiempo total de análisis utilizando un dispositivo genosensor respecto a las técnicas microbiológicas clásicas de análisis.

Por tanto, teniendo en cuenta todas estas ventajas que otorga el uso de un dispositivo genosensor, en el trabajo descrito en el presente capítulo se pretende conseguir mejoras respecto al genosensor de membranas recambiables desarrollado en el capítulo 5.

En primera instancia se pretende reducir aún más los tiempos de análisis utilizando un genosensor basado en un composite grafito-epoxi. En el trabajo descrito en el capítulo 9 se ha visto como el hecho de inmovilizar directamente el DNA analito –por adsorción física– sobre un composite grafito-epoxi trae aparejado un aumento de señal electroquímica y la reducción de los tiempos empleados en el procedimiento total de análisis de 24 a 2 h 30 min., en comparación con los genosensores de membranas recambiables desarrollados en los capítulos 4 a 8 (Figura 10.1). Además, se consiguió simplificar el proceso de preparación de los genosensores al eliminar el tratamiento de prehibridación y de premarcación con solución bloqueante, ya que se observó una marcada disminución en la adsorción inespecífica sobre el composite grafito-epoxi respecto a las membranas de nylon HYBOND.

Además, también se pretende introducir una nueva ventaja metodológica mediante la utilización de un formato de captura (Figura 10.2). En un formato de captura se inmoviliza sobre el transductor una sonda sintética complementaria a parte del analito o a una región aledaña a la secuencia del analito que se desea investigar. El analito, que se encuentra en solución, se hibrida con la sonda de captura en el soporte, y luego es reconocido por una sonda funcionalizada con biotina complementaria a otra región distinta del analito.

El formato de captura reúne muchas de las ventajas descritas para los formatos anteriores.

En primer lugar, el analito se encuentra en solución y para conseguirlo no es necesario que el mismo se deba funcionalizar con biotina como en los formatos dot-blot. Además, como ya se ha comentado, desde el punto de vista químico el hecho de que el analito se encuentre inmovilizado en

un soporte sólido implica una disminución en la efectividad de la hibridación, ya que la misma es menos efectiva en fase heterogénea que en solución ¹⁷⁻²². Esto provoca que una gran parte de analito (que normalmente es el reactivo limitante) se desaproveche y no esté disponible para hibridarse con la sonda funcionalizada. Desde el punto de vista metodológico, se debe preparar un sensor por cada muestra a analizar, hecho que dificulta la automatización del proceso de preparación del sensor y su futura implementación comercial como *kit*.

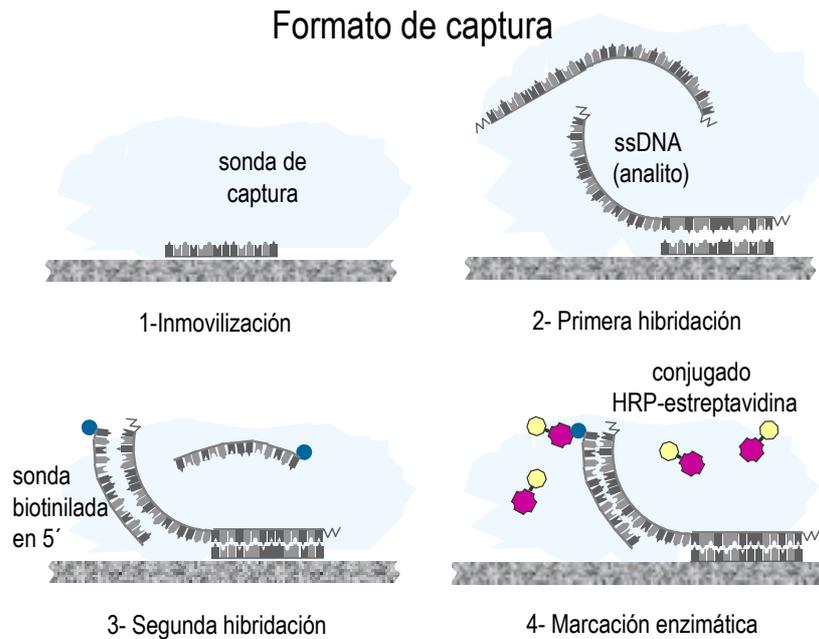


Figura 10.2. Pasos involucrados en un formato de captura.

Con anterioridad se ha solventado este problema mediante la implementación de un formato competitivo. La desventaja que presenta un formato competitivo (apéndice A del capítulo 4 y capítulo 6) respecto a un formato de captura es que se deben procesar tres lotes de sensores: blancos, genosensores y controles.

En segundo lugar, el formato de captura comparte una ventaja con el formato dot-blot de reconocimiento doble (capítulo 5): la doble hibridación (Figura 10.3). En el caso del formato de captura, el primer reconocimiento ocurre con la sonda de captura inmovilizada sobre el transductor grafito-epoxi y el segundo reconocimiento, con la sonda funcionalizada con biotina en la solución de hibridación. Así, se conseguiría aumentar el número de bases reconocidas en el analito –con lo que se incrementaría la especificidad de la reacción– al igual que en el formato de reconocimiento doble. Sin embargo, en el formato de captura la marcación es simple, con lo cual se pierde la ventaja de la doble marcación conseguida por el formato de reconocimiento doble, como puede observarse en la Figura 10.3.

Un formato de reconocimiento doble podría tener infinidad de aplicaciones. Para el caso de la investigación de microorganismos, la sonda de captura podría ser específica de género mientras que la sonda biotinilada, específica de especie. Así, para una muestra incógnita, se podría conocer el género y la especie de un microorganismo presente en la misma ²³. En la bibliografía se han reportado

numerosas variantes de formatos de captura que combinan la PCR, la doble funcionalización (como por ejemplo con biotina y con digoxigenina), la captura en un soporte sólido y la detección de tipo enzimática basada en métodos ópticos (espectroscopía y quimioluminiscencia) ²⁴⁻²⁹.

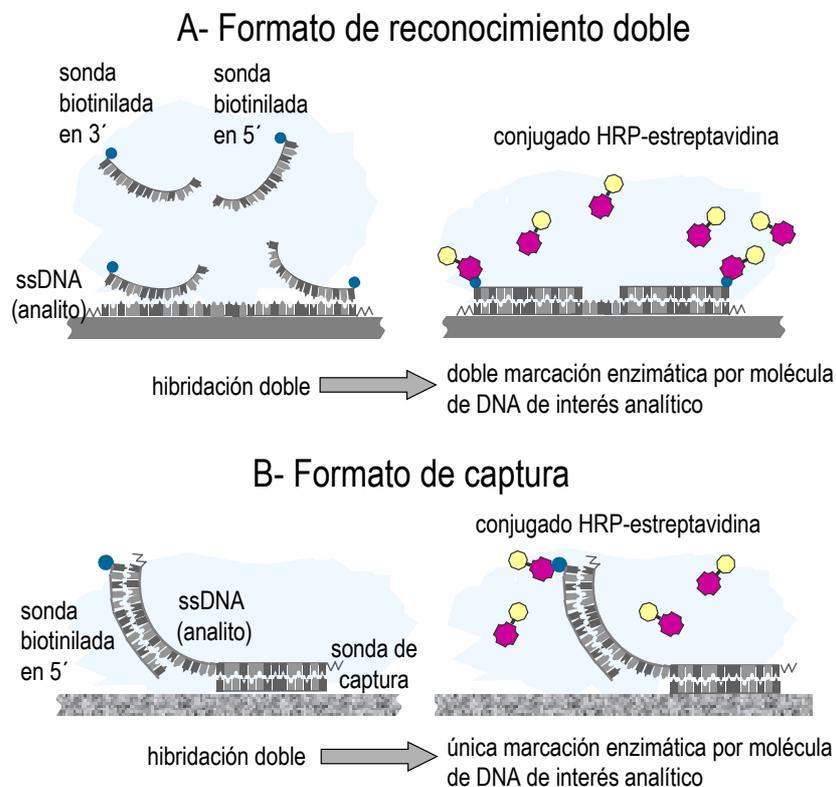


Figura 10.3. Esquema comparativo de los formatos dot-blot de reconocimiento doble (A) y de captura (B). En la figura se muestra como –mediante la metodología de doble hibridación– en un formato de captura se obtiene ventaja en cuanto a especificidad, al igual que en el formato dot-blot de doble reconocimiento. Sin embargo en el formato de captura, a diferencia del formato de reconocimiento doble, no hay doble marcación y se pierde la ventaja del aumento de sensibilidad.

En tercer lugar, el formato de captura comparte con el formato de reconocimiento simple (capítulo 9) otra característica importante, que es la sencillez del procedimiento. Como ya se verá más adelante, las dos hibridaciones involucradas en el formato de captura se pueden realizar con éxito en un único paso, lo cual implica desde el punto de vista metodológico similitud total con el formato de reconocimiento simple. Aún así, un formato de captura es más idóneo para ser implementado en forma de *kit* que un formato de reconocimiento simple, ya que permite tener pre-preparados los dispositivos genosensores con la sonda de captura previamente inmovilizada y mediante procedimientos planares de fabricación masiva (*screen printing*), lo que aumentaría sus perspectivas comerciales.

Por último, otra característica importante del formato de captura es la posibilidad de cuantificar DNA. Como ya se ha visto, no se puede cuantificar el analito si el mismo se inmoviliza en el transductor, ya que no existe una respuesta lineal con el aumento de la cantidad de analito (§ 9.3.4). Sin embargo, en la bibliografía se muestran curvas de calibrados lineales en formatos de captura y se reportan límites de detección con distintas metodologías de detección ²². Pese a que la mayoría de los

problemas analíticos genéticos requieren una respuesta de tipo SI/NO, el hecho de poder además dar una respuesta de tipo cuantitativa abre la posibilidad de cuantificar transcritos (mRNA). La cuantificación de RNA se utiliza para evaluar la expresión de un gen.

Para concluir, en el trabajo descrito en el presente capítulo se va a implementar un formato de captura en un genosensor amperométrico basado en un composite grafito-epoxi para detectar un nuevo determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos.

Para tal fin, se inmovilizará en la superficie del transductor una sonda de captura, y se ensayarán dos metodologías distintas de hibridación: un formato de captura secuencial y un formato de captura en un único paso (Figura 10.4).

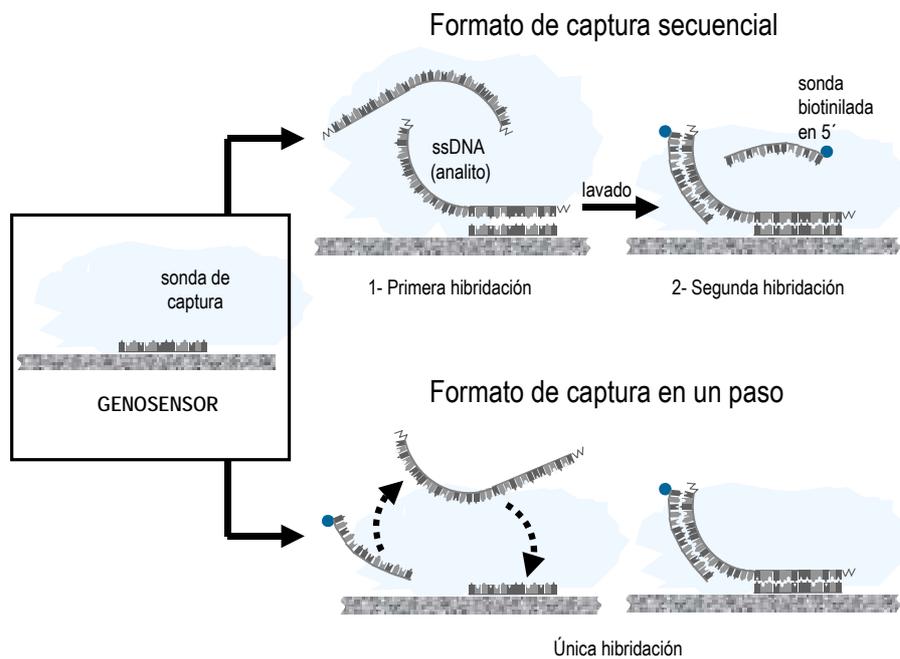


Figura 10.4. Esquema comparativo de los formatos de captura llevado a cabo en dos pasos secuenciales y en un único paso.

En el primer caso, se realiza –en dos pasos secuenciales– una primera hibridación con el analito y una segunda hibridación con la sonda biotinilada –luego de un paso de lavado–. En el formato de captura en un único paso, se realiza simultáneamente la hibridación de la sonda de captura inmovilizada sobre el composite con la sonda biotinilada y el analito. En la figura no se muestra el mecanismo de hibridación, aunque se supone que primero ocurre la hibridación en solución (que es la más favorable desde el punto de vista cinético¹⁷⁻²²) entre la sonda biotinilada y el analito, y posteriormente ocurre la hibridación de este dúplex preformado en solución con la sonda de captura inmovilizada en el transductor.

Posteriormente, una vez escogida la metodología más adecuada, se estudiará la respuesta del genosensor en sus aspectos cuantitativos mediante una curva de calibrado con distintas cantidades de analito en solución.

Además, se compararán los resultados con los obtenidos en el capítulo 5 para un formato dot-blot de reconocimiento doble utilizando un genosensor de membranas recambiables, y con un

formato de reconocimiento simple basado también en un composite grafito-epoxi, pero en el cual el analito se encuentra inmovilizado en el transductor.

10.2 EXPERIMENTAL

10.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS

10.2.1.1 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.

10.2.1.2 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 Molecular Biochemicals). La estreptavidina del conjugado se obtiene de *Streptomyces avidinii*, que se conjuga con la β -peroxidasa de rábano picante utilizando el método del periodato.

Se encargó la síntesis de la siguiente sonda de DNA modelo, a TIB-MOLBIOL (Alemania):

- Oligonucleótido N° 1 (sonda de captura, inmovilizada en el transductor grafito-epoxi).

5'-ATT AGA GTT CCC ATT TGC TG-3'

Características del producto:

$T_m = 53.2^\circ \text{C}$; GC = 40 %; cantidad de DNA: 15.3 OD, 480.9 μg , 74.9 nmol; P.M.: 6098.0 g/mol; purificación: HPSF; longitud = 20 mer.

Se encargó la síntesis de las siguientes sondas de DNA modelo, a MWG-BIOTECH (Alemania):

- Oligonucleótido N° 2 (analito en la solución de hibridación. Su secuencia es única y representa un nuevo determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *S. aureus*³⁰). El número de acceso de esta secuencia obtenida del banco de genes NCBI (National Center for Biotechnology Information) es AF077865.

5'-CAG CAA ATG GGA ACT CTA ATG GAG ATT TTT CCA AAC AAA ATA TAG ATA TT-3'

Características del producto: véase § 5.2.1.2 (oligonucleótido N° 1)

10.2.3 MODIFICACIÓN DEL GENOSENSOR: HIBRIDACIÓN Y MARCACIÓN

Las determinaciones con los genosensores siguieron un protocolo que constó de 2 pasos fundamentales:

- 1.-Hibridación de la sonda de captura inmovilizada en el transductor grafito-epoxi mediante un formato de captura en un paso o mediante un formato de captura secuencial.
- 2.-Marcación enzimática posthibridación de los híbridos formados en el transductor grafito-epoxi.

Una vez realizados estos pasos, se efectuaron las medidas amperométricas de los genosensores. En las secciones siguientes, se trata cada uno de estos pasos.

10.2.3.1 Hibridación del transductor grafito-epoxi modificado con la sonda de captura

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 ^{31,34-40}, uso de formamida ^{34-36,38,40} y SDS ^{22,34,36-40}, fuerza iónica ^{35,36}, uso de dextranos ^{36,37,39} o polietilenglicol ^{22,35,38}
- temperatura y tiempo de hibridación ^{34,35,40}
- agitación durante la hibridación ^{21,31,34}
- volumen de hibridación ^{34,40}

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

La preparación de la sonda biotinilada en 5' y del analito se realizó como se describiera en § 4.2.5.7.

Como ya se ha comentado, se han ensayado dos protocolos distintos: formato de captura secuencial y formato de captura en un paso.

En los apartados siguientes se explican cada uno de estos protocolos.

Protocolo de hibridación de los genosensores en un formato de captura secuencial

El protocolo de hibridación de los genosensores en formato de captura secuencial (Figura 10.4) 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 analito (oligonucleótido N° 2), 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 preparación del genosensor (§ 10.2.2.2).
- 4.- Hibridación N° 1 (sonda de captura-analito): 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 de 60 minutos (§ 9.3.3).
- 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: 5 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.
- 7.- Se repite el paso 1
- 8.- Se adiciona un volumen (en μl) de sonda biotinilada (oligonucleótido N° 3), de manera que el volumen final sea 150 μl .
- 9.- Hibridación N° 2 (dúplex sonda de captura/analito con la sonda biotinilada): 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 de 45 minutos (§ 9.3.3).
10. Se repiten los pasos 5 y 6.

Protocolo de hibridación de los genosensores en un formato de captura en un paso

El protocolo de hibridación de los genosensores en formato de captura en un paso (Figura 10.4) 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 analito (oligonucleótido N° 2) y de sonda biotinilada (oligonucleótido N° 3) 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 preparación del genosensor (§ 10.2.2.2).
- 4.- Hibridación única: 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 de 60 minutos (§ 9.3.3).
- 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: 5 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.

10.2.3.2 Marcación enzimática posthibridación

Luego del procedimiento de hibridación y de los lavados posthibridación, sea cual fuese la metodología (en un paso o secuencial), se han formado los híbridos entre la sonda de captura inmovilizada en el composite grafito-epoxi, el analito 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 ³⁵
- temperatura y tiempo de marcación enzimática ³⁵
- agitación durante la marcación enzimática ^{21,31,34,35}
- volumen de marcación enzimática ^{34,40}

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

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

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 marcación enzimática

El protocolo de marcación enzimática de los genosensores 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 30 minutos (§ 9.3.6).
- 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

10.2.4 EVALUACIÓN DE LOS GENOSENSORES

La evaluación de los sensores preparados 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 $I_{m\acute{a}x}$.

10.2.5 OPTIMIZACIÓN DE LOS GENOSENSORES BASADOS EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI EN FORMATO DE CAPTURA

Para evaluar la señal debida a la hibridación, se realizó en todos los casos un lote de genosensores, que evaluaron el proceso de hibridación en formato de captura. Con el objeto de evaluar la adsorción inespecífica, se realizó en paralelo un lote de sensores blanco, –en las que se adicionaron los mismos reactivos que en los genosensores excepto el analito, que en este caso se encuentra en la solución de hibridación–. 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 captura.

En la Figura 10.5 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

La modificación de los genosensores se realiza sobre los genosensores preparados según § 10.2.2, que ya tienen la sonda de captura inmovilizada sobre el composite grafito-epoxi.

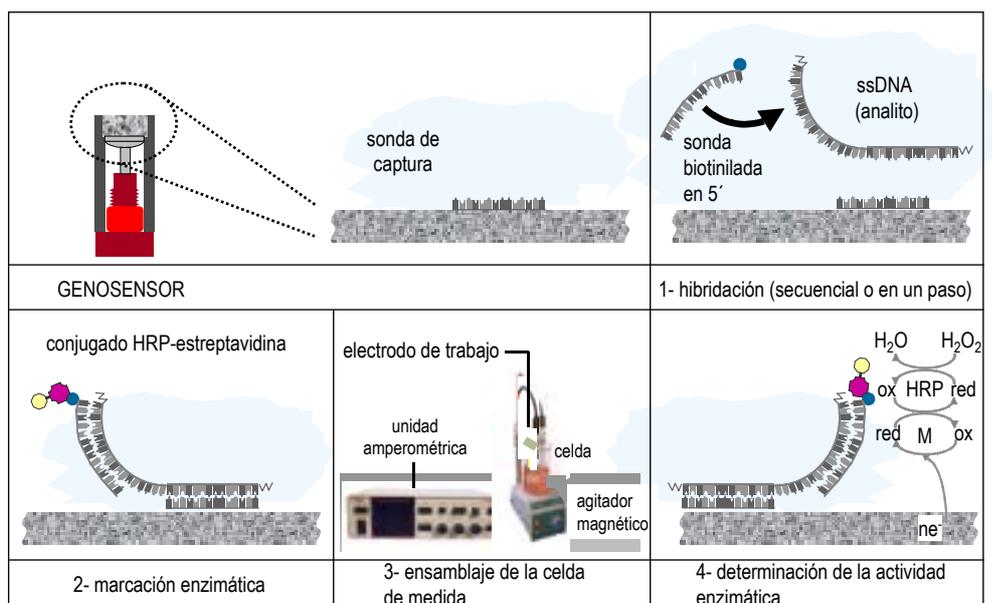


Figura 10.5. Dibujo esquemático en el que se muestran las etapas de análisis con un genosensor en el que la sonda de captura se inmoviliza por adsorción sobre el composite grafito-epoxi.

10.2.5.1 Protocolo de modificación de los genosensores en un formato de captura secuencial

- 1.- Se sigue el protocolo de hibridación, descrito en § 10.2.3.1, para un formato de captura secuencial.
- 2.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 10.2.3.2.

10.2.5.2 Protocolo de modificación de los genosensores basados en un formato de captura en un paso

- 1.- Se sigue el protocolo de hibridación, descrito en § 10.2.3.1, para un formato de captura en un paso.
- 2.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 10.2.3.2.

10.2.5.3 Protocolo de preparación de los sensores blancos

Este lote de sensores se realizó de manera idéntica al de los genosensores, pero obviando el paso de adición del analito (oligonucleótido N° 2) en la solución de hibridación.

Estos sensores blancos difieren respecto a los preparados en capítulos anteriores, ya que en este caso tienen DNA inmovilizado en su superficie: la sonda de captura.

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

Tanto en el formato de captura secuencial como en el formato de captura en un solo paso, durante la 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 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.

La modificación de los sensores blanco se realiza sobre los genosensores preparados según § 10.2.2, que ya tienen la sonda de captura inmovilizada sobre el composite grafito-epoxi.

Protocolo de modificación de los sensores blancos en un formato de captura secuencial

- 1.- Se sigue el protocolo de hibridación, descrito en § 10.2.3.1, para un formato de captura secuencial, con la única diferencia que en el paso 2 no se agrega el analito. En este caso, al no haber analito en la solución de hibridación, no va a haber hibridación y sí sólo adsorción inespecífica de la sonda biotinilada.
- 2.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 10.2.3.2.

Protocolo de modificación de los sensores blancos en un formato de captura en un paso

- 1.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 10.2.3.1, para un formato de captura en un paso, con la única diferencia que en el paso 2 no se agrega el analito. En este caso, al no haber analito en la solución de hibridación, no va a haber hibridación y sí sólo adsorción inespecífica de la sonda biotinilada.
- 2.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 10.2.3.2.

10.2.5.4 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 § 10.2.4. 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 genosensores y de los blancos.

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 que forma parte del dúplex en el composite (Figura 10.5).

10.2.5.5 Diseño del experimento en un formato de captura secuencial

Para evaluar la utilidad del formato de captura secuencial y optimizar las cantidades de reactivos (cantidad de la sonda de captura inmovilizada en el composite grafito-epoxi, de analito y de sonda biotinilada en la solución de hibridación y de conjugado enzimático), se realizaron cuatro experimentos. Cada experimento constó de un lote de genosensores y de un lote de sensores blancos, como se explicara en § 10.2.5.

La Tabla 10.1 resume las cantidades de reactivos utilizadas en la preparación del genosensor, en la hibridación y en la marcación enzimática.

Tabla 10.1. *Diseño del experimento de evaluación del formato de captura secuencial. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización por adsorción, hibridación 1, hibridación 2 y marcación enzimática.*

REACTIVOS	Experimento 1 blanco n=2	Experimento 1 genosensor n=2	Experimento 2 blanco n=3	Experimento 2 genosensor n=2
preparación del genosensor Oligonucleótido 1 -sonda de captura-	3.7 pmoles	3.7 pmoles	3.7 pmoles	3.7 pmoles
protocolo de hibridación (N° 1) Oligonucleótido 2 -determinante de resistencia-	No se adiciona (-)	38.2 pmoles	No se adiciona (-)	76.4 pmoles
protocolo de hibridación (N° 2) Oligonucleótido 3 -sonda biotinilada en 5'-	36.2 pmoles	36.2 pmoles	66.7 pmoles	66.7 pmoles
protocolo de marcación enzimática HRP-estreptavidina	1.84 µg	1.84 µg	9.00 µg	9.00 µg

REACTIVOS	Experimento 3 blanco n=2	Experimento 3 genosensor n=3	Experimento 4 blanco n=2	Experimento 4 genosensor n=3
preparación del genosensor Oligonucleótido 1 -sonda de captura-	3.7 pmoles	3.7 pmoles	64.2 pmoles	64.2 pmoles
protocolo de hibridación (N° 1) Oligonucleótido 2 - determinante de resistencia-	No se adiciona (-)	38.2 pmoles	No se adiciona (-)	38.2 pmoles
protocolo de hibridación (N° 2) Oligonucleótido 3 -sonda biotinilada en 5'-	66.7 pmoles	66.7 pmoles	66.7 pmoles	66.7 pmoles
protocolo de marcación enzimática HRP-estreptavidina	9.00 µg	9.00 µg	9.00 µg	9.00 µg

La cantidad de sonda de captura inmovilizada en el composite grafito-epoxi se adaptó de la cantidad encontrada como óptimo en el apéndice A del capítulo 9 (nivel bajo) teniendo en cuenta que en este caso el oligonucleótido es 5 veces menor de tamaño. En el caso del conjugado enzimático, se realizó una nueva optimización de la cantidad adicionada en la solución de marcación enzimática (experimentos no mostrados), debido a que se cambió de producto comercial. En este caso se observó que la adsorción inespecífica era significativamente menor que en el capítulo 9, por lo que se pudo adicionar mayor cantidad de conjugado enzimático, con un beneficio de la relación S/R.

10.2.5.6 Diseño del experimento en un formato de captura en un paso

La Tabla 10.2 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.

Tabla 10.2. *Diseño del experimento de evaluación del formato de captura en un paso. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización por adsorción, hibridación y marcación enzimática.*

REACTIVOS	blanco n=2	genosensor n=3
preparación del genosensor Oligonucleótido 1 -sonda de captura-	64.2 pmoles	64.2 pmoles
protocolo de hibridación Oligonucleótido 2 - determinante de resistencia-	No se adiciona (-)	38.2 pmoles
protocolo de hibridación Oligonucleótido 3 -sonda biotinilada en 5'-	66.7 pmoles	66.7 pmoles
protocolo de marcación enzimática HRP-estreptavidina	9.00 µg	9.00 µg

Para evaluar la utilidad del formato de captura en un paso y comparar los resultados con el formato de captura secuencial, se realizó un experimento que constó de un lote de genosensores y de un lote de sensores blanco, como se explicara en § 10.2.5.

Como se puede observar, se han procesado replicados de los genosensores y de los sensores blanco.

10.2.5.7 Cantidad de analito en la solución de hibridación en un formato de captura en un paso. Diseño del experimento

El objeto de esta experiencia es realizar un calibrado con cantidades crecientes de analito en la solución de hibridación.

Para evaluar el efecto de la cantidad de analito en la solución de hibridación en un formato de captura en un paso, se realizaron 10 experiencias.

Los genosensores sólo se diferenciaron en la cantidad de analito, las cuales fueron: 0 fmoles (blanco), 88.3, 176.7, 530.1, 1060.2, 3180.6, 6361.1, 19083.3, 28625.0 y 38166.7 fmoles de analito.

Las cantidades de sonda de captura inmovilizada en el composite grafito-epoxi, de sonda biotinilada en 5' en la solución de hibridación y de conjugado enzimático fueron, respectivamente, 29.4 pmoles, 66.7 pmoles y 9.00 µg. Por cada experiencia se realizaron replicados.

La Tabla 10.3 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.

Tabla 10.3. *Diseño del experimento de evaluación del efecto de la cantidad de analito en la solución de hibridación en un formato de captura en un paso. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización por adsorción, hibridación y marcación enzimática.*

Experimento N°:	Preparación del genosensor Oligonucleótido 1 -sonda de captura-	Protocolo de hibridación		Protocolo de marcación enzimática HRP-estreptavidina
		Oligonucleótido 2 -analito determinante de resistencia-	Oligonucleótido 3 -sonda funcionalizada con biotina en 5'-	
1 (blanco)	29.4 pmoles	0 fmoles	66.7 pmoles	9.00 µg
2	29.4 pmoles	88.3 fmoles	66.7 pmoles	9.00 µg
3	29.4 pmoles	176.7 fmoles	66.7 pmoles	9.00 µg
4	29.4 pmoles	530.1 fmoles	66.7 pmoles	9.00 µg
5	29.4 pmoles	1.1 pmoles	66.7 pmoles	9.00 µg
6	29.4 pmoles	3.2 pmoles	66.7 pmoles	9.00 µg
7	29.4 pmoles	6.4 pmoles	66.7 pmoles	9.00 µg
8	29.4 pmoles	19.1 pmoles	66.7 pmoles	9.00 µg
9	29.4 pmoles	28.6 pmoles	66.7 pmoles	9.00 µg
10	29.4 pmoles	38.2 pmoles	66.7 pmoles	9.00 µg

10.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.3.1 GENOSENSORES EN FORMATO DE CAPTURA SECUENCIAL

En la Figura 10.6 se muestran los resultados del experimento realizado en § 10.2.5.5. Este experimento se basa en el diseño de un formato de captura secuencial para la detección de un nuevo determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *S. aureus* utilizando un genosensor basado en un composite grafito-epoxi.

En la Figura 10.6 cada barra muestra el valor medio de los replicados de cada lote de sensores (blanco y genosensor) para cada experimento, y el error de las barras representa la desviación estándar de los replicados de cada lote (ec. 1, § 4B.1.1).

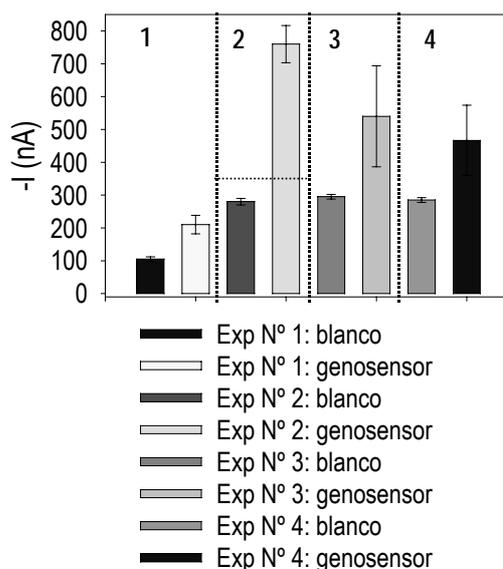


Figura 10.6. Resultados obtenidos en la evaluación del formato de captura secuencial mediante genosensores basados en composites grafito-epoxi. Las cantidades de sonda de captura, analito, sonda biotinilada en 5' y conjugado enzimático para cada experimento se describen en Tabla 10.1. Medio: fosfato 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 modificados según § 10.2.5.5.

Cada experimento se realizó con cantidades diferentes de reactivos. Como puede observarse, las mejores condiciones experimentales se consiguieron en el experimento N° 2. Para este experimento, en la Figura 10.6 se muestra el nivel a partir del cual la señal 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 Tabla 10.4 muestra los resultados de las pruebas estadísticas que comparan los blancos y los genosensores para el experimento N° 2.

La diferencia significativa de señal amperométrica que existe entre los genosensores y los blancos permite afirmar que el procedimiento de captura funciona correctamente, y que la hibridación del analito con la sonda de captura y el posterior reconocimiento del dúplex con una sonda biotinilada ocurre con efectividad sobre el transductor grafito-epoxi.

Pese a todo, las señales de los genosensores no son lo suficientemente altas como las que cabrían esperar para un genosensor basado en un composite grafito-epoxi (compárese con el nivel de las señales obtenidas en el capítulo 9).

Tabla 10.4: 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, en el formato de captura secuencial para el experimento N° 2, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	Experimento 2 blanco (n=3)	Experimento 2 genosensor (n=2)
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_1 = 10.0$	$s_2 = 56.6$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (32) < F_{1,2} (38.5)$	
S_p (ec. 4B, § 4B.1.4.1)	$S_p = 33.7$	
grados libertad (ec. 6B, § 4B.1.4.3)	3	
Prueba t (unilateral) (ec. 5B, § 4B.1.4.2)	$t_{\text{calc}} (15.61) > t_b (2.35)$	

Las diferencias entre los distintos experimentos con distintas cantidades de reactivos permite sacar algunas conclusiones nuevas y otras similares a capítulos anteriores. Por ejemplo, la disminución de la señal de hibridación existente entre el experimento 2 y 3 responde a que la cantidad de analito en solución hibridación se redujo a la mitad. Esta respuesta permitiría anticipar la posibilidad de la cuantificación del analito cuando se encuentra en solución en un formato de captura, a diferencia de un formato en el cual el analito se encuentra inmovilizado en el transductor.

La disminución de la señal de hibridación entre el experimento 3 y 4 responde al aumento de la cantidad de sonda de captura. Estos resultados no son sorprendentes; como ya se ha discutido en el capítulo 9 y en el apéndice A del capítulo 9, esta disminución en la señal amperométrica se debe a que el aumento de DNA (en este caso, la sonda de captura) inmovilizado en el transductor actuaría como una interfase que disminuiría –como si de una membrana se tratara– la conducción del composite, y perjudicaría la sensibilidad de los ensayos.

En la Figura 10.6 puede observarse que existe una buena reproducibilidad entre ensayos paralelos de un mismo lote, con desviaciones estándar relativas (ec. 2, § 4B.1.2) de menos del 10 % para los genosensores (excepto en el experimento 3), valores similares a los encontrados en los ensayos realizados en el capítulo 5 para un formato dot-blot de reconocimiento simple.

A pesar de haber cambiado de producto comercial del conjugado enzimático y de haber tenido que optimizar nuevamente las cantidades del mismo durante el paso de marcación enzimática, también se observó una buena reproducibilidad en la adsorción inespecífica en ensayos paralelos de

un mismo lote –de menos del 5 % para los blancos– que, unido al hecho de que existe reproducibilidad en ensayos llevados a cabo en días diferentes, podría conducir a la supresión de la construcción del lote de sensores blanco, con las ventajas prácticas que esto traería, siempre y cuando se utilice el mismo producto comercial.

De la observación de la Figura 10.6 también se deduce que la adsorción inespecífica está relacionada básicamente con el protocolo de marcación enzimática, ya que los experimentos 2, 3 y 4, que presentan similares señales en los sensores blanco, utilizan la misma cantidad de conjugado enzimático, y mayor que la utilizada en el experimento 1, que presenta menor señal.

Los genosensores se preparan en 50 minutos (§ 10.2.2). El tiempo total del procedimiento de captura secuencial en los genosensores pre-preparados es de 160 minutos.

10.3.2 GENOSENSORES EN FORMATO DE CAPTURA EN UN PASO

En la Figura 10.7 se muestran los resultados obtenidos del experimento realizado en § 10.2.5.6. Este experimento se basa en el diseño del formato de captura en un paso, es decir, en la hibridación simultánea de la sonda de captura, del analito –en este caso, un nuevo determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos–, y de la sonda biotinilada.

En la Figura 10.7 cada barra muestra el valor medio de los replicados de cada lote de sensores (blanco y genosensor), y el error de las barras representa la desviación estándar de los replicados de cada lote (ec. 1, § 4B.1.1).

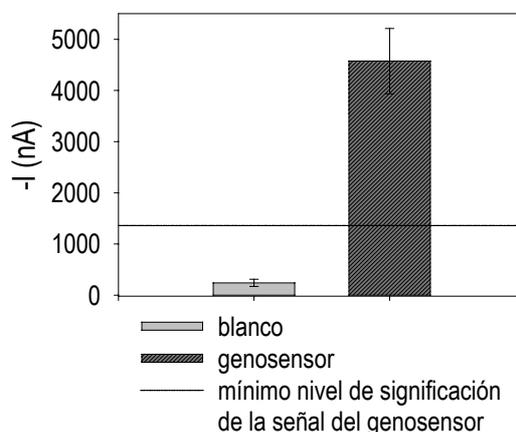


Figura 10.7. Resultados obtenidos en la evaluación del formato de captura en un paso mediante genosensores basados en composites grafito-epoxi. Sonda de captura inmovilizada: 64.2 pmoles. DNA analito (determinante de resistencia): 38.2 pmoles. Sonda biotinilada en 5': 66.7 pmoles. HRP-estreptavidina: 9.00 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 modificados según § 10.2.5.6.

En la Figura 10.7 se muestra el nivel a partir del cual la señal 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 Tabla 10.5 muestra los resultados de las pruebas estadísticas que comparan los blancos y los genosensores para el formato de captura en un paso.

La diferencia significativa de señal amperométrica que existe entre los genosensores y los blancos permite afirmar que el procedimiento de captura en un paso funciona correctamente, y que la hibridación simultánea del analito con la sonda de captura y con la sonda biotinilada ocurre con efectividad sobre el transductor grafito-epoxi.

Tabla 10.5: 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, en el formato de captura en un paso, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	blanco (n=2)	genosensor (n=3)
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_1 = 70.7$	$s_2 = 638.1$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{calc} (81.4) < F_{2,1} (799.5)$	
S_p (ec. 4B, § 4B.1.4.1)	$S_p = 522.6$	
grados libertad (ec. 6B, § 4B.1.4.3)	3	
Prueba t (unilateral) (ec. 5B, § 4B.1.4.2)	$t_{calc} (9.08) > t_3 (2.35)$	

Las señales de hibridación para el formato de captura en un paso, a diferencia del formato de captura secuencial, son lo suficientemente altas como las que cabrían esperar para un genosensor basado en un composite grafito-epoxi.

Los genosensores se preparan, al igual que para el formato de captura secuencial, en 50 minutos (§ 10.2.2). Sin embargo, el tiempo total del procedimiento de captura en un paso en los genosensores pre-preparados es de 110 minutos, mientras que para el formato de captura secuencial es de 160 minutos.

En la Figura 10.8 se muestra comparativamente los resultados obtenidos con la misma cantidad de reactivos de los formatos de captura en un paso (110 minutos) y secuencial (160 minutos).

Se puede ver claramente que, pese a que el procedimiento de captura en un paso es más simplificado y se lleva a cabo en un tiempo menor, se obtienen señales de hibridación significativamente mayores respecto a un formato de captura secuencial.

Esto implica que es más favorable una metodología que implique la hibridación simultánea de la sonda de captura, el analito, y la sonda biotinilada, en lugar de realizar en pasos sucesivos la hibridación de la sonda de captura con el analito, y posteriormente la hibridación del dúplex preformado en el composite con la sonda biotinilada.

Ambos mecanismos se pueden observar en la Figura 10.4. Como puede observarse en esta figura, en un formato de captura secuencial las dos hibridaciones sucesivas se realizan en fase heterogénea líquida/sólida. En el caso del formato de captura en un paso en el cual todos los reactivos se encuentran en contacto simultáneamente, es lógico pensar que en primera instancia ocurre la hibridación en solución –es decir, en fase líquida/líquida– entre el analito y la sonda biotinilada. Posteriormente, este dúplex se hibridaría en fase heterogénea líquida/sólida con la sonda de captura. Es evidente que con el hecho de eliminar una hibridación heterogénea se obtiene un rendimiento mayor en el proceso total de hibridación. Esto concuerda con lo relatado en la bibliografía¹⁷⁻²², en el que se puntualiza que las hibridaciones en solución son más efectivas que las hibridaciones sobre un soporte sólido.

En la Figura 10.9 se muestran comparativamente los resultados obtenidos para los sensores blanco en formato de captura en un paso y secuencial.

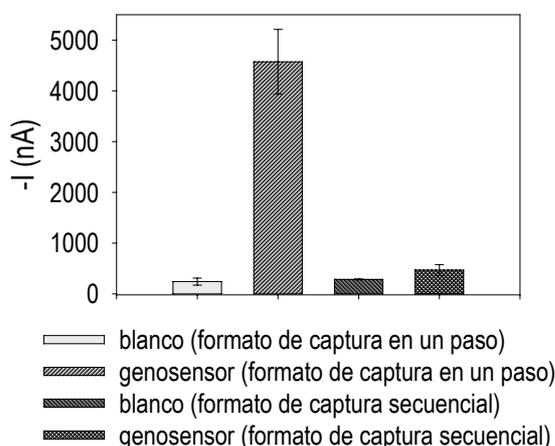


Figura 10.8. Comparación de los resultados obtenidos en la evaluación del formato de captura en un paso y secuencial (Experimento 4, Tabla 10.1), mediante genosensores basados en composites grafito-epoxi. Sonda de captura inmovilizada: 64.2 pmoles. DNA analito (determinante de resistencia): 38.2 pmoles. Sonda biotinilada en 5': 66.7 pmoles. HRP-estreptavidina: 9.00 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 modificados según §§ 10.2.5.5 y 10.2.5.6.

En la figura cada barra muestra el valor medio de los replicados de cada lote de blancos y el error de las barras representa la desviación estándar de los replicados de cada lote (ec. 1, § 4B.1.1).

Como puede observarse en la Figura 10.9 y en los resultados de la Tabla 10.6, las diferencias de las señales de adsorción inespecífica son no significativas, pese a que en el formato de captura secuencial hay un paso de lavado posthibridación extra (puntos 5 y 6 del protocolo de hibridación en formato de captura secuencial).

Esto confirmaría el hecho de que el paso que determina el valor de la adsorción inespecífica es el de marcación enzimática, que se ha realizado de manera idéntica para ambas metodologías.

Los resultados permiten concluir que el mejor formato de captura se lleva a cabo en una hibridación en un único paso, tanto si se tienen en cuenta el tiempo y la simplicidad de procedimiento como las señales obtenidas.

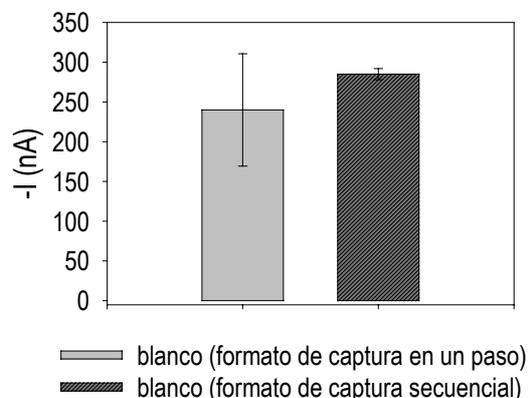


Figura 10.9. Comparación de los resultados obtenidos en la evaluación de los sensores blancos en formato de captura en un paso y secuencial (Experimento 4, Tabla 10.1). Los detalles experimentales son los mismos que para la Figura 10.8.

Tabla 10.6: Pruebas estadísticas para la comparación de las varianzas (prueba F) y de los valores medios (prueba t) de las señales de los blancos para un formato de captura en un paso y secuencial, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	blanco formato de captura en un paso (n=2)	blanco formato de captura secuencial (n=2)
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_1 = 70.7$	$s_2 = 7.1$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (100) < F_{1,1} (647.8)$	
S_p (ec. 4A, § 4B.1.4.1)	$S_p = 50.2$	
grados libertad (ec. 6A, § 4B.1.4.3)	2	
Prueba t (bilateral) (ec. 5A, § 4B.1.4.2)	$t_{\text{calc}} (0.9) < t_2 (4.3)$	

10.3.3 CANTIDAD DE ANALITO EN LA SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN EN UN FORMATO DE CAPTURA EN UN PASO

En la Figura 10.10 se muestra los resultados obtenidos con la variación de la cantidad de analito en la solución de hibridación.

Como puede observarse, existe una respuesta lineal con el aumento de analito en la solución de hibridación en un amplio rango de concentraciones, que va desde pocas fmoles hasta pmoles, bajo estas condiciones experimentales. La recta se ajusta bien, y presenta un r^2 de 0.98, y su ecuación es:

$$\text{Señal amperométrica}_{(\text{genosensores})} = 444.24 + 0.169 [\text{analito}]$$

Para poder determinar los límites de detección de este sistema, es importante analizar la zona de concentraciones bajas de analito de la curva, que se encuentra resaltada con un círculo en la Figura 10.10 y que se representa de manera separada en la Figura 10.11.

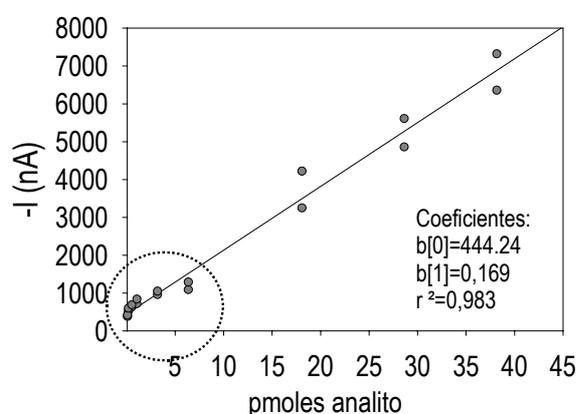


Figura 10.10. Variación de las cantidades de analito (determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos) en la solución de hibridación en un formato de captura en un paso utilizando genosensores basados en un composite grafito-epoxi. Sonda de captura inmovilizada: 29.4 pmoles. Sonda biotinilada en 5': 66.68 pmoles. HRP-estreptavidina: 9.00 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 modificados según § 10.2.5.7.

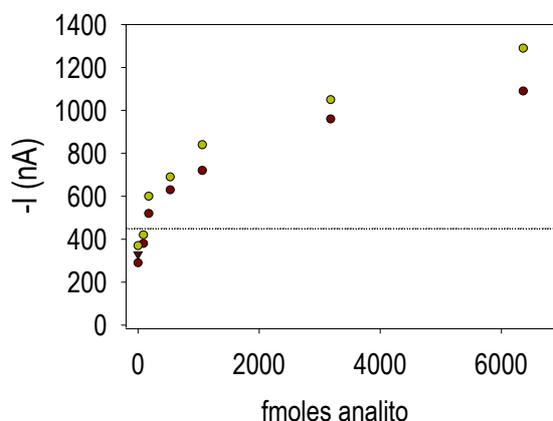


Figura 10.11. Variación de las cantidades de analito (determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos) en la solución de hibridación en un formato de captura en un paso utilizando genosensores basados en un composite grafito-epoxi. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 10.10.

Como puede observarse en la Figura 10.11, esta zona de concentraciones bajas no presenta un comportamiento lineal. La línea que se observa en la figura representa el nivel de los límites de detección, calculados teniendo en cuenta el criterio de la IUPAC, de 3 veces la desviación estándar de los replicados (triplicados) de los blancos.

El límite de detección se calcula, entonces, como:

$$LD \text{ (señal amperométrica)} = \bar{x} I_{\text{máx}} \text{ blancos} + 3 s$$

Para estas condiciones experimentales, y realizando una interpolación lineal dentro de este intervalo de concentraciones, el límite de detección es de 116 fmoles.

La Figura 10.12 muestra únicamente los puntos correspondientes al blanco (donde la cantidad de analito es de 0 fmoles), y los dos primeros puntos del calibrado, correspondientes a 88.3 y 176.7 fmoles de analito.

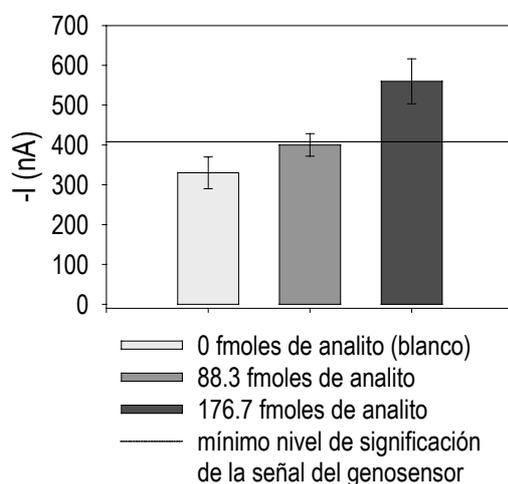


Figura 10.12. Variación de las cantidades de analito (determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos) en la solución de hibridación en un formato de captura en un paso utilizando genosensores basados en un composite grafito-epoxi. La figura muestra únicamente los puntos correspondientes al blanco (donde la cantidad de analito es de 0 fmoles), y los dos primeros puntos del calibrado. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 10.10.

En la figura cada barra muestra el valor medio de los replicados de cada experimento y el error de las barras representa la desviación estándar de los replicados de cada experimento (ec. 1, § 4B.1.1). En la Figura también se muestra el nivel a partir del cual la señal de los genosensores son significativamente superiores a la señal de los blancos, para estas mismas condiciones experimentales (ec. 7, § 4B.1.4.4).

Realizando una interpolación lineal dentro de este intervalo de concentraciones, este mínimo nivel de significación estadístico a partir del cual la señal de los genosensores es significativamente superior al de los blancos se corresponde a una concentración de analito de 93 fmoles, para estas condiciones experimentales. Teniendo en consideración el criterio más exigente, consideraremos un límite de detección (LD) para este sistema de 116 fmoles.

10.3.4 COMPARACIÓN DEL FORMATO DE RECONOCIMIENTO SIMPLE (EN EL CUAL SE INMOVILIZA EL ANALITO EN EL TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI) Y DEL FORMATO DE CAPTURA EN UN PASO (ANALITO EN SOLUCIÓN)

En la Figura 10.13 se muestran los resultados comparativos del formato de captura en un paso (§ 10.3.2) y de un formato en el cual la misma cantidad de analito (determinante de resistencia) ha sido inmovilizado directamente en el transductor grafito-epoxi y se evidencia mediante un esquema de reconocimiento simple con la sonda biotinilada en 5'. El protocolo de preparación de estos últimos sensores se describe en § 9A.2.3, pero utilizando los reactivos de este capítulo.

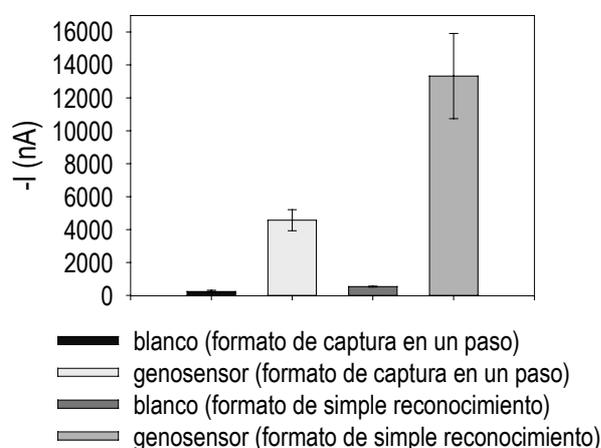


Figura 10.13. Comparación de los resultados obtenidos en la evaluación del formato de captura en un paso y en la evaluación de un formato de reconocimiento simple (preparados según el protocolo descrito en § 9A.2.3, pero utilizando los reactivos de este capítulo), mediante genosensores basados en composites grafito-epoxi. Formato de captura en un paso: sonda de captura inmovilizada: 64.2 pmoles; DNA analito (determinante de resistencia) en la solución de hibridación: 38.2 pmoles; Sonda biotinilada en 5' en la solución de hibridación: 66.7 pmoles; HRP-estreptavidina: 9.00 µg. Formato de reconocimiento simple: DNA analito (determinante de resistencia) inmovilizada: 38.2 pmoles; Sonda biotinilada en 5' en la solución de hibridación: 66.7 pmoles; HRP-estreptavidina: 9.00 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).

Como puede observarse, la señal de hibridación obtenida en la determinación de la misma cantidad de analito mediante un formato de reconocimiento simple (en el cual el analito está inmovilizado en el transductor) es mayor que mediante un formato de captura (en el cual el analito se encuentra en solución).

Estos resultados pueden entenderse si se observa la diferencia existente entre los mecanismos de hibridación implicados para cada formato, que se describen esquemáticamente en la Figura 10.14. Como puede observarse en la figura, en el formato de captura el analito –que se encuentra en solución– primero se hibrida con la sonda biotinilada en solución, y posteriormente este dúplex se hibrida con la sonda de captura inmovilizada en el composite grafito-epoxi. En este formato hay involucrados dos reconocimientos, y la hibridación que se realiza en fase sólida –que, como ya se ha visto, es la más lenta desde el punto cinético– implica el reconocimiento de un dúplex por el

oligonucleótido inmovilizado en superficie. Por el contrario, en el formato de reconocimiento simple existe una única hibridación que ocurre en fase sólida, pero la misma involucra el reconocimiento de un oligonucleótido por otro. Este reconocimiento es más sencillo desde el punto de vista estérico que el de un dúplex por un oligonucleótido, tal como ocurre en el formato de captura. De ahí que el rendimiento en el formato de captura sea menor que el involucrado en un formato de reconocimiento simple.

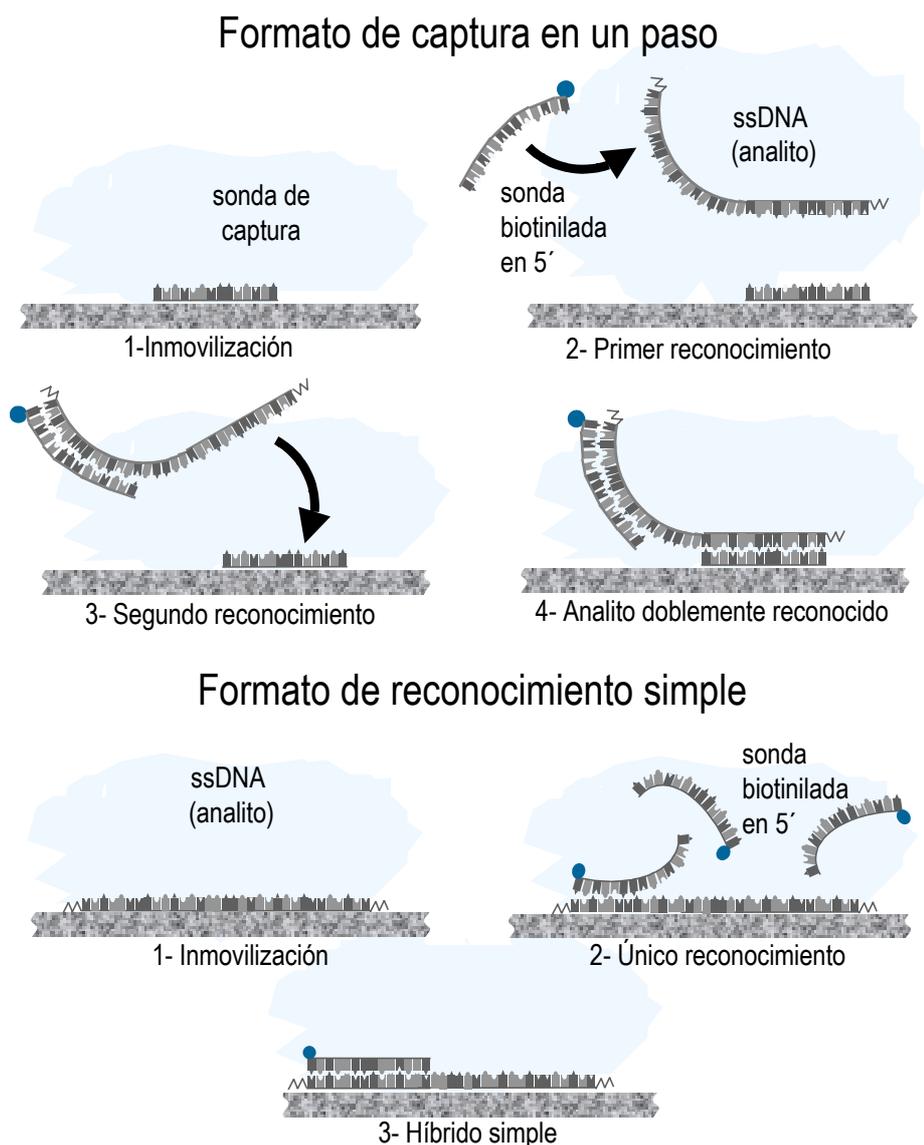


Figura 10.14. Esquema comparativo de un formato de captura en un paso y de un formato de reconocimiento simple.

En primer lugar, es necesario puntualizar que la sensibilidad del formato de captura es excelente, pese a ser menor que la del formato de reconocimiento simple.

A pesar de que la sensibilidad del formato de reconocimiento simple es mayor que la del formato de captura, este último presenta numerosas ventajas que lo hacen preferible frente al primero.

La principal ventaja es el hecho de que el analito se encuentra en solución. Este hecho es fundamental a la hora de construir un sensor. Desde el punto de vista metodológico, los sensores se pueden tener previamente modificados con la sonda de captura, y no se requiere preparar un sensor distinto por cada muestra a analizar, hecho que dificulta la automatización del proceso de preparación del sensor y su futura implementación comercial como *kit*.

En segundo lugar, el formato de captura en un paso comparte con el formato de reconocimiento simple otra característica importante, que es la sencillez del procedimiento. Sin embargo, el hecho de poder tener los genosensores pre-preparados hace que el procedimiento de análisis para el caso del formato de captura en un paso requiera un tiempo menor que para el caso del formato de reconocimiento simple.

En tercer lugar, en el formato de captura existe un doble reconocimiento: con la sonda de captura y con la sonda funcionalizada con biotina. Así, se consigue aumentar el número de bases reconocidas en el analito –con lo que se incrementa la especificidad del dispositivo genosensor–.

Por último, otra característica importante del formato de captura es la posibilidad de cuantificar DNA. Como ya se ha visto, no se puede cuantificar el analito si el mismo se inmoviliza en el transductor, ya que no existe una respuesta lineal con el aumento de la cantidad de analito (§ 9.3.4). El hecho de poder además dar una respuesta de tipo cuantitativa abre la posibilidad de cuantificar transcritos (RNAm). La cuantificación de RNA se utiliza para evaluar la expresión de un gen.

10.3.5 COMPARACIÓN DEL FORMATO DE RECONOCIMIENTO DOBLE MEDIANTE UN GENOSENSOR DE MEMBRANAS RECAMIABLES Y DEL FORMATO DE CAPTURA EN UN PASO MEDIANTE UN GENOSENSOR BASADO EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI

En la Figura 10.15 se muestran comparativamente los resultados obtenidos para la detección de un nuevo determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos mediante un formato de captura en un paso (§ 10.3.2), y mediante un genosensor de membranas recambiables en formato dot-blot de reconocimiento doble (§ 5.3.2). Las condiciones experimentales (cantidades de reactivos utilizadas) no son las mismas para ambos experimentos, pero cabe destacar que la comparación se basa teniendo en cuenta el criterio de que en ambos casos se trabajó con las condiciones experimentales óptimas para cada formato.

El formato de captura comparte una característica con el formato dot-blot de reconocimiento doble (capítulo 5): la doble hibridación, tal como se muestra en la Figura 10.3. En el caso del formato de captura, el primer reconocimiento ocurre con la sonda de captura inmovilizada sobre el transductor grafito-epoxi y el segundo reconocimiento con la sonda funcionalizada con biotina en la solución de hibridación. Así, se consigue aumentar el número de bases reconocidas en el analito –con lo que se incrementa la especificidad de la reacción– al igual que en el formato de reconocimiento doble. Sin embargo, en el formato de captura la marcación es simple, con lo cual se pierde la ventaja de la doble marcación conseguida por el formato de reconocimiento doble, como puede observarse en la Figura 10.3.

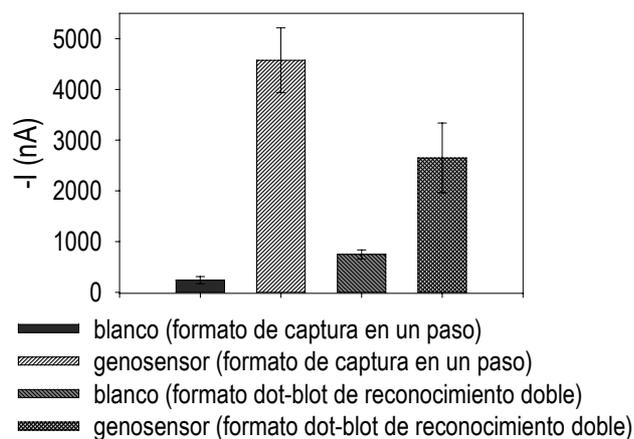


Figura 10.15. Comparación de los resultados obtenidos en la evaluación del formato de captura en un paso basados en composites grafito-epoxi y en la evaluación de un formato dot-blot de reconocimiento doble (preparados según el protocolo descrito en § 5.2.6.4), mediante genosensores de membranas recambiables. Formato de captura en un paso: sonda de captura inmovilizada: 64.2 pmoles; DNA analito (determinante de resistencia) en la solución de hibridación: 38.2 pmoles; Sonda biotinilada en 5' en la solución de hibridación: 66.7 pmoles; HRP-estreptavidina: 9.00 μ g. Formato dot-blot de reconocimiento doble: DNA analito (determinante de resistencia) inmovilizado en la membrana: 100.1 pmoles; Sonda biotinilada en 5' y en 3' en la solución de hibridación: 36.2 y 36.3 pmoles, respectivamente; 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).

Pese a que en el formato de captura la marcación es simple, la señal de hibridación es notablemente superior a la del formato dot-blot de reconocimiento doble (Figura 10.16).

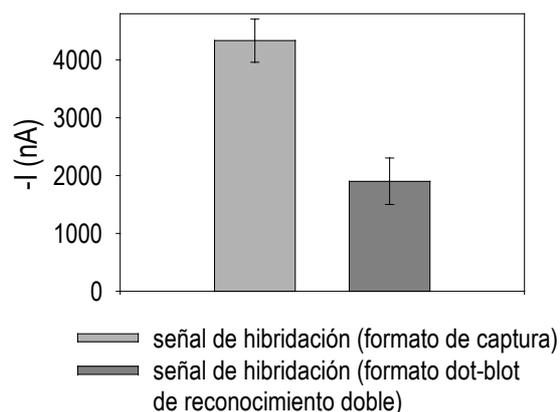


Figura 10.16. Comparación de las señales de hibridación de los genosensores en formato de captura y de los genosensores en formato dot-blot de reconocimiento doble. Las condiciones experimentales son las que se explicitan para la Figura 10.15.

Dicho de otra manera, la ganancia de señal amperométrica debida a la doble marcación en el formato dot-blot de reconocimiento doble no alcanza a compensar la pérdida de señal debida a la utilización de la membrana de nylon que, como ya se explicara, actúa de barrera difusional

disminuyendo la sensibilidad de los ensayos cuando éstos se realizan utilizando genosensores de membranas recambiables.

Además, cabe destacar que el tiempo del procedimiento total de preparación y modificación de los genosensores de membranas recambiables en formato dot-blot de reconocimiento doble es de 24 horas, mientras que en el formato de captura en un paso es de 110 minutos.

En la Figura 10.16 se muestra sólo la señal de hibridación de los genosensores en formato de captura, y de los genosensores en formato dot-blot de reconocimiento doble, obtenida de la siguiente manera:

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

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 experimento) (ec. 11, § 4B.2.1).

La Tabla 10.7 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación entre las señales de hibridación del formato de captura y del formato dot-blot de reconocimiento doble. En todos los casos se supuso varianzas comparables. La diferencia de los valores medios (prueba t) es significativamente diferente con un 95 % de confianza.

Tabla 10.7: Pruebas estadísticas para la comparación de los valores medios (prueba t) de las señales de hibridación de los formatos de captura y de reconocimiento doble, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	Señal de hibridación formato de captura	Señal de hibridación formato de doble reconocimiento
$S_{\bar{x}}$ (ec. 11, § 4B.2.1).	$S_{\bar{x}} = 371.8$	$S_{\bar{x}} = 400.3$
S_p (ec. 12, § 4B.2.2.1)	$S_p = 504.4$	
Grados libertad (ec. 16, § 4B.2.2.3)	7	
Prueba t (bilateral) (ec. 14, § 4B.2.2.2)	$t_{\text{calc}} (3.93) > t_t (2.36)$	

Cabe destacar que la reproducibilidad del formato de reconocimiento doble es menor que la obtenida en el formato de captura (desviaciones estándar relativas (ec. 2, § 4B.1.2) de 26 y de 14 %, respectivamente).

En la Figura 10.17 se muestran los valores comparativos de la adsorción inespecífica de los genosensores en formato de captura y de reconocimiento doble.

La Tabla 10.8 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación de los sensores blancos en formato de captura y en formato dot-blot de reconocimiento doble. La diferencia de los valores medios (prueba t) entre ambas determinaciones es significativamente diferente, con un 95 % de confianza. Estos resultados permiten confirmar las conclusiones que se obtuvieron en § 9.3.1, es decir, que la adsorción inespecífica es significativamente superior cuando se utilizan sensores de membranas recambiables respecto a sensores basados en un composite grafito-epoxi.

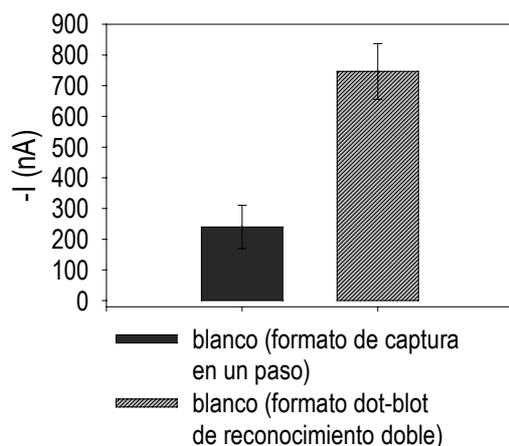


Figura 10.17. Comparación de las señales de los blancos en formato de captura y en formato dot-blot de reconocimiento doble. Las condiciones experimentales son las que se explicitan para la Figura 10.15.

La disminución de la señal amperométrica debida a la adsorción inespecífica colabora a incrementar aún más la relación S/R para el caso de los genosensores en formato de captura basados en un composite grafito-epoxi (S/R = 19), respecto a los genosensores en formato dot-blot de reconocimiento doble (S/R = 3.5)

Tabla 10.8. Pruebas estadísticas para la comparación de las varianzas (prueba F) y de los valores medios (prueba t) de las señales de los blancos en los formatos de captura y de reconocimiento doble, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	blanco formato de captura (n=2)	blanco formato dot-blot de doble reconocimiento (n=3)
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_1 = 70.7$	$s_2 = 90.7$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (1.6) < F_{2,1} (799.50)$	
S_p (ec. 4A, § 4B.1.4.1)	$S_p = 84.6$	
grados libertad (ec. 6A, § 4B.1.4.3)	3	
Prueba t (bilateral) (ec. 5A, § 4B.1.4.2)	$t_{\text{calc}} (6.56) > t_3 (3.18)$	

10.4 CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un nuevo dispositivo genosensor en un formato de captura basado en un composite grafito-epoxi para la detección a nivel genético de resistencia a antibióticos β -

lactámicos en *S. aureus* que –si se combina con PCR– requiere un tiempo de análisis considerablemente menor (6 a 8 hr) respecto a los métodos de análisis microbiológicos clásicos (3 a 5 días) y respecto a los genosensores de membranas recambiables (28 a 30 hr) (capítulo 5).

2. Desde el punto de vista metodológico, el formato de captura es el mejor respecto a ensayos hasta el momento, ya que reúne las ventajas de los anteriores formatos. Es el procedimiento más sencillo. El analito, que no necesita estar funcionalizado, se encuentra en solución y el reconocimiento del mismo es doble. Además, se ha conseguido implementar el formato de captura con éxito en genosensores basados en composite grafito-epoxi (en lugar de sobre las membranas de nylon), con las ventajas en sensibilidad que esto supone, y que ya se discutieron en el capítulo 9. El formato de captura es el más idóneo para ser implementado en forma de kit, ya que permite tener pre-preparados los dispositivos genosensores (procedimiento que requiere 50 minutos) con la sonda de captura previamente inmovilizada y mediante procedimientos planares de fabricación masiva (screen printing), lo que aumentaría sus perspectivas comerciales.

3. Tanto el formato de captura secuencial como el formato de captura en un paso son válidos para la detección del nuevo determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *S. aureus*. Sin embargo, el formato de captura en un paso es el más sencillo desde el punto de vista metodológico. Su tiempo de realización es menor (110 frente a 160 minutos) y, además, su sensibilidad es significativamente superior respecto al formato de captura secuencial. Este último hecho se explica teniendo en cuenta que en el formato de captura en un paso existe una hibridación en solución (más favorable cinéticamente) y la otra en fase heterogénea, mientras que en el formato de captura secuencial ambas hibridaciones se realizan en fase heterogénea.

4. Pese a que el formato de captura secuencial y en un paso son diferentes, las señales amperométricas debidas a la adsorción inespecífica –para ambos formatos– son comparables en magnitud desde el punto de vista estadístico, hecho que confirma nuevamente que el paso que determina la adsorción inespecífica es el de marcación enzimática, que se realiza de igual manera para ambos formatos. Se confirma el hecho de que la señal inespecífica depende fundamentalmente de la adsorción del conjugado enzimático, y no de la adsorción de la sonda funcionalizada con biotina.

5. Es necesario optimizar la cantidad de conjugado enzimático a adicionar en el paso de marcación enzimática cada vez que se cambie de producto comercial o de lote, de manera de colocar la cantidad de conjugado que de la mayor relación S/R. Sin embargo, la reproducibilidad en los blancos y en los genosensores no se ven alterados por el cambio de producto comercial.

6. La adsorción inespecífica es controlada y reproducible. Puede evitarse el hecho de preparar ensayos blanco para evaluarlas, ya que su magnitud es conocida siempre y cuando no se cambie de producto comercial de conjugado enzimático, o de lote.

7. Mediante el formato de captura en un paso se puede cuantificar el analito. Para estas condiciones experimentales, la recta (que se ajusta con un r^2 de 0.98) que determina el ensayo es:

Señal amperométrica (genosensores) = $444.24 + 0.169 [\text{analito}]$

El límite de detección es de 116 fmoles de analito en solución.

8. El formato de reconocimiento simple (en el cual el analito se encuentra inmovilizado en el transductor grafito-epoxi y es reconocido por la sonda biotinilada) da señales de hibridación significativamente superiores al formato de captura en un paso. Sin embargo, las ventajas metodológicas del formato de captura –tales como posibilidad de tener pre-preparados los genosensores, el doble reconocimiento del analito que se encuentra en solución y la capacidad de cuantificarlo– lo hacen preferible frente al primero, de cara a la posible implementación comercial de la metodología desarrollada en forma de *kit* genosensor.

9. Pese a que en el formato de captura la marcación es simple, la señal de hibridación es notablemente superior a la del formato dot-blot de reconocimiento doble. La ganancia de señal amperométrica debida a la doble marcación en el formato dot-blot de reconocimiento doble no alcanza a compensar la pérdida de señal debida al efecto de barrera difusional que implica la utilización de membranas recambiables –que actúan disminuyendo la sensibilidad de los ensayos–.

10. Además, cabe destacar que el tiempo del procedimiento total de preparación de los genosensores de membranas recambiables en formato dot-blot de reconocimiento doble es de 24 horas, mientras que en el formato de captura en un paso se requieren 110 minutos (más 50 minutos adicionales de preparación del genosensor, aunque los mismos se pueden tener pre-preparados). La disminución de la señal amperométrica debida a la adsorción inespecífica colabora a incrementar aún más la relación S/R para el caso de los genosensores en formato de captura basados en un composite grafito-epoxi (S/R = 19), respecto a los genosensores en formato dot-blot de reconocimiento doble (S/R = 3.5).

11. El formato de captura en un paso posee una reproducibilidad similar al formato de reconocimiento simple, con desviaciones estándar relativas del orden del 15 %.

10.5 PERSPECTIVAS FUTURAS

El formato de captura desarrollado abre la posibilidad de nuevas estrategias de preparación de sensores de cara a su producción comercial.

El formato de captura es el más idóneo para ser implementado en forma de *kit*, ya que permite tener pre-preparados los dispositivos genosensores con la sonda de captura previamente inmovilizada y mediante procedimientos planares de fabricación masiva (screen printing).

Otra posibilidad es la construcción de transductores de superficies renovables: biocomposites conductores modificados con estreptavidina. En este caso la versatilidad desde el punto de vista comercial de los sensores se incrementaría aún más, ya que el *kit* estaría compuesto por los biosensores de estreptavidina, que serían los mismos para cualquier secuencia analítica que se desee investigar. El *kit* incluiría también una sonda de captura (en este caso biotinilada), y una sonda de reconocimiento funcionalizada con digoxigenina, para el reconocimiento con un anticuerpo antiDIG-HRP. La hibridación del analito con las dos sondas de captura se realizaría en solución, y posteriormente la entidad formada sería capturada por el biosensor mediante la reacción de la biotina

de la sonda de captura con la estreptavidina del biosensor. Una vez utilizado, el genosensor puede pulirse y así se puede obtener una nueva superficie fresca para una nueva determinación.

Con este objeto, en el próximo capítulo se evaluará la posibilidad de una nueva marcación enzimática basada en el anticuerpo antiDIG-HRP sobre genosensores basados en composites grafito-epoxi.

10.6 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ M. Arthur, P. Courvalin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993, 37, 1563-1571.
- ² N. Woodford, A. P. Johnson, D. Morrison, D. C. E. Speller. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995, 8, 585-615.
- ³ K. Hiramatsu, H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri, F. C. Tenover. *J. Antimicrob. Chemother.* 1997, 40, 135-136.
- ⁴ Centers for Disease Control and Prevention. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 1997, 46, 765-766.
- ⁵ F. Guo, J. Huynh, G. I. Dmitrienko, T. Viswanatha, A. J. Clarke. *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1431, 132-147.
- ⁶ C. G. Dowson, T. J. Coffey, B. G. Spratt. *Trends Microbiol.* 1994, 2, 361-366.
- ⁷ F. C. Tenover, M. V. Lancaster, B. C. Hill, C. D. Steward, S. A. Stocker, G. A. Hancock, C. M. O'Hara, N. C. Clarc, K. Hiramatsu. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 1020-1027.
- ⁸ W. C. Noble, Z. Virani, R. Cree. *FEMS Microbiol. Lett.* 1992, 93, 195-198.
- ⁹ S. P. Yazdankhah, L. Solverod, S. Simonsen, E. Olsen. *Vet. Microbiol.* 1999, 67, 113-125.
- ¹⁰ O. Raimundo, M. Deighton, J. Capstick, N. Gerraty. *Vet. Microbiol.* 1999, 66, 275-284.
- ¹¹ C. Large, M. Cardoso, D. Senczek, S. Schwarz. *Vet. Microbiol.* 1999, 67, 127-141.
- ¹² G. G. Fthenakis. *Small Ruminant Res.* 1998, 28, 9-13.
- ¹³ D. Ivnitski, I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, E. Wilkins. *Biosens. Bioelectron.* 1999, 14, 599-624.
- ¹⁴ G. H. McGall, in *Biochip Arrays and integrated devices for clinical diagnosis*, ed. W. Hori and E. Nagle; IBC Library Series, Southborough: 1997, pp. 2.1-2.33.
- ¹⁵ M. Tietjen, D. Y. C. Fung. *Crit. Rev. Microb.* 1995, 21, 53-83.
- ¹⁶ A. Miele, M. Bandera, B. P. Goldstein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39, 1772-1778.
- ¹⁷ S. S. Ghost, G. F. Musso. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 5353-5372.
- ¹⁸ J. N. Kremsky, J. L. Dougherty, R. E. Meyers, M. Collins, E. L. Brown. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 2891-2909.
- ¹⁹ V. Lund, R. Schmid, D. Rickwood, E. Hornes. *Nucleic Acids Res.* 1988, 22, 10861-10880.
- ²⁰ J. Van Ness, S. Kalbfleisch, C. R. Petrie, M. W. Reed, J. C. Tabone, N. M. J. Vermeulen. *Nucleic Acids Res.* 1991, 19, 3345-3350.
- ²¹ S. F. Wolf, L. Haines, J. Fisch, J. N. Kremsky, J. P. Dougherty, K. Jacobs. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 2911-2926.
- ²² A. C. Syvanen, M. Laaksonen, H. Soderlund. *Nucleic Acids Res.* 1986, 14, 5037-5048.
- ²³ H. de Beenhouwer, Z. Liang, P. de Rijk, C. van Eekeren, F. Portaels. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 2994-2998.
- ²⁴ C. M. Elie, T. J. Lott, E. Reiss, C. J. Morrison. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 3260-3265.
- ²⁵ K. Povlsen, J. S. Jensen, I. Lind. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 3211-3216.
- ²⁶ T. Cherian, M. K. Latitha, A. Manoharan, K. Thomas, R. H. Yolken, M. C. Steinhoff. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 3605-3608.
- ²⁷ E. Luneberg, J. S. Jensen, M. Frosch. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 31, 1088-1094.
- ²⁸ C. A. Jantos, R. Roggendorf, F. N. Wuppermann, J. H. Hegemann. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 1890-1894.
- ²⁹ A. Lishanski, N. Kurn, E. F. Ullman. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, e42.
- ³⁰ P. M. Orwin, P. M. Schlievert. *Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 1998, 97, 532.
- ³¹ K. C. Reed, D. A. Mann. *Nucleic Acids Res.* 1985, 13, 7207-7221.
- ³² R. K. Saiki, P. S. Walsh, C. H. Levenson, H. A. Erlich. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 6230-6234.
- ³³ G. M. Church, W. Gilbert. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 1991-1995.
- ³⁴ J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2th ed.*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989.
- ³⁵ L. J. Kricka. *Nonisotopic DNA Probe Techniques*; Academic Press, Inc.: San Diego, 1992.

-
- ³⁶ J. Meinkoth, G. Wahl. *Anal. Biochem.* 1984, 138, 267-284.
- ³⁷ T. R. Gingeras, D. Y. Kwoh, G. R. Davis. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 5373-5390.
- ³⁸ M. Renz, C. Kurz. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 3435-3444.
- ³⁹ L. Singh, K. W. Jones. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 5627-2638.
- ⁴⁰ L. T. Kirby. *DNA Fingerprinting*, Stockton Press: New York, 1990.

DETECCIÓN DE DNA INMOVILIZADO SOBRE UNA SUPERFICIE GRAFITO-POLÍMERO MEDIANTE UN NUEVO SISTEMA DE MARCACIÓN ENZIMÁTICA PARA LA DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA BASADA EN UNA REACCIÓN INMUNOLÓGICA

11.1 INTRODUCCIÓN

En § 7.1 se ha comentado que el inmunoensayo se ha convertido en una de las técnicas más habituales en química clínica, utilizada sobre todo con propósito de diagnóstico ^{1,2}. Se ha explicado que los anticuerpos pueden conjugarse con una marca y que, en función de la naturaleza de la misma se puede utilizar una técnica de detección instrumental adecuada para el seguimiento de la interacción inmunológica. En un inmunoensayo clásico, el analito es uno de los componentes del par antígeno-anticuerpo. Sin embargo, en el trabajo desarrollado en el capítulo 7 se utilizó el inmunoensayo como una herramienta de marcación para la determinación de un analito de naturaleza diferente: el DNA. El objetivo final fue conseguir la marcación enzimática (con peroxidasa de rábano picante, HRP), pero en este caso a través de una reacción inmunológica, a diferencia del trabajo presentado en los demás capítulos, en los cuales la marcación enzimática se consiguió mediante la reacción biotina-estreptavidina.

En el genosensor de membranas recambiables en formato dot-blot de reconocimiento múltiple que se presentó en el trabajo desarrollado en el capítulo 7, se demostró la utilidad del uso de una sonda de DNA complementaria al analito funcionalizada con un antígeno: la digoxigenina (DIG). Dicha molécula fue evidenciada a través de una reacción antígeno-anticuerpo, utilizando un anticuerpo específico antidigoxigenina conjugado con la enzima HRP (antiDIG-HRP).

Una de las causas que llevó a desarrollar una metodología de marcación alternativa al sistema biotina-estreptavidina fue el hecho de que la biotina 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. Sin embargo, en el apéndice B del capítulo 9 se ha visto que la biotina no constituye un interferente cuando se utiliza como metodología de análisis un genosensor basado en un composite grafito-epoxi.

Tal como se ha comentado en § 7.1, este sistema de marcación, hasta ahora no utilizado con detección electroquímica, presenta las siguientes características que lo hacen atractivo desde el punto de vista analítico:

- sensibilidad –con detección quimioluminiscente– comparable a la del radioinmunoensayo;
- estabilidad de las sondas funcionalizadas con digoxigenina de más de un año;
- versatilidad en las estrategias de funcionalización de los oligonucleótidos con digoxigenina;
- posibilidad de hibridación de las sondas funcionalizadas mediante distintas metodologías y utilizando protocolos clásicos ³⁻⁹.

Además de por todas las ventajas enumeradas, el hecho de plantear una nueva alternativa de marcación para el análisis de secuencias de DNA responde a la versatilidad que puede dar a un formato de análisis genético el uso de la doble marcación biotina-digoxigenina: con biotina para la inmovilización, y con digoxigenina para la marcación basada en una reacción inmunológica. Este diseño se ha utilizado ya en distintos formatos clásicos y con diferentes objetivos analíticos ¹⁰⁻¹⁶.

En el presente capítulo se evaluará la posibilidad de la marcación enzimática basada en el uso del anticuerpo antiDIG-HRP sobre genosensores basados en composites grafito-epoxi. Se evaluará la utilidad de este tipo de marcación y sus ventajas –o desventajas– respecto a la marcación basada en el sistema biotina-estreptavidina.

Para tal fin, se escogió un esquema que se basa en un reconocimiento múltiple, y que hace uso de poli(dA) como analito y, como sonda funcionalizada, dT(20)-DIG. Este esquema de reconocimiento múltiple ya ha sido probado con éxito sobre composites grafito-epoxi en el trabajo presentado en el capítulo 9 y en los apéndices del capítulo 9, pero con el sistema de marcación basado en la reacción biotina-estreptavidina. Por otro lado, el sistema de marcación basado en una reacción inmunológica ha funcionado correctamente en los genosensores de membranas recambiables (capítulo 7).

Como ya se ha visto, pese a que el sistema de marcación inmunológico funcionó correctamente en los genosensores de membranas recambiables (capítulo 7), la adsorción inespecífica del anticuerpo antiDIG-HRP ha sido mayor que la del conjugado estreptavidina-HRP sobre las membranas de nylon. Este hecho se ha demostrado mediante la comparación de la relación S/R para el mismo formato dot-blot de reconocimiento múltiple en genosensores de membranas recambiables, que ha demostrado ser sensiblemente menor para el sistema de marcación inmunológico respecto al sistema de marcación basado en una reacción biotina-estreptavidina (1.9 vs 2.5 respectivamente). Como se utilizaron las mismas cantidades de DNA, es lógico pensar que en el sistema de marcación inmunológica la relación S/R disminuye respecto al sistema de marcación basado en el sistema biotina-estreptavidina debido a una mayor adsorción inespecífica sobre la membrana de nylon del primero.

De ahí la importancia de la evaluación de la viabilidad de este nuevo sistema de marcación sobre un transductor grafito-epoxi, sobre todo teniendo en cuenta que la adsorción inespecífica del

anticuerpo marcado ha mostrado ser diferente a la del conjugado HRP-estreptavidina, al menos sobre las membranas de nylon.

En la Figura 11.1 se muestra esquemáticamente los pasos del formato que se utilizará en el trabajo descrito en el presente capítulo. Como puede observarse, la principal diferencia con el esquema utilizado en el trabajo desarrollado en el capítulo 9 y en los apéndices del capítulo 9 radica en la reacción utilizada para lograr la marcación enzimática. Hasta el momento, la marcación se basaba en la reacción biotina-estreptavidina y, 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.

En el trabajo presentado en este capítulo se pretende aumentar la versatilidad del proceso de marcación enzimática sobre el transductor grafito-epoxi, de manera de poder incrementar las posibilidades de análisis y, en un futuro, implementar este sistema de marcación en la construcción de dispositivos genosensores basados en biocomposites de avidina.

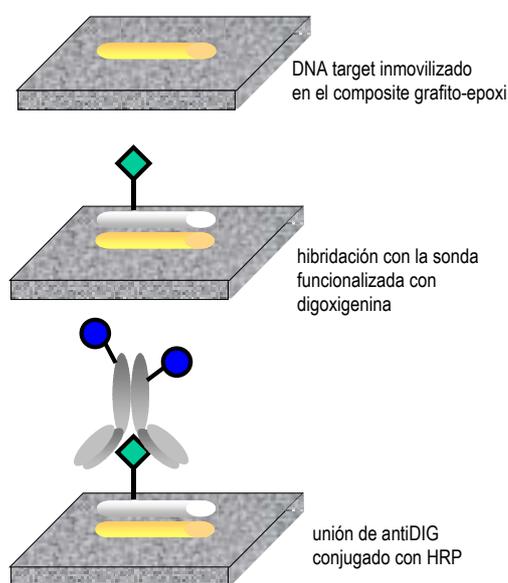


Figura 11.1. Esquema en el que se muestran los pasos de un formato basado en una marcación inmunológica, en este caso sobre un composite grafito-epoxi

11.2 EXPERIMENTAL

11.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS

11.2.1.1 Equipamiento

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

3.- Marcación enzimática de los híbridos formados en el transductor grafito-epoxi, con el anticuerpo antiDIG-HRP.

Una vez preparados, los genosensores fueron evaluados amperométricamente.

El tratamiento de prehibridación no se ha incluido en la preparación de los genosensores ya que se ha visto que su implementación no aporta ventajas sustanciales en cuanto a la disminución de la adsorción inespecífica sobre un composite grafito-epoxi (§ 9.3.2).

En las secciones siguientes se trata cada uno de estos pasos.

11.2.2.1 Inmovilización de poli(dA) en un composite grafito-epoxi

En § 4.2.3.1, se describen las distintas metodologías de inmovilización sobre una membrana de nylon ¹⁷⁻²¹. En el presente capítulo, al igual que en los capítulos 9 y 10, se utiliza también la inmovilización por calor seco ^{17,21-23}, ya que se ha visto que este procedimiento es efectivo sobre el composite grafito-epoxi.

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

El protocolo de inmovilización de poli(dA) en el 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 μm . 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 la Figura 9.2 (A).
- 3.- Se agregan 20 μl (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 °C durante un tiempo de 45 minutos (§ 9.3.7).

11.2.2.2 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 funcionalizada con digoxigenina con el poli(dA) inmovilizado en el composite 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 ^{17,19,21-26}, uso de formamida ^{19,21,22,24,26} y SDS ^{17,21-27}, fuerza iónica ^{19,22}, uso de dextranos ^{22,23,25} o polietilenglicol ^{19,24,27}.
- temperatura y tiempo de hibridación ^{17,21,26}
- 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 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 con una sonda funcionalizada con digoxigenina fueron básicamente las mismas que cuando se utiliza una sonda biotinilada, ya que el procedimiento de hibridación en este caso no depende de la naturaleza de la funcionalización sino más bien de la composición de la sonda en cuanto a sus bases nitrogenadas. Dichas variables fueron:

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

La preparación de la sonda funcionalizada con digoxigenina se realizó como se describiera en § 7.2.2.3.

El protocolo de hibridación de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi en formato de reconocimiento múltiple utilizando una sonda con digoxigenina consistió en:

- 1.- Se adiciona un volumen (en µl) de solución de hibridación en tubos *ependorf* 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 funcionalizada en 5' con digoxigenina (dT(20)-DIG) 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 (§ 11.2.2.1).
- 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 de 45 minutos (§ 9.3.3).
- 5.- Se colocan 150 µl de solución de lavado (2 X SSC - 0.1 % SDS) en tubos *ependorf*, para los lavados posthibridación de los genosensores: 5 minutos, con agitación suave, a 42 °C.
- 6.- Se remojan los genosensores con movimientos circulares en 2 X SSC a 20 °C para eliminar el SDS.

11.2.2.3 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 antiDIG-HRP.

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.

En § 7.2.2.4 se discuten en detalle y se seleccionan las variables del procedimiento de marcación enzimática basada en una reacción inmunológica, tales como:

- tipo de solución de marcación enzimática
- temperatura y tiempo de marcación enzimática
- agitación durante la marcación enzimática
- volumen de marcación enzimática
- tipo de solución y lavados de postmarcación

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

Buffer TRIS pH 7.5 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 μ l

La preparación del conjugado antiDIG-HRP se realizó de manera idéntica que en § 7.2.2.4.

En principio, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en § 9.3.2, no se llevó a cabo ningún tratamiento de premarcación con solución bloqueante.

El protocolo de marcación enzimática basada en una reacción inmunológica de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi consistió en:

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">1.- Se adiciona 150 μl de solución de conjugado antiDIG-HRP en solución bloqueante en tubos <i>ependorf</i> 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 <i>ependorf</i> que contienen la solución anterior.3.- Se dejan los genosensores en agitación suave y a 42 °C, durante un tiempo de 30 minutos (tiempo optimizado para el conjugado HRP-estreptavidina, § 9.3.6).4.- Luego de la marcación enzimática, se procede a los lavados postmarcación enzimática de los genosensores, de la siguiente manera:<ol style="list-style-type: none">a.- Enjuague (con movimientos circulares) de los genosensores con solución de lavado, a 20 °Cb.- Conservación –hasta el momento de la evaluación– en tubos <i>ependorf</i> con 150 μl de solución de lavado, a 20 °C |
|--|

En este caso, se utilizó la misma solución de lavado que en § 7.2.2.4: el buffer TRIS. La importancia de los lavados de postmarcación enzimática se trata con detalle en § 7.2.2.4.

11.2.3 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, y las condiciones de su determinación, por tanto, iguales. La señal analítica amperométrica está relacionada con la cantidad de enzima (HRP) que se haya unida 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 $I_{m\acute{a}x}$.

11.2.4 PREPARACIÓN DE LOS GENOSENSORES BASADOS EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI CON UN NUEVO SISTEMA DE MARCACIÓN ENZIMÁTICA BASADA EN UNA REACCIÓN INMUNOLÓGICA

Para evaluar la señal debida a la hibridación múltiple, se realizó un lote de genosensores, que evaluaron el proceso de reconocimiento múltiple mediante la sonda funcionalizada con digoxigenina en 5'. Con el objeto de evaluar la adsorción inespecífica, se realizó en paralelo un lote de sensores blanco, –en los que se adicionaron los mismos reactivos que en los genosensores excepto el analito–. Por cada lote se procesaron 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 a la hibridación en formato de reconocimiento múltiple.

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

En la Figura 11.2 se muestra esquemáticamente cada uno de los pasos involucrados en la preparación de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi 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.

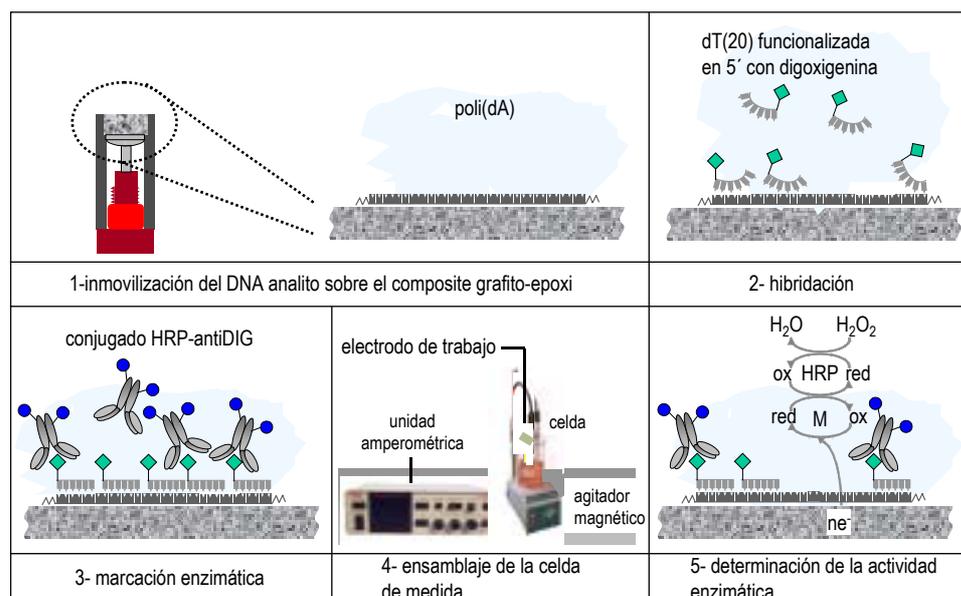


Figura 11.2. Representación esquemática del procedimiento experimental seguido en la preparación y evaluación de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi en formato de reconocimiento múltiple con un sistema de marcación basado en una reacción inmunológica.

11.2.4.1 Protocolo de preparación de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi en formato de reconocimiento múltiple con un nuevo sistema de marcación enzimática

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización de poli(dA), descrito en § 11.2.2.1.
- 2.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 11.2.2.2.
- 3.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática basada en una reacción inmunológica, descrito en § 11.2.2.3.

11.2.4.2 Protocolo de preparación de los sensores blanco

Este lote de sensores se realizó de manera idéntica al de los genosensores en formato de reconocimiento múltiple (§ 11.2.4.1), pero obviando el paso de adición de ssDNA, es decir, no hay analito –poli(dA)– inmovilizado en el transductor grafito-epoxi.

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

En § 7.2.5.2, se explicó de manera exhaustiva las posibilidades de adsorción inespecífica para este mismo formato, pero utilizando genosensores de membranas recambiables. En este caso, la principal diferencia es que la superficie del transductor es diferente (composite grafito-epoxi).

Aunque la funcionalización de la sonda es digoxigenina, ya se ha visto en capítulos anteriores (9 y 10) que la adsorción inespecífica de la sonda funcionalizada no es significativa sobre el composite grafito-epoxi. 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 9 y 10, por lo que es lógico pensar que la naturaleza y magnitud de la adsorción inespecífica podría ser distinta.

Las posibilidades de adsorción inespecífica en este caso son similares a las del formato descrito en el capítulo 9 y en los apéndices del capítulo 9. 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 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 el transductor 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 de poli(dA), descrito en § 11.2.2.1, con la única diferencia que no se adiciona ssDNA –poli(dA)–, es decir, no hay analito sobre el transductor grafito-epoxi (se obvia el paso 3 del protocolo).
- 2.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 11.2.2.2. En este caso, al no haber analito sobre el transductor grafito-epoxi, no va a haber hibridación, y sí sólo adsorción inespecífica de la sonda funcionalizada.
- 3.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática basada en una reacción inmunológica, descrito en § 11.2.2.3.

11.2.4.3 Evaluación de los genosensores

Una vez preparados los genosensores y los sensores blanco, la evaluación de los mismos se realizó basándose en la señal generada, finalmente, por la enzima peroxidasa conjugada al anticuerpo antiDIG, según se explicara en § 11.2.3.

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 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 11.2).

Así, estos híbridos en el formato de reconocimiento múltiple se forman entre el analito inmovilizado en el composite grafito-epoxi 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 antidigoxigenina conjugado con la enzima peroxidasa. 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 son las mismas.

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

La Tabla 11.1 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.

En este formato de reconocimiento múltiple con un nuevo sistema de marcación enzimática, se adaptaron las cantidades de reactivos que fueran optimizadas en el capítulo 9 y en el apéndice del capítulo 9, ya que el formato de hibridación y la naturaleza del material genético es básicamente el mismo.

La cantidad de poli(dA) inmovilizada en el composite grafito-epoxi fue la misma que se ha encontrado como óptimo en el apéndice A del capítulo 9 (nivel bajo), es decir, 837 fmoles, mientras que la cantidad de sonda funcionalizada [dT(20)-DIG] fue de 10.0 pmoles (nivel alto).

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

Tabla 11.1. *Diseño del experimento de evaluación de genosensores basados en un composite grafito-epoxi en formato 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=3	Lote 2 blanco n=3	Lote 2 genosensor n=3
protocolo de inmovilización poli(dA) -analito-	No se adiciona (-)	837 fmoles	No se adiciona (-)	837 fmoles
protocolo de hibridación dT(20)-DIG	10.0 pmoles	10.0 pmoles	10.0 pmoles	10.0 pmoles
protocolo de marcación enzimática antiDIG-HRP	2.5 µg	2.5 µg	11.8 µg	11.8 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 (-)	837 fmoles	No se adiciona (-)	837 fmoles
protocolo de hibridación dT(20)-DIG	10.0 pmoles	10.0 pmoles	10.0 pmoles	10.0 pmoles
protocolo de marcación enzimática antiDIG-HRP	49.8 µg	49.8 µg	124.5 µg	124.5 µg

Para tal fin, se realizaron –para cada cantidad de anticuerpo evaluada– dos lotes de sensores, como se explicara en § 11.2.4, denominados genosensores y sensores blanco.

En este apartado en particular se mantuvieron constante las cantidades de analito poli(dA) inmovilizado en el composite grafito-epoxi y de sonda funcionalizada con digoxigenina, mientras que se modificaron las cantidades de anticuerpo conjugado con HRP.

Cabe destacar que por cada lote se han evaluado triplicados de los sensores blanco y de los genosensores.

11.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

11.3.1 VARIACIÓN DE LAS CANTIDADES DE ANTIDIG-HRP EN LA SOLUCIÓN BLOQUEANTE DURANTE LA MARCACIÓN ENZIMÁTICA

En la Figura 11.3 se muestran los resultados del experimento realizado en § 11.2.4.4. Este experimento se basa en la optimización de la cantidad de antiDIG-HRP mediante un formato de reconocimiento múltiple en genosensores basados en un composite grafito-epoxi. Para tal fin, se modificaron las cantidades de antiDIG-HRP, manteniendo constante las cantidades de poli(dA) y de dT(20)-DIG.

En la Figura 11.3 cada barra muestra el valor medio de los triplicados de cada lote de sensores, y el error de las barras representa la desviación estándar de los triplicados de cada lote (ec. 1, § 4B.1.1).

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

Como puede observarse en todos los lotes con diferentes cantidades de anticuerpo marcado, la diferencia de señal amperométrica que existe entre los genosensores y los blancos (Tabla 11.2) permite afirmar que el procedimiento de marcación enzimática basada en una reacción inmunológica

funciona correctamente (aún en el punto de concentración de anticuerpo más bajo) sobre el composite grafito-epoxi y para todo el intervalo de concentraciones estudiado.

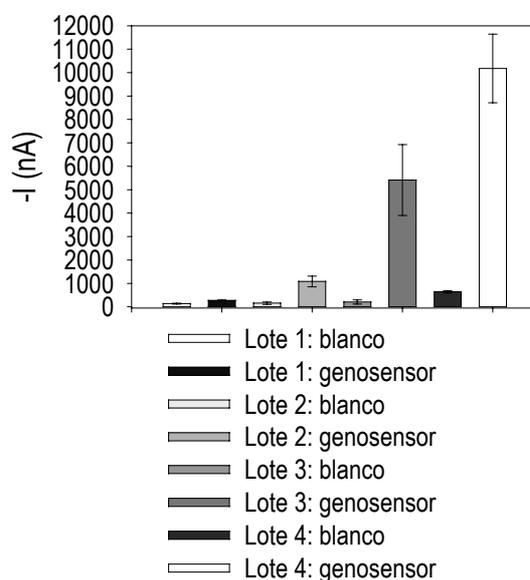


Figura 11.3. Resultados obtenidos en la evaluación de genosensores basados en un composite grafito-epoxi en formato de reconocimiento múltiple con un nuevo sistema de marcación basado en una reacción inmunológica mediante hibridación con una sonda de 20 mer funcionalizada en 5' con digoxigenina. DNA analito 260 mer (polidA) inmovilizado: 837 fmoles. Sonda funcionalizada con digoxigenina dT(20)-DIG: 10.0 pmoles. antiDIG-HRP: Lote 1 (2.5 μ g), Lote 2 (11.8 μ g), Lote 3 (49.8 μ g), Lote 4 (124.5 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/Ag/Cl). Electrodo de trabajo grafito-epoxi modificados según § 11.2.4.4.

Tabla 11.2. Pruebas estadísticas para la comparación de las varianzas y de los valores medios de los blancos y los genosensores para cada lote de sensores, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	Lote 1		Lote 2	
	s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_b=15.3$	$s_g=20.8$	$s_b=49.3$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (1.86) < F_{2,2} (39.00)$		$F_{\text{calc}} (21.5) < F_{2,2} (39.00)$	
Sp (ec. 4B, § 4B.1.4.1)	$Sp=18.3$		$Sp=165.6$	
grados libertad (ec. 6B, § 4B.1.4.3)	4		4	
Prueba t (unilateral) (ec. 5B, § 4B.1.4.2)	$t_{\text{calc}} (9.16) > t_4 (2.13)$		$t_{\text{calc}} (6.85) > t_4 (2.13)$	

ESTADÍSTICOS	Lote 3		Lote 4	
	s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_b = 86.2$	$s_g = 1512.3$	$s_b = 52.0$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (307.7) > F_{2,2} (39.00)$		$F_{\text{calc}} (794.6) > F_{2,2} (39.00)$	
grados libertad (ec. 9B, § 4B.1.5.2)	2		2	
Prueba t (unilateral) (ec. 8B, § 4B.1.5.1)	$t_{\text{calc}} (5.95) > t_2 (2.92)$		$t_{\text{calc}} (11.27) > t_2 (2.92)$	

11.3.2 COMPARACIÓN DE LOS GENOSENSORES BASADOS EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI Y DE LOS GENOSENSORES DE MEMBRANAS RECAMBIABLES CON UN NUEVO SISTEMA DE MARCACIÓN BASADA EN UNA REACCIÓN INMUNOLÓGICA

En la Figura 11.4 se muestra como se modifica la relación S/R con el aumento de la cantidad de anticuerpo conjugado con enzima, tanto para los genosensores de membranas recambiables (Figura 7.5) como para los genosensores basados en un composite grafito-epoxi. La relación S/R se calcula mediante el cociente entre el valor medio de la señal de los genosensores y el valor medio de la señal de los blancos. Una mayor relación S/R implica que existe una mayor proporción de reacción inmunológica con el híbrido funcionalizado respecto al fenómeno de adsorción inespecífica.

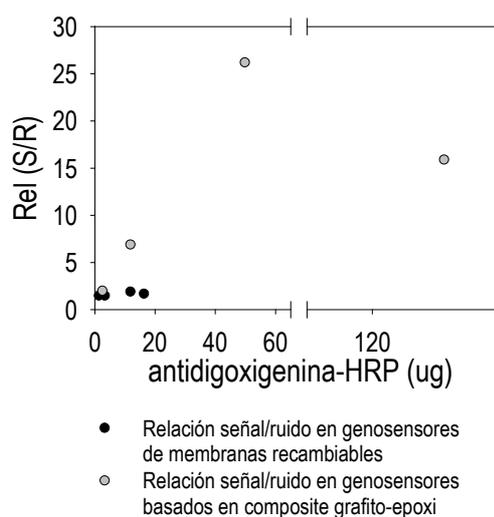


Figura 11.4. Relación entre el aumento de la concentración de antiDIG-HRP y el parámetro S/R, para genosensores de membranas recambiables (capítulo 7) y para genosensores basados en un composite grafito-epoxi. Las condiciones experimentales son las mismas que para la Figura 11.3.

Como ya se había discutido en § 7.3 y Figura 7.5, se puede observar que para los genosensores de membranas recambiables este parámetro aumenta hasta el nivel de antiDIG-HRP de 11.8 μg , mientras que por encima de este valor, la relación S/R disminuye. 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, como se muestra en la Figura 7.6. Sin embargo, para los genosensores basados en un composite grafito-epoxi, la relación S/R aumenta hasta un nivel mayor –de más de cuatro veces– de antiDIG-HRP (49.8 μg), mientras que por encima de este valor, la relación S/R disminuye. Además, según muestra la Figura 11.4, es evidente que los valores de esta relación son significativamente mayores para los genosensores basados en composites grafito-epoxi (con un valor óptimo de 26.2), respecto a los genosensores de membranas recambiables (con un valor óptimo de 1.9).

Estos resultados permiten extraer conclusiones similares a la de los capítulos anteriores, respecto a las ventajas del uso de genosensores basados en composites grafito-epoxi por sobre los genosensores de membranas recambiables. En primer lugar, la relación S/R es mayor en los genosensores basados en un composite grafito-epoxi debido a que estos, como ya se ha visto, presentan una mayor sensibilidad que los genosensores de membranas recambiables. En segundo lugar, el hecho de que la relación S/R óptima se consiga en éstos con cantidades superiores de antiDIG-HRP (49.8 vs 11.8 μg), implica que la adsorción inespecífica es menor sobre el composite grafito-epoxi que sobre las membranas de nylon, por lo que la reacción de marcación enzimática se puede llevar a cabo con una mayor cantidad de anticuerpo marcado con HRP.

En la Figura 11.5 se muestra comparativamente la señal de hibridación de los genosensores de membranas recambiables y basados en un composite grafito-epoxi para la relación S/R óptimas, es decir, para una cantidad de antiDIG-HRP de 11.8 y 49.8 μg , respectivamente, obtenida de la siguiente manera:

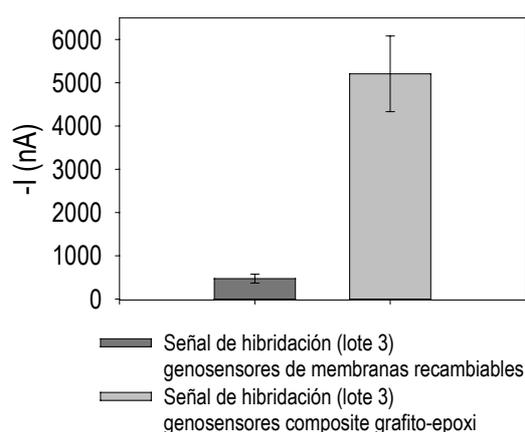


Figura 11.5. Comparación de la señal de hibridación de los genosensores de membranas recambiables y basados en un composite grafito-epoxi, en formato de reconocimiento múltiple con un nuevo sistema de marcación enzimática basado en una reacción inmunológica. En la figura se muestran sólo los resultados para la relación S/R óptimas, es decir, para una cantidad de antiDIG-HRP de 11.8 y 49.8 μg , respectivamente. Las condiciones experimentales son las mismas que para la Figura 7.4 y la Figura 11.3.

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

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 experimento (ec. 11, § 4B.2.1).

Como se puede observar, la señal de hibridación obtenida para los genosensores basados en un composite grafito-epoxi es significativamente superior a la de los genosensores de membranas recambiables.

11.3.3 COMPARACIÓN DE LOS SISTEMAS DE MARCACIÓN ENZIMÁTICA BASADOS EN UNA REACCIÓN INMUNOLÓGICA Y EN LA REACCIÓN BIOTINA-ESTREPTAVIDINA

La Figura 11.6 muestra comparativamente los resultados obtenidos utilizando genosensores basados en un transductor grafito-epoxi en formato de reconocimiento múltiple, y utilizando como sistema de marcación HRP-estreptavidina (que corresponde al nivel bajo de analito y alto tanto de sonda biotinilada como de conjugado enzimático, en el diseño de experimentos realizado en el apéndice A del Capítulo 9), y antiDIG-HRP (lote 3, Figura 11.3, que muestra tener la relación S/R óptima).

Para ambos experimentos, se inmovilizó la misma cantidad de analito en el transductor grafito-epoxi (840 fmoles). En cuanto a la sonda inmovilizada, en ambos casos se adicionó la misma cantidad de sonda en la solución de hibridación (10.0 pmoles) pero en un caso de sonda biotinilada, y en el otro de sonda funcionalizada con digoxigenina. En cuanto al marcador enzimático, los resultados que se muestran representan únicamente la cantidad de conjugado enzimático que ha demostrado tener la mejor relación S/R [para HRP-estreptavidina, 1.2 μg (Figura 9A.2, n° de experiencia 7); para antiDIG-HRP, 49.8 μg (Figura 11.4)].

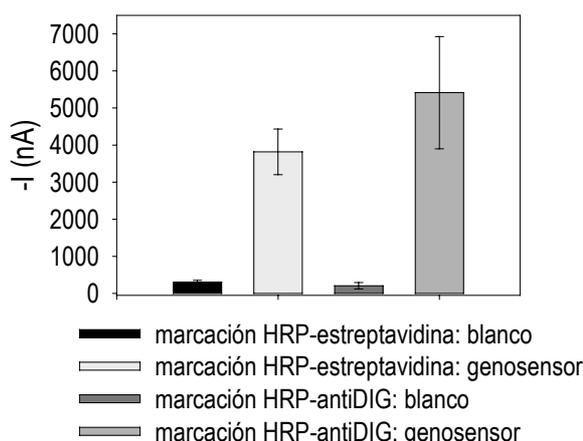


Figura 11.6. Comparación del sistema de marcación basado en una reacción inmunológica y en una reacción biotina-estreptavidina, en formato de reconocimiento múltiple y utilizando genosensores basados en un composite grafito-epoxi. Las condiciones experimentales se explicitan en el texto, para cada caso.

En la Figura 11.7 se muestra comparativamente la señal de hibridación de los genosensores, obtenida de la siguiente manera:

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

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 experimento (ec. 11, § 4B.2.1).

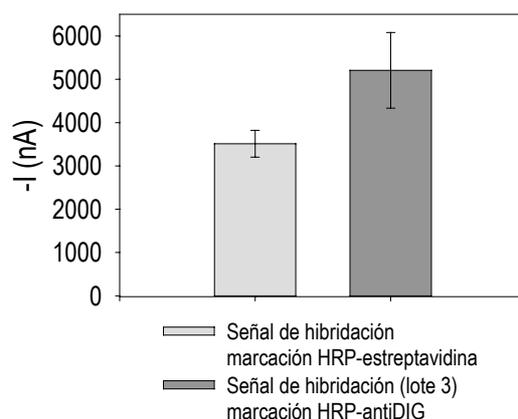


Figura 11.7. Comparación de la señal de hibridación de los genosensores con un sistema de marcación basado en una reacción inmunológica y en una reacción biotina-estreptavidina, en formato de reconocimiento múltiple y utilizando genosensores basados en un composite grafito-epoxi. Las condiciones experimentales se explicitan en el texto, para cada caso.

La Tabla 11.3 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación entre las señales de hibridación utilizando los distintos sistemas de marcación enzimática. En todos los casos se supuso varianzas comparables. La diferencia del valor medio (prueba t) no es significativamente diferente desde el punto de vista estadístico, con un 95 % de confianza.

Esto quiere decir que, para las mismas cantidades de analito, es indistinto utilizar como marcador enzimático HRP-estreptavidina o antiDIG-HRP, en cuanto a la sensibilidad de la detección amperométrica.

En la Figura 11.8 se muestran los valores comparativos de la adsorción inespecífica de los sensores blancos procesados con los distintos sistemas de marcación enzimática.

La Tabla 11.4 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación de los sensores blancos con los distintos sistemas de marcación enzimática. Estos resultados permiten concluir que la adsorción inespecífica no es significativamente diferente sobre un composite grafito-epoxi cuando se utiliza como marcador HRP-estreptavidina o antiDIG-HRP.

En los genosensores basados en un composite grafito-epoxi, la adsorción inespecífica para ambos sistemas de marcación es comparable desde el punto de vista estadístico, e inferior respecto a los genosensores de membranas recambiables, en ambos casos.

Tabla 11.3. Pruebas estadísticas para la comparación de los valores medios (prueba t) de las señales de hibridación de los distintos sistemas de marcación enzimática, calculados con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	Señal de hibridación con Marcación HRP-estreptavidina	Señal de hibridación con Marcación antiDIG-HRP
$S\bar{x}$ (ec. 11, § 4B.2.1)	$S\bar{x} = 310.2$	$S\bar{x} = 874.5$
Sp (ec. 12, § 4B.2.2.1)	$Sp = 846.4$	
Grados libertad (ec. 16, § 4B.2.2.3)	8	
Prueba t (bilateral) (ec. 14, § 4B.2.2.2)	$t_{\text{calc}} (1.69) < t_b (2.31)$	

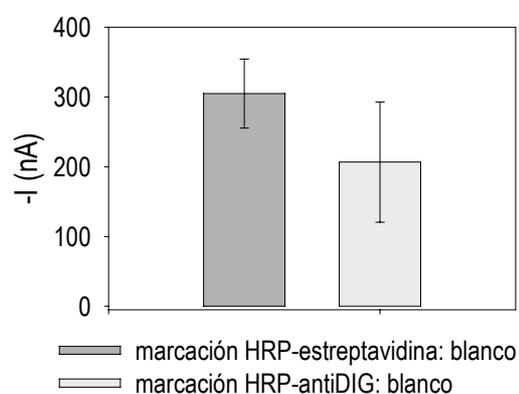


Figura 11.8. Comparación de las señales de los blancos con un sistema de marcación basado en una reacción inmunológica y en una reacción biotina-estreptavidina, en formato de reconocimiento múltiple y utilizando genosensores basados en un composite grafito-epoxi. Las condiciones experimentales se explicitan en el texto, para cada caso.

Tabla 11.4. Pruebas estadísticas para la comparación de las varianzas (prueba F) y de los valores medios (prueba t) de las señales de los blancos con distintos sistemas de marcación enzimática, calculados con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	blanco (HRP-estreptavidina) (n=2)	blanco (antiDIG-HRP) (n=3)
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_1 = 49.5$	$s_2 = 86.3$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (3.03) < F_{2,1} (799.50)$	
Sp (ec. 4A, § 4B.1.4.1)	$Sp = 75.98$	
grados libertad (ec. 6A, § 4B.1.4.3)	3	
Prueba t (bilateral) (ec. 5A, § 4B.1.4.2)	$t_{\text{calc}} (1.41) < t_b (3.18)$	

Para concluir, se puede aseverar que es indistinto, para el caso de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi, el uso de un sistema de marcación u otro, teniendo en cuenta tanto los valores de la adsorción inespecífica como los valores de las señales de hibridación.

Tanto el sistema que se basa en la reacción biotina-estreptavidina como el sistema que se basa en la reacción inmunológica son muy adecuados para la detección de las cantidades ensayadas de analito, y estadísticamente comparables.

Sin embargo, es importante destacar que los reactivos para el sistema de marcación basado en la reacción biotina-estreptavidina son más económicos (tanto la sonda biotilada como el conjugado HRP-estreptavidina) respecto al sistema de marcación basado en una reacción inmunológica (que utiliza una sonda funcionalizada con digoxigenina y antiDIG-HRP).

Además, la reproducibilidad de los resultados obtenidos con el sistema de marcación que utiliza HRP-estreptavidina es mejor que el que utiliza antiDIG-HRP (desviaciones estándar relativas (ec. 2, § 4B.1.2) de 16 y de 26 %, respectivamente).

Como además se ha visto que no existe interferencia por la biotina (apéndice B del capítulo 9), el sistema de marcación de elección es el basado en el conjugado enzimático HRP-estreptavidina.

11.4 CONCLUSIONES

1. Por primera vez se ha comprobado la utilidad de un sistema de marcación enzimática basado en una reacción inmunológica en un genosensor amperométrico basado en un composite grafito-epoxi en formato de reconocimiento múltiple.
2. La cantidad de anticuerpo conjugado con enzima encontrado como óptimo –es decir, que presenta la mejor relación S/R– para el formato de reconocimiento múltiple es de 49.8 μg .
3. Con este nuevo sistema de marcación inmunológica se observa también que la adsorción inespecífica es controlada y reproducible. Puede evitarse el hecho de preparar sensores blanco para evaluarla, si esta señal se mantiene, su magnitud es conocida y no se cambia de producto comercial de antiDIG-HRP.
4. La relación S/R es sensiblemente mayor –con este sistema de marcación– en los genosensores basados en un composite grafito-epoxi (26.2) respecto a los genosensores de membranas recambiables (1.9) debido a que los primeros, como ya se ha visto, presentan una mayor sensibilidad que los segundos.
5. El hecho de que la relación S/R óptima se consiga en los genosensores basados en un composite grafito-epoxi con cantidades superiores de antiDIG-HRP (49.8 μg) respecto a los genosensores de membranas recambiables (11.8 μg), implica que la adsorción inespecífica es menor sobre el composite grafito-epoxi que sobre las membranas de nylon, por lo que la reacción de marcación enzimática se puede llevar a cabo con una mayor cantidad de anticuerpo marcado con HRP, con las ventajas en la señal amperométrica que esto supone.
6. La señal de hibridación de los genosensores detectados mediante el anticuerpo conjugado con HRP muestra ser comparable desde el punto de vista estadístico a la señal de hibridación de los genosensores detectados mediante HRP-estreptavidina, para un sistema que utiliza la misma cantidad de analito y de sonda funcionalizada.

7. La adsorción inespecífica del anticuerpo conjugado con HRP muestra ser muy baja sobre el composite grafito-epoxi, y comparable desde el punto de vista estadístico a la del conjugado HRP-estreptavidina, para un sistema que utiliza la misma cantidad de analito y de sonda funcionalizada.

8. Debido a los resultados obtenidos, es indistinto utilizar como marcador enzimático HRP-estreptavidina como antiDIG-HRP, en cuanto a la sensibilidad de la detección amperométrica.

9. Sin embargo, es importante destacar que los reactivos para el sistema de marcación basado en la reacción biotina-estreptavidina son más económicos que los del sistema de marcación basado en una reacción inmunológica. Además, la reproducibilidad de los resultados obtenidos con el sistema de marcación que utiliza HRP-estreptavidina es mejor que el que utiliza antiDIG-HRP. Como además se ha visto que no existe interferencia por la biotina (apéndice B del capítulo 9), el sistema de marcación de elección es el basado en el conjugado enzimático HRP-estreptavidina.

10. Este nuevo sistema de marcación desarrollado permite una mayor versatilidad en las posibilidades de análisis, ya que abre la posibilidad de la construcción de transductores de superficies renovables (biocomposites conductores de estreptavidina) para implementar un sistema de análisis de secuencias de DNA mediante la doble marcación: biotina para la captura y digoxigenina para la marcación con antiDIG-HRP.

11.5 PERSPECTIVAS FUTURAS

El nuevo sistema de marcación desarrollado para los genosensores basados en un composite grafito-epoxi abre la posibilidad de nuevas estrategias de preparación de genosensores en formato de captura (véase capítulo 10) de cara a su producción comercial.

Una estrategia estaría basada en la construcción de transductores de superficies renovables: biocomposites conductores de estreptavidina o de avidina (Figura 11.9), cuyas superficies se pueden reutilizar tantas veces se quiera mediante un simple pulido. Esta estrategia permitiría preparar genosensores *in situ*.

El *kit* incluiría la sonda de captura (en este caso biotinilada), y una sonda de reconocimiento funcionalizada con digoxigenina, para la marcación con un anticuerpo antiDIG conjugado con peroxidasa (antiDIG-HRP). La hibridación del analito con las dos sondas de captura se realizaría en solución, y posteriormente la entidad formada sería capturada por el biocomposite conductor mediante la reacción de la avidina inmovilizada con la biotina de la sonda de captura. Como ya se comentara, el genosensor una vez utilizado puede pulirse y así se puede obtener una nueva superficie fresca para una nueva determinación.

Otra estrategia sería la utilización de la doble marcación biotina-digoxigenina, pero en sentido contrario: con digoxigenina para la inmovilización basada en una reacción inmunológica, y con biotina para la marcación con el conjugado HRP-estreptavidina (Figura 11.10). En este caso, por tanto, se utilizarían inmunocomposites de anticuerpo antiDIG. En nuestro laboratorio hay experiencia en la fabricación de inmunosensores basados en inmunocomposites ^{1,29}.

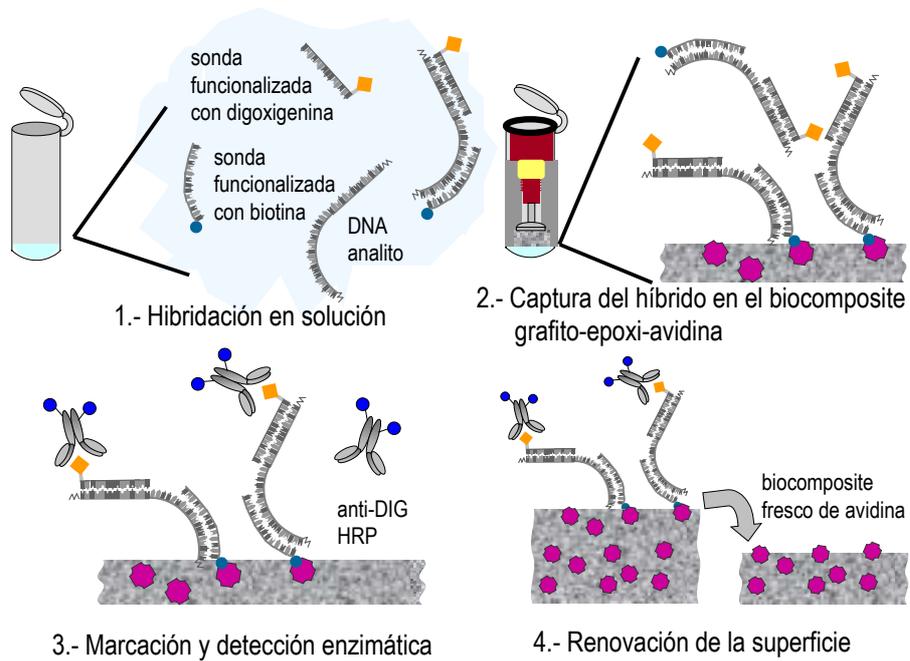


Figura 11.9. Esquema de un kit genosensor que se basa en una estrategia de captura y que utiliza biocompositos de avidina y marcación enzimática basada en una reacción inmunológica.

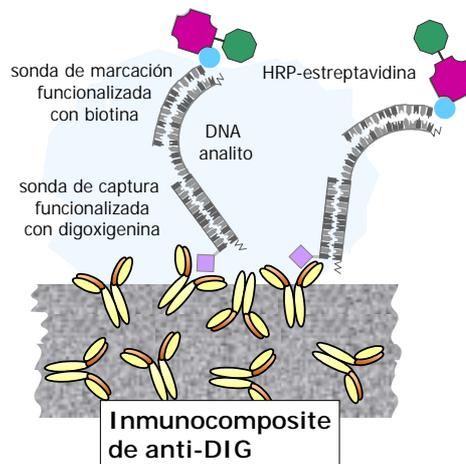


Figura 11.10. Esquema de un kit genosensor que se basa en una estrategia de captura y que utiliza inmunocompositos de anticuerpo antiDIG y marcación enzimática basada en una reacción con HRP-estreptavidina.

Este tipo de genosensores poseería una gran versatilidad desde el punto de vista comercial, ya que los transductores basados en biocompositos conductores serían los mismos para cualquier secuencia analítica que se desee investigar.

Este tipo de transductor también podría ser fabricados mediante procedimientos planares de fabricación masiva (screen printing).

11.6 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. Kwoh, 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.
- ²⁹ M. Santandreu, F. Céspedes, S. Alegret, E. Martínez Fàbregas. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2080-2085.

DETERMINACIÓN DE *SALMONELLA* SP MEDIANTE PCR Y DETECCIÓN DEL AMPLICÓN POR INMOVILIZACIÓN POR ADSORCIÓN SOBRE LA SUPERFICIE GRAFITO-EPOXI DE UN GENOSENSOR AMPEROMÉTRICO

OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DESHIBRIDIZANTE DEL ANALITO

12.1 INTRODUCCIÓN

En § 8.1 se ha explicado la etiopatogenia de las infecciones que tienen como agente causal las salmonelas ¹, y la importancia de las técnicas de diagnóstico de estas bacterias desde el punto de vista de la seguridad alimentaria de los consumidores ^{2,4}.

En § 8.1 se tratan en detalle cada uno de los pasos implicados en la determinación de las *Salmonella* mediante las técnicas microbiológicas clásicas: preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo, cultivo selectivo en placas, pruebas bioquímicas y confirmación serológica. Para la confirmación y clasificación de las salmonelas se han desarrollado inmunoensayos comercialmente disponibles ⁴.

Más recientemente, se han desarrollado ensayos en numerosas muestras ⁵ basados en el análisis del genoma bacteriano basados en sondas de DNA ⁶ y en la hibridación con el analito.

Como ya se ha comentado, la utilización de sondas génicas se asocia con la necesidad de cultivar las bacterias hasta la obtención de un nivel detectable ⁴. Las metodologías que impliquen hibridación requieren, al menos, la presencia de 10⁵-10⁶ bacterias en la muestra para obtener una señal positiva. Es por eso que se ha utilizado –con el objeto de reemplazar el paso de preenriquecimiento *in vivo*– la amplificación del DNA bacteriano *in vitro* por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) ^{7,8}.

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 ^{3,4,9-23}.

Una de las secuencias génicas de *Salmonella* que se utilizan para amplificar por PCR es la secuencia de inserción IS200²⁴⁻²⁷, que es un elemento transposable de aproximadamente 700 pb y que está presente en más del 90 % de los aislamientos de *Salmonella* sp (Tabla 8.1). Como la secuencia IS200 se encuentra en algunas cepas de *Shigella*, para una identificación certera se podría utilizar una segunda secuencia (IS630) que existe en *Shigella* pero no en *Salmonella*²⁶. La secuencia IS200 ha sido utilizada en numerosos trabajos para la caracterización de *Salmonella* sp²⁸⁻³⁷. Aunque las técnicas microbiológicas clásicas son los métodos de referencia para la detección de *Salmonella* sp, estas metodologías son engorrosas y consumen mucho tiempo⁴. Con el objeto de solventar estas desventajas, en el capítulo 8 se propuso una detección alternativa de *Salmonella* sp: la determinación de la información genética mediante la detección de la secuencia IS200, utilizando un genosensor de membranas recambiables. El principal objetivo del desarrollo de este dispositivo genosensor fue la mejora del tiempo de análisis, factor que es crítico para una detección precoz de estos microorganismos causantes de contaminaciones alimentarias graves, y la utilización de un método de detección más robusto que en el caso de los métodos clásicos de hibridación de DNA.

En el trabajo desarrollado en el capítulo 8 se inmovilizó por adsorción sobre una membrana de nylon HYBOND™ el amplicón de la secuencia IS200, de 229 pb. La detección del amplicón se realizó mediante 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. La especificidad total del procedimiento, tal como se comentó en el capítulo 8, viene dada por el reconocimiento de tres secuencias distintas. Estos tres reconocimientos están determinados por el uso de los dos *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 reconocieron 76 bases nitrogenadas de la secuencia IS200.

Como puede observarse en la Figura 12.1, las técnicas microbiológicas clásicas para la detección de las *Salmonella* requieren de 3 a 4 días para la obtención de un resultado presuntivo, y 1 o 2 días más para la confirmación bioquímica. Con el dispositivo genosensor de membranas recambiables, se consiguió reducir los tiempos de análisis a 28-30 horas.

Respecto a los análisis genéticos clásicos, un dispositivo genosensor amperométrico otorga, tal como se ha comentado repetidamente a lo largo del presente trabajo, una nueva alternativa de análisis con ventajas tales como: uso de equipamiento más robusto y de menor coste, posibilidad de miniaturización de los sensores (para medidas de campo) y de producción masiva, construcción de los sensores en distintas configuraciones para determinaciones en continuo, utilización de reactivos no isotópicos y no tóxicos, entre otras. La reacción de marcación basada en la unión biotina-estreptavidina otorga versatilidad a los formatos de cara a la producción comercial en forma de *kit*.

Teniendo en cuenta todas estas ventajas que proporciona el uso de un dispositivo genosensor, en el trabajo descrito en el presente capítulo se pretende conseguir una mejora respecto al genosensor de membranas recambiables desarrollado en el capítulo 8 para la determinación del amplicón de *Salmonella* sp: reducir aún más los tiempos de análisis utilizando un genosensor basado en un composite grafito-epoxi.

Ya se ha visto en el trabajo descrito en los capítulos 9 a 11 que en los dispositivos genosensores con DNA inmovilizado –por adsorción física– sobre un composite grafito-epoxi se obtuvo un aumento de señal electroquímica y la reducción de los tiempos empleados en el

procedimiento total de análisis de 24 a 150 min, en comparación con los genosensores de membranas recambiables desarrollados en los capítulos 4 a 8 (Figura 12.1).

Comparación de los métodos de detección de *Salmonella* sp

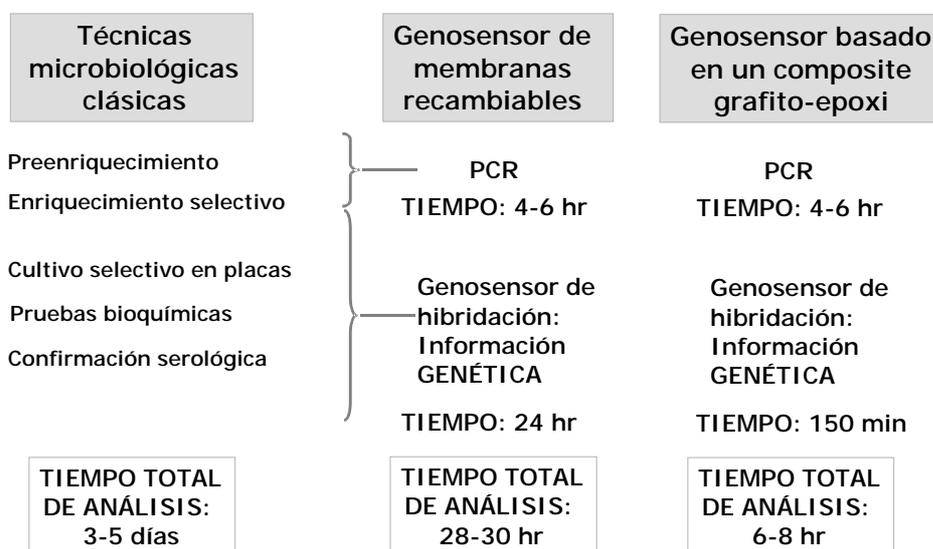


Figura 12.1. Esquema comparativo en el que se muestra la reducción del tiempo total de análisis utilizando un dispositivo genosensor respecto a las técnicas microbiológicas clásicas.

Además, se consiguió simplificar el proceso de preparación de los genosensores al eliminar el tratamiento de prehibridación y de premarcación con solución bloqueante, ya que se observó una marcada disminución en la adsorción inespecífica sobre el composite grafito-epoxi respecto a las membranas de nylon HYBOND.

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 basado en un composite grafito-epoxi.

Este nuevo método requiere los siguientes pasos:

- extracción del DNA cromosómico
- amplificación por PCR de la secuencia IS₂₀₀
- detección del amplicón mediante un genosensor amperométrico basado en un composite grafito-epoxi.

Como el amplicón de *Salmonella* se obtiene como dsDNA, en el trabajo desarrollado en el presente capítulo también se optimizará un procedimiento de desnaturalización de dsDNA, ya que en los dispositivos genosensores basados en composites grafito-epoxi desarrollados hasta el momento (capítulos 9 a 11) se utilizaron como analitos oligonucleótidos modelos y ssDNA y este procedimiento deshibridizante, por tanto, no era necesario.

Los resultados obtenidos se compararán con los del capítulo 8, en el que se utilizó un genosensor de membranas recambiables para la detección de *Salmonella* sp.

12.2 EXPERIMENTAL

12.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS

12.2.1.1 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 Cyclor 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.

12.2.1.2 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 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.

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: véase § 8.2.1.2.

El dsDNA [poli(dA)-poli(dT)] (sal sódica del ácido poliadenílico-politimidílico) (5 U, 24 A₂₆₀ unidades/mg) utilizado para la optimización del tratamiento deshibridante 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: véase § 9.2.1.2.

La composición de la solución de hibridación fue:

- 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.

Los medios utilizados fueron LB (Luria-Bertani: agarosa y caldo), marca Difco.

La PCR se realizó con un kit Expand High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals), que contiene la mezcla de enzimas termoestables (Taq DNA polimerasa y una polimerasa correctora) en una solución amortiguadora, la solución de amplificación 10 X (con 15 mM de MgCl₂), y los nucleótidos trifosfatos.

La proteinasa K, la agarosa y el bromuro de etidio son de Roche Molecular Biochemicals.

Los marcadores ΦX174 DNA/Hinf I Markers, la minicolumna Wizard®, y la resina de purificación de DNA Wizard® PCR Preps fueron suministradas por Promega (USA).

El resto de los reactivos utilizado fue de calidad proanálisis o similar. Las soluciones acuosas se prepararon con agua bidestilada o agua bidestilada filtrada.

Las composiciones de otras soluciones preparadas, fueron:

- 20 X SSC 3.0 M NaCl, 0.3 M citrato trisódico, pH 7.0
- solución deshibridante 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH
- solución neutralizadora 1.5 M NaCl, 0.5 M tris-HCl, 1 mM de EDTA disódico, pH 7.2
- 10 X PBS 1.3 M NaCl, 0.1 M fosfato sódico, pH 7.2
- 10 X TAE (Tris-acetato EDTA) 0.4 M TRIS acetato, 1 mM EDTA pH 8.0
- 6 X solución transportadora 0.25 % p/v azul de bromofenol, 0.25 % p/v xileno cianol, 15 % p/v Ficoll (tipo 400)

12.2.2 PROCEDIMIENTO DE AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA GÉNICA IS200 MEDIANTE PCR

Los pasos implicados en el procedimiento de amplificación de la secuencia génica IS200 se explicaron en detalle en § 8.2.2, y consistieron en:

- Preenriquecimiento de la bacteria *Salmonella*
- Extracción del DNA cromosómico de las salmonelas
- Electroforesis del DNA cromosómico

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- Electroforesis del amplicón
- Purificación de la banda obtenida

La preparación del amplicón purificado para su posterior inmovilización sobre el composite grafito-epoxi se llevó a cabo de manera similar a como se describiera en § 8.2.2.7.

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 minutos ³⁸. 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 favorece que las secuencias queden como ssDNA. En este punto el amplicón está listo para ser inmovilizado sobre el transductor grafito-epoxi.

12.2.3 MODIFICACIÓN DEL TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI: HIBRIDACIÓN Y MARCACIÓN

Los genosensores se prepararon mediante un protocolo que constó de 4 pasos:

- 1.-Inmovilización del amplicón en la superficie del genosensor basado en un transductor grafito-epoxi
- 2.-Tratamiento deshibridizante de la doble hebra de DNA
- 3.-Hibridación del amplicón inmovilizado en el transductor grafito-epoxi utilizando una sonda biotinilada complementaria a la secuencia IS200.
- 4.-Marcación enzimática de los híbridos formados en el transductor grafito-epoxi.

Una vez preparados, los genosensores fueron evaluados amperométricamente.

El tratamiento deshibridizante de la doble hebra de DNA se ha incluido en la preparación de los genosensores ya que en este caso, a diferencia de los genosensores preparados en los capítulos 9 a 11, el analito se presenta como dsDNA. La efectividad de este tratamiento se ha optimizado en el presente capítulo.

En las secciones siguientes se trata cada uno de estos pasos.

12.2.3.1 Inmovilización del amplicón en el composite grafito-epoxi

En § 4.2.3.1, se describen las distintas metodologías de inmovilización sobre una membrana de nylon ³⁸⁻⁴². En el presente capítulo, al igual que en los capítulos 9 a 11, se utiliza también la inmovilización por calor seco ^{38,39,43,44}, ya que se ha visto que este tratamiento es efectivo.

La preparación del DNA que será inmovilizado, en este caso el amplicón, se realiza según se ha explicado en § 12.2.2.

El protocolo de inmovilización del amplicón en el 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 μm . 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 la Figura 9.2 (A).
- 3.- Se agregan 20 μl (de la solución final obtenida del procedimiento de preparación del amplicón, § 12.2.2) 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 °C durante un tiempo de 45 minutos (§ 9.3.7).

12.2.3.2 Tratamiento deshibridizante del amplicón inmovilizado en el composite grafito-epoxi

Debido a que el amplicón de *Salmonella* se obtiene como dsDNA, es necesario llevar a cabo un tratamiento deshibridizante de la doble hebra de DNA previo a la hibridación para que el analito quede como simple hebra y, por tanto, disponible para hibridarse con la sonda biotinilada complementaria. En los dispositivos genosensores basados en composites grafito-epoxi desarrollados hasta el momento (capítulos 9 a 11) se utilizaron como analitos oligonucleótidos modelos y ssDNA y este procedimiento deshibridizante, por tanto, no era necesario.

Como ya se ha visto, la unión de dos simples hebras de DNA complementarias se basa en el establecimiento de puentes de hidrógeno entre ambas. Si se quiere obtener una simple hebra de DNA se debe, por tanto, desestabilizar estas fuerzas de unión. Una de las maneras es mediante el calentamiento de la muestra y su enfriamiento rápido ³⁸. Durante la preparación del amplicón para su posterior inmovilización sobre el composite grafito-epoxi se llevó a cabo el calentamiento del mismo a 95 °C durante 5 minutos y luego un enfriamiento rápido, hecho que favorece que las hebras queden como ssDNA. Inmediatamente después de este tratamiento, los genosensores se someten a 80 °C durante 45 minutos (procedimiento de inmovilización, § 12.2.3.1). Pese a que este tratamiento debería ser efectivo, en el presente capítulo se ha ensayado un tratamiento deshibridizante alcalino ^{38,39,43,45}, luego de la inmovilización del material genético sobre el composite grafito-epoxi.

El protocolo del tratamiento deshibridizante del dsDNA inmovilizado en el transductor grafito-epoxi fue el siguiente:

- 1.- Se adicionan 150 μl de solución deshibridizante en tubos eppendorf de 2.0 ml en el incubador con agitación suave y a 42 °C, durante 10 minutos (para que la solución deshibridizante tome esta temperatura).
- 2.- Se enjuagan brevemente los genosensores en solución 5 X SSC hasta eliminación de las sales adsorbidas durante el procedimiento de inmovilización (§ 12.2.3.1).
- 3.- Se colocan los genosensores invertidos en la solución deshibridizante durante 5 min, y se dejan los genosensores en agitación suave y a 42 °C. 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 remojan los genosensores con movimientos circulares en solución neutralizadora a 20 °C, y luego en solución 5 X SSC.

Este tratamiento sólo prolonga el tiempo de preparación de los genosensores en cinco minutos.

12.2.3.3 Hibridación del transductor grafito-epoxi modificado con el amplicón

Este es el paso más importante del procedimiento de construcción del sensor, ya que aquí ocurre la hibridación del amplicón de 229 pb con la sonda biotinilada complementaria de 30 mer.

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

- tipo de solución de hibridación: reactivos bloqueantes ^{38,39,41,43-47}, uso de formamida ^{38,41,43,45,46} y SDS ^{38,39,43-48}, fuerza iónica ^{41,43}, uso de dextranos ^{43,44,47} o polietilenglicol ^{41,46,48}.
- temperatura y tiempo de hibridación ^{38,39,45}.
- agitación durante la hibridación ^{38,39,49}.
- volumen de hibridación ^{38, 45}.

La composición de la solución de hibridación fue:

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 tratamiento de hibridación fueron:

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

La preparación de la sonda funcionalizada con biotina se realizó como se describiera en § 4.2.5.7. El protocolo de hibridación de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi con el amplicón inmovilizado 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' de manera que el volumen final sea 150 µl.
- 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 de 45 minutos (§ 9.3.3).
- 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: 5 minutos, con agitación suave, a 42 °C.
- 6.- Se remojan los genosensores con movimientos circulares en 2 X SSC a 20 °C para eliminar el SDS.

12.2.3.4 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 ⁴¹
- temperatura y tiempo de marcación enzimática ⁴¹
- agitación durante la marcación enzimática ^{38,39,41,49}
- volumen de marcación enzimática ^{38,45}

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

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

El protocolo de marcación enzimática consistió en:

- 1.- Se adiciona 150 µl 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 30 minutos (§ 9.3.6).
- 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 µl 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 postmarcación enzimática, se trata con detalle en § 4.2.6.7.

12.2.4 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 el transductor grafito-epoxi. En este caso, éstos híbridos se forman entre el amplicón inmovilizado en el transductor 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. 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_{máx}, 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_{máx}.

12.2.5 PREPARACIÓN DE LOS GENOSENSORES BASADOS EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI PARA LA DETECCIÓN DEL AMPLICÓN IS200

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

Las variables más importantes son:

- cantidad de amplicón inmovilizado en el transductor grafito-epoxi
- cantidad de sonda biotinilada en la solución de hibridación
- cantidad de conjugado estreptavidina-peroxidasa en la solución bloqueante durante la marcación enzimática

En cuanto a la cantidad de amplicón inmovilizado en el transductor grafito-epoxi, se ha utilizado la cantidad recuperada luego de la electroforesis.

La cantidad de sonda funcionalizada con biotina fue de 68.2 pmoles.

Por otro lado, como se ha utilizado el mismo conjugado enzimático que el optimizado en el capítulo 10, se han utilizado 9.00 μg de HRP-estreptavidina.

Para evaluar la señal debida a la hibridación del amplicón, se prepararon en todos los casos un lote de sensores blanco para la evaluación de la adsorción inespecífica, y un lote de genosensores para evaluar la hibridación. Por cada lote se procesaron replicados 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 los sensores blanco, se obtuvo la respuesta analítica debida al proceso de hibridación del amplicón.

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

En la Figura 12.2 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.

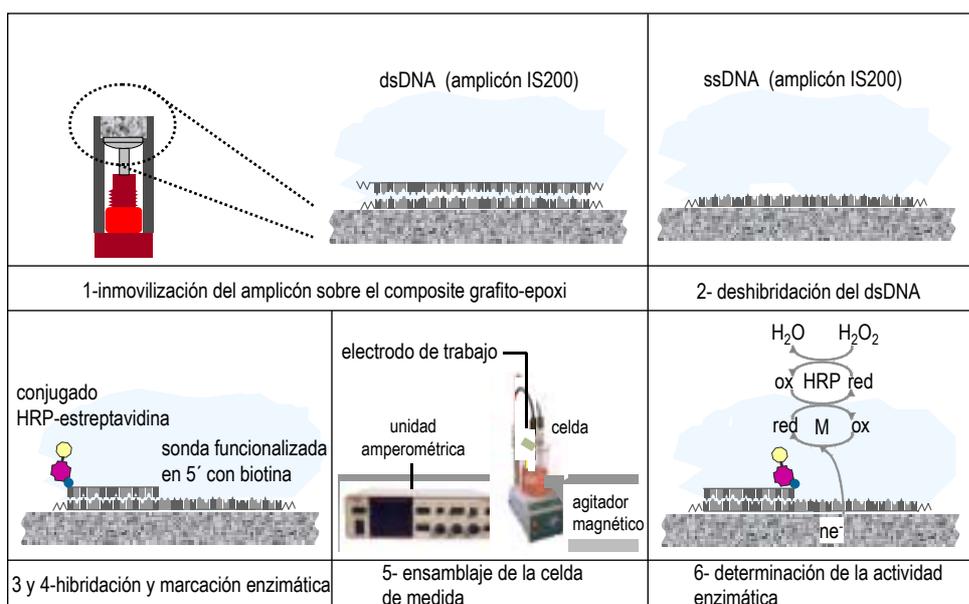


Figura 12.2. Representación esquemática del procedimiento experimental seguido en la preparación y evaluación de los genosensores para la determinación del amplicón IS200.

12.2.5.1 Protocolo de preparación de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi para la detección de *Salmonella sp*

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización del amplicón, descrito en § 12.2.3.1.
- 2.- Se continúa con el tratamiento deshibridante, descrito en § 12.2.3.2.
- 3.- Se sigue con el protocolo de hibridación descrito en § 12.2.3.3
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática descrito en § 12.2.3.4.

12.2.5.2 Protocolo de preparación de los sensores blanco basados en un composite grafito-epoxi para la detección de *Salmonella sp*

Este lote se realizó de manera idéntica al de los genosensores (§ 12.2.5.1), pero obviando el paso de adición del amplicón IS200, es decir, no hay analito 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 caso.

Durante el proceso de hibridación, puede adsorberse de manera inespecífica la sonda biotinizada. 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, el conjugado enzimático tiene dos posibilidades de adsorción inespecífica:

- unirse a la sonda biotinizada 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 § 12.2.3.1, con la única diferencia que no se adiciona amplicón IS200, es decir, no hay analito sobre el transductor grafito-epoxi (se obvia el paso 3 del protocolo).
- 2.- Se continúa con el tratamiento deshibridizante, descrito en § 12.2.3.2.
- 3.- Se sigue con el protocolo de hibridación descrito en § 12.2.3.3. En este caso, al no haber analito sobre el transductor grafito-epoxi, no va a haber hibridación, y sí sólo adsorción inespecífica de la sonda funcionalizada.
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática descrito en § 12.2.3.4.

12.2.5.3 Evaluación de los genosensores

Una vez preparados 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 § 12.2.4.

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 el transductor grafito-epoxi, pero que se encuentra únicamente unida al híbrido formado en la superficie y directamente relacionada con la cantidad de amplicón inmovilizado en el composite (Figura 12.2).

12.2.5.4 Eficacia del tratamiento deshibridizante. Diseño del experimento

El objeto de esta experiencia es evaluar la utilidad del tratamiento deshibridizante en el protocolo de preparación de un genosensor basado en un composite grafito-epoxi, es decir, si la realización o no de este paso posterior a la inmovilización de un analito que se encuentre como dsDNA –tal como es el caso del amplicón– favorece la hibridación del mismo, o bien, si sólo se requiere el tratamiento del analito con calor a 95 °C y el enfriamiento rápido para que un dsDNA se encuentre como ssDNA.

Esta experiencia se realizó con un analito modelo: poli(dA)-poli(dT). La detección del mismo se realizó mediante un formato de reconocimiento múltiple, utilizando como sonda biotinilada dT(50)-biotina, tal como se describiera en los capítulos 9 y en los apéndices del capítulo 9. La única diferencia es que en estos capítulos el poli(dA) se encontraba como ssDNA, mientras que ahora el analito se encuentra como dsDNA, hibridado con su cadena complementaria, es decir, unido a poli(dT).

Para evaluar la eficacia del tratamiento deshibridizante sobre el transductor grafito-epoxi, se realizaron dos experiencias distintas. En el Experimento N° 1 se evalúa la efectividad del tratamiento deshibridizante mediante calentamiento y enfriamiento brusco de la muestra previo a la inmovilización de la misma. Para tal fin, se llevó a cabo el protocolo de preparación de los genosensores tal como en § 9A.2.3 pero, en este caso, el analito [poli(dA)-poli(dT)] se preparó como se describe para el amplicón en § 12.2.2. Para la preparación del analito [poli(dA)-poli(dT)], se tomó un volumen en μl de solución concentrada en agua bidestilada filtrada, 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 minutos. Luego del calentamiento, se colocó esta solución inmediatamente en hielo. Este proceso de calentamiento-enfriamiento brusco durante la preparación del analito a ser inmovilizado, como ya se comentara, favorece que las secuencias queden como ssDNA.

El Experimento N° 2 se llevó a cabo preparando el analito tal como en el Experimento N° 1, pero además realizando el tratamiento deshibridizante alcalino (tal como en § 12.2.3.2).

Las cantidades de reactivos utilizadas para esta optimización se adaptaron del apéndice A del capítulo 9 que se encontraron como óptimas. Así, la cantidad de poli(dA)-poli(dT) fue correspondiente al nivel bajo (153.8 ng), mientras que la cantidad de sonda biotinilada fue de 9.97 pmoles y correspondiente al nivel alto.

Por otro lado, como se ha utilizado el mismo conjugado enzimático que el optimizado en el capítulo 10, se han utilizado 9.00 μg de HRP-estreptavidina.

Para ambos experimentos se realizó un lote de sensores blanco y un lote de genosensores. Cabe destacar que por cada lote (genosensores y sensores blanco) se han evaluado replicados.

La Tabla 12.1 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática para los experimentos 1 y 2.

Tabla 12.1. *Diseño del experimento N° 1 y 2 de evaluación de la eficacia de distintos tratamientos deshibridizantes, en el que se llevó a cabo la detección del analito dsDNA en formato de reconocimiento múltiple mediante un genosensor grafito-epoxi. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.*

REACTIVOS	blanco n=2	genosensor n=3
protocolo de inmovilización: Poli(dA)-poli(dT) -analito-	No se adiciona (-)	153.8 ng
protocolo de hibridación: dT(50)-biotina	9.97 pmoles	9.97 pmoles
protocolo de marcación enzimática: HRP-estreptavidina	9.00 µg	9.00 µg

12.2.5.5 Diseño del experimento de detección del amplicón IS200

Para evaluar la utilidad de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi en la determinación de amplicón, se realizó un procedimiento de amplificación de la secuencia IS200 (§ 12.2.2) y la cantidad de amplicón recuperada (1240 ng, i.e. 10.2 pmoles) –luego del procedimiento de purificación– se dividió en dos lotes de genosensores.

La Tabla 12.2 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.

Tabla 12.2. *Diseño del experimento de evaluación del amplicón IS200 mediante un genosensor grafito-epoxi. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización por adsorción, hibridación y marcación enzimática.*

REACTIVOS	blanco n=2	Lote 1 genosensor n=2	Lote 2 genosensor n=2
amplicón IS200 -analito- protocolo de adsorción	No se adiciona (-)	2.2 pmoles	2.9 pmoles
sonda biotinilada protocolo de hibridación	68.2 pmoles	68.2 pmoles	68.2 pmoles
HRP-estreptavidina protocolo de marcación enzimática	9.00 µg	9.00 µg	9.00 µg

En los genosensores del lote 1 se inmovilizaron 2.2 pmoles de amplicón, mientras que en las del lote 2 se inmovilizaron 2.9 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 (§ 12.2.2). La cantidad de sonda biotinilada fue de 68.2 pmoles. Por otro

lado, como se ha utilizado el mismo conjugado enzimático que el optimizado en el capítulo 10, se han utilizado 9.00 μg de HRP-estreptavidina.

Para ambos lotes de genosensores se realizó un lote de sensores blanco. Cabe destacar que en el lote de sensores blanco y en cada lote de genosensores se han evaluado replicados.

12.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

12.3.1 EFICACIA DEL TRATAMIENTO DESHIBRIDIZANTE

En la Figura 12.3 se muestran los resultados del experimento realizado en § 12.2.5.4. El objeto de esta experiencia es evaluar la efectividad del tratamiento deshibridizante alcalino (Experimento N° 2), frente al tratamiento por calor de la muestra previo a su inmovilización (Experimento N° 1), para conseguir la simple hebra de analito cuando el mismo se encuentra como dsDNA. En la Figura 12.3 cada barra muestra el valor medio de los replicados de cada lote de sensores, y el error de las barras representa la desviación estándar (ec. 1, § 4B.1.1) de los replicados de cada lote.

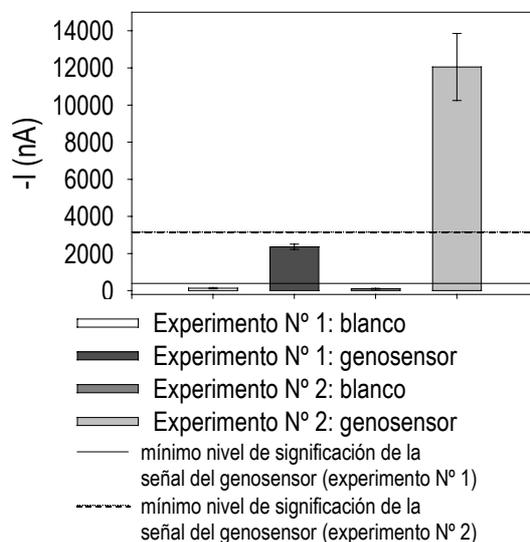


Figura 12.3. Resultados obtenidos en la evaluación del procedimiento deshibridizante del analito dsDNA inmovilizado en la superficie del composite grafito-epoxi mediante un formato de reconocimiento múltiple. Experimento N°1: tratamiento deshibridizante por calor del analito previo a su inmovilización. Experimento N° 2: tratamiento deshibridizante alcalino del analito posterior a su inmovilización. DNA analito [poli(dA)-poli(dT)] inmovilizado en el composite grafito-epoxi: 153.8 ng. Sonda biotinilada dT(50)-biotina: 9.97 pmoles. HRP-estreptavidina: 9.00 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). Electrodo de trabajo grafito-epoxi preparados según § 12.2.5.4.

Una mayor efectividad del tratamiento deshibridizante se traduce en una mayor señal de hibridación, ya que cuanto más efectiva sea la transformación del analito desde dsDNA a ssDNA, habrá mayor cantidad de analito disponible para hibridarse con la sonda biotinilada y mayor será la señal de hibridación.

La Tabla 12.3 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación entre las señales de los genosensores y de sus respectivos blancos, para cada uno de los experimentos (es decir, con tratamiento deshibridizante por calor –experimento N° 1– y con tratamiento deshibridizante alcalino –experimento N° 2–). La diferencia de los valores medios (prueba t) entre los genosensores y sus correspondientes blancos es significativamente diferente desde el punto de vista estadístico, con un 95 % de confianza, para ambos experimentos. Esto quiere decir que con ambos procedimientos deshibridizantes se consigue una señal del genosensor significativamente superior a la señal de los blancos. En la Figura 12.3 también se muestra el nivel a partir del cual la señal de los genosensores es significativamente superior a la señal de los blancos (ec. 7, § 4B.1.4.4 para el experimento N° 1 y ec. 10, § 4B.1.5.3 para el experimento N° 2), para estas mismas condiciones experimentales y que permite sacar las mismas conclusiones, es decir, que ambos procedimientos son efectivos.

Sin embargo, como puede observarse claramente en la Figura 12.3, la señal del genosensor con tratamiento deshibridizante alcalino es muy superior a la señal del genosensor con tratamiento deshibridizante por calor.

Así, la señal de hibridación, calculada según la siguiente expresión:

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

fue es de 2228.3 nA para el experimento N° 1, y de 11948.3 nA para el experimento N° 2.

Tabla 12.3. Pruebas estadísticas para la comparación de las varianzas y de los valores medios, respectivamente, de los blancos y los genosensores para cada experimento. En el experimento N° 1 los sensores fueron procesados sin tratamiento deshibridizante, mientras que en el experimento N° 2, los sensores fueron procesados con tratamiento deshibridizante.

ESTADÍSTICOS	Experimento N° 1		Experimento N° 2	
	s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_b = 35.4$	$s_g = 142.9$	$s_b = 21.2$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (16.3) < F_{2,1} (799.5)$		$F_{\text{calc}} (7253.8) > F_{2,1} (799.5)$	
Sp (ec. 4B, § 4B.1.4.1)	$Sp = 118.5$		No se puede calcular (varianzas no comparables)	
grados de libertad	3 (ec. 6B, § 4B.1.4.3)		2 (ec. 9B, § 4B.1.5.2)	
Prueba t (unilateral)	$t_{\text{calc}} (20.6) > t_3 (2.35)$ (ec. 5B, § 4B.1.4.2)		$t_{\text{calc}} (11.5) > t_2 (2.92)$ (ec. 8B, § 4B.1.5.1)	

Debido a estas conclusiones, para la determinación de *Salmonella* sp, mediante la detección del amplicón IS200 se utilizó en el protocolo de preparación de los genosensores basados en un

composite grafito-epoxi el tratamiento deshibridizante alcalino, por mostrar ser más efectiva que el tratamiento por calor de la muestra.

12.3.2 PROCEDIMIENTO DE AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA GÉNICA IS200 MEDIANTE PCR

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.

Para poder comprobar la efectividad de la amplificación por PCR del fragmento previsto de la secuencia IS200, luego de la PCR se realizó una electroforesis en agarosa con 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* y de los reactivos) y si la banda es única (selección correcta del par de *primers* desde el punto de vista de la especificidad). El segundo, mediante la utilización del marcador, es la comprobación del peso molecular del amplicón, que debería tener 229 pb. 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 § 12.2.2 fue efectivo (resultados no mostrados), y el par de *primers* seleccionado mostró una buena especificidad.

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), por lo que dicho procedimiento de purificación fue efectivo.

El producto del procedimiento de purificación fue el utilizado para la inmovilización en el genosensor (§§ 8.2.2.7 y 12.2.3.1).

12.3.3 GENOSENSOR PARA LA DETECCIÓN DEL AMPLICÓN IS200

En la Figura 12.4, se muestran los resultados del experimento realizado en § 12.2.5.5. Este experimento se basa en la detección del producto de la PCR mediante un genosensor amperométrico basado en un composite grafito-epoxi. En la figura, cada barra muestra el valor medio de cada lote de sensores (blanco y genosensores), y el error de las barras representa la desviación estándar (ec. 1, § 4B.1.1) de los replicados de cada lote.

La Tabla 12.4 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación de los genosensores (lote 1) y de los sensores blancos. La diferencia significativa de señal amperométrica que existe entre los genosensores y los blancos 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 sobre el composite grafito-epoxi.

En la Figura 12.4 también se muestra el nivel a partir del cual la señal de los genosensores (del lote 1) es significativamente superior a la señal de los blancos (ec. 7, § 4B.1.4.4), para estas mismas condiciones experimentales, que permite sacar la misma conclusión.

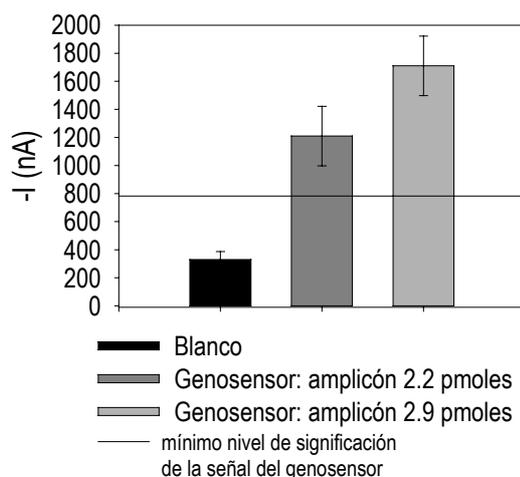


Figura 12.4. Resultados obtenidos en la evaluación del amplicón IS200 mediante un genosensor basado en un composite grafito-epoxi. DNA analito (amplicón) 229 mer inmovilizado en el composite grafito-epoxi: Lote 1 (2.2 pmoles); Lote 2 (2.9 pmoles). Sonda biotinilada 30 mer: 68.2 pmoles. HRP-estreptavidina: 9.0 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). Electrodo de trabajo grafito-epoxi preparados según § 12.2.5.5.

Tabla 12.4. Pruebas estadísticas para la comparación de las varianzas y de los valores medios de las señales de los genosensores (lote 1) y de los blancos, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	blanco (n=2)	genosensor (lote 1) (n=2)
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_1 = 56.6$	$s_2 = 212.1$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (14.1) < F_{1,1} (647.8)$	
S_p (ec. 4B, § 4B.1.4.1)	$S_p = 155.2$	
grados libertad (ec. 6B, § 4B.1.4.3)	2	
Prueba t (unilateral) (ec. 5B, § 4B.1.4.2)	$t_{\text{calc}} (5.66) > t_2 (2.92)$	

En la Figura 12.4 puede observarse que la desviación estándar relativa (ec. 2, § 4B.1.2) para los genosensores es del orden del 15 %.

Como puede observarse, existe un aumento de la señal amperométrica entre los genosensores del lote 1 (con 2.2 pmoles de amplicón) y del lote 2 (con 2.9 pmoles de amplicón inmovilizado en el transductor grafito-epoxi). Es necesario puntualizar que las cantidades en pmoles de amplicón inmovilizado son sólo estimadas por la densidad óptica observada en la electroforesis (§ 8.2.2.5).

En la Figura 12.5 se muestran comparativamente los resultados obtenidos para la detección del amplicón IS200 mediante un genosensor de membranas recambiables (§ 8.3.4, lote 2), y mediante un genosensor basado en un composite grafito-epoxi (§ 12.2.5.5, lote 2). Las condiciones experimentales (cantidades de reactivos utilizadas) no son las mismas para ambos experimentos, pero cabe destacar que la comparación se basa teniendo en cuenta el criterio de que en ambos casos se trabajó con las condiciones experimentales óptimas para cada caso.

En la Figura 12.5 se muestra la señal de hibridación de los genosensores de membranas recambiables y de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi, obtenida de la siguiente manera:

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

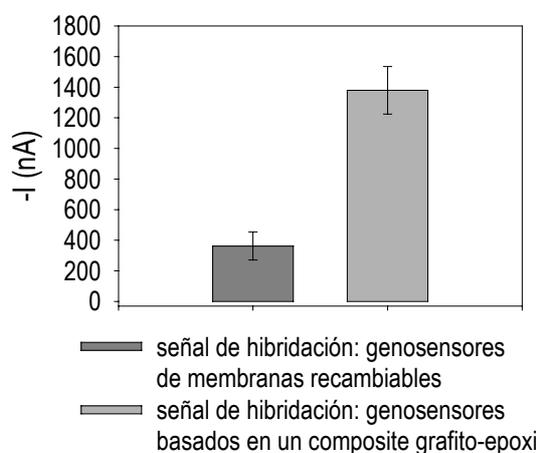


Figura 12.5. Resultados comparativos de la señal de hibridación obtenidos en la evaluación del amplicón IS200 mediante un genosensor basado en un composite grafito-epoxi y mediante un genosensor de membranas recambiables. Genosensor de membranas recambiables: DNA analito (amplicón) 229 mer, 9.9 pmoles; sonda biotinilada 30 mer, 60.0 pmoles; HRP-estreptavidina, 0.49 µg. Genosensor basado en un composite grafito-epoxi: DNA analito (amplicón) 229 mer, 2.9 pmoles; sonda biotinilada 30 mer, 68.2 pmoles; HRP-estreptavidina, 9.0 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). Electrodo de trabajo preparados según §§ 8.2.6.4 (lote 2) y 12.2.5.5 (lote 2), respectivamente.

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 experimento (ec. 11, § 4B.2.1).

La Tabla 12.5 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación entre las señales de hibridación de los genosensores de membranas recambiables y de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi para la determinación del amplicón IS200. En todos los casos se supuso varianzas comparables. La diferencia de los valores medios (prueba t) es significativamente superior con un 95 % de confianza, para los genosensores basados en un composite grafito-epoxi respecto a los genosensores de membranas recambiables.

Tabla 12.5. Pruebas estadísticas para la comparación de los valores medios de las señales de hibridación de los genosensores de membranas recambiables y basados en un composite grafito-epoxi, para la detección del amplicón IS200, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	Señal de hibridación genosensores de membranas recambiables	Señal de hibridación genosensores basados en un composite grafito-epoxi
$S_{\bar{x}}$ (ec. 11, § 4B.2.1)	$S_{\bar{x}} = 91.3$	$S_{\bar{x}} = 155.2$
S_p (ec. 12, § 4B.2.2.1)	$S_p = 120.5$	
Grados libertad (ec. 16, § 4B.2.2.3)	5	
Prueba t (bilateral) (ec. 14, § 4B.2.2.2)	$t_{\text{calc}} (6.24) > t_5 (2.57)$	

Nuevamente se puede concluir que las señales de hibridación obtenidas con los genosensores basados en un composite grafito-epoxi son mayores que en los genosensores de membranas recambiables debido a la utilización de la membrana de nylon que, como ya se explicara, actúa de barrera difusional disminuyendo la sensibilidad de los ensayos cuando éstos se realizan utilizando genosensores de membranas recambiables y, además, debido a factores inherentes a la porosidad y permeabilidad del nylon⁵⁰, que hace que la cinética de hibridación sea menos favorable sobre este soporte respecto al grafito-epoxi. Cabe destacar que el tiempo del procedimiento total de preparación de los genosensores de membranas recambiables es de 24 horas, mientras que en los genosensores basados en un composite grafito-epoxi es de 160 minutos.

Además, con los genosensores basados en un composite grafito-epoxi se detectaron cantidades menores de amplicón.

La desviación estándar relativa (ec. 2, § 4B.1.2) para los genosensores basados en un composite grafito-epoxi (del orden del 15 %), es comparable al de los genosensores de membranas recambiables (del orden del 13 %).

Es por eso que el mejor dispositivo genosensor para la detección de *Salmonella* sp es aquel en el que el amplicón IS200 se inmoviliza sobre el composite grafito-epoxi.

12.4 CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un nuevo dispositivo genosensor basado en un composite grafito-epoxi para la detección rápida y a nivel genético de *Salmonella* sp que –combinado con la amplificación por PCR de la secuencia de inserción IS200– requiere un tiempo de análisis considerablemente menor (6 a 8 h) respecto a los métodos de análisis microbiológicos clásicos (3 a 5 días) y respecto a los genosensores de membranas recambiables (28 a 30 h) (capítulo 8).
2. Se ha optimizado el procedimiento deshibridizante del analito presente como doble hebra e inmovilizado en el composite grafito-epoxi. El tratamiento deshibridizante que ha mostrado mayor efectividad es el alcalino posterior a la inmovilización del analito, frente al tratamiento por calor y enfriamiento brusco de la muestra previa a su inmovilización en el transductor grafito-epoxi.
3. Los protocolos de extracción del DNA cromosómico, de PCR, y de purificación del amplicón utilizados han dado resultados satisfactorios.
4. La detección del amplicón IS200 ha mostrado mayor sensibilidad si se utilizan genosensores grafito-epoxi respecto al uso de genosensores de membranas recambiables. Además, el tiempo de análisis es significativamente inferior (160 minutos frente a 24 h, respectivamente). La desviación estándar relativa es comparable para ambos tipos de dispositivos genosensores (del orden del 15 y 13 %, respectivamente).
5. 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 basado en un composite grafito-epoxi. Así, en total se reconocen 76 bases nitrogenadas de la secuencia IS200.
6. El método se puede simplificar aún más, mediante el acortamiento de procedimientos tales como extracción del DNA y eliminado el procedimiento de purificación de la banda.

12.5 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ P. Farreras Valentí y 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 G. H. McGall, in *Biochip Arrays and integrated devices for clinical diagnosis*, ed. W. Hori and E. Nagle; IBC Library Series: Southborough, 1997, pp. 2.1-2.33.
- ⁶ D. Ivnitski, I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, E. Wilkins. *Biosens. Bioelectron.* 1999, 14, 599-624.
- ⁷ R. K. Saiki, S. Scharf, F. Fallona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim. *Science* 1985, 230, 1350-1354.
- ⁸ M. J. Mc Pherson, P. Quirze, G. R. Taylor. *PCR 1. A Practical Approach*, Oxford University Press: Oxford, 1996.
- ⁹ 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.
- ¹⁰ A. C. Fluit, M. N. Widjoatmodjo, A. T. A. Box, R. Torensma, J. Verhoef. *App. Environ. Microbiol.* 1993, 59, 1342-1346.
- ¹¹ G. G. Stone, R. D. Oberst, M. P. Hays, D. S. McVey, M. M. Chengappa. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 1742-1749.
- ¹² S. Jitrapakdee, A. Tassanakajon, V. Boonsaeng, S. Piankijagum, S. Panyim. *Mol. Cell. Probes* 1995, 9, 375-382.
- ¹³ J. Kwang, E. T. Littledike, J. E. Keen. *Lett. App. Microbiol.* 1996, 22, 46-51.
- ¹⁴ C. Soumet, G. Ermel, V. Rose, N. Rose, P. Drouin, G. Salvat, P. Colin. *Lett. App. Microbiol.* 1999, 29, 1-6.
- ¹⁵ C. Lagatolla, L. Dolzani, E. Tonin, A. Lavenia, M. Di Michele, T. Tommasini, C. Monti-Bragadin. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 33, 775-777.
- ¹⁶ 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.
- ¹⁷ A. J. Bäumlér, F. Heffron, R. Reissbrodt. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 1224-1230.
- ¹⁸ G. G. Stone, R. D. Oberst, M. P. Hays, D. S. McVey, M. M. Chengappa. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 2888-2893.
- ¹⁹ W. Beyer, F. M. Mukendi, P. Kimmig, R. Böhm. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 1549-1554.
- ²⁰ A. A. Fadl, A. V. Nguyen, M. I. Khan. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 987-989.
- ²¹ 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.
- ²² C. H. Chiu, J. T. Ou. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 2619-1622.
- ²³ J. M. Luk, U. Kongmuang, R. S. W. Tsang, A. A. Lindberg. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 714-718.
- ²⁴ S. Lam, J. R. Roth. *Cell* 1983, 34, 951-960.
- ²⁵ S. Lam, J. R. Roth. *Genetics* 1983, 105, 801-811.
- ²⁶ I. Gibert, J. Barbé, J. Casadesús. *J. Gen. Microbiol.* 1990, 136, 2555-2560.
- ²⁷ I. Gibert, K. Carroll, D. R. Hillyard, J. Barbé, J. Casadesús. *Nucleic Acids Res.* 1991, 19, 1343.
- ²⁸ Y. Millemann, M. C. Lesage, E. C. Dancla, J. P. Lafont. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 173-179.
- ²⁹ J. Stanley, N. Baquar, A. Burnens. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 1206-1211.
- ³⁰ B. Liebisch, S. Schwarz. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 641-646.

-
- ³¹ 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.
- ³² A. Schiaffino, C. R. Beuzón, S. Uzzau, G. Leori, P. Cappuccinelli, J. Casadesús, S. Rubino. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 2375-2380.
- ³³ A. P. Burnens, J. Stanley, I. Sechter, J. Nicolet. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 1641-1645.
- ³⁴ M. Odaert, P. Berche, M. Simonet. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 2231-2235.
- ³⁵ F. Navarro, T. Llovet, M. A. Echeita, P. Coll, A. Aladueña, M. A. Usera, G. Prats. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 2831-2834.
- ³⁶ C. R. Beuzón, A. Schiaffino, G. Leori, P. Cappuccinelli, S. Rubino, J. Casadesús. *App. Environ. Microbiol.* 1997, 63, 2082-2085.
- ³⁷ E. Calva, L. G. Ordoñez, M. F. Mora, F. J. Santana, M. Bobadilla, J. L. Puente. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 3048-3053.
- ³⁸ J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2th ed.*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989.
- ³⁹ K. C. Reed, D. A. Mann. *Nucleic Acids Res.* 1985, 13, 7207-7221.
- ⁴⁰ R. K. Saiki, P. S. Walsh, C. H. Levenson, H. A. Erlich. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 6230-6234.
- ⁴¹ L. J. Kricka. *Nonisotopic DNA Probe Techniques*; Academic Press, Inc.: San Diego, 1992.
- ⁴² G. M. Church, W. Gilbert. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 1991-1995.
- ⁴³ J. Meinkoth, G. Wahl. *Anal. Biochem.* 1984, 138, 267-284.
- ⁴⁴ T. R. Gingeras, D. Y. Kwok, G. R. Davis. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 5373-5390.
- ⁴⁵ L. T. Kirby. *DNA Fingerprinting*; Stockton Press: New York, 1990.
- ⁴⁶ M. Renz, C. Kurz. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 3435-3444.
- ⁴⁷ L. Singh, K. W. Jones. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 5627-2638.
- ⁴⁸ A. C. Syvanen, M. Laaksonen, H. Soderlund. *Nucleic Acids Res.* 1986, 14, 5037-5048.
- ⁴⁹ S. F. Wolf, L. Haines, J. Fisch, J. N. Kremsky, J. P. Dougherty, K. Jacobs. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 2911-2926.
- ⁵⁰ E. Southern, K. Mir, M. Shchepinov. *Nature genetics Sup* 1999, 21, 5-9.

RESUMEN Y CONCLUSIONES GENERALES

PERSPECTIVAS FUTURAS DEL PRESENTE TRABAJO

La creciente demanda de información genética en campos cada vez más variados ha llevado al desarrollo de nuevas metodologías de análisis de DNA. El Proyecto Genoma Humano (PGH) ha contribuido en este punto en dos aspectos principales. En primer lugar, en favorecer la creación de metodologías analíticas que den información genética de manera rápida y fiable para poder culminarlo. El desarrollo de los chips de DNA ha cubierto estas demandas y se perfilan como dispositivos irremplazables en ciertos estudios e investigaciones que requieran llevar a cabo un amplio número de experimentos de análisis de DNA en paralelo, pero con aplicaciones concretas más bien acotadas. En segundo lugar, la información obtenida y los resultados derivados del PGH han generado nuevos mercados para la genética, abriendo las puertas a nuevas posibilidades analíticas. Para continuar con estos avances y explotar estos conocimientos, los dispositivos de análisis futuros deben reunir ciertas características tales como alta eficacia, rapidez, simplicidad y bajo coste.

En este contexto, en la presente tesis se ha planteado como objetivo la construcción de genosensores robustos y económicos y cuya utilización no requiera supervisión profesional. Por este motivo, los transductores electroquímicos fueron nuestros candidatos de estudio por sobre otras transducciones como la óptica.

Luego del estudio exhaustivo de las distintas metodologías de análisis existentes en la bibliografía en este campo, se evidenciaron distintos hechos. En primer lugar, se vio que los transductores electroquímicos más ampliamente utilizados y con resultados más interesantes eran los carbonáceos y los de oro. En segundo lugar, las inmovilizaciones de DNA que presentaban ciertas ventajas eran la covalente (por sus características favorables en cuanto a la cinética de hibridación) y la adsorción física (por su sencillez y bajo coste). En tercer lugar, y según nuestro criterio, hemos

evidenciado ciertas falencias en los métodos de detección del evento de hibridación en los genosensores electroquímicos existentes hasta el momento.

Todas estas conclusiones llevaron a delinear ciertas características del dispositivo genosensor a desarrollar en la presente tesis. Debido a la experiencia de nuestro grupo de trabajo y a las ventajas del material, nos decantamos hacia los transductores basados en composites rígidos y con detección amperométrica. Así, y en un principio, se abordaron dos líneas distintas: la primera, dirigida hacia la funcionalización de transductores rígidos para la inmovilización covalente del DNA y, la segunda, en la selección del mejor transductor carbonáceo para la inmovilización por adsorción del DNA.

De entre las distintas metodologías de inmovilización covalente del DNA tratadas en la bibliografía, la que se vio más conveniente fue la basada en la inmovilización del DNA funcionalizado con grupos $-NH_2$ sobre transductores modificados con grupos $-COOH$ mediante la reacción con una carbodiimida. Sin embargo, fueron infructuosos nuestros intentos de funcionalizar los composites rígidos con funciones carboxílicas, pese a que se probó que la reacción de inmovilización funcionaba de manera correcta. Este hecho, sumado a las desventajas que presenta una inmovilización covalente frente a la adsorción física (tales como necesidad de reactivos especiales, procedimientos más complejos, utilización de sondas funcionalizadas, tiempos de procedimientos más largos) llevó a que se decantasen nuestros esfuerzos hacia la inmovilización por adsorción física. Esta inmovilización es compatible con el desarrollo de dispositivos de fabricación masiva y de bajo coste. De hecho, muchos chips comerciales de DNA se basan en esta inmovilización.

Así, se han estudiado y caracterizado distintos transductores para conseguir este fin, y el que mostró propiedades físicas y electroquímicas extraordinarias fue el composite grafito-epoxi.

Debido a sus propiedades mecánicas y químicas, las membranas de nylon son el soporte por excelencia en los métodos de análisis clásicos de DNA. Incluso, este soporte se ha adaptado a nuevas circunstancias analíticas, y se utiliza en la actualidad para la construcción de chips de DNA. Los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática sobre este soporte son muy conocidos, están ampliamente descritos en la bibliografía y son utilizados de manera masiva en laboratorios de análisis genéticos. Por esto en una primera instancia nos planteamos la construcción de genosensores amperométricos de membranas recambiables en las que el DNA se inmovilice sobre el nylon. Por primera vez una membrana de nylon modificada con DNA se integró al transductor grafito-epoxi para la detección del evento de hibridación.

Se ha evaluado este genosensor de membranas recambiables basado en un transductor grafito-epoxi con diferentes secuencias génicas y en diferentes formatos (dot-blot, competitivo, de reconocimiento simple, doble y múltiple), con el objeto de validar el dispositivo para distintas situaciones analíticas. Incluso, se ha analizado una bacteria (salmonela) acoplado la PCR al genosensor de membranas recambiables. El tiempo de preparación de las membranas y de la detección con el genosensor fue de 24 hs. Las membranas de nylon con el DNA inmovilizado se pueden conservar al menos durante cinco meses, hecho fundamental si se quiere implementar el genosensor en forma de *kit*. En todos los casos, los genosensores de membranas recambiables mostraron funcionar correctamente.

Otro hecho que vale la pena destacar es que debido a las falencias mencionadas en las metodologías de detección del DNA en genosensores electroquímicos, se utilizó por primera vez un sistema de marcación basado en la enzima HRP, acoplada al DNA mediante la interacción biotina-

estreptavidina. Esta reacción, pese a ser utilizada ampliamente en protocolos clásicos, nunca hasta el momento se había utilizado en genosensores electroquímicos.

Sin embargo, el hecho de utilizar una membrana integrada a un transductor amperométrico implica la disminución de la sensibilidad en la detección. Por comparación del comportamiento electroquímico de los transductores grafito-epoxi-nylon y grafito-epoxi, se evidenció que este último presentaba una sensibilidad mucho mayor al primero, debido a que la membrana de nylon actúa como una barrera difusional. Así, se intentó por primera vez la inmovilización directa del DNA sobre el composite grafito-epoxi por adsorción física.

El genosensor basado en este tipo de transductor grafito-epoxi mostró unas propiedades excelentes. En comparación con los genosensores de membranas recambiables, las señales amperométricas fueron sensiblemente superiores con el composite grafito-epoxi, el tiempo de hibridación se consiguió reducir desde 15 horas a 45 minutos, se pudieron detectar de 10 a 100 veces menos cantidad de analito, y la adsorción inespecífica es notablemente inferior.

Todas estas observaciones se pueden explicar en parte por la mayor sensibilidad electroquímica del transductor grafito-epoxi pero, además, teniendo en cuenta ciertas características físicas y químicas de las superficies de dicho material composite.

El hecho de que el nylon sea más poroso y permeable que el composite rígido grafito-epoxi implica que la cinética de las reacciones sobre este soporte sea más complicada. La difusión del solvente y los solutos dentro de los poros del nylon cumplen un papel fundamental en este punto. Durante la inmovilización del DNA sobre este soporte, parte del mismo entraría en los poros y estaría menos disponible para su hibridación. Esto justifica el hecho de que se requiera más material genético para la inmovilización y para la posterior hibridación, y que los tiempos de hibridación sean mayores. En cambio, en el composite grafito-epoxi el DNA analito adsorbido tiene acceso inmediato a la sonda funcionalizada, reduciendo los tiempos de las reacciones y las cantidades de reactivos necesarias.

La adsorción inespecífica es casi nula en el composite grafito-epoxi. La permeabilidad de la membrana de nylon también justificaría la mayor adsorción inespecífica (que se debe al conjugado enzimático) respecto al composite grafito-epoxi. Pero también puede explicarse por la naturaleza química del composite, que es mixta aunque principalmente no polar, mientras que el nylon es de naturaleza hidrofílica. Este hecho permitió suprimir procedimientos usualmente utilizados con el nylon para el bloqueo de los sitios libres con el objeto de disminuir la adsorción inespecífica, acortando y simplificando aún más el protocolo.

Un hecho destacable es la diferencia en la capacidad adsortiva del composite grafito-epoxi cuando la adsorción se lleva a cabo en seco o en solución. Mientras que el DNA se adsorbe fuertemente al composite si la solución se deja secar en su superficie, si el mismo se encuentra en solución su adsorción es escasa. Pese a que muchos autores se han dedicado a interpretar la naturaleza de los fenómenos adsortivos del DNA sobre distintas superficies (incluso el nylon) sus conclusiones son escasas. Los fundamentos de la capacidad de la adsorción del DNA sobre distintos soportes son aún oscuros. No pretendemos dilucidar –por el momento– este comportamiento sobre el grafito-epoxi, aunque tal vez sus excelentes propiedades de adsorción en seco se deban a su porosidad superficial y a su naturaleza química dual. El DNA podría estabilizarse en el composite grafito-epoxi mediante su esqueleto fosfato-azúcar polar por interacciones electrostáticas con el grafito, o bien a través de los pares de bases no polares a la matriz polimérica mediante interacciones hidrofóbicas.

Finalmente, el genosensor basado en un composite grafito-epoxi se ha aplicado también a diversos formatos. El que ha mostrado mejores resultados ha sido el formato de captura. El analito, que no necesita estar funcionalizado, se encuentra en solución y el reconocimiento del mismo es doble. El formato de captura, además, posibilita la cuantificación del analito, y se han encontrado unos límites de detección de unos 100 fmoles. El formato de captura es el más idóneo para ser implementado en forma de *kit*, ya que permite tener pre-preparados los dispositivos genosensores con la sonda de captura inmovilizada. Los genosensores en un futuro se podrían fabricar con procedimientos planares de fabricación masiva, lo que aumentaría más sus perspectivas comerciales.

Un hecho observado que vale la pena destacar del formato de captura es que la hibridación es notablemente más efectiva cuando se realiza en un único paso, es decir, si se realiza la hibridación simultánea de la sonda de captura inmovilizada, el analito y la sonda funcionalizada con biotina respecto a que si se realiza secuencialmente la hibridación del analito con la sonda de captura y, posteriormente, la hibridación de este dúplex formado en la superficie con la sonda biotinilada. Estas observaciones experimentales confirman la importancia de la orientación y disponibilidad de las bases nitrogenadas en la cinética de la hibridación. Cuando se pretenda diseñar un genosensor, debe tenerse muy presente este hecho, porque el rendimiento de la reacción de hibridación puede ser notablemente diferente.

Además, los genosensores pueden medirse satisfactoriamente con equipamiento amperométrico portátil. La autonomía de la fuente de alimentación, su escaso peso y dimensiones reducidas posibilitan el uso de los genosensores para medidas de campo. Este tipo de equipo permite la conexión en serie de varios de ellos (los que se quiera) para el control simultáneo de numerosos electrodos de manera independiente, utilizándose la misma celda. Así, se podría en un futuro construir arreglos de genosensores multiparamétricos.

Se vio que, además de la marcación enzimática del DNA basada en la reacción biotina/estreptavidina-HRP, también puede utilizarse de manera satisfactoria una marcación alternativa basada en una reacción inmunológica, mediante el conjugado antiDIG-HRP. Pese a que se ha demostrado que la presencia de biotina en una muestra no constituye una interferencia para el genosensor basado en un composite grafito-epoxi con marcación basada en el conjugado estreptavidina-HRP, la validación de la marcación inmunológica abre una nueva perspectiva en la construcción de genosensores en formato de captura basados en composites de avidina. El DNA analito se haría reaccionar (en solución) con dos sondas complementarias a dos regiones diferentes, una de ellas marcada con biotina para la inmovilización en el biocomposite, y la otra con digoxigenina para la marcación enzimática basada en la reacción inmunológica.

Este tipo de dispositivos tendría una gran versatilidad comercial, ya que los transductores serían los mismos para cualquier secuencia que se desee investigar, y serían ideales para su implementación como *kit* genosensor.

Finalmente, se ha demostrado la utilidad de los dispositivos genosensores desarrollados en la determinación de *Salmonella*, mediante el acoplamiento de la PCR y la detección del amplicón con el genosensor amperométrico. El procedimiento total de análisis fue de 6 a 8 hs, en contraste con los 3 a 5 días requeridos para la determinación con métodos microbiológicos clásicos.

El nuevo dispositivo genosensor que se ha desarrollado, basado en un composite grafito-epoxi, cumple con todos los requerimientos que se habían planteado en los objetivos: es robusto, sensible, de bajo coste, capaz de ser miniaturizado y de ser construido en distintas configuraciones,

su uso es sencillo y su respuesta es rápida, se ha demostrado su capacidad de ser utilizado para medidas de campo, y es viable su implementación en *kits* genosensores. Además, puede aplicarse a diversas situaciones analíticas –sólo se debe diseñar el experimento con la secuencia del problema analítico que se pretenda resolver–, en campos de análisis genético tan variados como medicina, biotecnología y biología molecular y en determinaciones forenses, medioambientales y, principalmente, industriales.

GLOSARIO

Alelos: diversas variedades de un mismo gen situado en un locus específico del genoma. Cada uno de genes que ocupan el mismo lugar en los *cromosomas homólogos*.

Aminoácido: unidad estructural de una proteína. Los aminoácidos que forman parte de las proteínas naturales son 20.

Banda de DNA: fragmento de restricción DNA que se observa luego del tratamiento de una muestra a análisis por Southern blot (enzimas de restricción, electroforesis, transferencia e hibridación con sondas marcadas).

Cebador (en inglés *primer*): secuencia corta de ssDNA (20 mer aproximadamente), que se hibrida en el extremo 5' de una simple hebra de DNA que va a replicarse. El cebador es el punto de iniciación para la adición de desoxirribonucleótidos trifosfatos en la replicación del DNA.

Código genético: es la información necesaria para la construcción de proteínas, función primordial del DNA. Se encuentra codificada en los genes mediante tripletes de bases nitrogenadas (*codones*) cuya lectura se traduce en un aminoácido de la secuencia proteica.

Código genético degenerado: Fenómeno por el cual más de un triplete de bases de nucleótidos de DNA codifican para el mismo aminoácido. Así, por ejemplo, CGU, CGC, CGA, CGG, AGA y AGG codifican para la traducción a arginina.

Codón: triplete de bases nitrogenadas del DNA que codifica para una aminoácido de una proteína. Véase código genético.

Complementariedad: término que se refiere a la propiedad de dos hebras de DNA de formar un dúplex o híbrido, por asociación mediante puentes de hidrógeno de sus bases complementarias. Este es el fundamento de la especificidad de la reacción entre dos moléculas de ssDNA.

Cromosomas: estructura nuclear que posee, en los organismos eucarióticos, una porción del genoma. Son formaciones más o menos alargadas, constituidas por dos elementos denominados cromátides, que se encuentran unidos por una constricción de posición variable, de manera que cada cromosoma posee dos brazos. En el hombre, hay 46 cromosomas, formando dos pares de 22 cromosomas homólogos (los autosomas) y 2 cromosomas sexuales. Los organismos procarionóticos (como las bacterias) poseen un único cromosoma circular. Desde el punto de vista químico, el principal componente de los cromosomas es el DNA, y también, en menor medida, RNA, proteínas, lípidos y diversos iones. Su nombre deriva de su capacidad de teñirse en preparaciones citológicas, debido a su gran contenido proteico.

Cromosomas homólogos: constituyen el par de cromosomas que se encuentran duplicados en el núcleo celular, pero que no son iguales, es decir, poseen genes que codifican la misma información, deviniendo uno por parte paterna y el otro por parte materna. Por ejemplo, el par de cromosomas número 21 son cromosomas homólogos. En cada cromosoma del par homólogo, las copias de cada gen se encuentran en la misma posición de cada cromosoma (*locus*).

DNAasa (sinónimo: desoxirribonucleasa): enzima capaz de escindir el DNA a fragmentos pequeños.

DNA polimerasa: enzima que cataliza la unión de desoxirribonucleótidos trifosfato a una cadena de ssDNA. El producto final de la reacción es la unión del desoxirribonucleótido monofosfato (unidad polimérica) a la cadena con pérdida de pirofosfato, que otorga la energía necesaria para que se produzca la reacción de manera irreversible.

Doble hélice (sinónimos: dúplex, dsDNA, híbrido): conformación estructural en la que se encuentra de manera natural el DNA. Se genera mediante unión de dos hebras simples (ssDNA) de DNA (polinucleótidos complementarios) mediante la unión de las bases complementarias A con T y C con G, mediante establecimiento de puentes de hidrógeno entre ellas. Véase *complementariedad*.

Dot-blot: metodología de análisis del DNA en la cual la muestra es directamente aplicada sobre una membrana y determinada mediante hibridación con una sonda marcada.

Dot-blot reverso: metodología de análisis del DNA en la cual la muestra está marcada y se somete a hibridación con una sonda directamente aplicada sobre una membrana.

Dúplex: véase doble hélice.

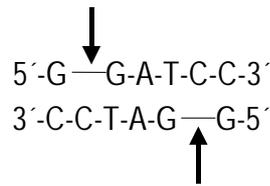
Electroforesis: procedimiento de separación de moléculas cargadas en un soporte poroso mediante la aplicación de un campo eléctrico. Los fragmentos de DNA cargados negativamente a un pH por encima de su punto isoelectrónico, pueden separarse en un medio poroso como es un gel de agarosa, mediante la aplicación de un campo eléctrico. Los fragmentos de DNA se separan en función de su tamaño, siendo los fragmentos más pequeños los que se mueven más rápidamente en el soporte.

Endonucleasas de restricción: véase *enzimas de restricción*.

Enzima: molécula de naturaleza proteica que cataliza una reacción química o bioquímica.

Enzimas de restricción (sinónimo: endonucleasas de restricción): enzimas que actúan como escindidoras de moléculas de dsDNA en sitios específicos (sitios de restricción). Estas enzimas reconocen *secuencias de bases palíndromas* específicas y cortan el dsDNA en este sitio. Las secuencias a reconocer son diferentes para cada enzima. Las enzimas de restricción se denominan según la especie bacteriana que le dio origen, por ejemplo, Eco RI deriva de *E. coli* RY 13.

Bam H I, por ejemplo, cliva el DNA en la siguiente secuencia:

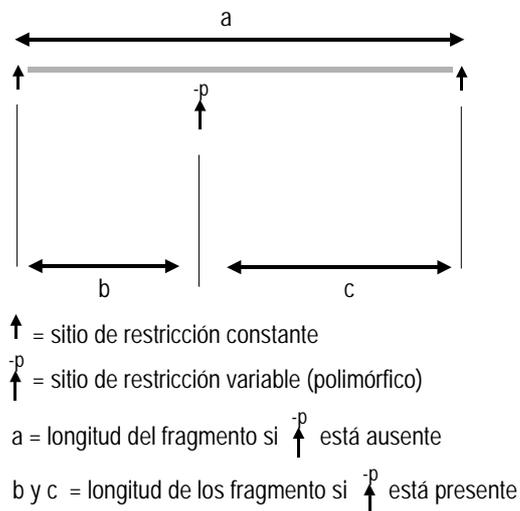


Eucariótico: Término que se refiere a organismos eucariotas, es decir, a organismos multicelulares que poseen células con núcleos verdaderos envueltos en una membrana celular que contienen los cromosomas que se dividen por *mitosis*.

Exón: Porción de un gen que, una vez que se une con otros exones luego del corte y emplame del mRNA, codifica para la formación de una proteína.

Fragmentos de restricción: trozos de DNA procedente de la digestión de un gen con enzimas de restricción.

Fragmentos de restricción de longitud variable (abreviatura: RFLP, del inglés *restriction fragment length polymorphism*): fragmentos de DNA de diferente longitud producidos por la acción de enzimas de restricción en un sitio de restricción. Aunque dos individuos de la misma especie tienen genomas casi idénticos, los mismos siempre diferirán en unos pocos nucleótidos. Algunas de estas diferencias pueden producir nuevos sitios de restricción, o eliminar otros. Si la endonucleasa de restricción reconoce y escinde el DNA en un sitio de restricción variable (es decir, polimórfico), el patrón de bandas se verá obviamente afectado.



Gen: unidad básica de transmisión de los caracteres genéticos contenidos en los cromosomas y constituido por DNA.

Hibridación: reacción específica que ocurre entre dos hebras de ssDNA complementarias para formar el dúplex o híbrido de DNA. Esta unión ocurre mediante establecimiento de puentes de hidrógenos específicos entre las bases nitrogenadas complementarias de cada una de las hebras de DNA.

Híbrido: véase doble hélice.

Intrón: Segmento de DNA no codificante que se localiza entre secuencias génicas codificantes (*exones*) de un gen específico de un organismo multicelular y que se transcribe a mRNA pero que, antes de su traslado al citoplasma celular, es cortado y degradado. En un gen se presentan normalmente un número variable de intrones de longitudes distintas separados entre sí por exones.

Linfocito B: célula del tejido sanguíneo que pertenece al grupo de los glóbulos blancos (o leucocitos); es el responsable de la inmunidad humoral, es decir, a la producción de inmunoglobulinas para la defensa del organismo frente a agresiones externas.

Lisado: metodología mediante la cual se rompen las membranas celulares y se libera el contenido soluble del interior de las células.

Loci (singular: **locus**): término que se refiere a las posiciones ocupadas por genes que codifican la misma información en el par de *cromosomas homólogos*.

Locus: posición específica que ocupa un gen en un cromosoma

Mapa de restricción: patrón de bandas obtenido luego de someter una muestra de DNA a enzimas de restricción y a su correspondiente análisis por Southern blot y que se utiliza para las pruebas de identificación de DNA, ya que es característico de cada individuo (excepto gemelos idénticos).

Mer: sufijo que antecede un número, y que representa la cantidad de bases nitrogenadas de un oligonucleótido, normalmente de naturaleza sintética.

Método autorradiográfico: término que se refiere a la exposición a radiaciones X de un soporte sólido que posee la muestra de DNA (tratada con enzimas de restricción y separadas mediante electroforesis, o no) y que fuera hibridada con sondas de DNA marcadas con isótopos de alta energía (P^{32}). El producto obtenido es un autorradiograma o autorradiografía.

Metodología de secuenciación del DNA: el objeto de este procedimiento es descifrar el código de un gen de interés, mediante el conocimiento del orden y tipo de las bases nitrogenadas que componen una secuencia génica.

Metodología de hibridación del DNA: el fundamento de este procedimiento es poner en contacto una muestra génica incógnita de ssDNA con una sonda de DNA de secuencia conocida y que se encuentra marcada. Si existe hibridación, es decir, si hay reacción entre la secuencia incógnita y la sonda conocida y marcada, habrá señal analítica debido a la marca y se sabrá que la muestra incógnita posee en su estructura una secuencia complementaria a la que posee la sonda.

Mitosis: proceso por el cual el núcleo de una célula somática se divide para formar dos núcleos hijos idénticos, luego de la replicación cromosómica.

Mutación: es un cambio o alteración de las bases nitrogenadas que afecta a un gen. Es un proceso que puede ocurrir de manera espontánea o por agentes externos. Las mutaciones pueden ser puntuales (cuando únicamente afecta un sector muy reducido de la cadena de DNA), o bien pueden afectar a un segmento entero y por lo tanto tener implicancia en diversos genes simultáneamente.

Nucleósido: molécula formada por una desoxirribosa (en el caso del DNA) o ribosa (en el RNA), y una base nitrogenada púrica (adenina o guanina) o pirimidínica (citosina o timina para el DNA o citosina o uracilo para el RNA).

Nucleótido: unidad estructural del polímero del DNA (desoxirribonucleótidos) y RNA (ribonucleótidos), compuesta por un nucleósido esterificado con una molécula de fosfato. Los

nucleótidos pueden estar también en su forma libre (es decir, sin formar parte del polímero), esterificados con tres moléculas de fosfato (desoxirribonucleótidos trifosfato).

Número variable de repeticiones en tandem (abreviatura: VNTR, del inglés *variable number of tandem repeats*): término que se refiere a la repetición de una secuencia de bases en un número variable, en un locus específico del genoma. La variación de la longitud de los alelos formados por estas secuencias repetidas en tandem, que es función del número de veces que se repite, es la base de una identificación individual característica de un individuo.

Oligonucleótido: polímero compuesto por pocos nucleótidos (usualmente menos de 100). Los oligonucleótidos son normalmente sintéticos y se utilizan como cebadores en reacciones de PCR así también como sondas de DNA.

Patrón de bandas: véase *mapa de restricción* y *bandas de DNA*.

Polimorfismo: más de una variante de un alelo en un determinado locus cromosómico. Si existen distintas variantes en una población de un gen en un locus específico del genoma, éste locus es polimórfico.

Polinucleótido: polímero compuesto por unidades repetitivas de nucleótidos. Cada una de las hebras simples que componen la doble hélice del DNA son polinucleótidos.

Primer: Véase *cebador*.

Proteasa: enzima capaz de degradar una proteína a fragmentos más pequeños.

Proteína: molécula biológica que, desde el punto de vista químico, se considera un polímero de unidades (aminoácidos). Las células están formadas en gran parte por proteínas, que constituyen más de la mitad del peso seco de una célula. Las proteínas determinan la forma y estructura de la célula, y también actúan como instrumento de reconocimiento molecular y de catálisis.

Proteínasa K: enzima hidrolítica utilizada en la digestión de proteínas a aminoácidos.

Puente de hidrógeno: unión relativamente débil entre un átomo de H (unido covalentemente a un átomo de N o de O), con otro átomo. (de O o N fundamentalmente). Este tipo de interacción une las hebras complementarias de ssDNA. Puede romperse con el aumento de la temperatura.

Reacción en cadena de la polimerasa (abreviatura: PCR, del inglés *polymerase chain reaction*): se basa en la amplificación in vitro de regiones específicas de dsDNA en más de un millón de veces usando una enzima, la Taq DNA polimerasa.

Replicación: término que se refiere a la duplicación del material genético inmediatamente antes de la división celular.

Secuencias de bases palíndromas: término que se refiere a aquellas secuencias génicas que leídas en un sentido (3' a 5') o en otro (5' a 3'), son iguales.

Secuencias repetidas en tandem: término que se refiere a la duplicación de una serie de trozos idénticos de DNA. Véase número variable de repeticiones en *tandem*.

Sitios de restricción: son los puntos de acción de las enzimas de restricción sobre el dsDNA. En este punto, las *endonucleasas de restricción* escinden el DNA. Existen sitios de restricción relativamente constantes y altamente conservados, mientras que otros son altamente polimórficos, es decir, varían entre individuos. Es el fundamento de la identificación de las personas mediante análisis de DNA, ya que al modificarse la posición de estos sitios de restricción, las enzimas generan fragmentos de diferente longitud, y, por lo tanto, un patrón de bandas característico para cada individuo. Véase *enzimas de restricción* y *fragmentos de restricción de longitud variable*.

Slot-blot: técnica similar al dot-blot, con la diferencia que en este caso se utiliza una máquina que realiza vacío para inmovilizar varias muestras simultáneamente y en un patrón determinado.

Sonda de DNA (en inglés *probe*): segmento de ssDNA, normalmente de origen sintético y de una longitud de entre 20 y 50 mer, que puede ser marcado con P³² u otro tipo de moléculas e hibridado con su secuencia complementaria.

Southern blot: metodología de análisis de DNA en el cual la muestra se somete a digestión enzimática, electroforesis y *transferencia de Southern*.

Taq DNA polimerasa: es una enzima de tipo DNA polimerasa aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*. Esta enzima es capaz de soportar altas temperaturas y es, por lo tanto, muy útil para llevar a cabo la polimerización durante la reacción de PCR:

Traducción: término que se refiere a la transferencia de la información genética desde una molécula de RNA a la molécula operativa desde el punto de vista biológico: la proteína.

Transferencia de *Southern*: técnica desarrollada por E. Southern para la transferencia directa de fragmentos de DNA desde un gel de agarosa a un soporte sólido como una membrana de nylon o de nitrocelulosa. La transferencia se produce por capilaridad utilizando una solución salina.

Transcripción: término que se refiere a la copia de la información genética desde una molécula de DNA a otra de RNA.