
INMOVILIZACIÓN DE DNA EN UNA MEMBRANA DE NYLON

INTEGRACIÓN DE LA MEMBRANA DE NYLON MODIFICADA A UN TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI.

CONSTRUCCIÓN DE GENOSENSORES DE MEMBRANAS RECAMBIABLES EN FORMATO DOT-BLOT.

4.1 INTRODUCCIÓN

El primer factor a tener en cuenta en el diseño de un genosensor es el tipo de señal analítica que se quiera obtener. Debido a las ventajas potenciales citadas en § 1.4.2.3, se seleccionó como metodología analítica la técnica amperométrica ¹⁻⁵. Cabe destacar que esta metodología no ha sido utilizada antes en la construcción de genosensores. Seguidamente, se debe seleccionar un transductor adecuado teniendo en cuenta que posteriormente el material genético debe inmovilizarse sobre él.

Con este objeto, se procedió a la construcción de transductores amperométricos basados en composites rígidos modificados. Los resultados que se muestran en §§ 2.3.1 a 2.3.4 y en §§ 3.3.3 y 3.3.4, permitieron concluir que la modificación de estos transductores con grupos –COOH fueron infructuosas. Posteriormente, se procedió a evaluar la metodología que se pretendía utilizar para inmovilizar el material genético sobre superficies modificadas con grupos –COOH. Así, en una primera instancia, se consiguió inmovilizar de manera covalente peroxidasa, utilizando como reactivos EDC y NHS ⁶⁻¹⁷, sobre un transductor de pasta de grafito modificado con ácido esteárico ^{18,19} basándose en los residuos –NH₂ de los aminoácidos básicos de la enzima (§ 3.3.5). Sin embargo, este tipo de transductor posee propiedades mecánicas indeseables ²⁰, por lo que esta prueba sólo sirvió para evaluar la metodología de inmovilización. Sin embargo, se debería continuar en la línea de construir nuevos transductores basados en composites rígidos funcionalizados con grupos –COOH para aplicar la metodología de inmovilización covalente evaluada en § 3.3.5.

En este capítulo se describe el desarrollo de genosensores sobre un transductor electroquímico nuevo, no descrito hasta el momento. Este transductor consiste en un composite grafito-epoxi con una membrana de nylon tipo HYBOND™ integrada a él.

El composite grafito-epoxi fue seleccionado –para la posterior integración de la membrana de nylon– de entre otros transductores rígidos evaluados por los resultados obtenidos en § 2.3.5.1. Dicho composite, además, mostró características tecnológicas deseables, tales como una excelente reproducibilidad en la construcción de sensores de un mismo lote (§ 2.3.5.3) y una muy buena reproducibilidad en la obtención de superficies frescas mediante pulido (§ 2.3.5.4). La evaluación electroquímica del transductor grafito-epoxi- HYBOND™ se ha realizado en §§ 2.3.6 y 3.3.2.

En cuanto al tipo de membrana, ampliamente utilizada en metodologías clásicas de análisis de DNA ²¹⁻³⁵, el material genético se adsorbe de manera efectiva debido a las características de la misma ³⁶, ya que posee un potencial Z superficial positivo entre pH 2.0 y 12.0. Teniendo en cuenta que el DNA es un polianión, esta atracción electrostática estabiliza la adsorción del material genético.

Luego de la selección y evaluación del transductor, es necesario escoger un sistema de detección adecuado, ya que por amperometría (al menos por el momento) no es posible detectar sin marcación el evento de hibridación. En este caso, se seleccionó un sistema enzimático basado en la peroxidasa. La caracterización del sistema de detección enzimático fue descrita en § 3.3.1 y se han aplicado las mismas condiciones en el presente capítulo, en cuanto a la utilización de la hidroquinona como mediador y de las condiciones de detección amperométrica de la enzima (medio, pH, sustrato y potencial).

Para que la enzima peroxidasa se una al híbrido de DNA, se seleccionó un formato compuesto basado en el sistema biotina-estreptavidina ^{32,33} (véase § 1.2.4.2).

El sistema de complejación biotina-estreptavidina se considera de gran utilidad en muchos campos, como puede ser en inmovilización sobre distintas superficies ^{17,31,37-49} y en conjugaciones a moléculas de variada naturaleza (enzimas, anticuerpos) ^{21,22,32,33,47,50-52}.

La estreptavidina es una gran proteína tetramérica (70 kD) que incorpora cuatro sitios de unión idénticos. La biotina es una molécula pequeña que se une con gran afinidad al sitio de unión con una constante de afinidad de $1 \cdot 10^{15} \text{ M}^{-1}$. Este valor es casi cercano al de unión covalente. Debido a su fuerte interacción, la formación del complejo casi no se afecta con pH y temperaturas extremas, con solventes orgánicos y con agentes desnaturizantes ^{31,53}.

La unión de la estreptavidina con la biotina permite el acoplamiento de enzimas conjugadas con estreptavidina a oligonucleótidos biotinilados ^{21,22,32,33,50,51}.

Así, se adsorbe sobre el transductor la secuencia de DNA que se desea detectar (analito) que posteriormente se hibrida con una sonda complementaria biotinilada. En un paso posterior, se expone el híbrido formado al conjugado estreptavidina-HRP (Figura 4.1).

Si el formato que se plantea se quiere aplicar a una muestra real, ésta debería inmovilizarse en la membrana. El hecho de que la muestra se encuentre inmovilizada en un soporte sólido implica que la efectividad de la hibridación sea menor que en solución ^{10,13,27,28,49,54}, por lo que una gran cantidad de analito se desaprovecharía y no estaría disponible para hibridarse con una sonda sintética funcionalizada ²⁷. Otra desventaja añadida es que debe prepararse un sensor para cada muestra a analizar y dificultaría, en un futuro, la automatización del proceso de preparación del sensor.

Una manera de solucionar este inconveniente es mediante la amplificación por PCR del analito utilizando en la reacción mononucleótidos o *primers* funcionalizados con biotina, de manera que el producto de la amplificación sea secuencias idénticas a la muestra, pero biotiniladas ^{21,33} (véase Figura 1.15, § 1.2.2).

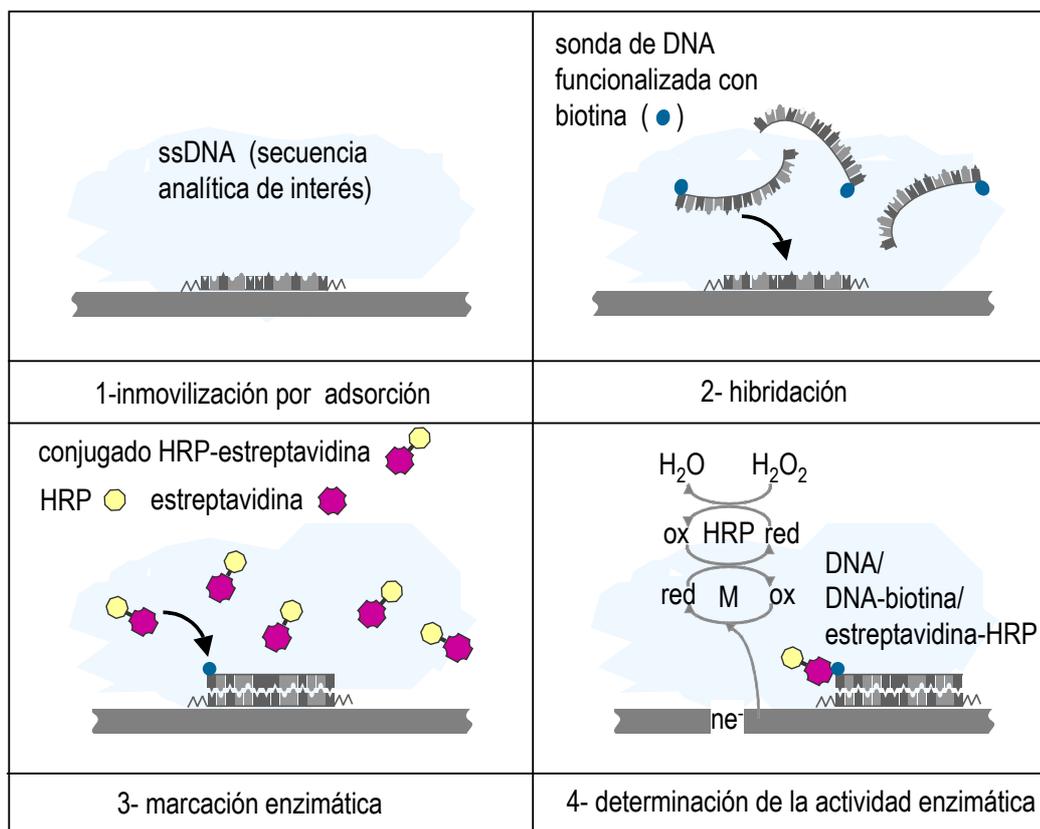


Figura 4.1. Esquema del formato del genosensor desarrollado, basado en un sistema compuesto de acoplamiento de la marca enzimática (HRP) a la sonda mediante la reacción de complejación biotina-estreptavidina

En este caso, se podría aplicar este formato inmovilizando en la membrana un oligonucleótido sintético sin funcionalizar y colocando en solución la muestra biotinilada procedente de la PCR, que sería la encargada de dar la señal analítica (véase Figura 1.18, § 1.2.4.3).

Existen otras posibilidades de formatos, si se quiere trabajar con el analito proveniente directamente de la muestra sin inmovilización ni funcionalización; éstos son los formatos de captura o sandwich ^{27,47-49,55} y competitivo (véase § 1.2.4.3).

En el Apéndice A del capítulo 4, se describirán los detalles de la puesta a punto de un genosensor en formato competitivo, con un esquema de detección similar al descrito en el presente capítulo.

4.2 EXPERIMENTAL

4.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS

4.2.1.1 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.

4.2.1.2 Reactivos y materiales

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

Las membranas de nylon integradas al composite grafito-epoxi fueron HYBOND™ N(+) (Amersham)³⁶. Para la preparación del transductor se utilizó también nylon de apertura de malla de 40 (DIN 130-40 tup 2221).

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) (Boehringer, actualmente 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

Se encargó la síntesis de las siguientes sondas de DNA modelo, a Boehringer:

- Oligonucleótido N° 1 (dT(20)-dG(25), analito inmovilizado en la membrana):

5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GGG GGG GGG GGG GGG GGG GGG GGG-3'

Características del producto:

$T_m \geq 75$ °C; GC = 55.6 %; cantidad de DNA: 15.8 OD, 473 μg , 33.2 nmol; P.M.: 14252 g/mol; purificación: HPLC

NOTA: La secuencia de este oligonucleótido modelo se seleccionó para que posteriormente pueda inmovilizarse de manera covalente utilizando la metodología basada en la reactividad de los residuos consecutivos de guanina a un transductor funcionalizado con grupos -COOH mediante la reacción de EDC-NHS optimizada en §§ 3.2.3 y 3.3.5. Así, luego de la inmovilización que emplea los 25 residuos de guanina, la secuencia a hibridar (secuencia analítica) es dT₍₂₀₎.

- Oligonucleótido N° 2 (sonda biotinilada):

5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA-3'-biotina

Características del producto:

$T_m \geq 38.3$ °C; GC = 0 %; cantidad de DNA: 6.6 OD, 142 μg , 21.4 nmol; P.M.: 6608 g/mol; purificación: HPLC.

- Oligonucleótido N° 3 (sonda interferente):

5'-AAA A \underline{C} A AAA A \underline{T} A AAA A \underline{G} A AA-3'

Características del producto:

T_m ≥ 40.9 ° C; GC = 10 %; cantidad de DNA: 8 OD, 171 μg, 27.6 nmol; P.M.: 6185 g/mol; purificación: HPSF (*high purified salt free*).

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

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

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

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 deshibridizante 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH
- solución neutralizadora 1.5 M NaCl, 0.5 M TRIS, 1 mM de EDTA disódico, pH 7.2
- 10 X PBS 1.3 M NaCl, 0.1 M de fosfato sódico, pH 7.2

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

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

- 1.-Inmovilización del oligonucleótido N° 1 –dT(20)-dG(25)– en la membrana de nylon HYBOND™.
- 2.-Tratamiento de prehibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el analito (bloqueo de los sitios libres de la membrana).
- 3.-Hibridación del analito soportado en las membranas de nylon HYBOND™, utilizando un formato dot-blot.
- 4.-Marcación enzimática posthibridación de los híbridos formados en la membrana.

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

4.2.3 INMOVILIZACIÓN DE dT(20)-dG(25) EN LA MEMBRANA DE NYLON HYBOND™

En este primer paso de la preparación de la membrana, anterior a su integración al transductor, se debe inmovilizar la secuencia de interés analítico (ssDNA) sobre la membrana de nylon (Figura 4.1, paso N° 1)

Esta inmovilización debe ser lo más efectiva posible para que el DNA no se desorba de la membrana y, además, es deseable que la misma no afecte los parámetros de hibridación.

En las secciones siguientes se describe y selecciona la metodología más adecuada de inmovilización del material genético.

4.2.3.1 Evaluación de las metodologías de inmovilización del DNA en nylon

Para la fijación de DNA a este tipo de membrana, la metodología que brinda la máxima reproducibilidad es el entrecruzamiento mediante radiación UV a 254 nm ^{21,24,30,32,36,56}. Esta es la metodología recomendada por los fabricantes de las membranas, debido a que es más rápida (2 a 5 min. de exposición) y porque el DNA se une covalentemente a la membrana ³⁰, aumentando así la señal de hibridación obtenida. La inmovilización por radiación UV se fundamenta en la formación de entrecruzamientos y acoplamientos entre una pequeña fracción de residuos de T del DNA (que se activan con la luz) y los grupos amino primario de la membrana de nylon ^{21,30,56}.

La fijación por radiación UV requiere equipamiento especializado (transiluminadores UV), que deben estar calibrados, ya que el tiempo de exposición y la intensidad de la radiación es crucial para una inmovilización adecuada.

La optimización del tiempo de exposición es crítica, debido a que una irradiación excesiva del DNA provocaría que una alta proporción de residuos T se unan de manera covalente al soporte, decreciendo así la señal analítica, debido a que el DNA adsorbido en la membrana se modifica químicamente, disminuyendo de manera drástica su capacidad de hibridarse con la secuencia complementaria ^{21,36}. Este hecho impone una seria limitación de la utilización de radiación UV para inmovilizar el DNA ³⁶.

Las calibraciones de los transiluminadores se realizan periódicamente mediante ensayos dot-blot y realizando metodologías de hibridación, siendo la única variable el tiempo de exposición. Así se selecciona el tiempo de exposición que genere mayor señal analítica.

Sin embargo, existen otras posibilidades de mayor accesibilidad como es la fijación alcalina o por calor que tienen como ventaja principal su simplicidad, ya que no requieren equipamiento especializado y no implica el riesgo de someter al personal de laboratorio a radiaciones peligrosas.

La fijación alcalina se basa en exponer la membrana con el DNA inmovilizado a una solución básica (0.4 M de NaOH) durante 20 minutos. La desventaja que presenta este tratamiento es que normalmente genera mayores niveles de señal inespecífica, que puede ser solucionado aumentando la concentración de agentes bloqueantes en el paso posterior de hibridación ^{30,32}.

La fijación por calor se basa fundamentalmente en la adsorción del DNA sobre el soporte. Se realiza sometiendo la membrana modificada con DNA a una temperatura de 80 °C durante un tiempo de entre 30 minutos a 2 h ^{22,23,30,36}. Para las membranas HYBOND™ no se requiere una estufa de vacío. La adsorción del DNA sobre el soporte se fundamenta en interacciones de tipo electrostáticas ⁵⁷. Para el caso de las membranas de nitrocelulosa, el DNA se retiene mejor en soluciones de alta fuerza iónica. Esto se debe a que un aumento en la concentración de sales se relaciona con una menor repulsión electrostática entre los grupos fosfatos del DNA y el soporte. En cambio, el nylon tiene, además de una mejor resistencia mecánica, una mayor capacidad de retención del DNA inmovilizado que las membranas de nitrocelulosa. Además, son capaces de inmovilizar de manera efectiva DNA en soluciones de baja fuerza iónica. Las membranas de nylon con cargas positivas (como es el caso de

las membranas HYBOND™) otorgan una interacción iónica estable entre los grupos fosfatos del DNA cargados negativamente ⁵⁷.

La fijación por calor es la metodología que se ha adoptado para la inmovilización del DNA sobre las membranas de nylon en el presente trabajo.

4.2.3.2 Preparación del DNA que será inmovilizado

Se tomó un volumen de solución de DNA –en este caso dG(25)-dT(20)– que se pretendía inmovilizar y se agregó un volumen idéntico de una solución 20 X SSC, de manera que el DNA se diluyó al medio en una solución de 10 X de SSC. Esta solución se calentó a 95 °C durante 5 min ^{30,32}. Este tratamiento provoca la deshibridación de la doble hebra de DNA, de manera que se genera ssDNA capaz de hibridarse con su sonda complementaria funcionalizada. Luego del calentamiento, se colocó esta solución inmediatamente en hielo. Este enfriamiento rápido permite que las secuencias queden como ssDNA.

4.2.3.3 Protocolo de inmovilización de dT(20)-dG(25) en las membranas de nylon

- 1.- Se prehumedecen las membranas de nylon en 10 X SSC.
- 2.- Se agregan 2 µl (de la solución final obtenida del procedimiento de preparación del DNA, § 4.2.3.2) sobre las membranas de nylon prehumedecidas. Para cada nueva adición, se espera que la alícuota anterior se seque completamente, a temperatura ambiente. Se repite tantas veces como material genético se desee inmovilizar.
- 3.- Se humedecen las membranas con solución deshibridante durante 5 min. Este procedimiento facilita la ruptura de los puentes de hidrógeno, asegurando que todo el material genético se encuentre como ssDNA y sea susceptible a hibridarse con su secuencia complementaria.
- 4.- Se transfieren las membranas a solución neutralizadora por 1 minuto.
- 5.- Se colocan las membranas sobre papel absorbente durante 30 minutos.
- 6.- Se procede a la fijación del DNA al soporte. Se envuelven las membranas con papel de filtro y se transfieren a una estufa, a 80 °C durante 2 horas.

4.2.3.4 Conservación de las membranas de nylon modificadas con el DNA

Una vez inmovilizado el material, si la membrana no va a usarse inmediatamente, puede conservarse envuelta en papel de aluminio a 4 °C.

4.2.4 TRATAMIENTO DE PREHIBRIDACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE NYLON HYBOND™ MODIFICADAS CON EL ANALITO

El principal objeto del tratamiento de prehibridación es bloquear –mediante moléculas de alto peso molecular de naturaleza diversa (proteínas, polisacáridos, DNA)– los sitios libres de las membranas de nylon (no ocupados por la secuencia de ssDNA analito adsorbida durante la

inmovilización). De esta manera, la sonda biotinilada (a la que será expuesta posteriormente la membrana en el paso de hibridación) tiene más probabilidad de unirse a su secuencia complementaria y se evita así que se adsorba de manera inespecífica a la membrana (Figura 4.2 - véase también la Figura 4.4).

Se han descrito numerosos métodos de prehibridación para conseguir el bloqueo de soportes sólidos. Estos métodos difieren en variables como ³⁰:

- Solvente y temperatura utilizados (por ejemplo, 68 °C en soluciones acuosas o 42 °C en 50 % v/v de formamida).
- Volumen de solución de reacción y tiempo del tratamiento de prehibridación (volúmenes grandes para períodos de tiempo mayores o volúmenes mínimos para tiempos menores).
- Grado de agitación.
- Uso de diferentes agentes bloqueantes para evitar la posterior unión inespecífica de la sonda biotinilada al soporte sólido.
- Uso de compuestos como dextranos o polietilenglicol para aumentar la concentración efectiva de los reactivos en la solución de prehibridación.

Aunque la elección de la metodología óptima depende en gran medida de las preferencias personales, en las secciones siguientes se da una breve guía para la elección entre las metodologías disponibles, describiéndose también los reactivos más comunes utilizados en el tratamiento de prehibridación y su función.

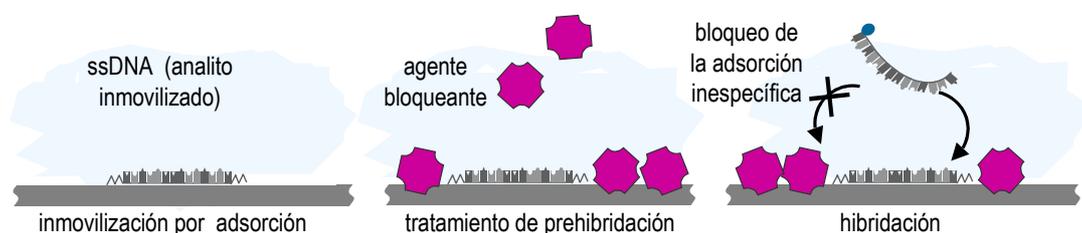


Figura 4.2. Mecanismo de funcionamiento de los reactivos bloqueantes utilizados en el tratamiento de prehibridación

4.2.4.1 Selección de la solución de prehibridación

Reactivos bloqueantes

Numerosos tipos de agentes pueden utilizarse para bloquear la unión inespecífica de la sonda biotinilada a la superficie de la membrana. Estos son ³⁰: reactivo de Denhardt ^{22,32,33,50} (Denhardt, 1966), heparina ⁵⁸ (Singh y Jones, 1984), leche desnatada desecada (reactivo BLOTTO) ^{32,36} (Johnson et al., 1984). Frecuentemente, estos agentes se utilizan en combinación con DNA desnaturizado y fragmentado de levaduras ⁵⁰ o de esperma de salmón ^{22,23,32,36}, y con tensioactivos como el SDS ^{22,23,36,49,50,58}.

En general, cuando se utiliza como soporte sólido membranas de nylon, es recomendable utilizar el reactivo de Denhardt, ya que da menores señales de fondo que el reactivo BLOTTO ³⁰.

En la literatura se reporta, la supresión completa de la adsorción inespecífica prehibridando las membranas con una solución bloqueante de 5 X reactivo de Denhardt, 0.5 % p/v de SDS y 100 µg/ml de DNA desnaturalizado y fragmentado³⁰.

Sin embargo, en muchas circunstancias puede utilizarse 0.25 % p/v de leche desnatada desecada (0.05 X BLOTTO), que es más económico y más fácil de utilizar que el reactivo de Denhardt, aunque no se recomienda en absoluto para sondas de RNA debido a que pueden poseer altos grados de actividad RNAasa.

Deben vigilarse los resultados cuando se añade como agente bloqueante DNA exógeno, ya que puede aumentar la adsorción inespecífica. Este hecho podría deberse a que este DNA exógeno se hibride al DNA inmovilizado en la membrana durante el tratamiento de prehibridación o, posteriormente durante la hibridación, a las sondas de DNA, si encuentra en ellos una secuencia complementaria.

Cabe destacar que está fuera del alcance de la tesina evaluar distintos reactivos bloqueantes, por lo que en este trabajo se escogió y se evaluó la efectividad de una solución de prehibridación basada en el reactivo de Denhardt (de la marca comercial Sigma) por ser el recomendado en el protocolo ofrecido por los fabricantes de la membrana utilizada y por ser el más ampliamente utilizado en los protocolos de la bibliografía que se han consultado.

Esta marca comercial ofrece una solución de prehibridación 2 veces concentrada (2 X) de manera que puede posteriormente diluirse, si se quiere, con formamida. Esta solución de prehibridación, que debe conservarse a -20 °C, consiste en:

Solución de prehibridación (2 X):

- 10 X SSC
- 10 X reactivo de Denhardt (5 X de solución de Denhardt es 1 % p/v de: Ficoll, polivinilpirrolidona y BSA fracción V)
- 200 µg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado y fragmentado.

Formamida

El fundamento del uso de la formamida como solvente se explica con mayor detalle en § 4.2.5.1, para la hibridación.

Durante el tratamiento de prehibridación se utilizaron las mismas condiciones que durante la hibridación, es decir, un 50 % v/v de formamida, lo que permitió disminuir la temperatura de reacción de 68 a 42 °C.

Estas condiciones fueron seleccionadas con el objeto de minimizar la evaporación del solvente durante el tratamiento de prehibridación ya que, al trabajar con volúmenes pequeños, la evaporación del solvente podría provocar que las membranas se sequen, hecho desaconsejable.

SDS

La adición de dodecilsulfato de sodio (SDS) ayuda, en este caso, a remover los reactivos bloqueantes mal adsorbidos al soporte sólido. Además, por el mismo motivo, es un reactivo muy utilizado en las soluciones de lavado³².

Es un componente muy común cuando se trabaja con reactivo de Denhardt y con DNA de esperma de salmón.

Aunque el SDS es el tensioactivo más comúnmente utilizado ^{22,23,36,49,50,58}, se ha reportado también el uso de Tween 20 y Triton X 100, entre otros tensioactivos.

En este trabajo se utilizó una concentración de SDS de 0.5 % p/v en las soluciones de prehibridación.

Otros reactivos utilizados en los protocolos más comunes

La presencia de 10 % p/v de dextranos (dextrán sulfato ^{22,23,58}) o de polietilenglicol ^{33,49,50} aumenta la concentración efectiva de los reactivos de la solución de prehibridación por exclusión del volumen de solución ocupado por dichos polímeros. Sin embargo, estas moléculas suelen provocar mayores adsorciones inespecíficas y las soluciones que las contienen son difíciles de manejar debido a su alta viscosidad ³⁰. En el presente trabajo no se han utilizado ninguno de estos reactivos ya que no ofrecían ventajas adicionales.

4.2.4.2 Preparación de la solución de prehibridación

La solución de prehibridación de la marca comercial Sigma, que contiene el reactivo de Denhardt y el DNA de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado disueltos en SSC, se encuentra 2 veces concentrada (2 X), por lo que sólo se requiere diluirla al medio mediante la adición de formamida y SDS.

Para tal fin, se preparó una solución 1 % p/v de SDS en formamida y se enfrió en hielo. Se adicionó un volumen idéntico de solución de prehibridación comercial (recién descongelada), quedando la solución de prehibridación en una concentración de 1 X, es decir:

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

4.2.4.3 Temperatura y tiempo del tratamiento de prehibridación

La selección de la temperatura de hibridación se discute en mayor detalle en § 4.2.5.3 y lo expuesto es extrapolable a las condiciones durante el tratamiento de prehibridación.

Para el tratamiento de prehibridación se seleccionó la misma temperatura que para la hibridación. En las condiciones de trabajo especificadas (tipo de solución de prehibridación, 50 % v/v de formamida) normalmente se utiliza una temperatura de 42 °C ³³, por lo que fue la temperatura que se utilizó en el presente trabajo para el tratamiento de prehibridación.

En cuanto al tiempo del tratamiento de prehibridación, existen discrepancias entre los distintos autores.

Lo que está claro es que cuanto mayor sea el tiempo del tratamiento de prehibridación, mayor será la efectividad del bloqueo de la membrana, pero más largo será el procedimiento analítico ^{30,32,33}. El tiempo del tratamiento de prehibridación seleccionado en este caso fue de 4 h ³³.

4.2.4.4 Agitación durante el tratamiento de prehibridación

Este factor se discute en más detalle en § 4.2.5.4 y lo expuesto es extrapolable a las condiciones del tratamiento de prehibridación.

Durante la prehibridación se aplicó el mismo grado de agitación (suave) que durante la hibridación. Esto favorecería el acercamiento de los reactantes que deben adsorberse de manera efectiva a la membrana y permitiría una desorción más rápida de los agentes bloqueantes mal adsorbidos ^{13,36}.

4.2.4.5 Volumen del tratamiento de prehibridación

Debe utilizarse el menor volumen posible, siempre y cuando las membranas estén siempre cubiertas de líquido ^{30,32}.

En este caso, las reacciones se llevaron a cabo en tubos eppendorf de 1.5 ml de capacidad, colocándose en su interior 450 μ l de solución de prehibridación. Con este volumen, las membranas circulares de 7 mm de diámetro se encontraban cubiertas de líquido.

Las membranas se dispusieron en los tubos eppendorf de manera que la cara en la que haya sido adsorbido el DNA quede hacia la luz del tubo y en íntimo contacto con la solución de prehibridación.

4.2.4.6 Protocolo del tratamiento de prehibridación de las membranas de nylon HYBOND™

En este protocolo se han incluido las variables seleccionadas en los apartados anteriores (solución de prehibridación, volumen de reacción, tiempo y temperatura). El protocolo que se detalla a continuación es, por tanto, el que se ha creído más conveniente.

- 1.- Se colocan las membranas, luego de la fijación del ssDNA (véase protocolo de inmovilización, § 4.2.3.3), en tubos eppendorf con la cara en la que ha sido adsorbido el DNA del lado de la luz del tubo de manera que quede en contacto con la solución.
- 2.- Se agregan 450 μ l de solución de prehibridación, preparada según § 4.2.4.2.
- 3.- Se colocan los tubos eppendorf en el incubador, con agitación suave y a 42 °C, durante 4 h.

4.2.4.7 Evaluación de la efectividad del tratamiento de prehibridación

La efectividad del tratamiento de prehibridación, en cuanto a su capacidad de disminuir la adsorción de la sonda biotinilada de manera inespecífica sobre la membrana, se evalúa en § 4.2.13.

4.2.5 HIBRIDACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE NYLON HYBOND™ MODIFICADAS CON EL ANALITO

Este es el paso más importante del procedimiento de construcción del transductor, ya que aquí ocurre la hibridación entre la sonda biotinilada y el ssDNA adsorbido en la membrana (Figura 4.1,

paso 2). La membrana se prepara previamente durante el tratamiento de prehibridación para que la hibridación ocurra en mayor grado que la adsorción inespecífica.

Del mismo modo que lo explicado para la prehibridación, se han descrito numerosos métodos de hibridación del DNA inmovilizado en la membrana. Estos métodos difieren en variables tales como:

- Solvente y temperatura utilizados (68 °C en soluciones acuosas o 42 °C en 50 % v/v de formamida)
- Volumen de solución de reacción y tiempo de hibridación (volúmenes grandes para períodos de tiempo mayores o volúmenes mínimos para tiempos menores)
- Grado de agitación
- Uso de diferentes agentes bloqueantes para evitar la unión inespecífica de la sonda funcionalizada al soporte
- Uso de compuestos como dextranos o polietilenglicol para aumentar la concentración efectiva de la sonda biotinilada en la solución de hibridación y el grado de reasociación del híbrido
- Concentración de la sonda biotinilada y su actividad específica
- Grado de lavados luego de la hibridación
- Fuerza iónica del medio.

Aunque al igual que en las condiciones descritas para el tratamiento de prehibridación la elección de la metodología óptima depende en gran medida de las preferencias personales, en las secciones siguientes se da una breve guía para la elección entre las metodologías disponibles, describiéndose también los reactivos más comunes utilizados en los pasos de hibridación y su función.

4.2.5.1 Selección de la solución de hibridación

Reactivos bloqueantes

Una amplia descripción de los reactivos bloqueantes más utilizados se ha hecho en § 4.2.4.1.

La utilización de agentes bloqueantes es más importante durante el tratamiento de prehibridación, pero también pueden ser de utilidad durante la hibridación.

Estos reactivos son normalmente incluidos tanto en la solución de prehibridación como en la de hibridación cuando se utilizan membranas de nitrocelulosa. Sin embargo, cuando se utilizan membranas de nylon, los reactivos bloqueantes a menudo se omiten en la solución de hibridación, debido a que una alta concentración de proteínas³⁰ o de DNA inespecífico²³ se cree que puede interferir en la hibridación entre la sonda y el ssDNA inmovilizado.

En la bibliografía se reportan tanto protocolos de hibridación de membranas de nylon que no utilizan el reactivo de Denhardt durante la hibridación³⁰, como protocolos que sí lo utilizan, aunque en concentraciones menores³³. Cabe destacar que en las especificaciones dadas por los fabricantes de las membranas, se utiliza el reactivo de Denhardt en concentraciones menores (5 veces más diluido respecto a la solución de prehibridación).

En el presente trabajo se utilizó una solución de hibridación basada en el reactivo de Denhardt (de la marca comercial Sigma).

Esta marca comercial ofrece una solución de hibridación 2 veces concentrada (2 X) de manera que puede posteriormente diluirse, si se quiere, con formamida. Esta solución de hibridación, que debe conservarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, consiste en:

Solución de hibridación (2 X):

- 10 X SSC
- 2 X reactivo de Denhardt (5 X de solución de Denhardt es 1 % p/v de: Ficoll, polivinilpirrolidona y BSA fracción V)
- 200 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de esperma de salmón desnaturalizado y fragmentado.

Formamida

En este caso, al igual que en el tratamiento de prehibridación (§ 4.2.4.1), se utilizó un 50 % v/v de formamida en la solución de hibridación.

Los híbridos de DNA se encuentran estabilizados mediante puentes de hidrógeno entre las bases complementarias, pero fundamentalmente, por interacciones hidrofóbicas entre los pares de bases sucesivos de la doble hélice.

La acción de la formamida (así como la de otros solventes orgánicos) se basa en su poder deshidrizante de la doble hebra al actuar sobre estas interacciones hidrofóbicas estabilizantes^{22,33}. En su presencia disminuye el valor de la T_m (T_m : del inglés *melting temperature*, es la temperatura a la cual la mitad de los híbridos se encuentran disociados), es decir, las hebras complementarias forman el dúplex a temperaturas más bajas si en el medio de reacción hay formamida.

Las reacciones de hibridación en 50 % v/v de formamida en membranas de nitrocelulosa son menos drásticas que las hibridaciones a $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ en soluciones acuosas. Sin embargo, se ha reportado que la cinética de hibridación en 80 % v/v de formamida es 4 veces menor respecto a su contraparte acuosa (*Casey y Davidson, 1977*). Asumiendo una relación lineal del grado de hibridación y la concentración de formamida, es de esperarse una hibridación 2 o 3 veces menor utilizando un 50 % v/v de formamida. Sin embargo, ambos tipos de solventes (formamida o agua), dan excelentes resultados, y aún no ha quedado clara la ventaja de uno sobre otro, a pesar de la amplia utilización de la formamida como solvente en protocolos de prehibridación y de hibridación^{22,30,32,33,50}.

En el presente trabajo se optó por utilizar un 50 % v/v de formamida tanto en el tratamiento de prehibridación como en la hibridación con el objeto de minimizar la evaporación del solvente durante estos procesos, por la posibilidad de disminuir la temperatura de 68 a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El volumen de solvente utilizado debe ser el mínimo necesario (§ 4.2.5.5) y el fenómeno de evaporación a $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ puede ser importante a volúmenes tan pequeños.

Está fuera del alcance de la tesina evaluar el efecto de la formamida sobre los parámetros de hibridación.

SDS

En este caso, al igual que en el paso de prehibridación (§ 4.2.4.1), se utilizó SDS.

La adición de dodecilsulfato de sodio (SDS) ayuda a remover las sondas biotiniladas unidas de manera inespecífica.

En este trabajo se utilizó una concentración de SDS de 0.5 % p/v en las soluciones de hibridación.

Fuerza iónica

Para maximizar el grado de hibridación de la sonda con el ssDNA inmovilizado en la membrana, es útil trabajar con soluciones de alta fuerza iónica.

Las fuerzas electrostáticas que se producen fundamentalmente por el esqueleto fosfato del DNA, se estabilizan con un aumento de la fuerza iónica del medio que provoca, por lo tanto, un aumento de la T_m . Dicho de otra manera, el híbrido es más estable a altas fuerzas iónicas^{22,33}.

En este trabajo se utilizó, tanto en las soluciones de prehibridación como en las de hibridación, la fuerza iónica dada por una solución 5 X SSC.

Otros reactivos utilizados en los protocolos más comunes

Se ha reportado que, en presencia de 10 % p/v de dextranos [dextrán sulfato^{22,23,58}] o de polietilenglicol^{33,49,50}, el grado de hibridación aumenta 10 veces debido a que estos agentes aumentarían la concentración efectiva de las sondas de DNA por exclusión del volumen de solución ocupado por los polímeros. Sin embargo, estas moléculas suelen provocar mayores adsorciones inespecíficas y las soluciones que las contienen son difíciles de manejar debido a su alta viscosidad³⁰. Por eso se recomienda que estas sustancias se utilicen sólo en casos que el grado de hibridación sea muy bajo, que las membranas contengan bajas cantidades de DNA inmovilizado o que la cantidad de sonda biotinilada sea una limitante.

En el presente trabajo no se han utilizado ninguno de estos reactivos ya que no ofrecían ninguna ventaja adicional.

4.2.5.2 Preparación de la solución de hibridación

La solución de hibridación de la marca comercial Sigma, que contiene el reactivo de Denhardt y el DNA de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado disueltos en SSC, se encuentra 2 veces concentrada (2 X), por lo que sólo se requiere diluirla al medio mediante la adición de formamida y SDS.

Para tal fin, se preparó una solución 1 % p/v de SDS en formamida y se enfrió en hielo. Se adicionó un volumen idéntico de solución de hibridación comercial (recién descongelada), quedando la solución de hibridación en una concentración de 1 X, es decir:

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

Nótese que la única diferencia con la solución de prehibridación (§ 4.2.4.2) es la concentración del reactivo de Denhardt que, como se ha explicado, en altas concentraciones puede perjudicar la hibridación.

4.2.5.3 Temperatura y tiempo de hibridación

El grado máximo de hibridación para sondas de más de 150 mer en una solución de una fuerza iónica de 1 M de NaCl, se consigue a 25 °C por debajo de la T_m del dúplex ³³.

La T_m se ve afectada por la fuerza iónica de la solución, la longitud de la sonda, la composición en cuanto a los tipos de bases (% G+C) y por la presencia de agentes desestabilizantes de la doble hélice como la formamida ³³.

Ya se ha explicado el efecto de la formamida y de la fuerza iónica (véase § 4.2.5.1) sobre este parámetro.

Como se ha visto, G se une a C mediante el establecimiento de tres puentes de hidrógeno, mientras que A y T forman dos puentes de hidrógeno. Es lógico pensar, por lo tanto, que secuencias ricas en G y C son más estables, y poseen T_m mayores que secuencias pobres en G y C. Así, también la T_m decrece para sondas de menor longitud.

Aunque existen fórmulas empíricas para calcular el valor de T_m , es mejor optimizar para las condiciones seleccionadas las temperaturas de hibridación.

Sin embargo, para las condiciones de trabajo especificadas, normalmente se utiliza una temperatura de 42 °C, por lo que fue la temperatura utilizada en el presente trabajo.

En cuanto al tiempo de hibridación, no existen discrepancias entre los distintos autores.

En general, coinciden en que debe ser de al menos de 10 h para obtener la máxima sensibilidad. Normalmente, se dejan las membranas en hibridación durante toda la noche.

El tiempo de hibridación seleccionado en este caso ha sido dejar las membranas hibridándose durante toda la noche ³³.

4.2.5.4 Agitación durante la hibridación

Uno de los problemas asociados a los ensayos desarrollados sobre soportes sólidos es que la cinética de interacción de los reactantes es lenta. Como uno de los reactivos se encuentra inmovilizado, el transporte del material que se encuentra en solución (sonda funcionalizada) hacia la superficie de la membrana generalmente limita la velocidad de los ensayos. Es por este hecho que los ensayos heterogéneos requieren tiempos de reacción tan largos.

En general, cuando se trabaja con fases sólidas en donde se encuentra inmovilizado uno de los reactivos, el incremento de la velocidad de interacción puede conseguirse utilizando una relación elevada entre el área superficial y el volumen (utilizando bajos volúmenes de reacción, § 4.2.5.5) o bien produciendo una mezcla efectiva de los reactantes. Sin agitación, los reactantes de la solución se acercarán a la membrana por difusión, mientras que si aplica agitación, este transporte ocurriría por convección y sería más rápido ¹³. Esto favorecería por un lado el acercamiento de los reactantes (sonda biotinilada en la solución de hibridación y analito inmovilizado en la membrana) y, además, permitiría una mayor desorción de los reactivos que se hayan unido de manera no específica, aumentando, por lo tanto, la especificidad de la reacción.

Este es un punto controvertido en la literatura. Según algunos autores la agitación es innecesaria y muchos protocolos no la utilizan, porque implicaría problemas metodológicos en cuanto

al equipamiento utilizado, que debería incorporar un dispositivo para la agitación ³⁰. Sin embargo, en otros protocolos –incluido el recomendado por los fabricantes de las membranas– utilizan agitación ^{13,36}.

El incubador que se utilizó en el presente trabajo, permite aplicar una agitación suave, que fue la utilizada en los procedimientos de hibridación, prehibridación y marcación enzimática.

4.2.5.5 Volumen de hibridación

Debe utilizarse el menor volumen posible, siempre y cuando las membranas estén continuamente cubiertas de líquido. En volúmenes más pequeños de solución, la cinética de hibridación es más rápida y la cantidad de sonda requerida, por lo tanto, se reduce de manera que el DNA adsorbido en la membrana actúa como conductor de la reacción ³⁰.

Disminuyendo el volumen de reacción aumenta la concentración de la sonda y aumenta también la relación entre el área superficial y el volumen, hechos que favorecen la cinética de la hibridación.

En este caso, las reacciones se llevaron a cabo en tubos eppendorf de 1.5 ml de capacidad, colocándose en su interior 450 μ l de solución de hibridación. Con este volumen, las membranas circulares de 7 mm de diámetro se encontraban cubiertas de líquido.

Las membranas se dispusieron en los tubos eppendorf de manera que la cara en la que haya sido adsorbido el DNA quede del lado de la luz del tubo y en íntimo contacto con la solución de hibridación y con la sonda biotinilada.

4.2.5.6 Lavados posthibridación

Este es un punto importante, ya que lavados efectivos permiten quitar de manera selectiva la sonda absorbida inespecíficamente, pero no la sonda hibridada con el ssDNA inmovilizado en la membrana.

La bibliografía propone soluciones de lavado (que normalmente se realiza en etapas secuenciales) de diferentes tipos, pero normalmente las variables a tener en cuenta son el tipo de tensioactivo y la fuerza iónica de las soluciones, la sal utilizada y el tiempo y temperatura de los lavados.

Si los lavados son muy intensos, se corre el riesgo de desestabilizar los híbridos formados y disminuir la señal analítica.

Los lavados normalmente se realizan en pasos secuenciales en el que se va disminuyendo la fuerza iónica, aumentando la temperatura (desde temperatura ambiente a 50°C o más) y disminuyendo la concentración de SDS (hasta 0) ³².

En este caso, se ha seleccionado la siguiente secuencia de lavados ³³:

Lavados posthibridación

- 1.- 10 minutos, en 40 ml de 2 X SSC-0.1 % p/v SDS, con agitación suave, a 20 °C.
- 2.- 10 minutos, en 40 ml de 0.2 X SSC-0.1 % p/v SDS, con agitación suave, a 50 °C.
- 3.- Se remojan las membranas en 2 X SSC dos veces a 20 °C, para eliminar el SDS

4.2.5.7 Preparación de la sonda biotinilada

Se tomó un volumen de solución acuosa de DNA (en este caso dA(20)-biotina) y se calentó a 95 °C durante 5 min. Este procedimiento provoca la deshibridación de la doble hebra de DNA, de manera que se genera ssDNA capaz de hibridarse con su sonda complementaria (analito) en la membrana. Luego del calentamiento, se colocó esta solución inmediatamente en hielo. Este enfriamiento rápido permite que las secuencias queden como ssDNA.

La optimización de la cantidad de sonda a agregar se realiza en § 4.2.11.

4.2.5.8 Protocolo de hibridación del analito soportado en las membranas de nylon HYBOND™ en formato dot-blot

En el siguiente protocolo se han incluido las variables seleccionadas en los apartados anteriores (solución de hibridación, volumen de reacción, tiempo y temperatura). El protocolo que se detalla a continuación es, por tanto, el que se ha creído más conveniente.

- 1.- Inmediatamente después del tratamiento de prehibridación (§ 4.2.4.6), se elimina la solución de prehibridación de los tubos eppendorf, sin mover las membranas, y se agregan 450 µl de solución de hibridación, preparada según § 4.2.5.2.
- 2.- Se dejan los tubos eppendorf en el incubador con agitación suave y a 42 °C, durante 10 minutos (para que la solución de hibridación tome esta temperatura).
- 3.- Se adiciona un volumen (en µl) de sonda biotinilada, preparada según § 4.2.5.7.
- 4.- Se dejan las membranas en hibridación con agitación suave y a 42 °C, durante toda la noche.
- 5.- Luego de la hibridación, se procede a los lavados posthibridación de las membranas según se indica en § 4.2.5.6.

4.2.5.9 Evaluación de la hibridación del analito soportado en las membranas de nylon HYBOND™ N(+) mediante un genosensor de membranas recambiables

Luego de la marcación enzimática, las membranas modificadas se evalúan según se describe en § 4.2.8.

4.2.6 MARCACIÓN ENZIMÁTICA POSTHIBRIDACIÓN

Una vez formados los híbridos de DNA funcionalizados con biotina, éstos deben revelarse mediante un esquema compuesto, que involucra la reacción de los dúplex –a través de la biotina– con el conjugado enzimático de la peroxidasa, mediante la estreptavidina (Figura 4.1, paso 3).

La peroxidasa será quien genere la señal analítica amperométrica, luego de la reacción con un sustrato adecuado.

Se han descrito varios métodos para la marcación del híbrido de DNA con el conjugado enzimático. Estos métodos difieren en variables como el tipo de reactivos bloqueantes, tiempo de marcación y agitación.

Aunque la elección de la metodología depende en gran manera de las preferencias personales, en las secciones siguientes se detalla la metodología seguida para la marcación enzimática, seleccionada para el presente trabajo.

4.2.6.1 Selección de la solución bloqueante para la marcación enzimática

Al igual que en las soluciones de prehibridación e hibridación, durante la marcación enzimática es común adicionar reactivos bloqueantes ³³.

Aunque el bloqueo de la membrana que ocurre durante la prehibridación e hibridación debería ser efectivo para prevenir la adsorción inespecífica de la enzima, este fenómeno indeseable normalmente es muy fuerte cuando se trabaja con proteínas, por lo que para evitarlo es mejor adicionar algún tipo de reactivo bloqueante durante la marcación enzimática.

Otro punto a destacar es que la enzima es la encargada de dar la señal analítica, por lo que cualquier adsorción, por más pequeña que sea, afectará de manera directa la señal de fondo.

Para las marcaciones enzimáticas, el reactivo bloqueante más universal es la BSA (seroalbúmina bovina, del inglés *bovine serum albumine*), que se ha utilizado en el presente trabajo.

Por otra parte, normalmente se adiciona algún tensioactivo que ayuda a eliminar la enzima adsorbida inespecíficamente. En este caso, se trabajó con Tween 20.

El medio iónico de la solución se consiguió con una solución 1 X PBS. Además, se adicionó EDTA para una mejor conservación, desde el punto microbiológico, de la solución bloqueante.

4.2.6.2 Composición de la solución bloqueante

La solución bloqueante se preparó de manera que su composición fuese ³³:

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

4.2.6.3 Temperatura y tiempo de premarcación con solución bloqueante

En un primer paso, se dejaron las membranas, luego de la hibridación, en la solución bloqueante durante 30 min. a 37 °C, con agitación suave ³³.

Este paso favorecería la interacción de la BSA sobre la membrana, previamente a la adición de la enzima, con el objeto de bloquear los posibles sitios de adsorción de la enzima durante el paso posterior de marcación enzimática.

4.2.6.4 Temperatura y tiempo de marcación enzimática

La temperatura de marcación con el conjugado enzimático es de 37 °C. El tiempo de marcación recomendado para este protocolo es de 1 h ³³.

4.2.6.5 Agitación durante la marcación enzimática

Este factor se trató en detalle en § 4.2.5.4.

El objeto de la agitación consiste en aumentar la cinética de interacción de los reactantes cuando uno de los reactivos se encuentra inmovilizado, facilitando el transporte del material que se encuentra en solución (en este caso el conjugado enzimático) hacia la superficie de la membrana en donde se encuentra el híbrido funcionalizado con biotina.

La agitación favorecería por un lado el acercamiento de los reactantes y además permitiría una mayor desorción de los conjugados enzimáticos adsorbidos de manera no específica, aumentando, por lo tanto, la especificidad de la reacción.

El incubador que se utilizó en el presente trabajo permite aplicar una agitación suave, que fue la utilizada en el procedimiento de marcación enzimática. Se aplicó la misma agitación que la utilizada durante el tratamiento de prehibridación e hibridación.

4.2.6.6 Volumen de marcación enzimática

Disminuyendo el volumen de reacción aumenta la concentración efectiva del conjugado enzimático y aumenta también la relación entre el área superficial y el volumen, hechos que favorecen la cinética de la reacción biotina (del dúplex formado en la membrana) –estreptavidina (del conjugado enzimático en la solución).

En este caso, las reacciones se llevaron a cabo en tubos eppendorf de 1.5 ml de capacidad, colocándose en su interior 450 μ l de solución bloqueante con conjugado enzimático. Con este volumen, las membranas circulares de 7 mm de diámetro se encontraban cubiertas de líquido.

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

4.2.6.7 Lavados postmarcación enzimática

Este es un punto importante, ya que lavados efectivos permiten quitar de manera selectiva el conjugado enzimático absorbido inespecíficamente, pero no afecta el complejo híbrido-biotina-estreptavidina-HRP de la membrana.

La bibliografía propone soluciones de lavado (que normalmente se realiza en etapas secuenciales) de diferentes tipos, pero normalmente las variables a tener en cuenta son el tipo de tensioactivo y la fuerza iónica de las soluciones, la sal utilizada y el tiempo y temperatura de los lavados.

Si los lavados son muy intensos, se corre el riesgo de desestabilizar los híbridos y complejos formados y, por tanto, de disminuir la señal analítica.

Los lavados normalmente se realizan mediante sucesivos pasos. En este caso, se ha seleccionado una solución de lavado de la siguiente composición ³³:

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

En este caso, se ha seleccionado la siguiente secuencia de lavados ³³:

Lavados postmarcación

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

4.2.6.8 Preparación del complejo estreptavidina-HRP

Se tomó un volumen de solución acuosa de enzima y se realizó la dilución que se considere conveniente en solución bloqueante ³³ (§ 4.2.6.2).

La optimización de la cantidad de conjugado enzimático a agregar se describe en § 4.2.12.

4.2.6.9 Protocolo de marcación enzimática posthibridación

En el protocolo, se han incluido las variables seleccionadas en los apartados anteriores (solución bloqueante, volumen de reacción, tiempo y temperatura). El protocolo que se detalla a continuación es, por tanto, el que se ha creído más conveniente ³³:

- 1.- Inmediatamente después de la hibridación (§ 4.2.5.8), y de los lavados de posthibridación, se colocan las membranas en los tubos eppendorf, con la cara en la que ha sido adsorbido el DNA hacia la luz del tubo, y se agregan 450 µl de solución bloqueante, preparada según § 4.2.6.2.
- 2.- Se dejan los tubos eppendorf en el incubador con agitación suave y a 37 °C, durante 30 minutos (procedimiento de premarcación con solución bloqueante).
- 3.- Se adiciona un volumen (en µl) de conjugado enzimático, preparado según § 4.2.6.8.
- 4.- Durante la marcación enzimática, se dejan las membranas en agitación suave y a 37 °C, por 1 h.
- 5.- Luego de la marcación, se procede a los lavados postmarcación de las membranas según se indica en § 4.2.6.7.

4.2.7 INTEGRACIÓN AL TRANSDUCTOR DE LAS MEMBRANAS MODIFICADAS

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

La membrana circular se colocó en la superficie del sensor (mediante pinzas) de manera que la cara modificada quede en contacto con el transductor (véase Figura 2.4). Posteriormente, se sujetó mediante una malla de nylon poro grueso de 2 x 2 cm. Esta última se sujetó al cuerpo del sensor mediante una junta tórica, y se selló con parafilm. Posteriormente, todo el conjunto se incorporó al sistema de detección amperométrico.

4.2.8 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 a las membranas y, por tanto, directamente relacionada con la cantidad de híbrido formado (Figura 4.1, paso 4).

Para tal fin, la evaluación se llevó a cabo con el sistema amperométrico descrito en § 2.2.2. La celda de medida fue una solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0, utilizándose como electrodo de trabajo el genosensor construido en § 4.2.7. 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), potencial que fuera optimizado en § 3.3.1.1.

En una primera instancia se realizaron calibrados completos, mediante adiciones de H_2O_2 al medio de calibración. A medida que va aumentando la concentración del sustrato (según se describe en la ecuación de Michaelis y Menten ⁵⁹), la velocidad de transformación del sustrato por parte de la enzima aumenta (generándose más producto y, por ende, mayores señales analíticas), hasta que se llega a una concentración de sustrato (llamada concentración de saturación), a partir de la cual la velocidad de la reacción enzimática llega a su máximo (velocidad de saturación de la enzima) y es constante, por más que se adicione más sustrato. En este punto, la intensidad de corriente, por ende, llega también a un máximo, que se denomina $I_{m\acute{a}x}$. Este es el dato analítico de mayor interés, ya que está en relación con la cantidad de enzima presente en la membrana y, por lo tanto directamente relacionada con la cantidad de híbrido formado en la superficie (Figura 4.3).

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

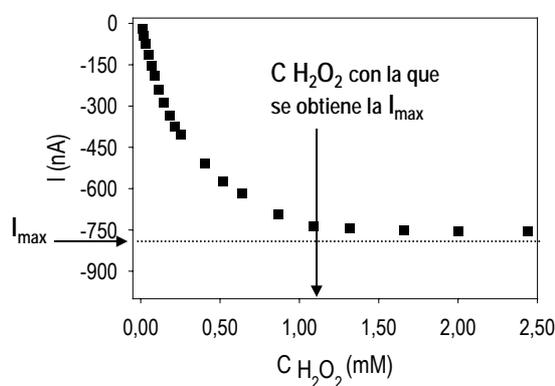


Figura 4.3. Ejemplo de calibrado completo que sigue una cinética de tipo enzimática. En la Figura se muestra la corriente de saturación y la concentración de H_2O_2 correspondiente a este punto.

4.2.9 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PREPARACIÓN DEL GENOSENSOR

Existen numerosísimas variables que se pueden optimizar en el dispositivo creado, y muchas de ellas escapan del objeto del presente trabajo.

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

En los apartados siguientes se muestran los resultados de las optimizaciones más importantes.

- cantidad de dT(20)-dG(25) inmovilizada en la membrana
- cantidad de dA(20)-biotina de la solución de hibridación
- cantidad de peroxidasa-estreptavidina en la solución bloqueante durante la marcación enzimática

Para tal fin, se prepararon en todos los casos, un lote de membranas “blanco”, que debe realizarse para evaluar la adsorción inespecífica, y un lote de membranas “genosensoras”, que evalúan el proceso de hibridación. Por cada lote se procesaron replicados de las membranas.

La adsorción inespecífica se utilizó para detectar la verdadera señal de fondo del dispositivo, ya que por diferencia entre el valor medio de la señal de las membranas “genosensoras” y de las membranas “blanco”, se obtiene la respuesta analítica debido al proceso de hibridación (véase § 4.2.9.3).

El fenómeno de adsorción inespecífica se trata en un apartado especial (§ 4.2.13).

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

4.2.9.1 Protocolo de preparación de las membranas “genosensoras”

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización de dT(20)-dG(25) (el analito) en las membranas de nylon, descrito en § 4.2.3.3.
- 2.- Se sigue con el tratamiento de prehibridación, descrito en § 4.2.4.6
- 3.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 4.2.5.8.
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 4.2.6.9.

4.2.9.2 Protocolo de preparación de las membranas “blanco”

Este lote de membranas se realizó de manera idéntica al de las membranas “genosensoras”, pero omitiendo el paso de adición de ssDNA (analito) sobre la membrana, es decir, no hay dT(20)-dG(25) inmovilizado en la membrana.

Como el resto de los reactivos es el mismo, en estas membranas se evaluaron todos los procesos de adsorción, excepto el proceso de hibridación sobre la membrana.

En § 4.2.13 se explican exhaustivamente las posibilidades de adsorción inespecífica en este formato y que es evaluado por el lote de membranas “blanco”.

El protocolo de preparación de estas membranas es el siguiente:

- 1.- Se sigue el protocolo de preparación de las membranas, descrito en § 4.2.3.3, con la única diferencia que no se adiciona dT(20)-dG(25), es decir, no hay analito sobre la membrana (se obvia el paso 2 del protocolo).
- 2.- Se colocan éstas membranas en tubos eppendorf y se continua con el paso 2 del tratamiento de prehibridación, descrito en § 4.2.4.6.
- 3.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 4.2.5.8. En este caso, al no haber analito en la membrana, no va a haber hibridación y sí sólo adsorción inespecífica de la sonda biotinilada.
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 4.2.6.9.

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

Tanto las membranas “genosensoras” como las membranas “blanco”, se integraron al transductor amperométrico, como se explicara en § 4.2.7.

La evaluación de los sensores preparados se realizó basándose en la señal generada, finalmente, por la enzima peroxidasa, según se explicara en § 4.2.8.

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

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

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

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

4.2.10 CANTIDAD DE dT(20)-dG(25) INMOVILIZADA EN LA MEMBRANA

Las cantidades de ssDNA que se inmovilizan normalmente en las membranas en un formato dot-blot en un procedimiento clásico es de aproximadamente 1 µg.

Cantidades crecientes de ssDNA inmovilizado en la membrana aumentaría la señal analítica pero, sin embargo, un exceso de DNA inmovilizado es contraproducente, ya que por impedimentos estéricos el analito se vería impedido para poder hibridarse con su sonda complementaria funcionalizada debido a la saturación de la membrana²².

El objeto de esta experiencia consistió en optimizar la cantidad de material a inmovilizar en la membrana.

Para tal fin, se variaron las cantidades de dT(20)-dG(25) de las membranas manteniendo constante las cantidades de dA(20)-biotina y HRP-estreptavidina y se compararon los resultados.

Se realizaron tres pruebas, con un lote de membranas “blanco” (para evaluar la adsorción inespecífica) y dos lotes de membranas “genosensoras”, que variaban entre sí sólo en la cantidad de

dT(20)-dG(25) en el paso de adsorción. Cada lote se realizó con tres membranas, es decir, en total se evaluaron 9 membranas.

La Tabla 4.1 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.

Los resultados se muestran en § 4.3.1.

Tabla 4.1. *Diseño del experimento de optimización de las cantidades de dT(20)-dG(25) inmovilizado en las membranas de nylon. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización por adsorción, hibridación y marcación enzimática.*

REACTIVOS	"blanco" n=3	Lote 1 "genosensor" n=3	Lote 2 "genosensor" n=3
Oligonucleótido 1 -dT(20)-dG(25)- protocolo de adsorción	No se adiciona (-)	99.6 pmoles	165.6 pmoles
Oligonucleótido 2 -dA(20)-biotina- protocolo de hibridación	107.0 pmoles	107.0 pmoles	107.0 pmoles
HRP-estreptavidina Protocolo de marcación enzimática	1.30 µg	1.30 µg	1.30 µg

4.2.11 CANTIDAD DE dA(20)-biotina EN LA SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN

El objeto de esta experiencia consistió en optimizar la cantidad de sonda biotinilada en la solución de hibridación.

La Tabla 4.2 resume las cantidades utilizadas de reactivos en los protocolos de adsorción, hibridación y marcación enzimática.

Tabla 4.2. *Diseño del experimento de optimización de las cantidades de dA(20)-biotina en la solución de hibridación. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización por adsorción, hibridación y marcación*

REACTIVOS	Lote 1 "blanco" n=3	Lote 1 "genosensor" n=3	Lote 2 "blanco" n=3	Lote 2 "genosensor" n=3
Oligonucleótido 1 -dT(20)-dG(25)- protocolo de adsorción	No se adiciona (-)	99.6 pmoles	No se adiciona (-)	99.6 pmoles
Oligonucleótido 2 -dA(20)-biotina- protocolo de hibridación	0.9 pmoles	0.9 pmoles	4.4 pmoles	4.4 pmoles
HRP-estreptavidina Protocolo de marcación enzimática	0.09 µg	0.09 µg	0.09 µg	0.09 µg

REACTIVOS	Lote 3 "blanco" n=3	Lote 3 "genosensor" n=3	Lote 4 "blanco" n=3	Lote 4 "genosensor" n=3
Oligonucleótido 1 -dT(20)-dG(25)- protocolo de adsorción	No se adiciona (-)	99.6 pmoles	No se adiciona (-)	99.6 pmoles
Oligonucleótido 2 -dA(20)-biotina- protocolo de hibridación	15.0 pmoles	15.0 pmoles	38.8 pmoles	38.8 pmoles
HRP-estreptavidina Protocolo de marcación enzimática	0.09 µg	0.09 µg	0.09 µg	0.09 µg

Para tal fin, la cantidad de dT(20)-dG(25) a inmovilizar en la membrana fue la optimizada en § 4.2.10, es decir, 99.6 pmoles para todas las membranas. También se mantuvo constante la cantidad de conjugado enzimático, mientras que se varió la cantidad de sonda funcionalizada.

Se realizaron cuatro lotes de membranas con diferentes cantidades de dA(20)-biotina, constanding cada uno de membranas "blanco" y membranas "genosensoras". Por cada lote se realizaron tres membranas, es decir, en total se evaluaron 24 membranas. Cada uno de los lotes se realizaron en días diferentes.

Los resultados se muestran en § 4.3.2.

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

El objeto de esta experiencia consistió en optimizar la cantidad de conjugado enzimático en la solución bloqueante durante la marcación enzimática. La Tabla 4.3 resume las cantidades utilizadas de reactivos en los protocolos de adsorción, hibridación y marcación enzimática.

Tabla 4.3. *Diseño del experimento de optimización de las cantidades de HRP-estreptavidina en la solución bloqueante durante la 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
Oligonucleótido 1 -dT(20)-dG(25)- protocolo de adsorción	No se adiciona (-)	99.6 pmoles	No se adiciona (-)	99.6 pmoles
Oligonucleótido 2 -dA(20)-biotina- protocolo de hibridación	38.8 pmoles	38.8 pmoles	38.8 pmoles	38.8 pmoles
HRP-estreptavidina Protocolo de marcación enzimática	0.09 µg	0.09 µg	0.29 µg	0.29 µg

REACTIVOS	Lote 3 "blanco" n=3	Lote 3 "genosensor" n=3	Lote 4 "blanco" n=3	Lote 4 "genosensor" n=3
Oligonucleótido 1 -dT(20)-dG(25)- protocolo de adsorción	No se adiciona (-)	99.6 pmoles	No se adiciona (-)	99.6 pmoles
Oligonucleótido 2 -dA(20)-biotina- protocolo de hibridación	38.8 pmoles	38.8 pmoles	38.8 pmoles	38.8 pmoles
HRP-estreptavidina Protocolo de marcación enzimática	0.82 µg	0.82 µg	1.14 µg	1.14 µg

Para tal fin, la cantidad de dT(20)-dG(25) a inmovilizar en la membrana fue la optimizada en § 4.2.10, es decir, 99.6 pmoles para todas las membranas. También se mantuvo constante la cantidad de dA(20)-biotina (38.8 pmoles), optimizada en § 4.2.11, mientras que se varió la cantidad de conjugado enzimático.

Se realizaron cuatro lotes de membranas con diferentes cantidades de HRP-estreptavidina, cada uno constaba de membranas "blanco" y membranas "genosensoras". Por cada prueba se realizaron tres membranas, es decir, en total se evaluaron 24 membranas. Cada una de los lotes se realizaron en días diferentes.

Los resultados se muestran en § 4.3.3.

4.2.13 EVALUACIÓN DE LA ADSORCIÓN INESPECÍFICA

El mecanismo de adsorción inespecífica se explica en la Figura 4.4. Durante el proceso de hibridación, la sonda funcionalizada con biotina puede hibridarse con su secuencia complementaria (analito), que se encuentra inmovilizada en la membrana de nylon (1), o puede adsorberse directamente sobre la membrana (2). El proceso deseable es el de hibridación (1), mientras que el proceso (2) es inconveniente, y trata de solventarse mediante el uso de soluciones de prehibridación e hibridación (véase § 4.2.4 y § 4.2.5). El mecanismo 2 contribuye a la adsorción inespecífica de manera indirecta, ya que por sí sola no aumenta la señal analítica inespecífica (véase más adelante).

Durante la marcación con HRP-estreptavidina, el conjugado tiene tres posibilidades: unirse al híbrido a través de la reacción con la biotina de la sonda (3); unirse a la sonda adsorbida en (2), también a través de la reacción con la biotina de la sonda (4); y adsorberse directamente sobre la superficie de la membrana de nylon (5). El procedimiento deseado es el (3), ya que de esa forma se genera el híbrido marcado (6). Los procedimientos (4) y (5) generan los productos adsorbidos (7) y (8) respectivamente, que son los responsables de la adsorción inespecífica propiamente dicha.

Para evaluar la adsorción inespecífica, se procedió a comparar dos lotes de membranas:

- el primero, llamado "blanco enzima", se preparó únicamente sometiendo las membranas al procedimiento de marcación enzimática y pretende evaluar la adsorción debido sólo a la enzima (fenómeno 5 y 8 de adsorción que se explica en la Figura 4.4).

- el segundo, llamado “blanco genosensor”, pretende evaluar el fenómeno de adsorción inespecífica global (fenómeno 5 y 8 de adsorción del conjugado enzimático y fenómeno 4 y 7 de adsorción de la sonda biotinilada y posterior reacción con el conjugado enzimático respectivamente, que se explica en la Figura 4.4).

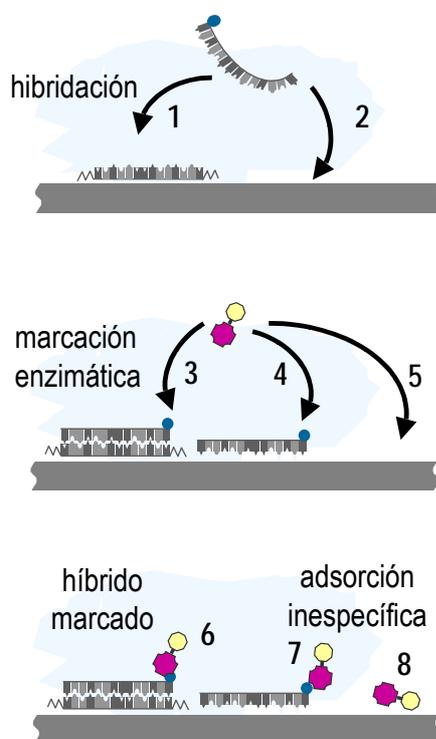


Figura 4.4. *Mecanismo de adsorción inespecífica (véase texto)*

4.2.13.1 Preparación de las membranas

El protocolo de preparación del lote de membranas “blanco enzima” fue el siguiente:

- 1.- Se colocan las membranas de nylon, sin ningún procedimiento anterior, en tubos eppendorf y se adicionan 450 μ l de solución bloqueante, preparada según § 4.2.6.2.
- 2.- Se dejan los tubos eppendorf en el incubador con agitación suave y a 37 °C, durante 30 minutos (procedimiento de premarcación con solución bloqueante).
- 3.- Se adiciona un volumen (en μ l) de conjugado enzimático, preparado según § 4.2.6.8.
- 4.- Se dejan las membranas en agitación suave y a 37 °C, durante 1 h.
- 5.- Luego de la marcación enzimática, se procede a los lavados de las membranas según se indica en § 4.2.6.7.

Como se explicara, este lote evalúa sólo la adsorción inespecífica debido al conjugado enzimático (Figura 4.5).

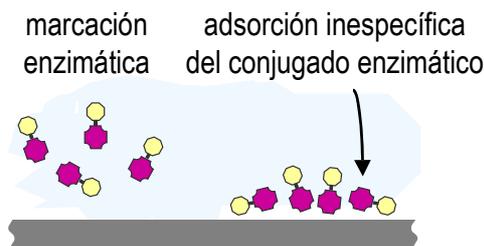


Figura 4.5. *Adsorción inespecífica debida al conjugado enzimático*

El otro lote de membranas, el llamado “blanco genosensor”, se preparó siguiendo el siguiente protocolo:

- 1.- Se sigue el protocolo de preparación de las membranas, descrito en § 4.2.3.3, con la única diferencia que no se adiciona dT(20)-dG(25), es decir, no hay analito sobre la membrana (se obvia el paso 2 del protocolo).
- 2.- Se colocan éstas membranas en tubos eppendorf y se continua con el paso 2 del tratamiento de prehibridación, descrito en § 4.2.4.6.
- 3.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 4.2.5.8. En este caso, al no haber analito en la membrana, no va a haber hibridación, y sí sólo adsorción inespecífica de la sonda biotinilada.
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 4.2.6.9.

Como se explicara, este lote evalúa la adsorción inespecífica global, es decir, adsorción de la sonda biotinilada (sólo puede adsorberse y no hibridarse ya que no hay analito inmovilizado en la membrana) y debido al conjugado enzimático (Figura 4.6).

4.2.13.2 Diseño del experimento

Para tal fin, se realizaron dos experimentos, cada uno con un lote de “blanco enzima” y “blanco genosensor”, que variaban entre sí sólo en la cantidad de enzima agregada en el paso de marcación enzimática. Cada lote se realizó con tres membranas, es decir, en total se evaluaron 12 membranas.

La Tabla 4.4 resume las cantidades utilizadas de reactivos en los protocolos de adsorción, hibridación y marcación enzimática.

4.2.13.3 Integración al transductor de las membranas modificadas y evaluación de los sensores

Una vez obtenidas las membranas de ambos lotes (“blanco enzima” y “blanco genosensor”), se procedió a su integración al transductor grafito-epoxi (§ 4.2.7) y a la evaluación amperométrica (§ 4.2.8).

Las conclusiones que se pretenden obtener se basan en la comparación de ambos lotes de membranas para poder evaluar quien posee mayor influencia sobre la adsorción inespecífica (sonda

biotinilada o conjugado enzimático), la efectividad de los procesos de bloqueo (solución de prehibridación, hibridación y marcación enzimática), y la influencia de la cantidad de conjugado enzimático sobre los procesos de adsorción y reproducibilidad en la respuesta. Los resultados se muestran en § 4.3.4.

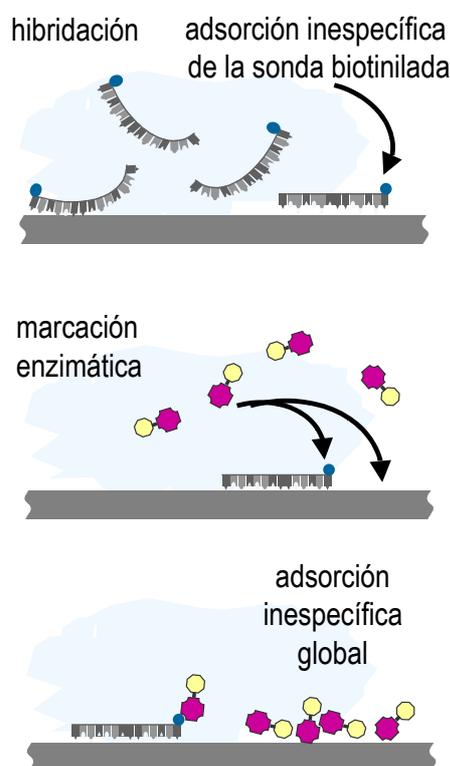


Figura 4.6. Adsorción inespecífica global, debida a la sonda biotinilada y al conjugado enzimático

Tabla 4.4. Diseño del experimento de evaluación de la adsorción inespecífica. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de hibridación y marcación enzimática. No se adiciona analito en la superficie de la membrana. Para todos los lotes, $n=3$.

REACTIVOS	Lote 1 "blanco enzima"	Lote 1 "blanco genosensor"	Lote 2 "blanco enzima"	Lote 2 "blanco genosensor"
Oligonucleótido 1 -dT(20)-dG(25)- protocolo de adsorción	No se adiciona (-)	No se adiciona (-)	No se adiciona (-)	No se adiciona (-)
Oligonucleótido 2 -dA(20)-biotina- protocolo de hibridación	No se adiciona (-)	39.0 pmoles	No se adiciona (-)	39.0 pmoles
HRP-estreptavidina Protocolo de marcación enzimática	0.80 μg	0.80 μg	1.10 μg	1.10 μg

4.2.14 ANÁLISIS DE INTERFERENCIAS

El objeto de esta experiencia consiste en adicionar en la solución de hibridación, junto con la sonda funcionalizada complementaria a la secuencia inmovilizada en la membrana (analito), una sonda interferente, que posee únicamente tres diferencias respecto a la sonda biotinilada.

La sonda funcionalizada posee la siguiente secuencia:

5'-AAA AAA AAA AAA AAA AA-3'-biotina

mientras que la sonda interferente tiene la siguiente secuencia:

5'-AAA ACA AAA ATA AAA AGA AA-3'

El mecanismo de acción de este interferente se explica en la Figura 4.7.

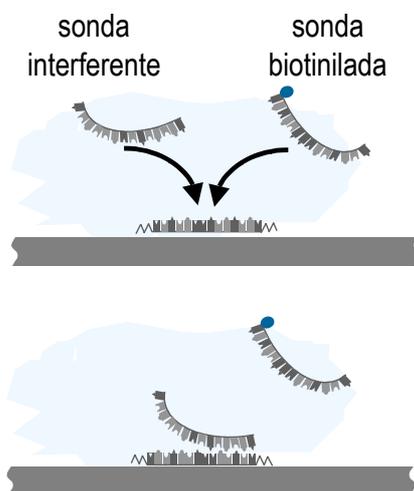


Figura 4.7. *Mecanismo de acción de un interferente. En este caso, el interferente actuaría compitiendo con la sonda biotinilada por la secuencia inmovilizada en la membrana.*

En este caso, si la sonda adicionada interfiriese en el análisis, se obtendrían señales amperométrica más bajas, ya que la sonda complementaria biotinilada no encontraría su secuencia complementaria en la membrana, por estar bloqueada con el interferente.

Para este procedimiento se realizaron tres lotes de membranas: “genosensoras”, “blanco” e “interferente”.

4.2.14.1 Protocolo de preparación de las membranas

Las membranas “blanco” y “genosensoras” se prepararon de manera idéntica a lo expresado en §§ 4.2.9.1 y 4.2.9.2.

El protocolo de preparación del lote de membranas “interferente” que se siguió, es similar al de preparación de las membranas “genosensoras”, con la única diferencia en la adición del interferente en el paso de hibridación. El protocolo seguido fue el siguiente:

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización de dT(20)-dG(25) (el analito) en las membranas de nylon, descrito en § 4.2.3.3.
- 2.- Se sigue con el tratamiento de prehibridación, descrito en § 4.2.4.6
- 3.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 4.2.5.8, con la única diferencia que luego de adicionar la sonda biotinilada, se agrega también un volumen (en μl), de sonda interferente.
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 4.2.6.9.

4.2.14.2 Diseño del experimento

Las cantidades adicionadas para este experimento de dT(20)-dG(25), dA(20)-biotina y HRP-estreptavidina fueron las optimizadas en §§ 4.2.10, 4.2.11 y 4.2.12, es decir, 99.6 y 38.8 pmoles y 0.82 μg respectivamente.

La Tabla 4.5 resume las cantidades de reactivos adicionados en los protocolos de adsorción, hibridación y marcación enzimática

Tabla 4.5. *Diseño del experimento de evaluación de interferentes. 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 2 "genosensor" n=3	Lote 3 "interferente" n=2
Oligonucleótido 1 -dT(20)-dG(25)- protocolo de adsorción	No se adiciona (-)	99.6 pmoles	99.6 pmoles
Oligonucleótido 2 -dA(20)-biotina- protocolo de hibridación	38.8 pmoles	38.8 pmoles	38.8 pmoles
Oligonucleótido 3 -sonda interferente- protocolo de hibridación	No se adiciona (-)	No se adiciona (-)	39.4 pmoles
HRP-estreptavidina Protocolo de marcación enzimática	0.82 μg	0.82 μg	0.82 μg

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

Una vez obtenidas las membranas de los tres lotes (membranas "blanco", "genosensoras" e "interferentes"), se procedió a su integración al transductor grafito-epoxi (§ 4.2.7).

Luego de la integración al transductor de las membranas modificadas, de las procedió a la evaluación amperométrica (§ 4.2.8).

Los resultados se muestran en § 4.3.5.

4.2.15 EVALUACIÓN DE LA VARIABLE EXPERIMENTAL QUE DETERMINA LA REPRODUCIBILIDAD Y EL ERROR ANALÍTICO

Para evaluar la variable que introduce mayor error al experimento, se prepararon las membranas según § 4.2.13.1. La Tabla 4.6 resume las cantidades de reactivos adicionados en los protocolos de adsorción, hibridación y marcación enzimática

En este caso se prepararon dos lotes cuya diferencia fundamental fue la forma de preparar y adicionar el conjugado enzimático.

En el lote 1, la enzima se preparó por dilución de un *pool* que se diluyó 7/1000 (en solución bloqueante) y se adicionaron 100 μl a cada tubo eppendorf durante la marcación enzimática (completándose a 450 μl el volumen final de la reacción de marcación enzimática con solución bloqueante). En el lote 2, la enzima se preparó con una dilución 1/9 y adicionándose 10 μl a cada tubo eppendorf durante la marcación enzimática.

La construcción de los sensores y su evaluación se realiza de la misma manera que en § 4.2.13.3.

Los resultados se muestran en § 4.3.6.

Tabla 4.6. *Diseño del experimento de determinación de la variable experimental que determina la reproducibilidad y el error analítico. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de adsorción, hibridación y marcación enzimática*

REACTIVOS	Lote 1 "blanco enzima"	Lote 1 "blanco genosensor"	Lote 2 "blanco enzima"	Lote 2 "blanco genosensor"
Oligonucleótido 1 -dT(20)-dG(25)- protocolo de adsorción	No se adiciona (-)	No se adiciona (-)	No se adiciona (-)	No se adiciona (-)
Oligonucleótido 2 -dA(20)-biotina- protocolo de hibridación	No se adiciona (-)	39.0 pmoles	No se adiciona (-)	39.0 pmoles
HRP-estreptavidina Protocolo de marcación enzimática	1.10 μg	1.10 μg	1.80 μg	1.80 μg

4.2.16 REPRODUCIBILIDAD DE ENSAYOS IDÉNTICOS REALIZADOS EN DÍAS DIFERENTES

El objeto de esta experiencia consistió en evaluar la reproducibilidad de los genosensores realizados en las mismas condiciones pero en días diferentes.

Para este procedimiento se realizaron dos lotes de membranas.

Uno corresponde a las membranas "genosensoras" y el otro corresponde a las membranas "blanco".

Las membranas “blanco” y “genosensoras” se prepararon de manera idéntica como se describiera en §§ 4.2.9.1 y 4.2.9.2, realizándose tres membranas por cada lote. Se evaluaron en total 12 membranas.

Las cantidades adicionadas para este experimento de dT(20)-dG(25), dA(20)-biotina y HRP-estreptavidina fueron las optimizadas en §§ 4.2.10, 4.2.11 y 4.2.12, es decir, 99.6 y 38.8 pmoles y 0.82 μg respectivamente.

Los ensayos se realizaron con 36 días de diferencia.

El ensamblaje del transductor y la evaluación de los sensores se realizó de la misma manera que lo descrito en § 4.2.9.3. Los resultados se muestran en § 4.3.7.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 CANTIDAD DE dT(20)-dG(25) INMOVILIZADA EN LA MEMBRANA

En la Figura 4.8 se muestran los resultados del experimento realizado en § 4.2.10, que se basa en la optimización de la cantidad de dT(20)-dG(25) inmovilizada en la membrana. Para tal fin, se modificaron las cantidades del analito, manteniendo constante las cantidades de dA(20)-biotina y de HRP-estreptavidina. En la Figura 4.8 cada barra muestra el valor medio de los replicados de cada lote de membranas “genosensoras”, así también como de las membranas “blanco”, y el error representa la desviación estándar (ec. 1, § 4B.1.1) de los replicados de cada lote.

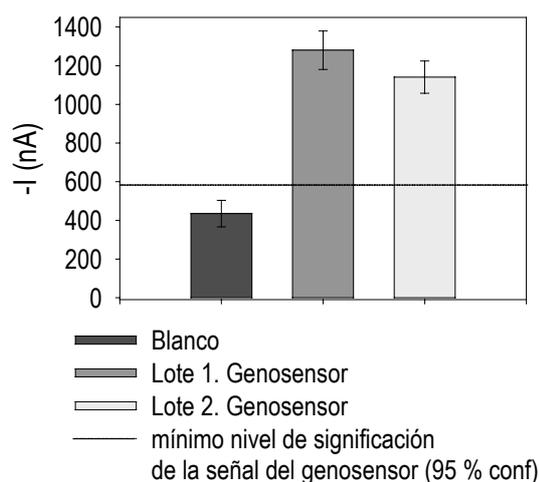


Figura 4.8. Optimización de la cantidad de dT(20)-dG(25). dA(20)-biotina: 107.0 pmoles. HRP-estreptavidina: 1.30 μg . Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Electrodo de trabajo: grafito-epoxi-membrana HYBOND™ modificada según § 4.2.10.

La Tabla 4.7 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación de las membranas “genosensoras” del lote 1 y de las membranas “blanco”. Las determinaciones de las membranas “blanco” y de las membranas “genosensoras” son comparativamente iguales de precisas (prueba F). La diferencia de los valores medios de la determinación de las membranas “genosensoras” y de las membranas “blanco”, como era de esperar, es significativamente diferente (prueba t). Para ambas pruebas se trabajó con un 95 % de confianza. Este hecho permite afirmar que el procedimiento funciona correctamente, y que la hibridación del analito con la sonda biotinilada complementaria ocurre con efectividad. En la Figura 4.8 también se muestra el nivel a partir del cual la señal de las membranas “genosensoras” (del lote 1) es significativamente superior a la señal de las membranas “blanco”, para estas mismas condiciones experimentales (ec. 7, § 4B.1.4.4).

Tabla 4.7. Pruebas estadísticas para la comparación de las varianzas (prueba F) y de los valores medios (prueba t) de las señales de las membranas “genosensoras” (del lote 1) y “blanco”, en el experimento de optimización de la cantidad de dT(20)-dG(25), realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	membranas “blanco” (n=3)	Lote 1 membranas “genosensoras” (n=3)
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_1 = 68.5$	$s_2 = 90.5$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (2.11) < F_{2,2} (39.00)$	
S_p (ec. 4B, § 4B.1.4.1)	$S_p = 85.4$	
grados libertad (ec. 6B, § 4B.1.4.3)	4	
Prueba t (unilateral) (ec. 5B, § 4B.1.4.2)	$t_{\text{calc}} (12.12) > t_4 (2.13)$	

Los resultados muestran una respuesta amperométrica mayor para una cantidad de dT(20)-dG(25) de 99.6 pmoles, mientras que la $I_{\text{máx}}$ obtenida con 165.6 pmoles es menor.

Estos valores demuestran que existe una saturación de la membrana, y que no es conveniente aumentar la cantidad de dT(20)-dG(25) a valores superiores a 100 pmoles.

Esta disminución (aunque pequeña) de la señal confirma el hecho de que al saturarse la membrana con ssDNA, éste queda menos orientado, por impedimentos estéricos, para hibridarse de manera óptima con su secuencia complementaria biotinilada.

En la Figura 4.8 también se observa un valor importante del blanco, aunque, como puede observarse por el error, la adsorción inespecífica es reproducible para un mismo ensayo.

A partir de estos resultados, las siguientes optimizaciones (de dA(20)-biotina y HRP-estreptavidina) se realizaron con una cantidad de dT(20)-dG(25) de 99.6 pmoles.

4.3.2 CANTIDAD DE SONDA BIOTINILADA EN LA SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN

En la Figura 4.9 se muestran los resultados del experimento realizado en § 4.2.11, que se basa en la optimización de la cantidad de dA(20)-biotina en la solución de hibridación. Para tal fin, se

modificaron las cantidades de ésta, manteniendo constante las cantidades de dT(20)-dG(25) y de HRP-estreptavidina.

En la Figura 4.9 se muestra sólo la señal de hibridación de las membranas “genosensoras”, obtenida mediante la siguiente expresión:

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

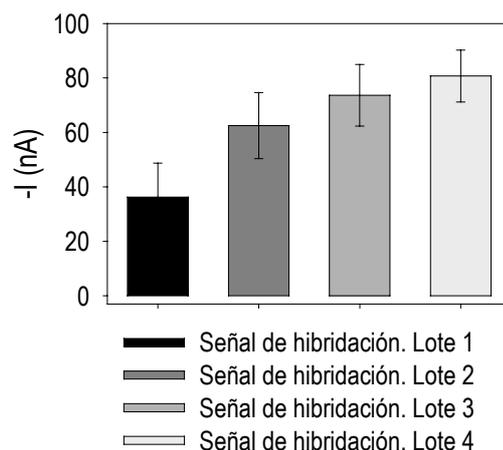


Figura 4.9. Optimización de la cantidad de dA(20)-biotina en la solución de hibridación). dT(20)-dG(25): 99.6 pmoles. HRP-estreptavidina: 0.09 μg . Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Electrodo de trabajo: grafito-epoxi-membrana HYBOND™ modificada según § 4.2.11.

El error de las barras representa la desviación estándar de la diferencia de los valores medios de las membranas “genosensoras” y de las membranas “blanco” para cada lote (ec. 11, § 4B.2.1).

Se observa una respuesta amperométrica creciente para cantidades crecientes de sonda biotinilada, hasta una cantidad de 38.8 pmoles.

No se siguió realizando pruebas con cantidades mayores de sonda funcionalizada, porque este formato se pretende implementar en otro competitivo. En un formato competitivo, estos 38.8 pmoles de dA(20)-biotina estarán determinando los límites de detección del analito. De todas maneras, se observa una tendencia clara a la saturación de la señal.

A partir de estos resultados, la siguiente optimización (de HRP-estreptavidina) se realizó con una cantidad de dA(20)-biotina de 38.8 pmoles y de dT(20)-dG(25) de 99.6 pmoles.

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

En la Figura 4.10 se muestran los resultados del experimento realizado en § 4.2.12 (únicamente los lotes 1, 2 y 3).

Este experimento se basa en la optimización de la cantidad de HRP-estreptavidina. Para tal fin, se modificaron las cantidades de éste, manteniendo constante las cantidades de dT(20)-dG(25) y

de dA(20)-biotina. En la Figura 4.10 cada barra muestra el valor medio de los replicados de cada lote de membranas “genosensoras”, así también como de sus correspondientes membranas “blanco”, y el error representa la desviación estándar (ec. 1, § 4B.1.1) de los replicados de cada lote.

Se observa una respuesta amperométrica creciente para cantidades crecientes de conjugado enzimático, hasta una cantidad de 0.82 μg .

Asimismo, se observa un aumento creciente de la adsorción inespecífica a medida que aumenta la concentración de conjugado enzimático.

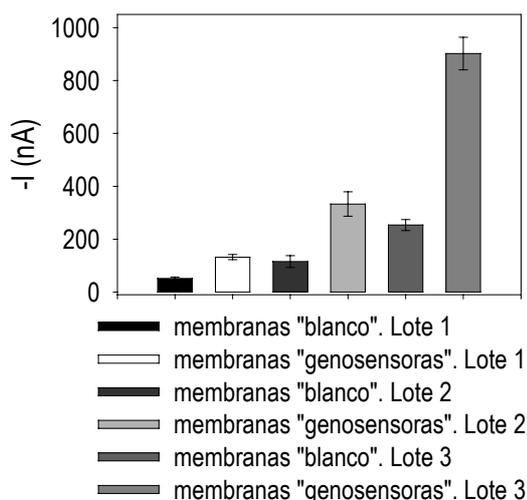


Figura 4.10. Optimización de la cantidad de HRP-estreptavidina durante la marcación enzimática. $dT(20)$ - $dG(25)$: 99.6 pmoles. $dA(20)$ -biotina: 38.8 pmoles. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Electrodo de trabajo: grafito-epoxi-membrana HYBOND™ modificada según § 4.2.12.

Además, al aumentar la cantidad de enzima, aumenta la relación S/R.

Esta relación se calculó como el cociente entre el valor medio de la señal de las membranas “genosensoras” y el valor medio de la señal de sus correspondientes membranas “blanco”.

En la Figura 4.11 se muestran los resultados obtenidos de los lotes 3 y 4. En este caso se observa que al aumentar la cantidad de conjugado enzimático por encima de 0.82 μg (evaluado mediante las membranas del lote 3), aumenta la señal de manera lineal tanto en el sensor blanco como en el genosensor, o dicho de otra manera, la señal de hibridación permanece constante (Figura 4.13).

En la Figura 4.12 se muestra como se modifica la relación S/R con el aumento de la cantidad de conjugado enzimático. Se puede observar que, hasta el nivel de conjugado enzimático de 0.82 μg este parámetro aumenta, mientras que por encima de este valor, la relación S/R disminuye.

Una mayor relación S/R implica que existe una mayor proporción de reacción del conjugado enzimático con el híbrido marcado respecto al fenómeno de adsorción inespecífica, hecho que ocurre hasta un nivel de 0.82 μg .

Así, a partir de este valor, los híbridos formados en las membranas se saturarían y la señal del genosensor aumentaría a expensas del aumento de la adsorción inespecífica del conjugado enzimático más que por su reacción con los híbridos.

Es por esto por lo que se ha tomado como óptimo este nivel de enzima, es decir, 0.82 μg .

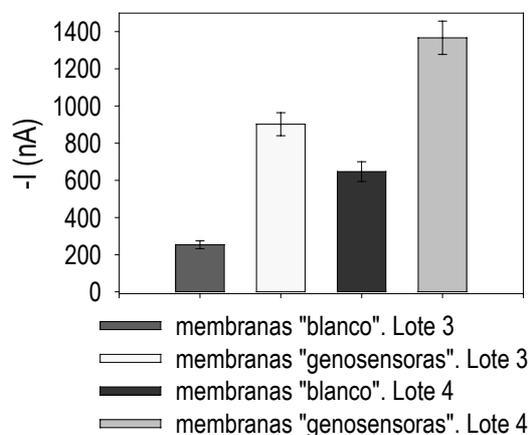


Figura 4.11. Optimización de la cantidad de HRP-estreptavidina durante la marcación enzimática. dT(20)-dG(25): 99.6 pmoles. dA(20)-biotina: 38.8 pmoles. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Electrodo de trabajo: grafito-epoxi-membrana HYBOND™ modificada según § 4.2.12.

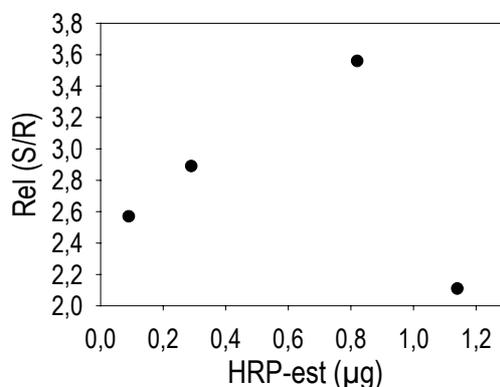


Figura 4.12. Relación entre el aumento de la concentración del conjugado enzimático y el parámetro S/R.

Estas conclusiones se pueden confirmar mediante la Figura 4.13, en la cual se muestra sólo la señal de hibridación de las membranas "genosensoras", obtenida mediante la siguiente expresión:

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

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

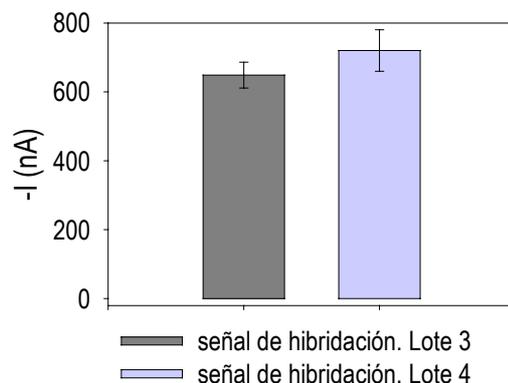


Figura 4.13. Comparación de las señales de hibridación de los genosensores de los lotes 3 y 4. Las condiciones experimentales son las que se muestran en la Figura 4.11.

La Tabla 4.8 muestra que no existe una diferencia significativa entre la señal de hibridación de los lotes 3 y 4, por lo que el aumento de señal amperométrica observada en el lote 4 respecto al lote 3 (Figura 4.11) se debe a la adsorción inespecífica, y no a la hibridación.

Tabla 4.8. Pruebas estadísticas para la comparación de los valores medios (prueba t) de las señales de hibridación de los lotes 3 y 4, en el experimento de optimización de la cantidad de HRP-estreptavidina, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	Señal de hibridación Lote 3	Señal de hibridación Lote 4
S_p (ec. 13, § 4B.2.2.1)	$S_p = 61.47$	
grados libertad (ec. 17, § 4B.2.2.3)	8	
Prueba t (bilateral) (ec. 15, § 4B.2.2.2)	$t_{\text{calc}} (1.00) < t_b (2.31)$	

La Tabla 4.9 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación de las membranas “genosensoras” y de sus correspondientes membranas “blanco”, para cada lote. La diferencia significativa de la señal amperométrica que existe –para todos los lotes– entre las membranas “genosensoras” y las membranas “blanco” (prueba t), permite afirmar que pese a que el valor óptimo de conjugado enzimático es de 0.82 μg , se pueden obtener resultados con una fiabilidad del 95 % para todo el intervalo de concentraciones de conjugado enzimático ensayado.

Tabla 4.9. Pruebas estadísticas para la comparación de las varianzas (prueba F) y de los valores medios (prueba t) de las señales de las membranas “genosensoras” y sus correspondientes membranas “blanco”, en el experimento de optimización de la cantidad de HRP-estreptavidina, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	Lote 1 “blanco” (n=3)	Lote 1 “genosensor” (n=3)	Lote 2 “blanco” (n=3)	Lote 2 “genosensor” (n=3)
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_{1b} = 5.51$	$s_{1g} = 9.54$	$s_{2b} = 22.55$	$s_{2g} = 46.13$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (3.00) < F_{2,2} (39.00)$		$F_{\text{calc}} (4.19) < F_{2,2} (39.00)$	
S_p (ec. 4B, § 4B.1.4.1)	$S_p = 7.79$		$S_p = 36.31$	
grados libertad (ec. 6B, § 4B.1.4.3)	4		4	
Prueba t (unilateral) (ec. 5B, § 4B.1.4.2)	$t_{\text{calc}} (12.68) > t_4 (2.13)$		$t_{\text{calc}} (7.34) > t_4 (2.13)$	

ESTADÍSTICOS	Lote 3 “blanco” (n=3)	Lote 3 “genosensor” (n=3)	Lote 4 “blanco” (n=3)	Lote 4 “genosensor” (n=3)
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_{3b} = 21.03$	$s_{3g} = 61.65$	$s_{4b} = 53.11$	$s_{4g} = 89.72$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (8.59) < F_{2,2} (39.00)$		$F_{\text{calc}} (2.85) < F_{2,2} (39.00)$	
S_p (ec. 4B, § 4B.1.4.1)	$S_p = 46.06$		$S_p = 73.72$	
grados libertad (ec. 6B, § 4B.1.4.3)	4		4	
Prueba t (unilateral) (ec. 5B, § 4B.1.4.2)	$t_{\text{calc}} (17.25) > t_4 (2.13)$		$t_{\text{calc}} (11.96) > t_4 (2.13)$	

4.3.4 EVALUACIÓN DE LA ADSORCIÓN INESPECÍFICA

En la Figura 4.14 se observan los resultados del experimento descrito en § 4.2.13. Cada barra muestra el valor medio de los replicados de cada lote de membranas “blanco enzima” y “blanco genosensor”, y el error representa la desviación estándar (ec. 1, § 4B.1.1) de los replicados de cada lote.

Los sensores “blanco enzima” evalúan la adsorción inespecífica debida al conjugado enzimático (Figura 4.5), mientras que los “blanco genosensor” evalúan la adsorción inespecífica global (Figura 4.6), es decir, debida tanto al conjugado enzimático como a la sonda biotinilada.

La Tabla 4.10 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación de las membranas “blanco enzima” y de las membranas “blanco genosensor”, para cada lote. La diferencia no significativa de la señal amperométrica que existe –para ambos lotes– entre las membranas “blanco genosensor” y las membranas “blanco enzima” (prueba t), permite afirmar que quien más contribuye a la adsorción inespecífica es el conjugado enzimático propiamente dicho.

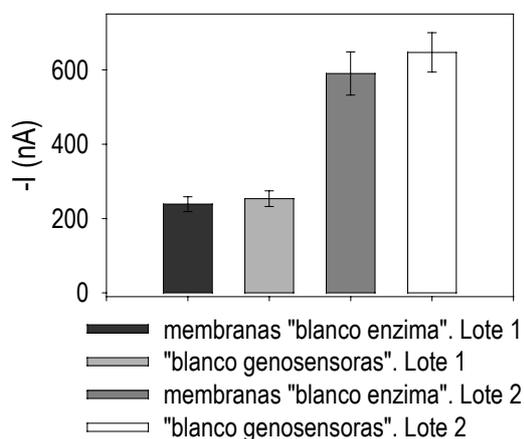


Figura 4.14. Evaluación de la adsorción inespecífica. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (Ag/AgCl). Electrodo de trabajo: grafito-epoxi-membrana HYBOND™ modificada según § 4.2.13.

Tabla 4.10. Pruebas estadísticas para la comparación de las varianzas (prueba F) y de los valores medios (prueba t) de las señales de las membranas “blanco enzima” y las membranas “blanco genosensor” para cada lote, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	Lote 1 “blanco enzima” (n=3)	Lote 1 “blanco genosensor” (n=3)	Lote 2 “blanco enzima” (n=3)	Lote 2 “blanco genosensor” (n=3)
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$S_{1be} = 20.0$	$S_{1bg} = 21.0$	$S_{2be} = 58.1$	$S_{2bg} = 53.1$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{calc} (1.10) < F_{2,2} (39.00)$		$F_{calc} (1.20) < F_{2,2} (39.00)$	
S_p (ec. 4A, § 4B.1.4.1)	$S_p = 20.51$		$S_p = 55.67$	
grados libertad (ec. 6A, § 4B.1.4.3)	4		4	
Prueba t (bilateral) (ec. 5A, § 4B.1.4.2)	$t_{calc} (0.87) < t_4 (2.77)$		$t_{calc} (1.24) < t_4 (2.77)$	

Los resultados de este experimento permiten también concluir que los pasos de hibridación y prehibridación son efectivos para prevenir la adsorción inespecífica debido a la sonda, y que la sonda fundamentalmente sólo formaría parte de los híbridos. Poca cantidad de sonda se adsorbe sobre la membrana directamente.

Se puede concluir, por tanto, que los reactivos bloqueantes escogidos (solución de prehibridación e hibridación basados en el reactivo de Denhardt) cumplen su función con efectividad en cuanto a prevenir la adsorción inespecífica de la sonda biotinilada, pero no contribuye a la disminución de la adsorción inespecífica debida al conjugado enzimático.

También se puede observar que la adsorción es reproducible y que no es un fenómeno aleatorio, debido a que las desviaciones estándar del valor medio son pequeñas, con desviaciones estándar relativas (ec. 2, § 4B.1.2) entre 8 y 10 %.

Este hecho es muy importante, ya que permitiría suprimir la necesidad de preparar las membranas "blanco genosensor", si el valor de la señal debida a la adsorción se repite y mantiene de manera reproducible en ensayos realizados en días diferentes (véase § 4.3.7).

4.3.5 ANÁLISIS DE INTERFERENCIAS

En la Figura 4.15 se muestran los resultados del experimento realizado en § 4.2.14. Cada barra muestra el valor medio de los replicados de cada lote de membranas "blanco", "genosensoras" e "interferentes", y el error representa la desviación estándar (ec. 1, § 4B.1.1) de los replicados de cada lote.

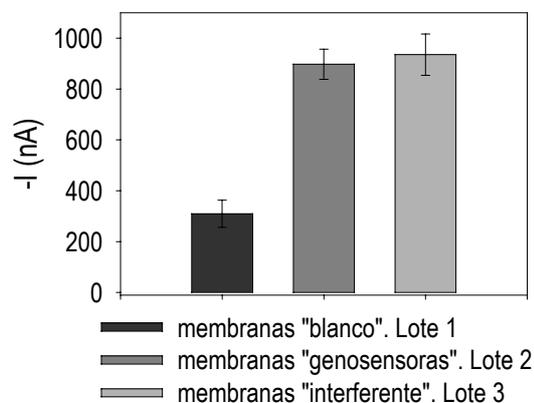


Figura 4.15. Evaluación de interferencias. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Electrodo de trabajo grafito-epoxi-membrana HYBOND™ modificada según § 4.2.14.

El lote 1 evalúa la adsorción inespecífica, el lote 2 evalúa la señal debida a la hibridación, mientras que el lote 3 evalúa la señal de hibridación en presencia de un oligonucleótido interferente que presenta una diferencia respecto a la sonda biotinilada de tres bases nitrogenadas en su secuencia génica.

Según el esquema que se presenta en la Figura 4.7, se espera que la presencia del interferente provoque una disminución en la señal amperométrica, ya que la sonda complementaria biotinilada no encontraría su secuencia complementaria en la membrana, por estar bloqueada con el interferente.

La Tabla 4.11 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación de las membranas “genosensoras” e “interferentes”. La diferencia no significativa de la señal amperométrica que existe entre ambos lotes de membranas (prueba t), permite afirmar que en este sistema no hay interferencia por esta secuencia y que el genosensor modelo que se propone es capaz de diferenciar, al menos, secuencias génicas con tres bases cambiadas.

Tabla 4.11. Pruebas estadísticas para la comparación de las varianzas (prueba F) y de los valores medios (prueba t) de las señales de las membranas “genosensoras” y las membranas “interferentes” para cada lote, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	Lote 2 membranas “genosensoras” (n=3)	Lote 3 membranas “interferentes” (n=2)
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_2 = 59.21$	$s_3 = 81.32$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (1.88) < F_{1,2} (38.51)$	
S_p (ec. 4A, § 4B.1.4.1)	$S_p = 67.39$	
grados libertad (ec. 6A, § 4B.1.4.3)	3	
Prueba t (bilateral) (ec. 5A, § 4B.1.4.2)	$t_{\text{calc}} (0.61) < t_3 (3.18)$	

4.3.6 EVALUACIÓN DE LA VARIABLE EXPERIMENTAL QUE DETERMINA LA REPRODUCIBILIDAD Y EL ERROR ANALÍTICO

En la Figura 4.16 se observan las desviaciones estándar (ec. 1, § 4B.1.1) de dos lotes cuya diferencia reside fundamentalmente en la forma de preparar y adicionar el conjugado enzimático.

Las membranas fueron preparadas según § 4.2.15.

En el lote 1, la enzima se preparó por dilución mayor de un *pool* de conjugado enzimático y tomándose volúmenes mayores de esta solución más diluida, respecto al lote 2, que se preparó por dilución menor del *pool* y tomándose volúmenes menores de esta solución más concentrada.

Como se puede ver, la preparación del lote 2 tiene mayor incertidumbre, ya que se realizan adiciones de volúmenes más chicos y de una solución más concentrada.

Esta diferencia se evidencia de manera directa en la desviación estándar de los resultados (Figura 4.16). Las membranas del lote 2 tienen una desviación estándar relativa (ec. 2, § 4B.1.2) de alrededor del 30 %, mientras que en el lote 1 se obtienen valores de menos de un 10 %.

Es evidente que la variable experimental que determina el error de las determinaciones es la adición de la enzima, por lo que es un paso crítico si se quieren obtener resultados con reproducibilidad. Para medidas más reproducibles es, por lo tanto, recomendable realizar una dilución mayor del *pool* de conjugado enzimático y adicionar volúmenes mayores a los tubos de reacción.

Por el contrario, la adición de la sonda introduce un error menospreciable respecto al anterior. Esto puede evidenciarse en el error obtenido que se observa en el lote 1 "blanco enzima", al que sólo se le ha adicionado enzima, respecto al lote 1 "blanco genosensor", al que se le ha adicionado enzima y sonda biotinilada. Las desviaciones estándar relativas (ec. 2, § 4B.1.2) son comparables y del orden de 9.8 % y 8.2 %, respectivamente.

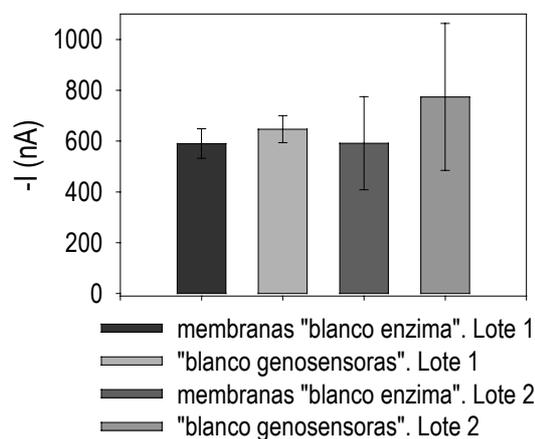


Figura 4.16. Evaluación de las variables que determinan el error en los experimentos. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Electrodo de trabajo grafito-epoxi-membrana HYBOND™ modificada según § 4.2.15.

4.3.7 REPRODUCIBILIDAD DE ENSAYOS IDÉNTICOS REALIZADOS EN DÍAS DIFERENTES

En la Figura 4.17 se muestran los resultados del experimento realizado en § 4.2.16.

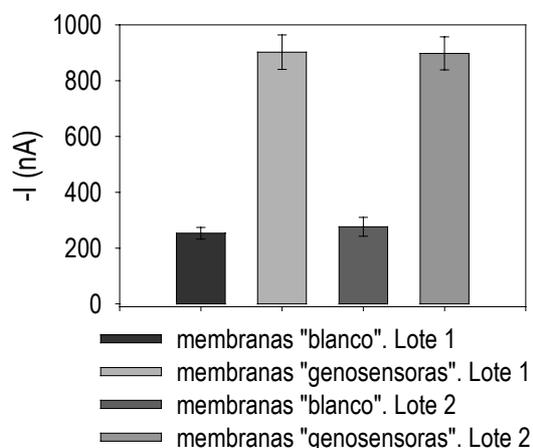


Figura 4.17. Estudio de la reproducibilidad de los ensayos realizados en días diferentes. dT(20)-dG(25): 99.6 pmoles. dA(20)-biotina: 38.8 pmoles. HRP-estreptavidina: 0.82 μ g. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Electrodo de trabajo grafito-epoxi-membrana HYBOND™ modificada según § 4.2.16.

Cada barra muestra el valor medio de los replicados de cada lote de membranas “blanco” y “genosensoras”, y el error representa la desviación estándar (ec. 1, § 4B.1.1) de los replicados de cada lote.

Los ensayos se llevaron a cabo con 36 días de diferencia y se realizaron con las cantidades de reactivos que fueran optimizadas en el presente capítulo, es decir, 99.6 pmoles de dT(20)-dG(25), 38.8 pmoles de dA(20)-biotina y 0.82 μ g de HRP-estreptavidina.

Como se puede observar, existe una excelente reproducibilidad de estos ensayos realizados en días diferentes, tanto en las membranas “blanco” como en las membranas “genosensoras”.

Este hecho es muy importante, ya que se observa que los valores de las señales amperométricas de las membranas “blanco”, que evalúan la adsorción inespecífica, son muy reproducibles.

Esto permitiría suprimir la preparación de las membranas “blanco”, ya que el valor de la señal debida a la adsorción inespecífica se repite y mantiene en ensayos realizados en días diferentes y su magnitud es conocida.

Así, se conseguiría una importante ventaja práctica para el presente formato.

4.4 CONCLUSIONES

1. Por primera vez se construyeron genosensores basados en señales amperométricas directas.
2. Se construyó y evaluó un nuevo transductor electroquímico de un sólo uso con una membrana de nylon HYBOND™ integrada al mismo.
3. El genosensor amperométrico de membranas recambiables desarrollado sobre la base de este transductor permite efectuar análisis genéticos en un formato similar al dot blot, es decir, con el analito inmovilizado en la membrana.
4. Se optimizaron variables en el sistema tales como la cantidad de dT(20)-dG(25) (analito a inmovilizar, dA(20)-biotina (sonda funcionalizada), y HRP-estreptavidina (conjugado enzimático). Las cantidades óptimas son de aproximadamente 100 pmoles de dT(20)-dG(25), 40 pmoles de dA(20)-biotina y 0.8 μ g de HRP-estreptavidina.
5. En el genosensor se observa un fenómeno de saturación de la membrana, por lo que no es conveniente agregar cantidades superiores a 100 pmoles de analito.
6. El sistema de marcaje compuesto basado en la reacción de sonda biotinilada/HRP-estreptavidina funciona de manera adecuada. Hasta el momento, este tipo de sistema de detección de los híbridos no había sido utilizado en la construcción de genosensores.
7. La cantidad de analito detectada por este sistema modelo es de 99.6 pmoles, con un alto margen de señal, por lo que se espera que puedan detectarse cantidades aún menores (experimento no realizados).
8. Los límites de detección (mínima cantidad de analito detectado) reportados en la bibliografía para genosensores electroquímicos son aún mayores que esta cantidad, por lo que, debido al margen en la señal que se tiene, se espera poder realizar análisis genéticos en ciertas muestras reales con este dispositivo sin tener que recurrir a amplificación por PCR.

Esto se puede deber a la nueva metodología de detección implementada en este modelo, basado en una enzima, biomolécula capaz de amplificar la señal analítica.

9. Se comprobó que la señal inespecífica se debe fundamentalmente a la adsorción de la enzima sobre el transductor. Además, esta adsorción inespecífica es reproducible.

10. Los reactivos bloqueantes utilizados en las soluciones de hibridación y prehibridación previenen completamente la adsorción de la sonda biotinilada, pero no la adsorción posterior del conjugado enzimático.

11. Se encontró que la variable experimental que determina el error es la forma de preparación y adición del conjugado enzimático, por lo que este es el paso crítico si se quiere obtener resultados reproducibles.

12. Existe una excelente reproducibilidad de ensayos realizados en días diferentes. Este hecho es muy importante, porque al ser la adsorción inespecífica controlada y reproducible, puede evitarse el hecho de preparar “ensayos blanco” para evaluarla, si esta señal se mantiene y su magnitud es conocida.

13. No existe interferencia por secuencias con diferencias de tres bases nitrogenadas, por lo que este dispositivo es capaz de al menos reconocer tres mutaciones puntuales en una secuencia génica concreta.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Marta Santandreu i Vilajosana. *Tesis Doctoral*. Universitat Autònoma de Barcelona, 1998.
- ² M. Álvarez Icaza, V. Bilitewski. *Anal. Chem.* 1993, 65, 525A-533A.
- ³ J. Albery. *Electrode Kinetics*; Oxford University Press: Oxford, 1975.
- ⁴ M. Måsson, Z. Liu; T. Harayama, E. Kobatake, Y. Ikariyama, M. Aizawa. *Anal. Chim. Acta* 1995, 304, 353-359.
- ⁵ A. W. Bott. *Current separations* 1996, 14, 104-110.
- ⁶ B. Johnsson, S. Lofas, G. Lindquist. *Anal. Biochem.* 1991, 198, 268-277.
- ⁷ D. Sehgal, I. K. Vijay. *Anal. Biochem.* 1994, 218, 87-91.
- ⁸ A. Previero, J. Derancourt, M. A. Coletti Previero. *Febs Letters* 1973, 33, 135-138.
- ⁹ D. Sehgal, I. K. Vijay. *Anal. Biochem.* 1994, 218, 87-91.
- ¹⁰ V. Lund, R. Schmid, D. Rickwood, E. Hornes. *Nucleic Acids Res.* 1988, 22, 10861-10880.
- ¹¹ X. Sun, P. He, S. Liu, J. Ye, Y. Fang. *Talanta* 1998, 47, 487-495.
- ¹² S. Liu, J. Ye, P. He; Y. Fang. *Anal. Chim. Acta* 1996, 335, 239-243.
- ¹³ S. F. Wolf, L. Haines, J. Fisch, J. N. Kremsky, J. P. Dougherty, K. Jacobs. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 2911-2926.
- ¹⁴ B. C. F. Chu, G. M. Wahl, L. E. Orgel. *Nucleic Acids Res.* 1983, 11, 6513-6529.
- ¹⁵ P. A. E. Piunno, U. J. Krull, R. H. E. Hudson, M. J. Damha, H. Cohen. *Anal. Chim. Acta* 1994, 288, 205-214.
- ¹⁶ L. Henke, P. A. E. Piunno, A. C. McClure, U. J. Krull. *Anal. Chim. Acta* 1997, 344, 201-213.
- ¹⁷ F. Caruso, E. Rodda, D. N. Furlong, K. Niikura, Y. Okahata. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2043-2049.
- ¹⁸ K. M. Millan, A. Sarullo, S. R. Mikkelsen. *Anal. Chem.* 1994, 66, 2943-2948.
- ¹⁹ S. R. Mikkelsen. *Electroanalysis* 1996, 8, 15-19.
- ²⁰ F. Céspedes, E. Martínez Fàbregas, S. Alegret. *Trends in Anal. Chem.* 1996, 15, 296-304.
- ²¹ R. K. Saiki, P. S. Walsh, C. H. Levenson, H. A. Erlich. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 6230-6234.
- 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 G. M. Church, W. Gilbert. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 1991-1995.
- ²⁵ S. Girotti, E. Ferri, S. Ghini. *Anal. Chim. Acta* 1991, 255, 387-394.
- ²⁶ S. R. Rasmussen, M. R. Larsen, S. E. Rasmussen. *Anal. Biochem.* 1991, 198, 138-142.
- ²⁷ 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.
- ²⁸ S. S. Ghosh, G. F. Musso. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 5353-5372.
- ²⁹ U. Maskos, E. M. Southern. *Nucleic Acids Res.* 1992, 20, 1679-1684.
- ³⁰ J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2th ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989.
- ³¹ M. Yang, M. E. McGovern, M. Thompson. *Anal. Chim. Acta* 1997, 346, 259-275.
- ³² L. T. Kirby. *DNA Fingerprinting*, Stockton Press: New York, 1990.
- ³³ L. J. Kricka. *Nonisotopic DNA Probe Techniques*; Academic Press, Inc.: San Diego, 1992.
- ³⁴ T.A. Brown. *Molecular Biology*, Bios Scientific Publishers: Oxford, 1991
- ³⁵ L.G. Davis, M.D. Dibner, J. F. Battey. *Basic methods in Molecular Biology*, Elsevier: U.S.A., 1986.
- ³⁶ K. C. Reed, D. A. Mann. *Nucleic Acids Res.* 1985, 13, 7207-7221.
- ³⁷ G. Marrazza, I. Chianella, M. Mascini. *Biosens. Bioelectron.* 1999, 14, 43-51.
- ³⁸ A. P. Abel, M. G. Weller, G. L. Duveneck, M. Ehrat, M. Widmer. *Anal. Chem.* 1996, 68, 2905-2912.
- ³⁹ F. Kleinjung, F. F. Bier, A. Warsinke, F. W. Scheller. *Anal. Chim. Acta.* 1997, 350, 51-58.
- ⁴⁰ F. F. Bier, F. W. Scheller. *Biosens. Bioelectron.* 1996, 11, 669-674.

-
- ⁴¹ H. J. Watts, D. Yeung, H. Parkes. *Anal. Chem.* 1995, 67, 4283-4289.
- ⁴² P. J. Bates, H. S. Dosanjh, S. Kumar, T. C. Jenkins, C. A. Laughton, S. Neidle. *Nucleic Acids Res.* 1995, 23, 3627-3632.
- ⁴³ P. Nilsson, B. Persson, M. Uhlén, P. A. Nygren. *Anal. Biochem.* 1995, 224, 400-408.
- ⁴⁴ K. Bondeson, A. Frostell-Karlsson, L. Fagerstam, G. Magnusson. *Anal. Biochem.* 1993, 214, 245-251.
- ⁴⁵ I. D. Parsons, B. Persson, A. Mekhalfia, G. M. Blackburn, P. G. Stockley. *Nucleic Acids Res.* 1995, 23, 211-216.
- ⁴⁶ C. E. Jordan, A. G. Frutos, A. J. Thiel, R. M. Corn. *Anal. Chem.* 1997, 69, 4939-4947.
- ⁴⁷ R. C. Ebersole, J. A. Miller, J. R. Moran, M.D. Ward. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 3239-3241.
- ⁴⁸ X. Chen, X-E. Zhang, Y-Q Chain, W-P Hu, Z-P Zhang, X-M Zhang, A. E. G. Cass. *Biosens. Bioelectron.* 1998, 13, 451-458.
- ⁴⁹ A. C. Syvanen, M. Laaksonen, H. Soderlund. *Nucleic Acids Res.* 1986, 14, 5037-5048.
- ⁵⁰ M. Renz, C. Kurz. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 3435-3444.
- ⁵¹ Y. Nagata, H. Yokota, O. Kosuda, K. Yokoo, K. Takemura, T. Kikuchi. *Febs Lett.* 1985, 183, 379-382.
- ⁵² P. Pantano, T. H. Morton, W. G. Kuhr. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 1832-1833.
- ⁵³ W. B. Nowall, D. O. Wipf, W. G. Kuhr. *Anal. Chem.* 1998, 70, 2601-2606.
- ⁵⁴ J. N. Kremsky, J. L. Dougherty, R. E. Meyers, M. Collins, E. L. Brown. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 2891-2909.
- ⁵⁵ V. T. Kung, P. R. Panfili, E. L. Sheldon, R. S. King, P. A. Nagainis, B. Gomez, D. A. Ross, J. Briggs, R. F. Zuk. *Anal. Biochem.* 1990, 187, 220-227.
- ⁵⁶ D. J. Duggan; M. Bittner; Y. Chen; P. Meltzer; J. M. Trent. *Nature Genetics Sup.* 1999, 21, 10-14.
- ⁵⁷ D. M. Kube; A. Srivastava. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 3375-3376.
- ⁵⁸ L. Singh, K. W. Jones, *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 5627-5638.
- ⁵⁹ T. Ohgaru, H. Tatsumi, K. Kano, T. Ikeda. *J. Electroanal. Chem.* 2001, 496, 37-43.

CONSTRUCCIÓN DE UN GENOSENSOR DE MEMBRANAS RECAMBIABLES EN FORMATO COMPETITIVO

4A.1 INTRODUCCIÓN

El tipo de formato del genosensor desarrollado y evaluado en el capítulo 4, como ya se indicara en § 4.1, posee algunas limitaciones:

- El analito, al no estar funcionalizado, debe inmovilizarse en la membrana. El hecho de que la muestra se encuentre inmovilizada en un soporte sólido, implica que la efectividad de la hibridación sea menor que en solución ¹⁻⁶, por lo que una gran cantidad de analito se desaprovecharía y no estaría disponible para hibridarse con una sonda sintética funcionalizada ⁶. Como el grado de efectividad de la hibridación determina la señal analítica, los límites de detección de estos formatos son, por tanto, menores, comparativamente a si el analito se encontrara en solución. Otra dificultad añadida es que debe prepararse una membrana para cada muestra a analizar, y dificultaría, en un futuro, la automatización del proceso de preparación del sensor y su implementación comercial como *kit*.

En un sensor, por tanto, es conveniente que la muestra se encuentre en solución. Cabe destacar que esta limitación también la poseen los ensayos clásicos de análisis de DNA (véase § 1.2).

- Si se quiere aplicar este formato al analito en solución, obligatoriamente el analito debe estar funcionalizado. La funcionalización del analito puede conseguirse si el mismo se amplifica por PCR utilizando *primers* o mononucleótidos funcionalizados (véase Figura 1.15, § 1.2.2) ⁷⁻⁹.

Existen otras posibilidades de formatos, si se quiere trabajar con el analito proveniente directamente de la muestra sin inmovilización ni funcionalización:

- Formato de captura o sandwich ^{5,6,10-12} Figura 4A.1):

En este caso, se inmoviliza en la membrana un oligonucleótido sintético llamado sonda de captura. Este oligonucleótido es complementario a una secuencia que bordea el gen que se desea analizar, o bien a parte del analito.

Para el caso del reconocimiento de un analito mediante la captura de una secuencia aledaña a éste, la misma debe ser conservada, es decir, de bajo polimorfismo entre individuos de una misma especie. Así, la muestra se inmoviliza en la membrana por hibridación con la sonda de captura, dejando la secuencia de interés analítico disponible para ser hibridada con una segunda sonda sintética complementaria al gen de interés, en este caso funcionalizada. En ese caso, el principal inconveniente de un formato de captura es que se debe conocer con exactitud secuencias aledañas al gen de interés, y estas secuencias, como se dijo, deben ser altamente conservadas.

Otra posibilidad es el doble reconocimiento del analito: el primer reconocimiento ocurriría con la sonda de captura inmovilizada sobre el transductor y el segundo reconocimiento con la sonda funcionalizada. Así, se conseguiría aumentar el número de bases reconocidas del analito, con lo cual se incrementaría la especificidad de la reacción (véase § 5.1).

En ambos casos, no es necesario que el analito esté funcionalizado. Además, cabe destacar que en este formato el analito se encuentra en solución.

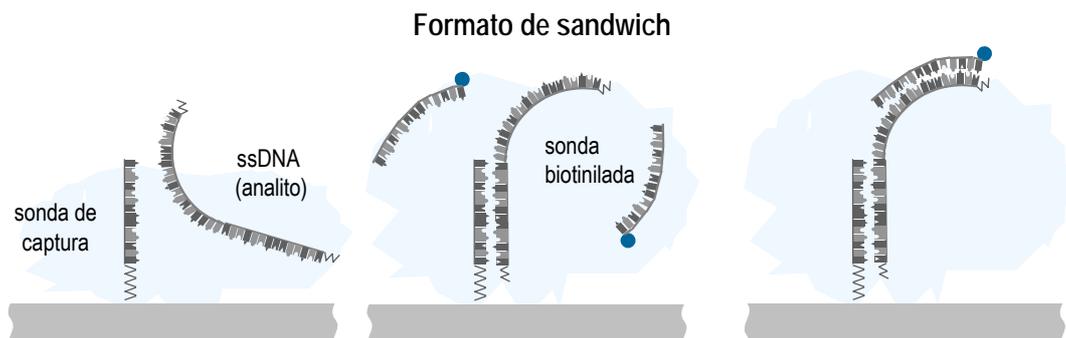


Figura 4A.1. Esquema de un formato de hibridación de captura o sandwich

- Formato competitivo (Figura 4A.2):

En este caso, se inmoviliza en la membrana un oligonucleótido sintético de secuencia idéntica al analito.

Luego, se somete la misma a hibridación simultánea con el analito y con una sonda sintética funcionalizada de secuencia complementaria al analito.

Así, la sonda funcionalizada tiene posibilidad de hibridarse tanto en solución (con el analito), como en fase sólida (con el oligonucleótido sintético inmovilizado en la membrana).

Dicho de otra manera, el analito en solución competirá con el oligonucleótido inmovilizado en la membrana por la sonda funcionalizada.

En este caso, la señal analítica es inversamente proporcional a la concentración del analito.

Cabe destacar que la hibridación que se ve favorecida es la que ocurre en solución, es decir, la formación del híbrido sonda biotinilada-analito ¹⁻⁶. Las hibridaciones en solución son de 10 a 100 veces más rápidas que las que ocurren en fase mixta solución-soporte sólido ²⁻⁴, por lo que se espera

que la señal analítica obtenida en la membrana, en un formato competitivo de este tipo, disminuya drásticamente.

La única desventaja que presenta este formato es que requiere procesar otro lote de “sensores controles” en el que no haya analito, con el objeto de evaluar la hibridación total de la sonda funcionalizada con el oligonucleótido inmovilizado en la superficie cuando el analito está ausente, indicando, por lo tanto, la máxima señal analítica posible de ser obtenida.

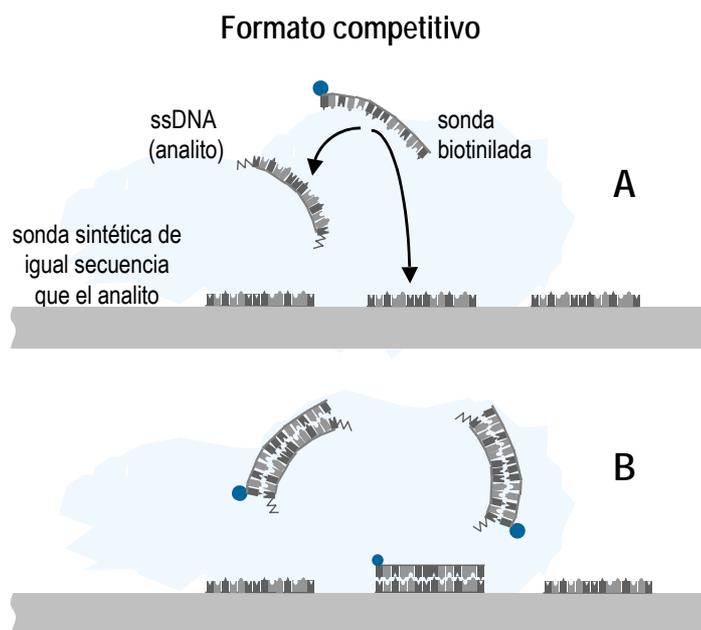


Figura 4A.2. Esquema de un formato de hibridación competitivo. (A) Un oligonucleótido de secuencia idéntica a la del analito se inmoviliza en la membrana. Una sonda funcionalizada de secuencia complementaria a la del analito compete entre el analito en solución y la sonda sintética en la membrana. (B) La señal analítica obtenida es inversamente proporcional a la cantidad de analito en la solución, debido a que los híbridos formados en solución entre el analito y la sonda biotinilada se eliminan en el procedimiento de lavado posthibridación.

La señal analítica de las membranas “genosensoras” debería estar comprendida entre los valores dados por el “blanco” (mínima señal debida a adsorción inespecífica) y por las membranas “controles” (máxima señal analítica, cuando no hay analito y no existe, por tanto, competencia).

En el presente trabajo, se seleccionó el formato competitivo para poder aplicar el mismo modelo planteado en el capítulo 4, que se basa en un marcaje compuesto biotina-estreptavidina.

El modelo que se propone, por tanto, permite que el analito se encuentre en solución. El formato competitivo sería especialmente útil para la detección de transcritos de RNA y para la detección, por tanto, de la expresión de un gen.

El objetivo del presente capítulo consiste en mejorar el diseño y ampliar las posibilidades de análisis del dispositivo genosensor desarrollado en el capítulo 4 mediante la introducción del analito, sin ningún tipo de modificación, en la solución de hibridación.

4A.2 EXPERIMENTAL

4A.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS

4A.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.

4A.2.1.2 Reactivos y materiales

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

Las membranas de nylon integradas al composite grafito-epoxi fueron HYBOND™ N(+)(Amersham). Para la preparación del transductor se utilizó también nylon de apertura de malla de 40 (DIN 130-40 tup 2221).

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) (Boehringer, actualmente 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

Se encargó la síntesis de las siguientes sondas de DNA modelo, a Boehringer:

- Oligonucleótido N° 1 [dT(20)-dG(25)] (en el formato competitivo, esta secuencia cumple la función de oligonucleótido sintético inmovilizado en la membrana y de analito en solución):

5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GGG GGG GGG GGG GGG GGG GGG GGG-3'

Características del producto: véase § 4.2.1.2.

- Oligonucleótido N° 2 (sonda biotinilada):

5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA-3'-biotina

Características del producto: véase § 4.2.1.2.

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

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

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

Una vez inmovilizado el material, si las membranas no van a usarse inmediatamente, pueden conservarse envueltas en papel de aluminio a 4 °C.

4A.2.2.2 Tratamiento de prehibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el oligonucleótido sintético de igual secuencia que el analito

El principal objeto del tratamiento de prehibridación es bloquear, mediante moléculas de alto peso molecular, los sitios libres de la membrana de nylon, de manera de favorecer la hibridación y no la adsorción inespecífica de la sonda biotinilada.

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

- tipo de solución de prehibridación: reactivos bloqueantes ^{7,8,14-19}, uso de formamida ^{7,8,14,16,18} y SDS ^{5,8,14-19}.
- temperatura y tiempo de prehibridación ^{7,8,14}.
- agitación durante el tratamiento de prehibridación ^{4,14,15}.
- volumen utilizado durante el tratamiento de prehibridación ^{8,14}.

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

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

Las variables utilizadas en el tratamiento de prehibridación fueron:

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

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

- 1.- Se colocan las membranas, luego de la fijación del ssDNA (véase protocolo de inmovilización, § 4A.2.2.1), en tubos eppendorf con la cara en la que ha sido adsorbido el DNA del lado de la luz del tubo, de manera que quede en contacto con la solución.
- 2.- Se agregan 450 µl de solución de prehibridación
- 3.- Se colocan los tubos eppendorf en el incubador, con agitación suave y a 42 °C, durante 4 h.

4A.2.2.3 Hibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el oligonucleótido sintético de igual secuencia que el analito

Este es el paso más importante del procedimiento de construcción del sensor, ya que aquí ocurre la hibridación de la sonda biotinilada, distribuyéndose entre el oligonucleótido inmovilizado en la membrana y el analito que, en este caso, se encuentra en solución. Obviamente, para que haya competición la secuencia del oligonucleótido sintético inmovilizado es idéntica a la del analito.

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 ^{7,8,14-19}, uso de formamida ^{7,8,14,16,18} y SDS ^{5,8,14-19}, fuerza iónica ^{7,16}, uso de dextranos ^{16,17,19} o polietilenglicol ^{5,7,18}.
- temperatura y tiempo de hibridación ^{7,8,14}.
- agitación durante la hibridación ^{4,14,15}.
- volumen de hibridación ^{8,14}.

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

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

Las variables utilizadas en el procedimiento de hibridación fueron:

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

La preparación del DNA analito en solución, en este caso dG(25)-dT(20) y de la sonda biotinilada se realizó como se describiera en § 4.2.5.7.

El protocolo de hibridación de las membranas de nylon HYBOND™ para un formato competitivo, fue el mismo que el utilizado en § 4.2.5.8, con la única diferencia que antes de la hibridación, se agregó en el medio de hibridación el analito, en este caso dT(20)-dG(25).

Así, éste competiría en solución por la sonda funcionalizada (dA(20)-biotina), con el oligonucleótido sintético inmovilizado en la membrana, de igual secuencia que el analito.

La sonda biotinilada puede hibridarse, por lo tanto, en solución con el analito, o en la membrana con el oligonucleótido sintético. Los híbridos biotinilados formados en solución son desechados, mientras que los híbridos funcionalizados con biotina generados en la membrana son los que darán la señal analítica en el dispositivo genosensor.

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

- 1.- Inmediatamente después del tratamiento de prehibridación (§ 4A.2.2.2), se elimina la solución de prehibridación de los tubos eppendorf, sin mover las membranas, y se agregan 450 µl de solución de hibridación preparada según § 4.2.5.2.
- 2.- Se dejan los tubos eppendorf en el incubador con agitación suave y a 42 °C, durante 10 minutos (para que la solución de hibridación tome esta temperatura).
- 3.- Se adiciona un volumen (en µl) de dT(20)-dG(25) (en el modelo propuesto esta secuencia representa al analito).
- 4.- Se adiciona un volumen (en µl) de sonda biotinilada (dA(20)-biotina).
- 4.- Se dejan las membranas en hibridación con agitación suave y a 42 °C, durante toda la noche.
- 5.- Luego de la hibridación, se procede a los lavados posthibridación de las membranas, de la siguiente manera:
 - 1.- 10 minutos, en 40 ml de 2 X SSC-0.1 % SDS, con agitación suave, a 20 °C.
 - 2.- 10 minutos, en 40 ml de 0.2 X SSC-0.1 % SDS, con agitación suave, a 50 °C.
 - 3.- Se remojan las membranas en 2 X SSC dos veces a 20 °C, para eliminar el SDS.

Los lavados de posthibridación, en este caso, tienen una importancia extra que la expresada en § 4.2.5.6. Como ya se explicara, en el formato competitivo una parte de los híbridos biotinilados se generan en solución (analito-sonda biotinilada), mientras que otros (oligonucleótido sintético-sonda biotinilada) se generan en la membrana. Luego de los lavados, éstos últimos son los que se evalúan, y su señal será inversamente proporcional a la cantidad de DNA muestra presente en la solución.

4A.2.2.4 Marcación enzimática posthibridación

Luego de la competición, hibridación y lavados posthibridación, los híbridos de DNA entre el oligonucleótido inmovilizado en la membrana de secuencia idéntica al analito y la sonda biotinilada, deben revelarse. Esto se consigue mediante el acoplamiento entre la biotina del dsDNA de la membrana y la estreptavidina del conjugado estreptavidina-HRP.

La peroxidasa es quien genera la señal analítica amperométrica, luego de la reacción con un 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 ⁷
- temperatura y tiempo de premarcación con solución bloqueante ⁷
- temperatura y tiempo de marcación ⁷
- agitación durante la marcación ^{4,7,14,15}
- volumen de marcación ^{8,14}

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

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

Las variables utilizadas en el procedimiento de marcación enzimática fueron:

- temperatura y tiempo de premarcación con solución bloqueante: 37 °C, 30 min.
- temperatura y tiempo de marcación enzimática: 37 °C, 1h.
- agitación durante la premarcación con solución bloqueante y marcación enzimática: suave.
- volumen de marcación enzimática: 450 µl.

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

El protocolo de marcación enzimática de las membranas de nylon HYBOND™, luego de la hibridación para un formato competitivo, es el mismo que el utilizado en § 4.2.6.9, y consistió en:

- | |
|---|
| 1.- Inmediatamente después de la hibridación (§ 4A.2.2.3), y de los lavados de posthibridación, se colocan las membranas en los tubos eppendorf con la cara en la que se ha adsorbido el DNA hacia la luz del tubo y se agregan 450 µl de solución bloqueante.
2.- Se dejan los tubos eppendorf en el incubador con agitación suave y a 37 °C, durante 30 minutos (procedimiento de premarcación con solución bloqueante).
3.- Se adiciona un volumen (en µl) de conjugado enzimático.
4.- Durante la marcación enzimática, se dejan las membranas en agitación suave y a 37 °C, durante 1 h.
5.- Luego de la marcación, se procede a los lavados postmarcación de las membranas, de la siguiente manera:
1.- 10 minutos, en 40 ml de solución de lavado, con agitación suave, a 20 °C
2.- Se repite 2 veces más. |
|---|

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

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

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

4A.2.3 INTEGRACIÓN AL TRANSDUCTOR DE LAS MEMBRANAS MODIFICADAS

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

La membrana circular se colocó en la superficie del sensor (mediante pinzas) de manera que la cara modificada quede en contacto con el transductor (véase Figura 2.4). Posteriormente, se sujetó mediante una malla de nylon poro grueso de 2 x 2 cm. Esta última se sujetó al cuerpo del sensor mediante una junta tórica y se selló con parafilm. Posteriormente, todo el conjunto se incorporó al sistema de detección amperométrico.

4A.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 amperométrica está relacionada con la cantidad de enzima de la superficie de la membrana, que a su vez está directamente relacionada con la cantidad de híbrido formado en la membrana, entre la sonda biotinilada y el oligonucleótido sintético inmovilizado. Ahora bien, la cantidad de híbrido formado sobre la membrana, en un formato competitivo, está relacionada de manera inversa con la cantidad de analito en solución.

La evaluación se llevó a cabo con el sistema amperométrico descrito en § 2.2.2. La celda de medida fue una solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0, utilizándose como electrodo de trabajo el genosensor construido en § 4A.2.3. La concentración de hidroquinona en el medio fue de 1.8 mM. A este sistema, se le aplicó el potencial de reducción de la hidroquinona (-0.1 V, vs Ag/AgCl), potencial 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 $I_{máx}$, la cual es proporcional a la actividad enzimática en la superficie del transductor. Los tiempos de respuesta fueron de 2 minutos, que es el tiempo de respuesta del sistema para la obtención de la lectura correspondiente a la $I_{máx}$.

4A.2.5 PREPARACIÓN DEL GENOSENSOR DE MEMBRANAS RECAMBIABLES EN FORMATO COMPETITIVO

En la Figura 4A.3, se esquematiza el fundamento de la obtención de la señal analítica en un formato competitivo.

Existen numerosísimas variables que se pueden optimizar en el dispositivo creado, y muchas de ellas escapan del objeto de la tesina.

Entre algunas de las variables, optimizadas en el capítulo 4, se encuentran:

- cantidad de dT(20)-dG(25) inmovilizada en la membrana: 100 pmoles (§ 4.2.10)
- cantidad de dA(20)-biotina de la solución de hibridación: 40 pmoles (§ 4.2.11)
- cantidad de HRP-estreptavidina en la solución bloqueante durante la marcación enzimática: 0.8 μg (§ 4.2.12)

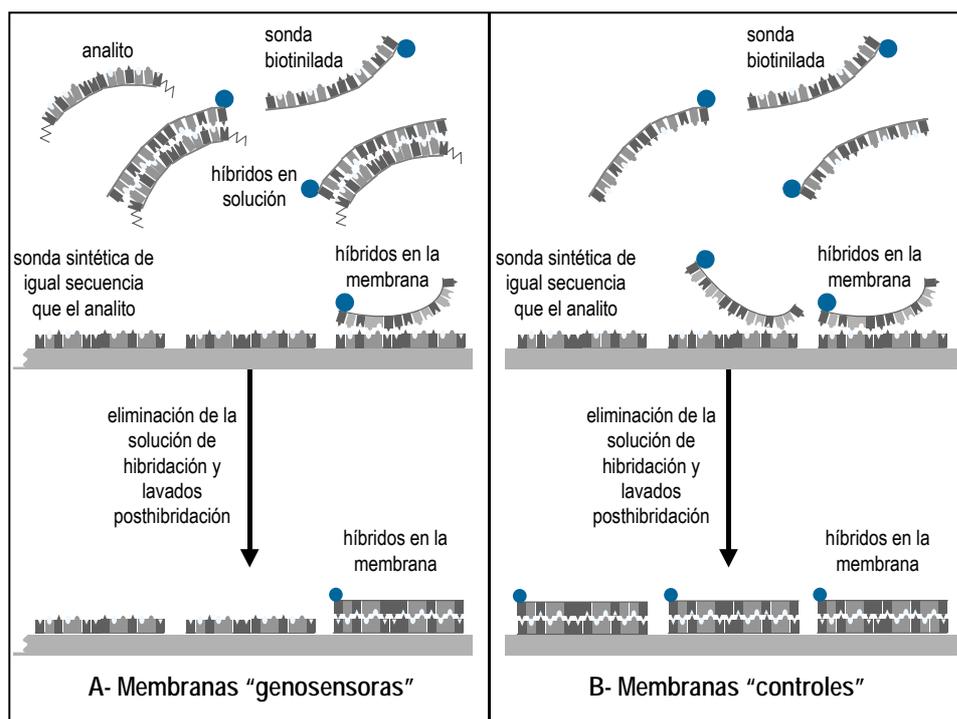


Figura 4A.3. Esquema del proceso de hibridación en las membranas "genosensoras" (A) y en las membranas "controles" (B). En este dibujo esquemático se observa como en las membranas "genosensoras", en las cuales ocurre competencia por la sonda entre el analito en solución y el oligonucleótido sintético inmovilizado en la membrana, la señal analítica es comparativamente menor que en las membranas "controles", que evalúan la hibridación total. Esto se debe a que parte de las sondas biotiniladas, en lugar de inmovilizarse en la membrana, se pierden al formarse el híbrido en solución con el analito, luego de eliminar la solución de hibridación y de lavar las membranas luego del procedimiento de hibridación.

En este formato, se utilizaron las mismas cantidades de reactivos que las optimizadas en el capítulo 4.

Para tal fin, se realizaron en todos los casos, un lote de membranas "blanco", con el objeto de evaluar la adsorción inespecífica (véase Figura 4A.4). Otro lote de membranas fueron las llamadas "genosensoras", que evaluaron el proceso de competición. Además, se construyó un lote de membranas "controles", con el objeto de evaluar la hibridación total de la sonda biotinilada con el oligonucleótido inmovilizado en la superficie, cuando el analito está ausente y que indicaron, por lo tanto, la máxima señal analítica posible de ser obtenida. Por cada lote se procesaron replicados de las membranas.

La señal analítica de las membranas “genosensoras” debería estar comprendida entre los valores dados por el “blanco” (mínima señal debida a adsorción inespecífica), y por las membranas “controles” (máxima señal analítica, cuando no hay analito y no existe, por tanto, competencia). La adsorción inespecífica se utilizó para detectar la verdadera señal de fondo del dispositivo, ya que por diferencia entre la señal de las membranas “genosensoras” y las membranas “blanco”, y las membranas “controles” y las membranas “blanco”, se obtuvo la respuesta analítica debido al proceso de hibridación en formato competitivo e hibridación total, respectivamente.

En la Figura 4A.3 se puede observar como, en las membranas “controles”, la señal analítica es comparativamente mayor respecto a las membranas “genosensoras”, ya que en estas últimas parte de las sondas biotiniladas se eliminan al formarse los híbridos en solución con el DNA analito.

4A.2.5.1 Protocolo de preparación de las membranas “genosensoras” en formato competitivo

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización del oligonucleótido de igual secuencia que el analito, descrito en § 4A.2.2.1.
- 2.- Se sigue con el tratamiento de prehibridación, descrito en § 4A.2.2.2.
- 3.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 4A.2.2.3.
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 4A.2.2.4.

4A.2.5.2 Protocolo de preparación de las membranas “controles” en formato competitivo

Este lote se realizó de manera idéntica al anterior, pero obviando el paso de adición de ssDNA (analito) en la solución de hibridación (paso 3 del protocolo de hibridación, § 4A.2.2.3), es decir, no se adicionó dT(20)-dG(25), que en este modelo representaría el analito.

Como el resto de los reactivos fue el mismo, en estas membranas “controles” se evaluó el proceso de hibridación total, y el resultado representaría la señal analítica máxima, cuando la cantidad del analito es nula y no existe competencia.

El protocolo que se siguió fue:

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización del oligonucleótido de igual secuencia que el analito, descrito en § 4A.2.2.1.
- 2.- Se sigue con el tratamiento de prehibridación, descrito en § 4A.2.2.2.
- 3.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 4A.2.2.3, con la única diferencia que no se adiciona dT(20)-dG(25) en la solución de hibridación (se obvia el paso 3 de este protocolo).
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 4A.2.2.4.

4A.2.5.3 Protocolo de preparación de las membranas "blanco"

Este lote se realizó de manera idéntica al de las membranas "genosensoras" en formato competitivo, pero obviando el paso de adición de ssDNA (oligonucleótido sintético de igual secuencia que el analito) sobre la membrana, es decir, no hay dT(20)-dG(25) inmovilizado.

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

En § 4.2.13, se explicó de manera exhaustiva las posibilidades de adsorción inespecífica en el formato descrito en el capítulo 4. Todas las consideraciones que allí se expresan son válidas para el formato competitivo, excepto que existen nuevas posibilidades de adsorción inespecífica, tal como se observa en la Figura 4A.4.

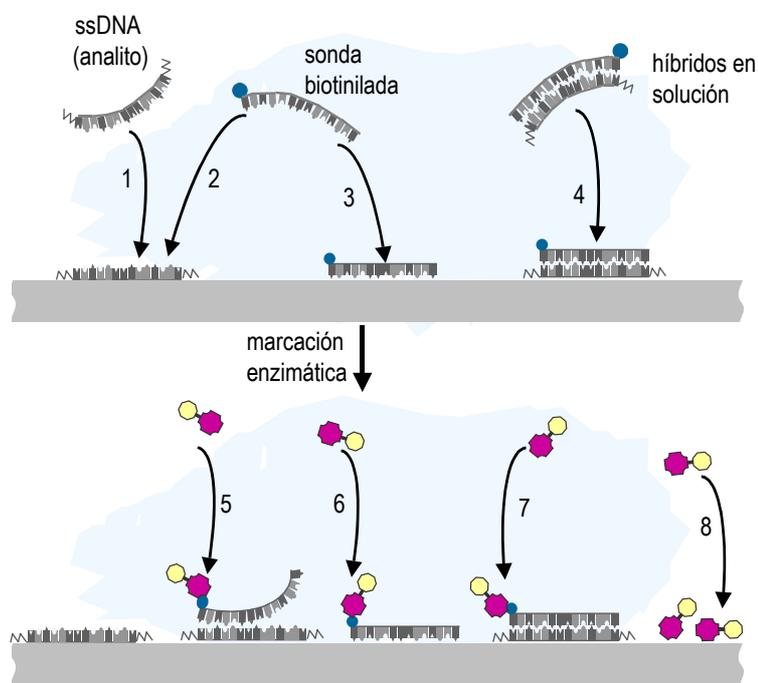


Figura 4A.4. Mecanismo de adsorción inespecífica en un formato competitivo (véase texto). Este proceso se evalúa en las membranas "blanco".

En este caso, al igual que en el formato descrito en el capítulo 4, durante el proceso de hibridación puede adsorberse de manera inespecífica la sonda biotinilada (3). También, puede adsorberse el analito, pero éste no contribuiría directamente al aumento de la señal del blanco (1). Ahora bien, el analito adsorbido inespecíficamente puede hibridarse con la sonda biotinilada, y así sí contribuir de manera indirecta a la adsorción inespecífica (2). Otra nueva posibilidad de adsorción es la del híbrido analito-sonda biotinilada preformado en solución (4). Los mecanismos de adsorción inespecífica (2, 3 y 4), contribuyen de manera indirecta, ya que por sí solos no aumentan la señal analítica inespecífica.

Durante la marcación enzimática, el conjugado HRP-estreptavidina en el formato competitivo tendría cuatro posibilidades de adsorción inespecífica, mientras que en el formato del capítulo 4, sólo eran dos (véase Figura 4.6):

- unirse a la sonda biotinilada adsorbida (6);
- unirse a la sonda biotinilada hibridada al analito adsorbido inespecíficamente (5);
- adsorberse directamente en la membrana (8);
- unirse al híbrido –formado en solución– adsorbido en la membrana (7).

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

El protocolo que se siguió para su preparación fue:

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización del oligonucleótido de igual secuencia que el analito, descrito § 4A.2.2.1, con la única diferencia que no se adiciona dT(20)-dG(25) (se obvia el paso 2 del protocolo).
- 2.- Se colocan estas membranas en tubos eppendorf y sigue con el paso 2 del tratamiento de prehibridación, descrito en § 4A.2.2.2. Se debe tener en cuenta que en estas membranas no hay adsorbido dT(20)-dG(25).
- 3.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 4A.2.2.3.
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 4A.2.2.4.

4A.2.5.4 Integración al transductor de las membranas modificadas y evaluación de los genosensores

Una vez preparadas las membranas “genosensoras”, “controles” y “blanco”, se integraron al transductor amperométrico, como se explicara en 4A.2.3.

La evaluación de los sensores preparados se realizó basándose en la señal generada, finalmente, por la enzima peroxidasa, según se explicara en § 4.2.8.

De esta forma, la información analítica que se obtuvo –en este caso por triplicado– fue correspondiente a la $I_{\text{máx}}$, la cual es proporcional a la actividad enzimática de las membranas “blanco”, “genosensoras” y “controles”.

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

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

$$\text{Señal de hibridación de los controles} = \bar{x} I_{\text{máx}} \text{ control} - \bar{x} I_{\text{máx}} \text{ blanco}$$

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

Esta señal de hibridación en los genosensores está en relación con la cantidad de enzima presente en la membrana pero que se encuentra únicamente unida al híbrido formado en la superficie e inversamente relacionada con la cantidad de analito en solución (§ 4A.2.4 y Figura 4A.3).

4A.2.5.5 Diseño del experimento en formato competitivo

Para evaluar la utilidad del formato competitivo, se realizaron tres lotes de membranas, como se expresara en § 4A.2.5, denominados membranas “genosensoras”, membranas “controles” y membranas “blanco”.

La Tabla 4A.1 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.

Tabla 4A.1. *Diseño del experimento de evaluación del formato competitivo. 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 2 “genosensor” n=3	Lote 3 “control” n=3
Oligonucleótido 1 -dT(20)-dG(25)- protocolo de adsorción	No se adiciona (-)	99.6 pmoles	99.6 pmoles
Oligonucleótido 2 -dA(20)-biotina- protocolo de hibridación	38.8 pmoles	38.8 pmoles	38.8 pmoles
Oligonucleótido 1 -dT(20)-dG(25), analito- protocolo de hibridación	83.0 pmoles	83.0 pmoles	No se adiciona (-)
HRP-estreptavidina Protocolo de marcación enzimática	0.8 µg	0.8 µg	0.8 µg

Como ya se expresara, las membranas “genosensoras” evaluaron la hibridación y la competición (Figura 4A.3, A), las membranas “controles” la hibridación total en la membrana (Figura 4A.3, B), y las membranas “blanco” la adsorción inespecífica global (Figura 4A.4). Por cada lote se evaluaron triplicados de las membranas.

Para obtener la información de la cantidad de analito en una muestra se requiere procesar los tres lotes de membranas.

Cabe destacar que en §§ 4.2.10, 4.2.11 y 4.2.12, se optimizaron las cantidades de dT(20)-dG(25) inmovilizado en la membrana, de dA(20)-biotina y del conjugado HRP-estreptavidina, respectivamente. Estas cantidades fueron las utilizadas en el presente diseño.

4A.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 4A.5 se muestran los resultados del experimento realizado en § 4A.2.5.5. Este experimento se basa en el diseño de un formato competitivo. En la Figura 4A.5 cada barra muestra el valor medio de los replicados de cada lote de membranas “genosensoras”, así también como de las membranas “blanco” y de las membranas “controles”, y el error representa la desviación estándar (ec. 1, § 4B.1.1) de los replicados de cada lote.

Estos valores demuestran que la señal amperométrica de los genosensores en formato competitivo disminuyen drásticamente en presencia del analito en solución (en comparación con la señal observada en las membranas “controles” que indican la hibridación total, en ausencia de analito en solución), por lo que ha ocurrido hibridación entre el analito y la sonda biotinilada en solución.

La causa de que la señal amperométrica descienda en la membrana “genosensora” se debe a que los híbridos formados en solución entre el analito y la sonda biotinilada, provocan un descenso de la cantidad de sonda disponible para hibridarse con la sonda sintética inmovilizada en la membrana.

En la figura también puede observarse que existe reproducibilidad entre ensayos paralelos de un mismo lote, con desviaciones estándar relativas (ec. 2, § 4B.1.2) de alrededor del 10 %.

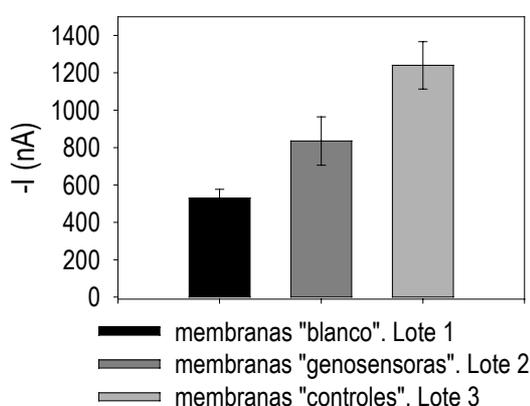


Figura 4A.5. Evaluación del diseño del formato competitivo. *dT(20)-dG(25)* inmovilizado en la membrana: 99.6 pmoles. *dA(20)-biotina*: 38.8 pmoles. *dT(20)-dG(25)* (analito) en la solución de hibridación: 83.0 pmoles. HRP-estreptavidina: 0.8 μ g. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Electrodo de trabajo grafito-epoxi-membrana HYBOND™ modificada según 4A.2.5.5.

En la Figura 4A.6 se ha graficado sólo la señal de hibridación, obtenida según las siguientes expresiones:

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

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

El error de las barras representa la desviación estándar de la diferencia de los valores medios de las membranas “genosensoras” y “controles” respecto a las “blanco” (ec. 11, § 4B.2.1).

La Tabla 4A.2 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación entre las señales de hibridación de las membranas “genosensoras” y las “controles”. Se supuso varianzas comparables. Se puede concluir que la diferencia de señal de hibridación entre ambas es significativa (prueba \hat{t}).

En la Figura 4A.6 se muestra el nivel a partir del cual la señal de hibridación de las membranas “genosensoras” es significativamente inferior a la de las membranas “controles”, para estas mismas condiciones experimentales (ec. 19, § 4B.2.2.4).

Como se puede observar, la señal de hibridación de los genosensores obtenida experimentalmente permitiría disminuir aún más la cantidad de analito en la solución de hibridación.

Según lo visto en el capítulo 4, § 4.3.7, la reproducibilidad que existe en la adsorción inespecífica en ensayos llevados a cabo en días diferentes podría conducir a la supresión de la construcción del lote de membranas “blanco”, con las ventajas prácticas que esto traería al formato competitivo diseñado, ya que sólo sería necesario construir dos lotes de membranas, en lugar de tres.

Este formato permite, por tanto, que el analito se encuentre en solución, abriendo un espectro más amplio de posibilidades de análisis y permitiendo en un futuro la automatización del proceso de construcción de sensores con este formato.

Con un formato de este tipo, existe también la posibilidad de regenerar las superficies para poder utilizar el mismo dispositivo en múltiples ensayos.

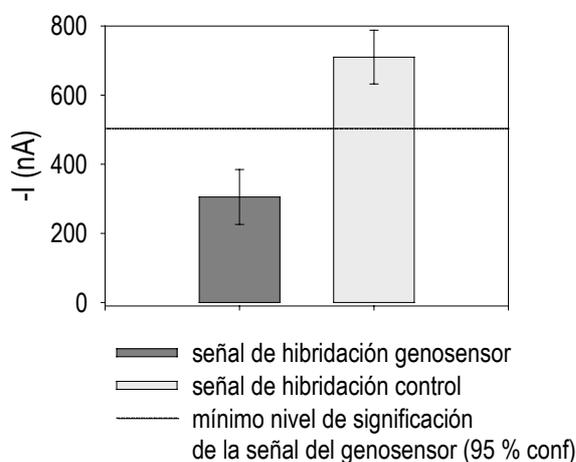


Figura 4A.6. Señales netas de hibridación obtenidas en la evaluación del formato competitivo. Las condiciones experimentales son las que se muestran en la Figura 4A.5.

Tabla 4A.2. Pruebas estadísticas para la comparación de los valores medios de la señal de hibridación (prueba *t*) de las membranas “genosensoras” y “controles”, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	Comparación de las señales de hibridación entre las membranas “genosensoras” y las “controles”
S_p (ec. 13, § 4B.2.2.1)	$S_p = 96.51$
grados libertad (ec. 17, § 4B.2.2.3)	8
Prueba <i>t</i> (bilateral) (ec. 15, § 4B.2.2.2)	$t_{\text{calc}} (3.63) > t_8 (1.86)$

4A.4 CONCLUSIONES

1. Por primera vez se construyeron genosensores en formato competitivo.
2. El genosensor amperométrico desarrollado sobre la base de un transductor electroquímico con una membrana de nylon HYBOND™ integrada al mismo, permite efectuar análisis genéticos en un formato competitivo, es decir, con el analito en solución.
3. El hecho de que el analito se encuentre en solución otorga al dispositivo numerosas ventajas prácticas, como es la capacidad de analizar una muestra sin necesidad de inmovilizarla o funcionalizarla y la posibilidad de automatizar el proceso de preparación de los dispositivos genosensores. Estos, además, podrían ser utilizados en varios ensayos, mediante renovación de la superficie o por regeneración de la membrana “genosensora”.
4. La cantidad de analito detectada por este sistema modelo es de 80.0 pmoles, pero con un margen de señal que permitiría detectar cantidades aún menores (experimentos no realizados).
5. El formato competitivo sería especialmente útil para el análisis de transcritos de RNA (es decir, mRNA), que otorga información sobre la expresión de un gen.
6. La adsorción inespecífica es controlada y reproducible. Puede evitarse el hecho de preparar “ensayos blanco” para evaluarla, si esta señal se mantiene y su magnitud es conocida.
7. Los reactivos bloqueantes utilizados en las soluciones de hibridación y prehibridación cumplen su función con eficacia.

4A.5 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ S. S. Ghosh, G. F. Musso. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 5353-5372.
- ² J. N. Kremsky, J. L. Dougherty, R. E. Meyers, M. Collins, E. L. Brown. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 2891-2909.
- ³ V. Lund, R. Schmid, D. Rickwood, E. Hornes. *Nucleic Acids Res.* 1988, 22, 10861-10880.
- ⁴ S. F. Wolf, L. Haines, J. Fisch, J. N. Kremsky, J. P. Dougherty, K. Jacobs. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 2911-2926.
- ⁵ A. C. Syvanen, M. Laaksonen, H. Soderlund. *Nucleic Acids Res.* 1986, 14, 5037-5048.
- ⁶ 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.
- ⁷ L. J. Kricka. *Nonisotopic DNA Probe Techniques*; Academic Press, Inc.: San Diego, 1992.
- ⁸ L. T. Kirby. *DNA Fingerprinting*; Stockton Press: New York, 1990.
- ⁹ R. K. Saiki, P. S. Walsh, C. H. Levenson, H. A. Erlich. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 6230-6234.
- ¹⁰ V. T. Kung, P. R. Panfili, E. L. Sheldon, R. S. King, P. A. Nagainis, B. Gomez, D. A. Ross, J. Briggs, R. F. Zuk. *Anal. Biochem.* 1990, 187, 220-227.
- ¹¹ X. Chen, X-E. Zhang, Y-Q Chain, W-P Hu, Z-P Zhang, X-M Zhang, A. E. G. Cass. *Biosens. Bioelectron.* 1998, 13, 451-458.
- ¹² R. C. Ebersole, J. A. Miller, J. R. Moran, M.D. Ward. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 3239-3241.
- ¹³ G. M. Church, W. Gilbert. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 1991-1995.
- ¹⁴ J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2th ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989.
- ¹⁵ K. C. Reed, D. A. Mann. *Nucleic Acids Res.* 1985, 13, 7207-7221.
- ¹⁶ J. Meinkoth, G. Wahl. *Anal. Biochem.* 1984, 138, 267-284.
- ¹⁷ T. R. Gingeras, D. Y. Kwoh, G. R. Davis. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 5373-5390.
- ¹⁸ M. Renz, C. Kurz. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 3435-3444.
- ¹⁹ L. Singh, K. W. Jones. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 5627-5638.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

4B.1 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO PARA LAS SEÑALES AMPEROMÉTRICAS NETAS

En los siguientes apartados se describe el tratamiento estadístico seguido para aquellos resultados obtenidos por lectura directa, es decir, tal como es el caso de las señales amperométricas netas (por ejemplo, para la comparación de las señales amperométricas de un grupo de datos de genosensores y de sus correspondientes blancos).

En § 4B.2 se detalla el tratamiento estadístico de las señales de hibridación, es decir, de aquellos resultados que se obtiene por diferencia de dos grupos sencillos de datos obtenidos por lectura directa.

4B.1.1 CALCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR

En los gráficos que se expresan como barras en el presente trabajo y que muestran los valores de las señales amperométricas netas (es decir, obtenidas por lectura directa), el error que se muestra en dichas barras representa la desviación estándar, que se obtiene de la siguiente expresión (ecuación 1):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

donde x_i es el valor individual, \bar{x} el valor medio, y n el número de determinaciones.

4B.1.2 DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA

La desviación estándar relativa (DER), también denominada coeficiente de variación (CV), se calcula según la siguiente expresión (ecuación 2):

$$DER = 100 \cdot \frac{s}{\bar{x}}$$

El CV o DER, cuyas unidades se expresan en porcentaje, es un error relativo, es decir, una estimación del error dividida por una estimación del valor absoluto de la cantidad medida.

4B.1.3 PRUEBA F PARA LA COMPARACIÓN DE DESVIACIONES ESTÁNDAR

La prueba F permite la comparación de las desviaciones estándar, es decir, de los errores aleatorios de dos conjuntos de datos.

La función F de Fisher se obtiene por el cociente de dos varianzas (definidas como s^2 , es decir el cuadrado de la desviación estándar). Dicha función se calcula –con un nivel de significación prefijado– mediante la siguiente expresión (ecuación 3):

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

Si se quiere probar si dos desviaciones estándar difieren significativamente (por ejemplo, antes de aplicar una prueba t), es adecuado realizar una prueba de dos colas (bilateral) (véase § 4B.1.4.2).

Los valores de las varianzas deben disponerse en la fracción de manera que F sea siempre ≥ 1 .

La hipótesis nula adoptada es que las poblaciones de donde se toman las muestras sean normales, y que sean iguales las varianzas de las mismas. Si la hipótesis nula es verdadera, entonces la razón de las varianzas debería ser próxima a 1. Las diferencias respecto a 1 se deben a variaciones aleatorias, pero si la diferencia es demasiado grande no se podrá atribuir a esta causa: si el valor de F calculado excede un cierto valor (obtenido de tablas), entonces se rechaza la hipótesis nula. El valor crítico de la función F tabulado depende del tamaño de las dos muestras, del nivel de significación y del tipo de prueba realizada (bilateral en el caso del presente trabajo). Si $F_{\text{calc}} > F_{\text{crit}}$, las varianzas de

ambos grupos de datos no son comparables al nivel de significación prefijado, mientras que si $F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}}$, las varianzas de ambos grupos de datos son comparables, es decir, las determinaciones de ambos grupos de datos son comparativamente iguales de precisas.

4B.1.4 COMPARACIÓN DE LOS VALORES MEDIOS DE DOS GRUPOS DE DATOS CON VARIANZAS COMPARABLES

Para poder comprobar que la señal de un genosensor, por ejemplo, es significativamente superior a la de su correspondiente blanco, se parten de los dos valores medios muestrales \bar{x}_b y \bar{x}_g . Si se considera como hipótesis nula que los valores de los genosensores y los blancos dan el mismo resultado, se necesita comprobar si $\bar{x}_g - \bar{x}_b$ difiere en forma significativa de cero. Para tal fin, se realiza la prueba t.

Los apartados que se explican a continuación tratan sobre la comparación de los valores medios de dos grupos de datos con varianzas comparables (determinado por la Prueba F, § 4B.1.3).

4B.1.4.1 Estimación conjunta de la desviación estándar

Si los dos grupos de datos cualesquiera \bar{x}_1 y \bar{x}_2 tienen desviaciones estándar que no sean significativamente diferentes (comprobado con la prueba F), se puede calcular una estimación conjunta de la desviación estándar a partir de las dos desviaciones estándar individuales s_1 y s_2 utilizando la siguiente expresión general (ecuación 4A):

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Para el caso particular de la comparación de genosensores con sus respectivos blancos, los dos grupos de datos son \bar{x}_b y \bar{x}_g y las desviaciones estándar individuales, s_b y s_g . Se utiliza, entonces, la ecuación 4B:

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_g - 1)s_g^2 + (n_b - 1)s_b^2}{n_g + n_b - 2}}$$

4B.1.4.2 Prueba t de comparación de los valores medios de dos grupos de datos con varianzas comparables

La prueba t para dos grupos de datos cualesquiera \bar{x}_1 y \bar{x}_2 con varianzas comparables se calcula mediante la siguiente expresión general (ecuación 5A):

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Una vez calculado el valor de t , se debe comparar con el t_{crit} obtenido de las tablas. Si el valor de t calculado excede el valor de t obtenido de tablas, entonces se rechaza la hipótesis nula, es decir, si $t_{\text{calc}} > t_{\text{crit}}$, los valores medios de ambos grupos son diferentes al nivel de significación prefijado. El valor crítico de tablas de t depende del tamaño de las dos muestras, del nivel de significación y del tipo de prueba realizada (unilateral o bilateral).

La ecuación 5A se ha utilizado en el presente trabajo para un caso general, en el cual no se tiene una idea preconcebida, previa a las mediciones experimentales, con relación a si la diferencia entre los valores medios de ambos grupos de datos será positiva o negativa. De esta manera, es necesario contar con una prueba que cubra esta posibilidad, como es el caso de una prueba bilateral.

Para el caso particular de la comparación de genosensores con sus respectivos blancos, los dos grupos de datos son \bar{x}_b y \bar{x}_g . Se utiliza, entonces, la ecuación 5B:

$$t = \frac{(\bar{x}_g - \bar{x}_b)}{s_p \sqrt{\frac{1}{n_g} + \frac{1}{n_b}}}$$

En este caso particular, se espera una diferencia en un sentido. Es evidente que antes de empezar el experimento se espera incrementar la respuesta en los genosensores respecto al blanco y, por lo tanto, es necesario probar un incremento. Este tipo de prueba se llama unilateral.

4B.1.4.3 Cálculo de los grados de libertad

Ya se ha comentado que los valores de t_{crit} dependen del tamaño muestral. Para poder encontrar el t_{crit} en las tablas, es necesario calcular los grados de libertad. Si las varianzas de ambos grupos de datos son comparables (determinado por la Prueba F, § 4B.1.3), los grados de libertad se calculan mediante la siguiente expresión general (ecuación 6A):

$$gl(v) = n_1 + n_2 - 2$$

Para el caso particular de la comparación de genosensores con sus respectivos blancos, se utiliza, entonces, la ecuación 6B:

$$gl(v) = n_g + n_b - 2$$

4B.1.4.4 Mínimo nivel de significación de la señal de los genosensores

Si se quiere conocer a partir de que valor la señal amperométrica de los genosensores es significativamente superior a la de sus correspondientes blancos para un nivel de significación prefijado, se puede realizar una modificación de la ecuación 5B, transformándola en la siguiente expresión (ecuación 7):

$$\bar{x}_g = \bar{x}_b + t_{\text{crit}} \cdot s_p \sqrt{\frac{1}{n_g} + \frac{1}{n_b}}$$

Así, \bar{x}_g representa el valor medio del mínimo nivel de significación de los genosensores que se pretende calcular, \bar{x}_b es el valor medio de los correspondientes blancos, s_p es la desviación estándar calculada según la ecuación 4B y t es el valor de t_{crit} para los grados de libertad calculados según la ecuación 6B y para el nivel de significación prefijado.

4B.1.5 COMPARACIÓN DE LOS VALORES MEDIOS DE DOS GRUPOS DE DATOS CON VARIANZAS NO COMPARABLES

Los apartados que se explican a continuación tratan sobre la comparación de los valores medios de dos grupos de datos con varianzas no comparables (determinado por la Prueba F, § 4B.1.3).

En este caso, no es correcto realizar una estimación conjunta de la desviación estándar.

4B.1.5.1 Prueba t de comparación de los valores medios de dos grupos de datos con varianzas no comparables

La prueba t para dos grupos de datos cualesquiera \bar{x}_1 y \bar{x}_2 con desviaciones estándar no comparables (s_1 y s_2) se calcula mediante la siguiente expresión (ecuación 8A):

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

La ecuación 8A se ha utilizado en el presente trabajo para un caso general, en el cual no se tiene una idea preconcebida, previa a las mediciones experimentales, como es el caso de una prueba bilateral.

Para el caso particular de la comparación de genosensores con sus respectivos blancos con desviaciones estándar no comparables (s_b y s_g), los dos grupos de datos son \bar{x}_b y \bar{x}_g . Se utiliza, entonces, la ecuación 8B:

$$t = \frac{\bar{x}_g - \bar{x}_b}{\sqrt{\frac{S_g^2}{n_g} + \frac{S_b^2}{n_b}}}$$

La ecuación 8B se ha utilizado cuando se espera una diferencia en un sentido, es decir, para el caso de una prueba unilateral.

4B.1.5.2 Cálculo de los grados de libertad

Ya se ha comentado que los valores de t_{crit} dependen del tamaño muestral. Para poder encontrar el t_{crit} en las tablas, es necesario calcular los grados de libertad. Si las varianzas de ambos grupos de datos cualesquiera no son comparables (determinado por la Prueba F, § 4B.1.3), los grados de libertad se calculan mediante la siguiente expresión general (ecuación 9A):

$$g.l.(v) = \left\{ \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{S_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 + 1}} \right\} - 2$$

El resultado se redondea al número entero más cercano.

Para el caso particular de la comparación de genosensores con sus respectivos blancos, se utiliza, entonces, la ecuación 9B:

$$g.l.(v) = \left\{ \frac{\left(\frac{S_g^2}{n_g} + \frac{S_b^2}{n_b} \right)^2}{\frac{\left(\frac{S_g^2}{n_g} \right)^2}{n_g + 1} + \frac{\left(\frac{S_b^2}{n_b} \right)^2}{n_b + 1}} \right\} - 2$$

4B.1.5.3 Mínimo nivel de significación de la señal de los genosensores

Si se quiere conocer a partir de que valor la señal amperométrica de los genosensores es significativamente superior a la de sus correspondientes blancos para un nivel de significación prefijado y cuando ambos grupos de datos no poseen varianzas comparables (determinado por la Prueba F, § 4B.1.3), se puede realizar una modificación de la ecuación 8B, transformándola en la siguiente expresión (ecuación 10):

$$\bar{X}_g = \bar{X}_b + t_{\text{crít}} \cdot \sqrt{\frac{S_g^2}{n_g} + \frac{S_b^2}{n_b}}$$

Así, \bar{X}_g representa el valor medio del mínimo nivel de significación de los genosensores que se pretende calcular, \bar{X}_b es el valor medio de los correspondientes blancos, s_b y s_g son las desviaciones estándar individuales de los blancos y de los genosensores, y $t_{\text{crít}}$ es el valor de t para los grados de libertad calculados según la ecuación 9B y para el nivel de significación prefijado.

4B.2 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO PARA LAS SEÑALES DE HIBRIDACIÓN

En los siguientes apartados se describe el tratamiento estadístico seguido para las señales de hibridación, es decir, de aquellos resultados que se obtiene por diferencia de dos grupos sencillos de datos obtenidos por lectura directa, y que se obtienen por la siguiente expresión:

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

4B.2.1 CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR

En los gráficos que se expresan como barras en el presente trabajo y que muestran los valores de las señales de hibridación, el error que se muestra representa la desviación estándar de las diferencias de dos valores medios, que se obtiene de la siguiente expresión (ecuación 11):

$$S_{\bar{x}_g - \bar{x}_b} = \sqrt{\frac{S_b^2}{n_b} + \frac{S_g^2}{n_g}}$$

4B.2.2 COMPARACIÓN DE LOS VALORES MEDIOS OBTENIDOS POR DIFERENCIA DE DOS GRUPOS DE DATOS

Para poder comprobar que la señal de hibridación de un genosensor difiere de la de otro genosensor, se realiza una simplificación y se suponen varianzas comparables.

4B.2.2.1 Estimación conjunta de la desviación estándar

Si se pretende comparar las señales de hibridación de un experimento 1 y de un experimento 2, se puede calcular una estimación conjunta de la desviación estándar a partir de las dos desviaciones estándar individuales de los correspondientes blancos y genosensores para el lote 1 (S_{b1} y S_{g1}), y para el lote 2 (S_{b2} y S_{g2}), utilizando la siguiente expresión (ecuación 12):

$$S_p = \sqrt{\frac{(n_{b1} - 1) S_{b1}^2 + (n_{g1} - 1) S_{g1}^2 + (n_{b2} - 1) S_{b2}^2 + (n_{g2} - 1) S_{g2}^2}{(n_{b1} - 1) + (n_{g1} - 1) + (n_{b2} - 1) + (n_{g2} - 1)}}$$

Si el número de determinaciones de los genosensores y de los blancos para ambos lotes son iguales, es decir, si $n_{b1}=n_{g1}=n_{b2}=n_{g2}=n$, la ecuación 12 se simplifica a la siguiente expresión (ecuación 13):

$$S_p = \sqrt{\frac{S_{b1}^2 + S_{g1}^2 + S_{b2}^2 + S_{g2}^2}{4}}$$

4B.2.2.2 Prueba t de comparación de la señal de hibridación de dos grupos de datos

Si se pretende comparar las señales de hibridación de un experimento 1 y de un experimento 2, se realiza la prueba t. Para tal fin, se parten de los valores medios de los blancos y de los genosensores para el lote 1 (\bar{x}_{b1} y \bar{x}_{g1}) y para el lote 2 (\bar{x}_{b2} y \bar{x}_{g2}).

La prueba t para dos grupos de datos con varianzas comparables se calcula mediante la siguiente expresión (ecuación 14):

$$t = \frac{(\bar{x}_{g1} - \bar{x}_{b1}) - (\bar{x}_{g2} - \bar{x}_{b2})}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_{b1}} + \frac{1}{n_{g1}} + \frac{1}{n_{b2}} + \frac{1}{n_{g2}}}}$$

Si el número de determinaciones de ambos lotes y de los genosensores y de los blancos son iguales, es decir, si $n_{b1}=n_{g1}=n_{b2}=n_{g2}=n$, la ecuación 14 se simplifica a la siguiente expresión (ecuación 15):

$$t = \frac{(\bar{X}_{g1} - \bar{X}_{b1}) - (\bar{X}_{g2} - \bar{X}_{b2})}{S_p \sqrt{\frac{4}{n}}}$$

Una vez calculado el valor de t , se debe comparar con el t_{crit} obtenido de las tablas. Si el valor de t calculado excede el valor de t obtenido de tablas, entonces se rechaza la hipótesis nula, es decir, si $t_{calc} > t_{crit}$, los valores medios de la señal de hibridación de ambos experimentos son diferentes al nivel de significación prefijado. El valor crítico de t tabulado depende del tamaño de los dos grupos de datos, del nivel de significación y del tipo de prueba realizada (unilateral o bilateral).

4B.2.2.3 Cálculo de los grados de libertad para la comparación de la señal de hibridación de dos grupos de datos

Ya se ha comentado que los valores de t_{crit} dependen del tamaño muestral. Para poder encontrar el t_{crit} en las tablas, es necesario calcular los grados de libertad. Los grados de libertad se calculan mediante la siguiente expresión (ecuación 16):

$$(n_{b1} - 1) + (n_{g1} - 1) + (n_{b2} - 1) + (n_{g2} - 1)$$

Si el número de determinaciones de ambos lotes y de los genosensores y de los blancos son iguales, es decir, si $n_{b1}=n_{g1}=n_{b2}=n_{g2}=n$, la ecuación 16 se simplifica a la siguiente expresión (ecuación 17):

$$4(n-1)$$

4B.2.2.4 Mínimo nivel de significación de una señal de hibridación respecto a otra

Si se quiere conocer a partir de que valor una señal de hibridación para un experimento dado es significativamente superior a la de otro para un nivel de significación prefijado, se puede realizar una modificación de las ecuaciones 14 y 15.

La ecuación 14 se transforma en la siguiente expresión (ecuación 18):

$$(\bar{X}_{g1} - \bar{X}_{b1}) = (\bar{X}_{g2} - \bar{X}_{b2}) + t_{crit} \cdot S_p \sqrt{\frac{1}{n_{b1}} + \frac{1}{n_{g1}} + \frac{1}{n_{b2}} + \frac{1}{n_{g2}}}$$

en la cual $(\bar{X}_{g1} - \bar{X}_{b1})$ es la señal de hibridación del lote con el mínimo nivel de significación que se pretende calcular, t_{crit} es el valor de t para los grados de libertad calculados según la ecuación 16 y para el nivel de significación prefijado, y S_p es la desviación estándar calculada según la ecuación 12.

Si el número de determinaciones de ambos lotes y de los genosensores y de los blancos son iguales, es decir, si $n_{b1}=n_{g1}=n_{b2}=n_{g2}=n$, la ecuación 18 se simplifica a la siguiente expresión (ecuación 19):

$$(\bar{X}_{g1} - \bar{X}_{b1}) = (\bar{X}_{g2} - \bar{X}_{b2}) + t_{\text{crít}} \cdot S_p \sqrt{\frac{4}{n}}$$

4B.3 TABLAS ESTADÍSTICAS

Tabla 4B.1. Valores de distribución *t* para un intervalo de confianza del 95 %, y para valores de *P* de 0.05

Número de grados de libertad	Prueba unilateral	Prueba bilateral
1	6.31	12.71
2	2.92	4.30
3	2.35	3.18
4	2.13	2.78
5	2.02	2.57
6	1.94	2.45
7	1.89	2.36
8	1.86	2.31
9	1.83	2.26
10	1.81	2.23
12	1.78	2.18
14	1.76	2.14

Tabla 4B.2. Valores críticos de *F* para una prueba bilateral (*P* = 0.05)

Número de grados de libertad del denominador	Número de grados de libertad del numerador				
	1	2	3	4	5
1	647.8	799.5	864.2	899.6	921.8
2	38.51	39.00	39.17	39.25	39.30
3	17.44	16.04	15.44	15.10	14.88
4	12.22	10.65	9.979	9.605	9.364
5	10.01	8.434	7.764	7.388	7.146

4B.4 BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ J. C. Miller, J. N. Miller. *Estadística para Química Analítica*, 2da ed.; Addison-Wesley Iberoamericana: Wilmington (USA), 1993.
- ² R. Kellner, J. M. Mermet, M. Otto, H. M. Widmer. *Analytical Chemistry*; Wiley-VCH: Alemania, 1998.
- ³ J. L. Beltran, E. Bosch, R. Compañó, A. Izquierdo Ridorsa, M. Rosés, R. Tauler. *Exercicis d'introducció a la quimiometria amb full de càlcul*; Edicions Universitat de Barcelona: Barcelona, 2000.

CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE UN GENOSENSOR AMPEROMÉTRICO DE MEMBRANAS RECAMBIABLES EN FORMATO DOT-BLOT DE RECONOCIMIENTO SIMPLE Y DOBLE

DETERMINACIÓN DE UN NUEVO DETERMINANTE DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

5.1 INTRODUCCIÓN

En el año 1945, Alexander Fleming fue galardonado con el Premio Nobel por el descubrimiento del antibiótico penicilina. La relevancia de este hecho marcó el comienzo de la era de los antimicrobianos. Las enfermedades antes mortales que diezaban poblaciones fueron reducidas mediante un tratamiento sencillo con antibióticos. Sin embargo, los antibióticos se han utilizado de manera incorrecta durante décadas y se ha abusado en su prescripción. Como consecuencia, las bacterias comenzaron a adaptarse a este tipo de medicamento, generando resistencia. Así, las infecciones causadas por estos organismos resistentes a los antibióticos son cada vez más difíciles y caras de tratar.

Una de las bacterias resistentes más antigua y prevalente es *Staphylococcus aureus*. En el año 1941, todavía todas las cepas de *S. aureus* eran susceptibles a la penicilina. El mecanismo de acción de la penicilina estriba en la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana. Para ello, la penicilina debe atravesar dicha pared y alcanzar las proteínas aceptoras de penicilina (PBPs, del inglés *penicillin binding proteins*), que son enzimas situadas en la membrana bacteriana. Las penicilinas compiten con las PBP por el sustrato y dificultan la síntesis de peptidoglucano, que es el constituyente principal de la pared celular bacteriana.

Por el año 1944 se vio que algunas cepas de *S. aureus* comenzaron a producir β -lactamasa, una enzima que confiere resistencia al antibiótico penicilina, entre otros antibióticos β -lactámicos. La enzima β -lactamasa –o penicilinasas, como también se la denomina– actúa destruyendo el anillo β -lactámico y hace que este tipo de antibióticos sea completamente ineficaz. A partir de entonces, y

durante casi dos décadas, las infecciones estafilocócicas fueron las infecciones intrahospitalarias más frecuentes y temidas. En el año 1960, y con el objeto de combatir aquellas cepas productoras de β -lactamasa, se desarrollaron las penicilinas semisintéticas resistentes a la penicilinasa. Estos antibióticos, como la meticilina, resultan de su modificación estructural por la introducción de cambios en la cadena lateral de la penicilina que protegen su anillo β -lactámico central de la acción inactivadora de la penicilinasa.

Estos antibióticos mejoraron el pronóstico de estas infecciones, pero sin embargo, en los años 70, los hospitales comenzaron a reportar casos de infecciones a estafilococos que resistían el tratamiento con meticilina. La última línea de defensa que quedaba era, entonces, la vancomicina ^{1,2}. Pero desde 1996, se han reportado algunos casos de *S. aureus* con susceptibilidad disminuida a la vancomicina ^{3,4}, que es uno de los antibióticos más poderosos y una de las últimas posibilidades de tratamiento para estas infecciones.

S. aureus produce múltiples factores de resistencia, incluyendo, como ya se dijo, β -lactamasa⁵ y proteínasceptoras de penicilina alternativas ⁶ (PBPs).

Todos estos hechos sugieren la posibilidad de la aparición de alguna cepa de *S. aureus* resistente a todos los antibióticos ⁷. Hasta el momento, esta bacteria no existe, pero se sabe que *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina es capaz de transferir horizontalmente la resistencia a los estafilococos ⁸ bajo condiciones similares a las existentes en la naturaleza. Esta experiencia se realizó en el laboratorio, pero la posibilidad de transferencia *in vivo* podría ser viable.

Las infecciones estafilocócicas más frecuentes son las de la piel, en donde originan supuraciones localizadas. También infectan con frecuencia las heridas quirúrgicas. Desde ambas localizaciones pueden acceder a la sangre y originar sepsis, con posibilidad de metástasis en múltiples órganos, tejidos o estructuras como endocardio, meninges, pulmón, pleura, huesos largos, articulaciones, músculos, entre otros muchos.

La detección temprana y el reporte precoz de estas cepas resistentes facilitarían el tratamiento apropiado de los pacientes infectados y prevendrían la posibilidad de extensión a otras personas.

Además de la problemática de las infecciones de *S. aureus* en humanos, es importante la importancia en el ámbito de la veterinaria y de la alimentación. La mastitis producida por *S. aureus* como agente causal es la enfermedad de mayor importancia económica en la industria lechera, ya que reduce la calidad de la leche y disminuye su producción. Además, produce gastos en servicios veterinarios y en medicación ⁹⁻¹¹. Es por esto que para tratar la mastitis se utilizan antibióticos de manera menos controlada que en humanos, hecho que colabora en la aparición en la naturaleza de nuevas cepas resistentes a antibióticos ¹².

Aunque las técnicas microbiológicas clásicas permiten la detección de resistencia de las bacterias, estas metodologías son engorrosas y consumen mucho tiempo.

Las técnicas microbiológicas clásicas implican los siguientes pasos:

- preenriquecimiento
- enriquecimiento selectivo
- pruebas bioquímicas
- confirmación serológica

- test de susceptibilidad a los antimicrobianos Concentración inhibitoria mínima
Difusión en disco

Además, es importante destacar que los métodos microbiológicos clásicos no siempre son capaces de detectar resistencia ¹³.

Las aplicaciones de las sondas génicas, tal como repetidamente se ha comentado en el presente trabajo, es un área de importante desarrollo en la actualidad ¹⁴. Las aplicaciones de las sondas génicas se asocian a la determinación ultrasensible de microorganismos en numerosas muestras tales como en aguas, suministros, alimentos, plantas, animales, muestras clínicas, entre otras muchas ¹⁵.

La utilización de sondas génicas trae aparejada la necesidad de cultivar las bacterias hasta la obtención de un nivel detectable. Las metodologías que implican hibridación requieren, al menos, la presencia de 10^5 - 10^6 bacterias en la muestra para obtener una señal positiva. Por lo tanto, las metodologías basadas en la hibridación no tienen la sensibilidad suficiente para detectar directamente las bacterias en una muestra sin un paso previo de preenriquecimiento del microorganismo que se quiere investigar ¹⁶. Sin embargo, la utilización de la PCR puede incrementar de manera notable la sensibilidad de las metodologías basadas en sondas génicas ^{17,18}. Así, las bacterias pueden detectarse sin necesidad de recurrir al cultivo u otro paso de enriquecimiento, mediante la extracción y el aislamiento del ácido nucleico de la muestra real, seguido de PCR y de hibridación con una sonda génica específica. El inconveniente intrínseco de las metodologías en las que se utilizan sondas de DNA para la detección de una secuencia génica consiste en que los genes de interés deben haber sido clonados y/o secuenciados.

Con el objeto de solventar las desventajas de los métodos clásicos microbiológicos, en este capítulo se propone una detección alternativa de resistencia a antibióticos: la detección de la información genética que confiere resistencia, mediante el uso de un genosensor. Cabe destacar que en el momento en el que se llevó a cabo las experiencias descritas en el presente capítulo, no había referencias bibliográficas del uso de genosensores electroquímicos para la determinación de resistencia a antibióticos.

El principal objetivo del desarrollo de este dispositivo es la mejora del tiempo de análisis, factor que es crítico para una detección precoz de estos microorganismos resistentes, y la utilización de un método de detección más robusto que en el caso de los métodos clásicos de hibridación de DNA.

En esta oportunidad, se inmovilizó por adsorción sobre una membrana de nylon HYBOND™ una secuencia de DNA de 50 mer –que es un nuevo determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *S. aureus*–.

La detección de este nuevo determinante de resistencia se realizó ensayando dos metodologías distintas. En primer lugar, se utilizó una sonda génica de 20 mer funcionalizada con biotina, en un formato dot-blot de reconocimiento simple [Figura 5.1 (A)]. Y en segundo lugar, se utilizaron dos sondas génicas biotiniladas complementarias a dos regiones distintas del determinante de resistencia, en un formato dot-blot de reconocimiento doble [Figura 5.1 (B)]. Con el reconocimiento doble se pretende aumentar el número de bases reconocidas en el determinante de resistencia, con lo

que se incrementaría la especificidad de la reacción. Además, con el uso de dos sondas biotiniladas, se busca incrementar también la sensibilidad en la detección debido a la doble marcación.

Un formato de reconocimiento doble podría tener infinidad de aplicaciones. Para el caso de la investigación de microorganismos, una de las sondas biotiniladas podría ser específica de género, mientras que la otra podría ser específica de especie. Así, para una muestra incógnita, y evaluando las señales utilizando una o ambas sondas funcionalizadas con biotina, se podría conocer el género y la especie de un microorganismo presente en la misma ¹⁹.

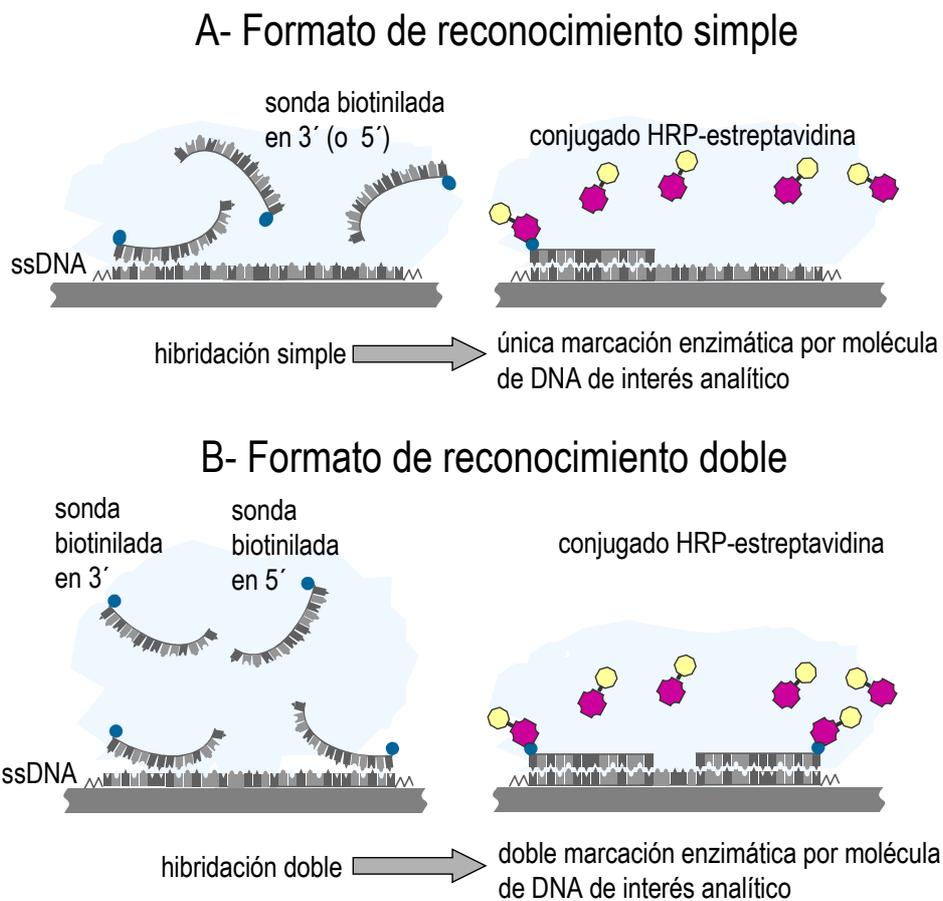


Figura 5.1. Esquema de los formatos dot-blot de reconocimiento simple (A) y reconocimiento doble (B), en el que se muestra como mediante la metodología de doble hibridación se ganaría en cuanto a especificidad (debido al doble reconocimiento) y en cuanto a sensibilidad (gracias a la doble marcación).

5.2 EXPERIMENTAL

5.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS

5.2.1.1 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.

5.2.1.2 Reactivos y materiales

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

Las membranas de nylon integradas al composite grafito-epoxi fueron HYBOND™ N(+) (Amersham) ²⁰. Para el ensamblaje del transductor se utilizó también nylon de apertura de malla de 40 (DIN 130-40 tup 2221).

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 las siguientes sondas de DNA a MWG-BIOTECH (Alemania):

- Oligonucleótido N° 1 (analito inmovilizado en la membrana. Su secuencia es única y representa un nuevo determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *S. aureus* ⁻²¹). 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:

T_m = 68.6 ° C; GC = 30 %; cantidad de DNA: 13.7 OD, 353 μg , 22.9 nmol; P.M.: 15432 g/mol; purificación: HPSF (high purified salt free); longitud = 50 mer.

- Oligonucleótido N° 2 (sonda biotinilada en 3').

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

Características del producto:

T_m = 53.2 ° C; GC = 40 %; cantidad de DNA: 20.0 OD, 614 μg , 94.3 nmol; P.M.: 6503 g/mol; purificación: HPSF; longitud = 20 mer.

- Oligonucleótido N° 3 (sonda biotinilada en 5').

biotina- 5'-AAT ATC TAT ATT TTG TTT GG-3'

Características del producto:

T_m = 45.0 ° C; GC = 20 %; cantidad de DNA: 10.8 OD, 320 μg , 48.9 nmol; P.M.: 6532 g/mol; purificación: HPSF; longitud = 20 mer.

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

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

- Solución de hibridación (Sigma): 10 X SSC, 2 X reactivo de Denhardt, 200 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.

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, 1 mM de EDTA disódico, pH 7.2
- 10 X PBS 1.3 M NaCl, 0.1 M de fosfato sódico, pH 7.2

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

Las membranas de nylon se modificaron mediante un procedimiento que constó de 4 pasos:

- 1.-Inmovilización del oligonucleótido N° 1 –de secuencia idéntica a la del analito, que representa un nuevo determinante de resistencia a antibióticos β-lactámicos en *S. aureus*– en la membrana de nylon HYBOND™.
- 2.-Tratamiento de prehibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el analito (bloqueo de los sitios libres de la membrana).
- 3.-Hibridación del analito soportado en las membranas de nylon HYBOND™, utilizando dos metodologías diferentes: formato de reconocimiento simple y formato de reconocimiento doble.
- 4.-Marcación enzimática posthibridación de los híbridos formados en la membrana.

Una vez preparadas, las membranas se integraron al transductor y, posteriormente, se las procedió a evaluar amperométricamente. En las secciones siguientes, se trata cada uno de estos pasos. Para mayores detalles de cada uno de estos procedimientos véase el capítulo 4, ya que la metodología utilizada es la que fuera optimizada en ese capítulo.

5.2.2.1 Inmovilización del oligonucleótido determinante de resistencia a antibióticos β-lactámicos en la membrana de nylon HYBOND™

En § 4.2.3.1, se describen las distintas metodologías de inmovilización sobre una membrana de nylon ^{20,22-25}. En el presente capítulo, al igual que en el formato desarrollado en el capítulo 4, se utiliza también la inmovilización por calor seco ^{20,25-27}.

La preparación del DNA que será inmovilizado, en este caso el oligonucleótido N° 1, cuya secuencia es:

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

se realiza de manera idéntica que en § 4.2.3.2.

El protocolo de inmovilización del oligonucleótido N°1 en las membranas de nylon fue el siguiente:

- 1.- Se prehumedecen las membranas de nylon en 10 X SSC.
- 2.- Se agregan 2 μ l (de la solución final obtenida del procedimiento de preparación del DNA, § 4.2.3.2) sobre las membranas de nylon prehumedecidas. Para cada nueva adición, se espera que la alícuota anterior se seque completamente, a temperatura ambiente. Se repite tantas veces como oligonucleótido sintético se desee inmovilizar.
- 3.- Se humedecen las membranas con solución deshibridizante durante 5 min. Este procedimiento facilita la ruptura de los puentes de hidrógeno intermoleculares, asegurando que todo el material genético se encuentre como ssDNA y sea susceptible a hibridarse con su secuencia complementaria.
- 4.- Se transfieren las membranas a solución neutralizadora por 1 minuto.
- 5.- Se colocan las membranas sobre papel absorbente durante 30 minutos.
- 6.- Se procede a la fijación del DNA al soporte. Se envuelven las membranas con papel de filtro y se transfieren a una estufa, a 80 °C durante 2 horas.

Una vez inmovilizado el material genético, si las membranas no van a usarse inmediatamente, pueden conservarse envueltas en papel de aluminio a 4 °C.

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

El principal objeto del tratamiento de prehibridación es bloquear, mediante moléculas de alto peso molecular, los sitios libres de la membrana de nylon de manera de favorecer la hibridación y no la adsorción inespecífica de la sonda que lleva la funcionalización con biotina.

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

- tipo de solución de prehibridación: reactivos bloqueantes ^{20,22,25-30}, uso de formamida ^{22,25,26,28,30} y SDS ^{20,25-31}
- temperatura y tiempo de prehibridación ^{22,25,30}
- agitación durante la prehibridación ^{20,25,32}
- volumen utilizado durante el tratamiento de prehibridación ^{25,30}

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

5 X SSC;
 5 X de reactivo de Denhardt;
 100 μ g/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 prehibridación fueron:

- temperatura y tiempo de prehibridación: 42 °C, 4 h
- agitación durante el tratamiento de prehibridación: suave
- volumen utilizado en el tratamiento de prehibridación: 450 μ l

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

- 1.- Se colocan las membranas, luego de la fijación del ssDNA (véase protocolo de inmovilización, § 5.2.2.1), en tubos eppendorf con la cara en la que ha sido adsorbido el DNA del lado de la luz del tubo de manera que quede en contacto con la solución.
- 2.- Se agregan 450 µl de solución de prehibridación.
- 3.- Se colocan los tubos eppendorf en el incubador, con agitación suave y a 42 ° C, durante 4 h.

5.2.2.3 Hibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el analito

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

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

- tipo de solución de hibridación: reactivos bloqueantes ^{20,22,25-30} , uso de formamida ^{22,25,26,28,30} y SDS ²⁵⁻³¹ , fuerza iónica ^{22,26} , uso de dextranos ^{26,27,29} o polietilenglicol ^{22,28,31}
- temperatura y tiempo de hibridación ^{22,25,30}
- agitación durante la hibridación ^{20,25,32}
- volumen de hibridación ^{25,30}

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

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

Las variables utilizadas en el procedimiento de hibridación fueron:

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

La preparación de las sondas biotiniladas en 3' y en 5' (oligonucleótidos N° 2 y N° 3, respectivamente) se realizó como se describiera en § 4.2.5.7.

Hibridación del analito soportado en las membranas de nylon HYBOND™ en formato de reconocimiento simple

El protocolo de hibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el analito para el formato de reconocimiento simple fue el mismo que el utilizado en § 4.2.5.8 en cuanto a la metodología, con la única diferencia en la secuencia del analito y de la sonda biotinilada.

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

- 1.- Inmediatamente después del tratamiento de prehibridación (§ 5.2.2.2), se elimina la solución de prehibridación de los tubos eppendorf, sin mover las membranas, y se agregan 450 µl de solución de hibridación, preparada según § 4.2.5.2.
- 2.- Se dejan los tubos eppendorf en el incubador con agitación suave y a 42 °C, durante 10 minutos (para que la solución de hibridación tome esta temperatura).
- 3.- Se adiciona un volumen (en µl) de sonda biotinilada en 3' o en 5' (oligonucleótidos N° 2 o N° 3, respectivamente).
- 4.- Se dejan las membranas en hibridación con agitación suave y a 42 °C, durante toda la noche.
- 5.- Luego de la hibridación, se procede a los lavados posthibridación de las membranas, de la siguiente manera:
 - 1.- 10 minutos, en 40 ml de 2 X SSC-0.1 % SDS, con agitación suave, a 20 °C
 - 2.- 10 minutos, en 40 ml de 0.2 X SSC-0.1 % SDS, con agitación suave, a 50 °C
 - 3.- Se remojan las membranas en 2 X SSC dos veces a 20 °C, para eliminar el SDS.

Hibridación del analito soportado en las membranas de nylon HYBOND™ en formato de reconocimiento doble

El protocolo de hibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el analito para el formato de reconocimiento doble fue el mismo que el utilizado en el formato de reconocimiento simple, con la única diferencia que se agregó en el medio de hibridación un volumen (en µl) de sonda biotinilada en 3' y también en 5' (oligonucleótidos N° 2 y N° 3, respectivamente).

Estas sondas reconocen dos sectores distintos del analito, por lo que el reconocimiento es doble. En el formato de reconocimiento simple se reconocen 20 bases nitrogenadas del analito, mientras que en el formato de reconocimiento doble se reconocen 40 bases nitrogenadas, aumentando así al doble la especificidad de la hibridación y la sensibilidad al duplicarse los sitios biotinilados disponibles para la posterior marcación enzimática.

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

- 1.- Inmediatamente después del tratamiento de prehibridación (§ 5.2.2.2), se elimina la solución de prehibridación de los tubos eppendorf, sin mover las membranas, y se agregan 450 µl de solución de hibridación, preparada según § 4.2.5.2.
- 2.- Se dejan los tubos eppendorf en el incubador con agitación suave y a 42 °C, durante 10 minutos (para que la solución de hibridación tome esta temperatura).
- 3.- Se adiciona un volumen (en µl) de sonda biotinilada en 3' (oligonucleótidos N° 2).
- 4.- Se adiciona un volumen (en µl) de sonda biotinilada en 5' (oligonucleótidos N° 3).
- 5.- Se dejan las membranas en hibridación con agitación suave y a 42 °C, durante toda la noche.
- 6.- Luego de la hibridación, se procede a los lavados posthibridación de las membranas, de la siguiente manera:
 - 1.- 10 minutos, en 40 ml de 2 X SSC-0.1 % SDS, con agitación suave, a 20 °C
 - 2.- 10 minutos, en 40 ml de 0.2 X SSC-0.1 % SDS, con agitación suave, a 50 °C
 - 3.- Se remojan las membranas en 2 X SSC dos veces a 20 °C, para eliminar el SDS.

5.2.2.4 Marcación enzimática posthibridación

Luego del procedimiento de hibridación, en el formato de simple reconocimiento se genera el híbrido simple de DNA funcionalizado con una molécula de biotina por molécula de DNA analito, mientras que, para el caso del formato de reconocimiento doble, se genera un doble híbrido funcionalizado con dos moléculas de biotina por molécula de DNA analito.

Sea cual fuera el caso, una vez formados estos híbridos funcionalizados con biotina, éstos se deben evidenciar mediante un esquema que involucra la reacción del dúplex formado, a través de la biotina, con el conjugado enzimático de la peroxidasa, mediante la estreptavidina.

La peroxidasa es quien genera la señal analítica amperométrica, luego de la reacción con un 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 ²²
- temperatura y tiempo de premarcación con solución bloqueante ²²
- temperatura y tiempo de marcación ²²
- agitación durante la marcación ^{20,22,25,32}
- volumen de marcación ^{25,30}

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

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

Las variables utilizadas en el procedimiento de marcación enzimática fueron:

- temperatura y tiempo de premarcación con solución bloqueante: 37 °C, 30 min
- temperatura y tiempo de marcación enzimática: 37 °C, 1h
- agitación durante la premarcación con solución bloqueante y marcación enzimática: suave
- volumen de marcación enzimática: 450 µl

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

El protocolo de marcación enzimática de las membranas de nylon HYBOND™ luego de la hibridación para el formato de reconocimiento simple y doble ha sido descrito en § 4.2.6.9 y consistió en:

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

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

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

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

5.2.3 INTEGRACIÓN AL TRANSDUCTOR DE LAS MEMBRANAS MODIFICADAS

Una vez se preparan las membranas, están listas para incorporarse al transductor amperométrico. En § 2.3.5.1 se seleccionó como transductor el composite rígido grafito-epoxi. Para todas las determinaciones se utilizó el mismo sensor. Antes de integrar la membrana al transductor, éste fue sometido al procedimiento de pulido (§ 2.2.4.3), cuya reproducibilidad fue evaluada en §

2.3.5.4. Este procedimiento se repitió entre calibrados con el objeto de obtener superficies frescas ya que, en caso contrario, el transductor sufre de pasivación (§ 3.2.2.5).

La membrana circular se colocó en la superficie del sensor (mediante pinzas) de manera que la cara modificada quede en contacto con el transductor (véase Figura 2.4). Posteriormente, se sujetó mediante una malla de nylon poro grueso de 2 x 2 cm. Esta última se sujetó al cuerpo del sensor mediante una junta tórica, y se selló con parafilm. Posteriormente, todo el conjunto se incorporó al sistema de detección amperométrico.

5.2.4 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 a las membranas.

Para tal fin, la evaluación se llevó a cabo con el sistema amperométrico descrito en § 2.2.2. La celda de medida fue una solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0, utilizándose como electrodo de trabajo el genosensor construido en § 5.2.3. La concentración de hidroquinona en el medio fue de 1.8 mM. A este sistema, se le aplicó el potencial de reducción de la hidroquinona (-0.1 V, vs Ag/AgCl), potencial que fuera optimizado en § 3.3.1.1.

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

5.2.5 OPTIMIZACIÓN DE LOS GENOSENSORES DE MEMBRANAS RECAMBIABLES EN FORMATO DOT-BLOT DE RECONOCIMIENTO SIMPLE

En la Figura 5.2 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 un formato de reconocimiento simple.

Existen numerosísimas variables que se pueden optimizar en el dispositivo creado, y muchas de ellas escapan del objeto de la presente tesis.

Entre algunas de las variables, optimizadas en el capítulo 4, se encuentran:

- cantidad de analito inmovilizado en la membrana: 100 pmoles (§ 4.2.10)
- cantidad de sonda biotinilada de la solución de hibridación: 40 pmoles (§ 4.2.11)
- cantidad de peroxidasa-estreptavidina en la solución bloqueante durante la marcación enzimática: 0.8 μ g (§ 4.2.12).

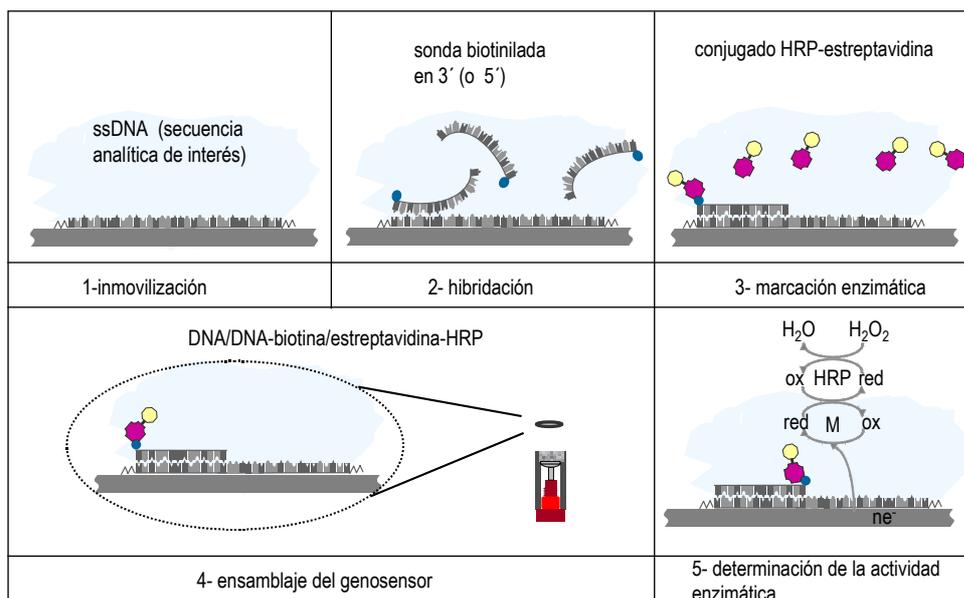


Figura 5.2. Representación esquemática del procedimiento experimental seguido en la preparación y evaluación de los genosensores en formato de reconocimiento simple.

En este formato de reconocimiento simple se utilizaron las mismas cantidades de reactivos que las optimizadas en el capítulo 4 excepto para la cantidad de conjugado enzimático, debido a que se ha utilizado para este apartado un nuevo *pool* de enzima que mostró una actividad mayor que el anterior. En este caso se utilizaron 0.5 μg de HRP-estreptavidina que se encontró como óptimo. Cabe destacar que en este formato de reconocimiento simple se ha utilizado tanto sonda funcionalizada con biotina en 3' como en 5', pero se utilizaron siempre una de ellas para cada ensayo.

Para evaluar la señal debida a la hibridación simple, se realizó un lote de membranas llamadas “genosensoras 3'” que evaluaron el proceso de reconocimiento simple mediante la sonda funcionalizada con biotina en 3'. Con el objeto de evaluar su adsorción inespecífica, se realizó en paralelo un lote de membranas “blanco 3'”, –en las que se adicionaron los mismos reactivos que en las membranas “genosensoras 3'” excepto el analito–. Asimismo, se realizó un lote de membranas llamadas “genosensoras 5'”, que evaluaron el proceso de reconocimiento simple mediante la sonda biotinilada en 5', y también se procesó un lote de membranas “blanco 5'”. Por cada lote se procesan normalmente triplicados de las membranas.

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

5.2.5.1 Protocolo de preparación de las membranas “genosensoras” en formato de reconocimiento simple

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización del oligonucleótido determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos en la membrana, descrito en § 5.2.2.1.
- 2.- Se sigue con el tratamiento de prehibridación, descrito en § 5.2.2.2.
- 3.- Se sigue con el protocolo de hibridación en formato de reconocimiento simple, descrito en § 5.2.2.3.
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 5.2.2.4.

5.2.5.2 Protocolo de preparación de las membranas “blanco” en formato de reconocimiento simple

Este lote se realizó de manera idéntica al de las membranas “genosensoras” en formato de reconocimiento simple (§ 5.2.5.1), pero obviando el paso de adición de ssDNA (oligonucleótido N° 1), es decir, no hay analito –determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *S. aureus*– inmovilizado en la membrana.

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

El protocolo que se siguió para su preparación fue:

- 1.- Se sigue el protocolo de preparación de las membranas, descrito en § 5.2.2.1, con la única diferencia que no se adiciona ssDNA (oligonucleótido N° 1), es decir, no hay analito -determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *S. aureus*– sobre la membrana (se obvia el paso 2 del protocolo).
- 2.- Se colocan estas membranas en tubos eppendorf y se continua con el paso 2 del tratamiento de prehibridación, descrito en § 5.2.2.2.
- 3.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 5.2.2.3. En este caso, al no haber analito en la membrana, no va a haber hibridación, y sí sólo adsorción inespecífica de la sonda biotinilada.
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 5.2.2.4.

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

En este caso, al igual que en el formato descrito en el capítulo 4, durante el proceso de hibridación puede adsorberse de manera inespecífica la sonda biotinilada. 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 con el conjugado enzimático, el conjugado HRP-estreptavidina en el formato de reconocimiento simple tiene dos posibilidades de adsorción inespecífica:

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

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

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

Una vez preparadas las membranas “genosensoras” y las membranas “blanco”, se integraron al transductor amperométrico, como se explicara en § 5.2.3.

La evaluación de los sensores preparados se realizó basándose en la señal generada, finalmente, por la enzima peroxidasa, según se explicara en § 5.2.4.

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

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

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

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

Esta señal de hibridación está en relación con la cantidad de enzima presente en la membrana pero que se encuentra únicamente unida al híbrido formado en la superficie y directamente relacionada con la cantidad de analito en la membrana (Figura 5.2).

5.2.5.4 Diseño del experimento en formato de reconocimiento simple

Para evaluar la utilidad del formato de reconocimiento simple, se realizaron cuatro lotes de membranas, como se explicara en § 5.2.5, denominados membranas “genosensoras 3’”, membranas “genosensoras 5’” y, por último, membranas “blanco 3’” y membranas “blanco 5’”.

La Tabla 5.1 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.

Como ya se expresara, las membranas “genosensoras 3’” evalúan el formato de reconocimiento simple mediante la utilización durante la hibridación de una sonda complementaria biotinilada en 3’, mientras que las membranas “blanco 3’” evalúan la adsorción inespecífica debido a la sonda biotinilada en 3’ y al conjugado enzimático.

Por otro lado, el mismo formato se evaluó utilizando una sonda biotinilada en 5’, mediante las membranas “genosensoras 5’” y sus correspondientes “blancos 5’”.

Cabe destacar que por cada lote, se han evaluado triplicados de las membranas.

Para obtener la información de la cantidad de analito en una muestra, se requiere procesar dos lotes de membranas como en cualquier ensayo dot-blot, utilizando una sonda biotinilada en 3’ o bien, utilizando una sonda biotinilada en 5’, indistintamente.

Es importante puntualizar nuevamente que en §§ 4.2.10 y 4.2.11 se optimizaron las cantidades de analito inmovilizado en la membrana y de sonda biotinilada, respectivamente.

En el caso del conjugado enzimático, se realizó una nueva optimización de la cantidad a adicionar (experimentos no mostrados), debido a que se cambió de producto, por lo que se adicionó una cantidad menor, ya que se observó que este producto presentaba mayor actividad enzimática.

Tabla 5.1. *Diseño del experimento de evaluación del formato de reconocimiento simple. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización por adsorción, hibridación y marcación.*

REACTIVOS	Lote 1 "blanco 3'" n=3	Lote 2 "genosensor 3'" n=3	Lote 3 "blanco 5'" n=3	Lote 4 "genosensor 5'" n=3
Oligonucleótido 1 -analito determinante de resistencia- protocolo de adsorción	No se adiciona (-)	100.1 pmoles	No se adiciona (-)	100.1 pmoles
Oligonucleótido 2 -sonda funcionalizada con biotina en 3'- protocolo de hibridación	36.3 pmoles	36.3 pmoles	No se adiciona (-)	No se adiciona (-)
Oligonucleótido 3 -sonda funcionalizada con biotina en 5'- protocolo de hibridación	No se adiciona (-)	No se adiciona (-)	36.2 pmoles	36.2 pmoles
HRP-estreptavidina Protocolo de marcación enzimática	0.49 µg	0.49 µg	0.49 µg	0.49 µg

5.2.6 OPTIMIZACIÓN DE LOS GENOSENSORES DE MEMBRANAS RECAMBIABLES EN FORMATO DOT-BLOT DE RECONOCIMIENTO DOBLE

En el formato de doble reconocimiento, se utilizaron las mismas cantidades de reactivos que las utilizadas en § 5.2.5. Cabe destacar que en este formato de reconocimiento doble se ha utilizado tanto sonda biotinilada en 3' como en 5' simultáneamente durante la hibridación.

Con el objeto de evaluar la señal debida a la hibridación doble, se realizaron en todos los casos un lote de membranas "blanco" con el objeto de evaluar la adsorción inespecífica –en las que se adicionan todos los reactivos excepto el analito–. El otro lote de membranas fueron las llamadas "genosensoras", que evaluaron el proceso de reconocimiento doble. Por cada lote se procesan normalmente triplicados de las membranas.

Las señales obtenidas con el formato de reconocimiento doble se compararon con los resultados obtenidos en el formato de reconocimiento simple –§ 5.2.5– para poder comprobar la hipótesis previa del aumento de señal que se consigue con la metodología que utiliza la doble hibridación.

Al igual que en el formato de reconocimiento simple, la absorción inespecífica se utilizó para detectar la verdadera señal de fondo del dispositivo, ya que por diferencia entre la señal de las

membranas “genosensoras” y las membranas “blanco” se obtuvo la respuesta analítica debido únicamente a la hibridación en formato de reconocimiento doble.

En la Figura 5.3 se muestra esquemáticamente cada uno de los pasos involucrados en la preparación de los genosensores y el fundamento de la obtención de la señal analítica en un formato de reconocimiento doble.

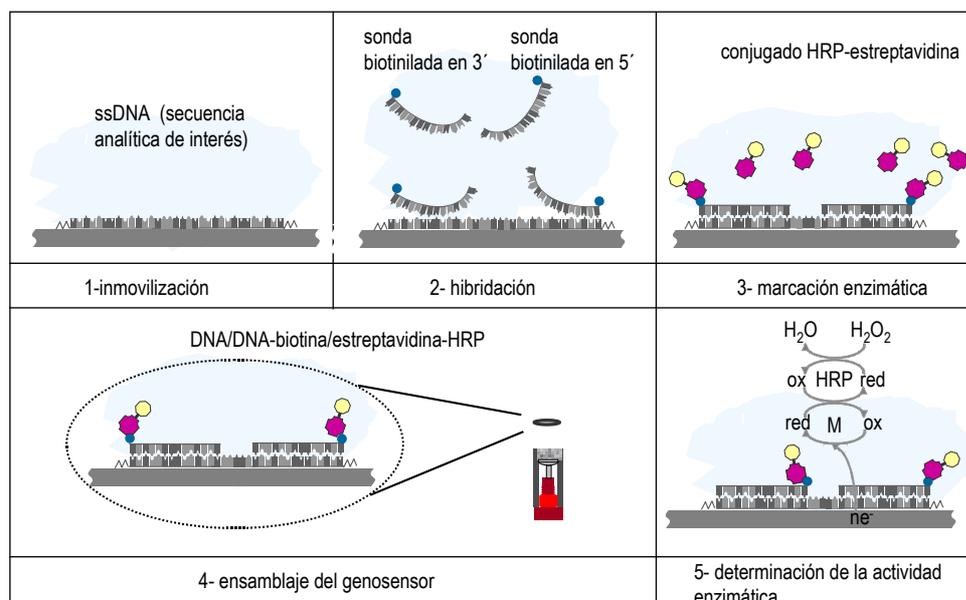


Figura 5.3. Representación esquemática del procedimiento experimental seguido en la preparación y evaluación de los genosensores en formato de reconocimiento doble.

5.2.6.1 Protocolo de preparación de las membranas “genosensoras” en formato de reconocimiento doble

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización del oligonucleótido determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos en la membrana, descrito en § 5.2.2.1.
- 2.- Se continúa con el tratamiento de prehibridación, descrito en § 5.2.2.2.
- 3.- Se sigue con el protocolo de hibridación en formato de reconocimiento doble, descrito en § 5.2.2.3.
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 5.2.2.4.

5.2.6.2 Protocolo de preparación de las membranas “blanco” en formato de reconocimiento doble.

Este lote se realizó de manera idéntica al de las membranas “genosensoras” en formato de reconocimiento doble (§ 5.2.6.1), pero obviando el paso de adición de ssDNA (oligonucleótido N° 1), es decir, no hay analito –determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *S. aureus*– sobre la membrana.

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

En § 4.2.13, se explicó de manera exhaustiva las posibilidades de adsorción inespecífica en el formato descrito en el capítulo 4, y las mismas consideraciones son válidas para el formato dot-blot de reconocimiento doble.

Al igual que en el formato de reconocimiento simple, durante el proceso de hibridación puede adsorberse de manera inespecífica la sonda biotinilada. En este caso se agregan durante la hibridación tanto sonda biotinilada en 3', como en 5', por lo que se tiene el doble de probabilidades de adsorción inespecífica debido a la sonda biotinilada. Estos mecanismos de adsorción inespecífica contribuyen de manera indirecta, ya que por sí solos no aumentan la señal analítica inespecífica.

Durante el procedimiento de marcación con el conjugado enzimático, el conjugado HRP-estreptavidina en el formato de reconocimiento doble tiene tres posibilidades de adsorción inespecífica:

- unirse a la sonda biotinilada en 3' adsorbida inespecíficamente;
- unirse a la sonda biotinilada en 5' adsorbida inespecíficamente;
- adsorberse directamente en la membrana.

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

El protocolo que se siguió para su preparación fue:

- 1.- Se sigue el protocolo de preparación de las membranas, descrito en § 5.2.2.1, con la única diferencia que no se adiciona ssDNA (oligonucleótido N° 1), es decir, no hay analito – determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *S. aureus*– sobre la membrana (se obvia el paso 2 del protocolo).
- 2.- Se colocan estas membranas en tubos eppendorf y se continua con el paso 2 del tratamiento de prehibridación, descrito en § 5.2.2.2.
- 3.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 5.2.2.3. En este caso, al no haber analito en la membrana, no va a haber hibridación, y si sólo adsorción inespecífica de las sondas biotiniladas en 3' y en 5'.
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 5.2.2.4.

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

Una vez preparadas las membranas "genosensoras" y las membranas "blanco", se integraron al transductor amperométrico, como se explicara en § 5.2.3.

La evaluación de los sensores preparados se realizó basándose en la señal generada, finalmente, por la enzima peroxidasa, según se explicara en § 5.2.4 y se realiza de igual manera que para el formato de reconocimiento simple (§ 5.2.5.3).

Para este caso, y según puede observarse en la Figura 5.3, es fácil predecir que en el formato de reconocimiento doble –y pese a haber la misma cantidad de analito– la señal de

hibridación debería ser mayor que para el formato de reconocimiento simple, ya que en el primer caso dos moléculas de biotina existen por cada molécula de DNA de analito susceptibles a reaccionar con el conjugado HRP-estreptavidina; en el caso del reconocimiento simple, habrá una única molécula de biotina por cada molécula de DNA de analito, susceptible a reaccionar con el conjugado enzimático (Figura 5.2). La señal amperométrica, por tanto, debería ser mayor en el formato de reconocimiento doble respecto a la señal obtenida en el formato de reconocimiento simple. Es de esperar que la sensibilidad del sistema sea mayor en el formato de reconocimiento doble.

5.2.6.4 Diseño del experimento en formato de reconocimiento doble

Para evaluar la utilidad del formato de reconocimiento doble, se realizaron dos lotes de membranas, como se explicara en § 5.2.6, denominados membranas “genosensoras de reconocimiento doble” y membranas “blanco de reconocimiento doble”.

La Tabla 5.2 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.

Como ya se expresara, las membranas “genosensoras” evalúan el formato de reconocimiento doble mediante la utilización de la sonda complementaria biotinilada en 3’ y de la sonda complementaria biotinilada en 5’, ambas adicionadas simultáneamente en la solución de hibridación, mientras que las membranas “blanco” evalúan la adsorción inespecífica debido a la sonda biotinilada en 3’, a la sonda biotinilada en 5’ y al conjugado enzimático.

Tabla 5.2. *Diseño del experimento de evaluación del formato de reconocimiento doble. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización por adsorción, hibridación y marcación.*

REACTIVOS	Lote 1 (n=3) “blanco doble reconocimiento”	Lote 2 (n=3) “genosensor doble reconocimiento”
Oligonucleótido 1 -analito determinante de resistencia- protocolo de adsorción	No se adiciona (-)	100.1 pmoles
Oligonucleótido 2 -sonda funcionalizada con biotina en 3’- protocolo de hibridación	36.3 pmoles	36.3 pmoles
Oligonucleótido 3 -sonda funcionalizada con biotina en 5’- protocolo de hibridación	36.2 pmoles	36.2 pmoles
HRP-estreptavidina Protocolo de marcación enzimática	0.49 µg	0.49 µg

Cabe destacar que por cada lote se han evaluado triplicados de las membranas.

Para obtener la información de la cantidad de analito en una muestra, se requiere procesar dos lotes de membranas como en cualquier ensayo dot-blot. Es importante puntualizar nuevamente

que en §§ 4.2.10 y 4.2.11 se optimizaron las cantidades de analito inmovilizado en la membrana y de sonda biotinilada respectivamente, mientras que la cantidad de HRP-estreptavidina ha sido nuevamente optimizada porque en este caso se ha utilizado un nuevo *pool* enzimático que demostró tener mayor actividad.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 GENOSENSORES DE RECONOCIMIENTO SIMPLE

En la Figura 5.4 se muestran los resultados del experimento realizado en § 5.2.5.4. Este experimento se basa en el diseño de un formato de reconocimiento simple para la detección de un nuevo determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *S. aureus*.

En la Figura 5.4 cada barra muestra el valor medio de los replicados de cada lote de membranas (“blanco 3’”, “genosensoras 3’”, “blanco 5’”, y “genosensoras 5’”), y el error de la barra representa la desviación estándar (ec. 1, § 4B.1.1) de los replicados de cada lote.

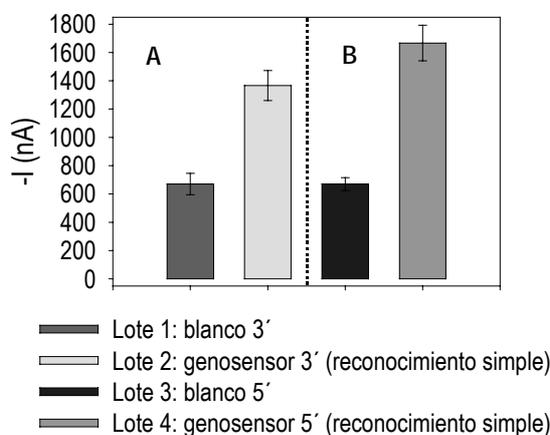


Figura 5.4. Resultados obtenidos en la evaluación del diseño del formato de reconocimiento simple mediante hibridación con una sonda biotinilada en 3' (A) y mediante hibridación con una sonda biotinilada en 5' (B). DNA analito (50 mer) inmovilizado en la membrana: 100.1 pmoles. Oligonucleótido 2 (3' biotina): 36.3 pmoles (sólo en A). Oligonucleótido 3 (5' biotina): 36.2 pmoles (sólo en B). HRP-estreptavidina: 0.49 μ g. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Electrodo de trabajo: grafito-epoxi-membrana HYBOND™ modificada según § 5.2.5.4.

La Tabla 5.3 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación de los lotes 1 y 2 (reconocimiento simple en 3') y lotes 3 y 4 (reconocimiento simple en 5').

Las determinaciones de las membranas “blanco” y de las membranas “genosensoras” para ambos casos son comparativamente iguales de precisas (prueba F).

La diferencia de los valores medios de la determinación de las membranas “genosensoras” y de las membranas “blanco”, para ambos casos y como era de esperar, es significativamente diferente (prueba t). Para ambas pruebas se trabajó con un 95 % de confianza.

Tabla 5.3. Pruebas estadísticas para la comparación de las varianzas (prueba F) y de los valores medios (prueba t) de las señales de los genosensores y de los blancos, en los formatos de reconocimiento simple, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	Lote 1 “blanco 3’” (n=3)	Lote 2 “genosensor 3’” (n=3)	Lote 3 “blanco 5’” (n=3)	Lote 4 “genosensor 5’” (n=3)
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_1 = 75.5$	$s_2 = 106.0$	$s_3 = 45.8$	$s_4 = 125.8$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (1.97) < F_{2,2} (39.00)$		$F_{\text{calc}} (7.54) < F_{2,2} (39.00)$	
Sp (ec. 4B, § 4B.1.4.1)	$Sp = 92.0$		$Sp = 94.7$	
grados libertad (ec. 6B, § 4B.1.4.3)	4		4	
Prueba t (unilateral) (ec. 5B, § 4B.1.4.2)	$t_{\text{calc}} (9.27) > t_4 (2.13)$		$t_{\text{calc}} (12.89) > t_4 (2.13)$	

Existe una diferencia entre los resultados obtenidos entre el formato de reconocimiento simple que utiliza una sonda biotinilada en 3’ y la que utiliza una sonda biotinilada en 5’, a pesar de que se colocaron en la solución de hibridación la misma cantidad de reactivo.

Esta diferencia (que es significativa, véase Tabla 5.5, § 5.3.3) puede deberse a que la eficiencia de la funcionalización con biotina sea mayor en 5’ en el reactivo comercial utilizado o bien a que la eficiencia de la hibridación de la sonda biotinilada en 5’ es mayor para las condiciones experimentales de la hibridación.

En la Figura 5.4 puede observarse que existe una buena reproducibilidad entre ensayos paralelos de un mismo lote, con desviaciones estándar relativas de menos del 10 % (ec. 2, § 4B.1.2), valores similares a los encontrados en los ensayos realizados en el capítulo 4 también en un formato dot-blot, utilizando un DNA modelo.

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 –membranas “blanco 3’” y “blanco 5’”– 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 membranas “blanco”, con las ventajas prácticas que esto traería, siempre y cuando se utilice el mismo producto comercial.

5.3.2 GENOSENSORES DE RECONOCIMIENTO DOBLE

En la Figura 5.5 se muestran los resultados obtenidos del experimento realizado en § 5.2.6.4.

Este experimento se basa en el diseño del formato de reconocimiento doble, es decir, en el uso de dos sondas funcionalizadas con biotina para la determinación de una única secuencia de DNA de interés analítico –en este caso, un nuevo determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos–, en un formato como se muestra en la Figura 5.1.

En la Figura 5.5 cada barra muestra el valor medio de los replicados de cada lote de membranas, y el error de la barra representa la desviación estándar (ec. 1, § 4B.1.1) de los replicados de cada lote.

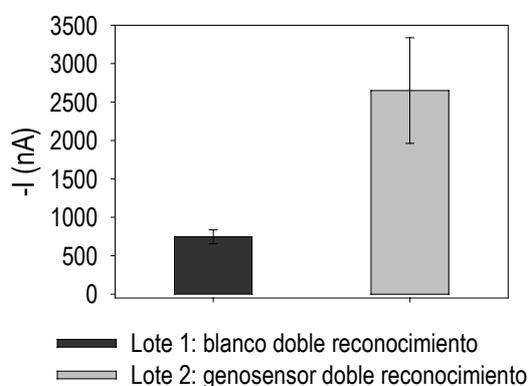


Figura 5.5. Resultados obtenidos en la evaluación del diseño del formato de reconocimiento doble mediante hibridación con una sonda biotinilada en 3' y en 5', simultáneamente. DNA analito (50 mer) inmovilizado en la membrana: 100.1 pmoles. Oligonucleótido 2 (3' biotina): 36.3 pmoles. Oligonucleótido 3 (5' biotina): 36.2 pmoles. HRP-estreptavidina: 0.49 μ g. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Electrodo de trabajo: grafito-epoxi-membrana HYBOND™ modificada según § 5.2.6.4.

La Tabla 5.4 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación de los lotes 1 y 2 de reconocimiento doble. Las determinaciones de las membranas “blanco” y de las membranas “genosensoras” no son comparativamente iguales de precisas (prueba *F*). Esto podría asociarse a razones de impedimentos estéricos a la hora de realizarse la doble hibridación, ya que el doble híbrido podría estar más impedido que el híbrido simple (véase Figura 5.1). Las determinaciones de las membranas “genosensoras” y de las membranas “blanco” son significativamente diferentes (prueba *t*). Para ambas pruebas se trabajó con un 95 % de confianza.

También se observó una buena reproducibilidad en la adsorción inespecífica en ensayos paralelos de un mismo lote de membranas “blanco de doble reconocimiento”, con desviaciones estándar relativas del orden del 10 % (ec. 2, § 4B.1.2). Sin embargo, la reproducibilidad observada en los genosensores de reconocimiento doble es menor, con desviaciones estándar relativas del orden del 26 %.

Tabla 5.4. 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 reconocimiento doble, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	Lote 1 blanco doble reconocimiento (n=3)	Lote 2 Genosensor doble reconocimiento (n=3)
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_1 = 90.7$	$s_2 = 687.4$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (57.4) > F_{2,2} (39.00)$	
grados libertad (ec. 9B, § 4B.1.5.2)	2	
Prueba t (unilateral) (ec. 8B, § 4B.1.5.1)	$t_{\text{calc}} (4.75) > t_2 (2.92)$	

5.3.3 COMPARACIÓN DE LA SEÑAL DE HIBRIDACIÓN DE LOS FORMATOS DE RECONOCIMIENTO SIMPLE Y DOBLE

En la Figura 5.6 se muestra sólo la señal de hibridación de los genosensores de reconocimiento simple en 3', en 5', y de los genosensores de reconocimiento doble, obtenida de la siguiente manera:

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

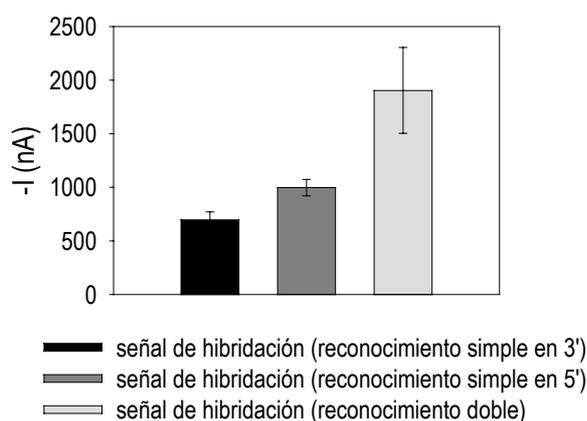


Figura 5.6. Comparación de las señales de hibridación de los genosensores en formato de reconocimiento simple y del genosensor en formato de reconocimiento doble. Las condiciones experimentales son las que se muestran en la Figura 5.4 y en la Figura 5.5, respectivamente.

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 lote (ec. 11, § 4B.2.1).

La Tabla 5.5 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación entre las señales de hibridación del formato de reconocimiento doble y los formatos de reconocimiento

simple (en 3' y en 5'), y entre los formatos de reconocimiento simple. En todos los casos se supuso varianzas comparables. La diferencia de los valores medios en todos los casos es significativamente diferente con una confianza del 95 % (prueba t).

Tabla 5.5. Pruebas estadísticas para la comparación de los valores medios (prueba t) de las señales de hibridación en los diferentes formatos, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	Comparación señal hibridación simple reconoc. en 3' vs doble reconocimiento	Comparación señal hibridación simple reconoc. en 5' vs doble reconocimiento	Comparación señal hibridación simple reconoc en 3' vs simple reconoc en 5'
S_p (ec. 13, § 4B.2.2.1)	$S_p = 352.7$	$S_p = 353.1$	$S_p = 93.4$
grados libertad (ec. 17, § 4B.2.2.3)	8		
Prueba t (ec. 15, § 4B.2.2.2)	$t_{\text{calc}} (2.96) > t_8 (1.86)$ (unilateral)	$t_{\text{calc}} (2.22) > t_8 (1.86)$ (unilateral)	$t_{\text{calc}} (2.78) > t_8 (2.31)$ (bilateral)

Como se puede observar, la señal del genosensor de doble reconocimiento es notablemente mayor (casi del doble) respecto a los genosensores de reconocimiento simple (tanto en 3' como en 5'). Así, el uso de dos sondas biotiniladas que reconozcan dos secuencias distintas del analito no sólo aumenta la especificidad del dispositivo (debido a que se reconocen 40 bases nitrogenadas frente a 20 del formato de reconocimiento simple), sino que también incrementa de manera notable la sensibilidad del mismo. Cabe destacar que la reproducibilidad del formato de reconocimiento doble es menor que la obtenida en los formatos de reconocimiento simple.

5.3.4 EVALUACIÓN DE LA ADSORCIÓN INESPECÍFICA

En la Figura 5.7 se muestran los valores comparativos de la adsorción inespecífica de los genosensores en formato de reconocimiento simple y doble.

La Tabla 5.6 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación de las membranas “blanco de reconocimiento simple en 3'” y “blanco de reconocimiento doble”. En ambos casos no existe una diferencia significativa entre las varianzas (prueba F). La diferencia de los valores medios entre ambas determinaciones no es significativamente diferente, con una confianza del 95 % (prueba t).

Estos resultados permiten confirmar las conclusiones que se obtuvieron en § 4.2.13. La cantidad de sonda funcionalizada con biotina utilizada en los experimentos de reconocimiento simple es de 36 pmoles, mientras que en los experimentos de reconocimiento doble se usaron 72 pmoles, 36 de sonda biotinilada en 3' y 36 de sonda biotinilada en 5'.

Como el pequeño aumento de señal observada en las membranas “blanco de reconocimiento doble” respecto a las de “reconocimiento simple” no es significativo, pese a la diferencia de cantidad de sonda biotinilada adicionada en la solución de hibridación, se puede confirmar que la adsorción

inespecífica se debe fundamentalmente a la adsorción directa del conjugado enzimático y no por su adsorción a través de la reacción con sonda biotinilada adsorbida previamente, por lo que el reactivo que más influye en la señal de la adsorción inespecífica es el conjugado enzimático.

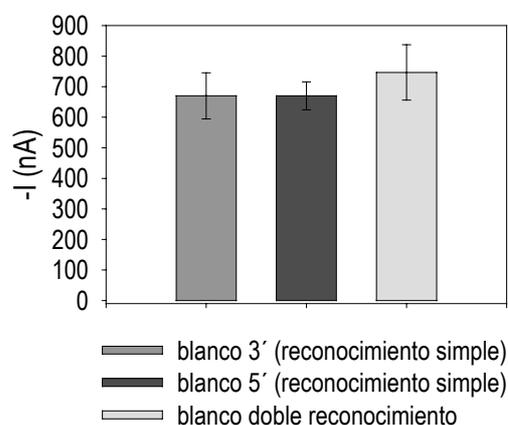


Figura 5.7. Comparación de las señales de los blancos en formato de reconocimiento simple y en formato de reconocimiento doble. Las condiciones experimentales son las que se muestran en la Figura 5.4 y en la Figura 5.5, respectivamente.

Tabla 5.6. Pruebas estadísticas para la comparación de las varianzas (prueba F) y de los valores medios (prueba t) de las señales de los blancos en el formato de reconocimiento simple y doble, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	"blanco simple reconocimiento 3'" (n=3)	"blanco doble reconocimiento" (n=3)
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_1 = 75.5$	$s_2 = 90.7$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{\text{calc}} (1.44) < F_{2,2} (39.00)$	
Sp (ec. 4A, § 4B.1.4.1)	$Sp = 88.5$	
Grados libertad (ec. 6A, § 4B.1.4.3)	4	
Prueba t (bilateral) (ec. 5A, § 4B.1.4.2)	$t_{\text{calc}} (1.12) < t_4 (2.78)$	

5.4 CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado una metodología alternativa para la detección del genotipo de *S. aureus* resistente a antibióticos β -lactámicos la cual –si se combina con PCR– requiere un

tiempo de análisis considerablemente menor que los métodos fenotípicos de susceptibilidad tradicionales.

2. Tanto el formato de reconocimiento simple como el formato de reconocimiento doble son válidos para la detección del nuevo determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *S. aureus*.

3. El formato de reconocimiento doble permite detectar un número mayor de bases en la secuencia del analito, lo que incrementa la especificidad del análisis respecto al formato de reconocimiento simple.

4. El formato de reconocimiento doble posee una mayor sensibilidad que el formato de reconocimiento simple al utilizar dos sondas funcionalizadas con biotina, ya que cada molécula de analito es reconocida por dos moléculas de conjugado enzimático, hecho que amplifica la señal analítica.

5. El formato de reconocimiento doble posee una menor reproducibilidad que el formato de reconocimiento simple. Este hecho se puede deber a que la hibridación exitosa en este formato depende más de la disposición de las bases nitrogenadas del analito por factores de tipo estéricos.

6. La diferencia existente entre los resultados obtenidos para el formato de reconocimiento simple que utiliza una sonda biotinilada en 3' y la que utiliza una sonda biotinilada en 5' puede deberse a que la eficiencia de la funcionalización con biotina sea mayor en 5' en el reactivo comercial comprado, o a una mayor eficiencia de la hibridación de la sonda biotinilada en 5' para estas condiciones experimentales.

7. 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, es decir, la mejor relación entre la señal de los genosensores respecto a la adsorción inespecífica. Sin embargo, la reproducibilidad en los blancos y en los genosensores de reconocimiento simple no se ven alterados por el cambio de producto comercial.

8. 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.

9. La adsorción inespecífica es controlada y reproducible. Puede evitarse el hecho de preparar "ensayos blanco" para evaluarlas, si esta señal se mantiene, su magnitud es conocida y no se cambia de producto comercial de conjugado enzimático.

5.5 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 A. Miele, M. Bandera, B. P. Goldstein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39, 1772-1778.
- ¹⁴ D. Ivnitski, I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, E. Wilkins. *Biosens. Bioelectron.* 1999, 14, 599-624.
- ¹⁵ G. H. McCall, 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.
- ¹⁶ M. Tietjen, D. Y. C. Fung. *Crit. Rev. Microb.* 1995, 21, 53-83.
- ¹⁷ R. K. Saiki, S. Scherf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim. *Science* 1985, 230, 1350-1354.
- ¹⁸ M. J. Mc Pherson, P. Quirze, G. R. Taylor. *PCR 1. A Practical Approach*, Oxford University Press: Oxford, 1996.
- ¹⁹ H. de Beenhouwer, Z. Liang, P. de Rijk, C. van Eekeren, F. Portaels. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 2994-2998.
- ²⁰ K. C. Reed, D. A. Mann. *Nucleic Acids Res.* 1985, 13, 7207-7221.
- ²¹ P. M. Orwin, P. M. Schlievert. *Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 1998, 97, 532.
- ²² L. J. Kricka. *Nonisotopic DNA Probe Techniques*; Academic Press, Inc.: San Diego, 1992.
- ²³ R. K. Saiki, P. S. Walsh, C. H. Levenson, H. A. Erlich. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 6230-6234.
- ²⁴ G. M. Church, W. Gilbert. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 1991-1995.
- ²⁵ J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2th ed.*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989.
- ²⁶ J. Meinkoth, G. Wahl. *Anal. Biochem.* 1984, 138, 267-284.
- ²⁷ T. R. Gingeras, D. Y. Kwok, G. R. Davis. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 5373-5390.
- ²⁸ M. Renz, C. Kurz. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 3435-3444.
- ²⁹ L. Singh, K. W. Jones. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 5627-2638.
- ³⁰ L. T. Kirby. *DNA Fingerprinting*; Stockton Press: New York, 1990.
- ³¹ A. C. Syvanen, M. Laaksonen, H. Soderlund. *Nucleic Acids Res.* 1986, 14, 5037-5048.
- ³² S. F. Wolf, L. Haines, J. Fisch, J. N. Kremsky, J. P. Dougherty, K. Jacobs. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 2911-2926.

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN GENOSENSOR AMPEROMÉTRICO DE MEMBRANAS RECAMBIABLES DE RECONOCIMIENTO MÚLTIPLE EN DIFERENTES FORMATOS

ESTUDIO DE LA CONSERVACIÓN DE LAS MEMBRANAS GENOSENSORAS

6.1 INTRODUCCIÓN

Una característica importante de un dispositivo genosensor debe ser su versatilidad, de manera de que pueda aplicarse a diversas situaciones analíticas. En capítulos anteriores se ha demostrado la validez del dispositivo genosensor de membranas recambiables desarrollado en diferentes formatos, entre ellos basados en una metodología dot-blot (capítulo 4 y 5), en un formato competitivo (apéndice A del capítulo 4) y en un esquema de reconocimiento doble (capítulo 5). Por otro lado, se ha utilizado para cada caso DNA de naturaleza diferente y de secuencias distintas. El punto en común es que en todos estos casos la hibridación se realizó con sondas biotiniladas de una longitud de 20 mer para el reconocimiento de analitos de 45 (capítulo 4 y apéndice A del capítulo 4) y de 50 mer (capítulo 5).

En el trabajo descrito en este capítulo se pretende desarrollar una metodología para la determinación de un DNA analito de mayor longitud (de 260 mer aproximadamente). El objeto es adecuar la metodología a la detección de analitos con una longitud más realista, es decir, con un número de bases nitrogenadas similar a lo que se puede obtener, por ejemplo, luego de llevar a cabo una amplificación por PCR¹⁻¹¹.

Además, para la hibridación se utiliza una sonda biotinilada de una mayor longitud (50 mer), lo que aumentaría la especificidad del dispositivo genosensor al ampliar la secuencia de bases nitrogenadas a ser detectadas (Figura 6.1).

Para el desarrollo de este trabajo se ha escogido un reactivo de catálogo (es decir, más económico) como analito, en este caso un poli(dA), cuya longitud es de 260 mer aproximadamente, y como sonda funcionalizada dT(50)-biotina.

Así, y dependiendo de cómo se ubique la sonda biotinilada sobre el analito, la hibridación del analito se realizará con una única sonda (como mínimo) y con 5 sondas (como máximo); de ahí el nombre que se ha escogido para este formato: dot-blot de reconocimiento múltiple.

Cabe destacar que este sistema de reconocimiento múltiple representa un modelo y que en una muestra real esta situación se podría trasladar a la hibridación del analito con más de una sonda funcionalizada, con distintos objetos. Por ejemplo, en el caso de la investigación de un microorganismo, una de las sondas funcionalizadas podría ser específica de género, mientras que otra podría ser específica de especie ¹². Otra situación sería conseguir la doble funcionalización del analito mediante la doble hibridación del mismo con dos sondas funcionalizadas, para inmovilizar el analito por un extremo a un soporte sólido, y conseguir la marcación enzimática por el otro ^{1-3,12-15} en un formato de captura o *sandwich*. En la Figura 6.1 se muestra como en este modelo, dependiendo de la disponibilidad de las bases nitrogenadas del poli(dA) inmovilizado en la membrana, la hibridación puede ser única o múltiple. Del mismo modo ocurrirá con la marcación enzimática, por lo que se puede deducir que la reproducibilidad esperada en este formato sería menor que en un formato de reconocimiento simple.

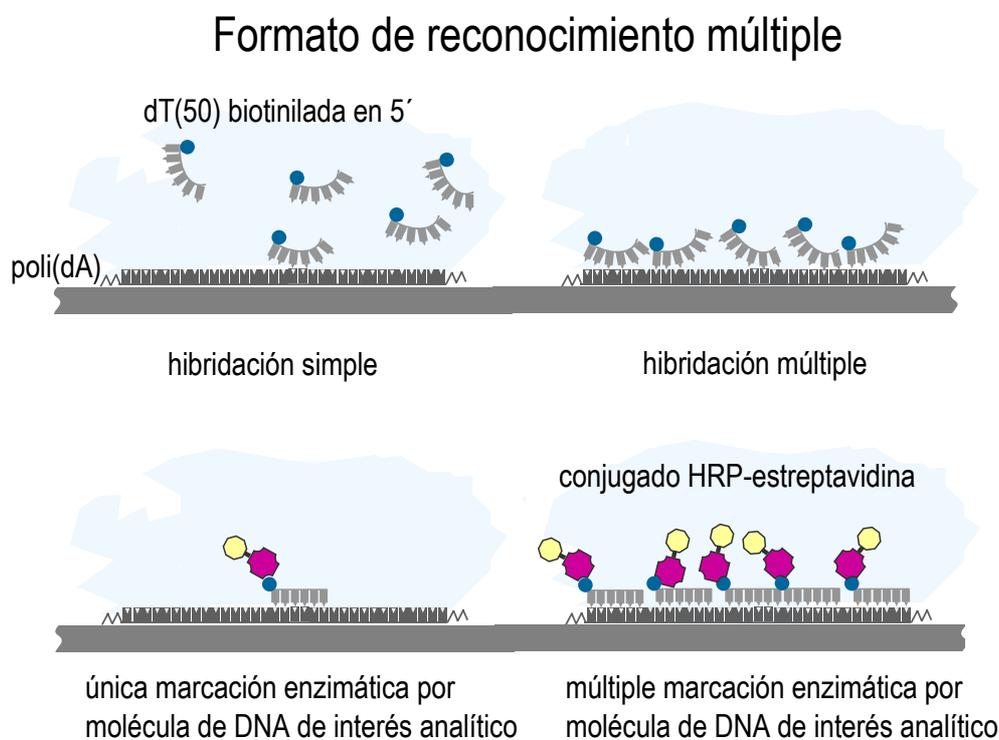


Figura 6.1. Posibilidades de hibridación entre el analito poli(dA) y la sonda dT(50) funcionalizada con biotina. En el esquema se muestran los casos extremos.

Asimismo, se intentó utilizar una sonda de 50 mer para el reconocimiento del analito de 260 mer en un formato competitivo. En el apéndice A del capítulo 4 se explica exhaustivamente el mecanismo de competición. En este caso se debe tener en cuenta las mismas consideraciones que las hechas con anterioridad, es decir, la hibridación puede ser múltiple tanto en los híbridos formados en la superficie de la membrana como en los que se generan en solución entre el analito y la sonda funcionalizada con biotina. Este formato competitivo ha sido especialmente pensado para la detección de transcritos de RNA (véase apéndice A del capítulo 4).

Además, y con el objeto de disminuir los tiempos de análisis de la metodología empleada, se intentó realizar la hibridación y la marcación enzimática en un único paso. Así, se debe compatibilizar las variables implicadas durante la hibridación y que utilizan material genético como protagonista, con el paso de marcación enzimática, que depende de una molécula proteica como es una enzima. En este único paso ocurriría simultáneamente la hibridación de la sonda biotinilada con el DNA inmovilizado en la membrana y la unión del conjugado estreptavidina-peroxidasa con la sonda funcionalizada con biotina ¹⁶.

Ahora bien, pueden existir dos mecanismos distintos en este procedimiento en un único paso, según muestra la Figura 6.2.

El mecanismo A implica que en primer lugar ocurra la hibridación, y una vez formado este híbrido marcado con biotina en la membrana, éste reacciona con el conjugado enzimático. Este mecanismo seguiría la misma secuencia de reacciones que lo que ocurre en un formato dot-blot cuyos pasos de hibridación y de marcación enzimática se realiza de manera secuencial. La diferencia entre ambos estribaría en que en el formato dot-blot convencional existe un paso de lavado entre la hibridación y la marcación enzimática.

En el caso del mecanismo B, primero ocurriría la reacción del conjugado enzimático a través de la estreptavidina con la biotina de la sonda biotinilada. Esta reacción ocurriría en solución. Luego, esta entidad sonda biotinilada/conjugado enzimático reaccionaría con el analito inmovilizado en la membrana.

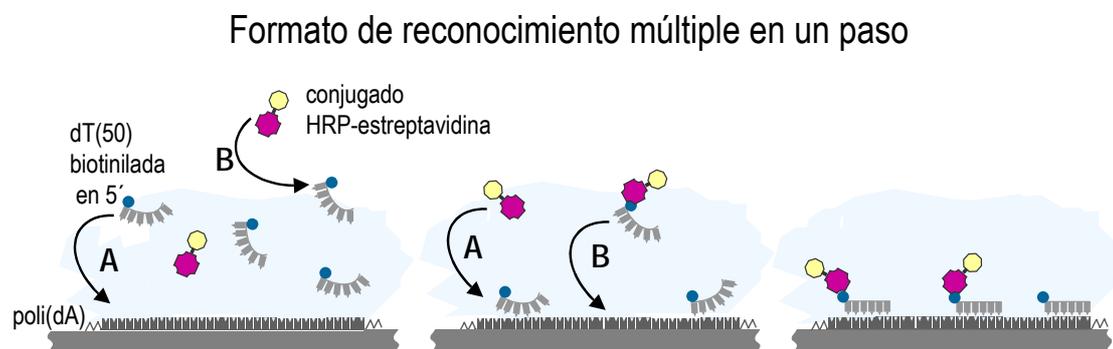


Figura 6.2. Posibles mecanismos en el formato dot-blot de reconocimiento múltiple en un único paso. Para más detalle, véase el texto.

A priori, parece más factible que el mecanismo más favorable sea el B, debido a que la reacción biotina/estreptavidina es extremadamente rápida. Otro factor a tener en cuenta es que las

dos reacciones necesarias para que se lleve a cabo el mecanismo A ocurren en fase sólida/líquida, mientras que en el caso del mecanismo B, la reacción biotina/estreptavidina ocurre en solución, un hecho que la favorecería aún más.

Por último, en el presente trabajo se busca determinar el tiempo de conservación de las membranas “genosensoras” modificadas con material genético. Este estudio pretende evaluar la posibilidad de utilizar en un futuro las membranas “genosensoras” pre-preparadas –si efectivamente se demuestra su conservación- en un *kit* genosensor.

Para resumir, el trabajo descrito en el presente capítulo evalúa la hibridación de un analito de 260 mer (similar a la longitud que puede tener un amplicón), con una sonda biotinilada de una secuencia más amplia –de 50 mer–, mediante un genosensor amperométrico de membranas recambiables en un formato dot-blot de reconocimiento múltiple y su aplicación en un formato competitivo. Se determina también el tiempo de conservación de las membranas modificadas con DNA para su posible implementación en forma de *kit* y se evalúa la posibilidad de acortar el procedimiento de preparación en un esquema en el cual la hibridación y la marcación enzimática ocurran en un único paso.

6.2 EXPERIMENTAL

6.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS

6.2.1.1 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.

6.2.1.2 Reactivos y materiales

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

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

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

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

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.

6.2.2.1 Inmovilización de poli(dA) en la membrana de nylon HYBOND™

En § 4.2.3.1, se describen las distintas metodologías de inmovilización sobre una membrana de nylon¹⁶⁻²⁰. En el presente capítulo, al igual que en el formato desarrollado en el capítulo 4, se utiliza también la inmovilización por calor seco^{17,20-22}.

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 las membranas de nylon fue el siguiente:

- 1.- Se prehumedecen las membranas de nylon en 10 X SSC.
- 2.- Se agregan 2 μ l (de la solución final obtenida del procedimiento de preparación del DNA, § 4.2.3.2) sobre las membranas de nylon prehumedecidas. Para cada nueva adición, se espera que la alícuota anterior se seque completamente, a temperatura ambiente. Se repite tantas veces como oligonucleótido sintético se desee inmovilizar.
- 3.- Se humedecen las membranas con solución deshibridizante durante 5 min.
- 4.- Se transfieren las membranas a solución neutralizadora por 1 minuto.
- 5.- Se colocan las membranas sobre papel absorbente durante 30 minutos.
- 6.- Se procede a la fijación del DNA al soporte. Se envuelven las membranas con papel de filtro y se transfieren a una estufa, a 80 °C durante 2 horas.

6.2.2.2 Conservación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con DNA

Una vez inmovilizado el material según el procedimiento indicado en § 6.2.2.1, las membranas modificadas (con el DNA adsorbido) se conservan envueltas en papel de aluminio a 4 °C. El tiempo que estas membranas pueden ser conservadas es evaluada en el trabajo descrito en el presente capítulo.

6.2.2.3 Tratamiento de prehibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con DNA

El principal objeto del tratamiento de prehibridación es bloquear, mediante moléculas de alto peso molecular, los sitios libres de la membrana de nylon, de manera de favorecer la hibridación, y no la adsorción inespecífica de la sonda que lleva la funcionalización con biotina.

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

- tipo de solución de prehibridación: reactivos bloqueantes^{17,18,20-25}, uso de formamida^{18,20,21,23,25} y SDS^{17,20-26}.
- temperatura y tiempo de prehibridación^{18,20,25}
- agitación durante el tratamiento de prehibridación^{17,20,27}
- volumen utilizado en el tratamiento de prehibridación^{20,25}

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

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

Las variables utilizadas en el tratamiento de prehibridación fueron:

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

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

- 1.- Se colocan las membranas, luego de la fijación del ssDNA (véase protocolo de inmovilización, § 6.2.2.1), en tubos eppendorf con la cara en la que ha sido adsorbido el DNA del lado de la luz del tubo de manera que quede en contacto con la solución.
- 2.- Se agregan 450 µl de solución de prehibridación.
- 3.- Se colocan los tubos eppendorf en el incubador, con agitación suave y a 42 ° C, durante 4 h.

6.2.2.4 Hibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con DNA

Este es el paso más importante del procedimiento de construcción del sensor, ya que aquí ocurre la hibridación de la(s) sonda(s) biotinilada(s) con el poli(dA) inmovilizado en la membrana, tanto en el formato de dot-blot reconocimiento múltiple como en el formato competitivo.

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 ^{17,18,20-25}, uso de formamida ^{18,20,21,23,25} y SDS ²⁰⁻²⁶, fuerza iónica ^{18,21}, uso de dextranos ^{21,22,24} o polietilenglicol ^{18,23,26}
- temperatura y tiempo de hibridación ^{18,20,25}
- agitación durante la hibridación ^{17,20,27}
- volumen de hibridación ^{20,25}

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

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

Las variables utilizadas en el procedimiento de hibridación fueron:

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

La preparación de la sonda biotinilada en 5' [dT(50)-biotina] se realizó como se describiera en § 4.2.5.7.

Hibridación del analito soportado en las membranas de nylon HYBOND™ en formato dot-blot de reconocimiento múltiple

El protocolo de hibridación de las membranas de nylon HYBOND™ para el formato dot-blot de reconocimiento múltiple fue el mismo que el utilizado en § 4.2.5.8 en cuanto a la metodología, con la única diferencia en la secuencia del analito y de la sonda biotinilada.

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

- 1.- Inmediatamente después del tratamiento de prehibridación (§ 6.2.2.3), se elimina la solución de prehibridación de los tubos eppendorf, sin mover las membranas, y se agregan 450 µl de solución de hibridación, preparada según § 4.2.5.2.
- 2.- Se dejan los tubos eppendorf en el incubador con agitación suave y a 42 °C, durante 10 minutos (para que la solución de hibridación tome esta temperatura).
- 3.- Se adiciona un volumen (en µl) de sonda biotinilada en 5' (dT(50)-biotina).
- 4.- Se dejan las membranas en hibridación con agitación suave y a 42 °C, durante toda la noche.
- 5.- Luego de la hibridación, se procede a los lavados posthibridación de las membranas, de la siguiente manera:
 - 1.- 10 minutos, en 40 ml de 2 X SSC-0.1 % SDS, con agitación suave, a 20 °C
 - 2.- 10 minutos, en 40 ml de 0.2 X SSC-0.1 % SDS, con agitación suave, a 50 °C
 - 3.- Se remojan las membranas en 2 X SSC dos veces a 20 °C, para eliminar el SDS.

Hibridación del oligonucleótido soportado en las membranas de nylon HYBOND™ en formato competitivo de reconocimiento múltiple

Durante el paso de hibridación en el formato competitivo ocurre la hibridación de la sonda biotinilada en la membrana y en solución, distribuyéndose entre el DNA inmovilizado en la membrana y el analito que se encuentra en solución. Obviamente, para que haya competición, la secuencia del DNA inmovilizada en la membrana es idéntica a la del analito.

El protocolo de hibridación de las membranas de nylon HYBOND™ para el formato competitivo de reconocimiento múltiple fue el mismo que el utilizado en § 4A.2.5.

Así, el analito competiría en solución por la sonda biotinilada (dT(50)-biotina) con el DNA inmovilizado en la membrana, de igual secuencia que éste.

La sonda biotinilada puede hibridarse, por lo tanto, en solución con el analito, o en la membrana con el DNA inmovilizado en ella. Los híbridos marcados formados en solución son desechados, mientras que los híbridos generados en la membrana son los que darán la señal analítica en el dispositivo genosensor.

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

- 1.- Inmediatamente después del tratamiento de prehibridación (§ 6.2.2.3), se elimina la solución de prehibridación de los tubos eppendorf, sin mover las membranas, y se agregan 450 µl de solución de hibridación, preparada según § 4.2.5.2.
- 2.- Se dejan los tubos eppendorf en el incubador con agitación suave y a 42 °C, durante 10 minutos (para que la solución de hibridación tome esta temperatura).
- 3.- Se adiciona un volumen (en µl) de poli(dA) (en el modelo propuesto, esta secuencia representa al analito).
- 4.- Se adiciona un volumen (en µl) de sonda biotinilada en 5' (dT(50)-biotina).
- 5.- Se dejan las membranas en hibridación competitiva con agitación suave y a 42 °C, durante toda la noche.
- 6.- Luego de la hibridación, se procede a los lavados posthibridación de las membranas, de la siguiente manera:
 - 1.- 10 minutos, en 40 ml de 2 X SSC-0.1 % SDS, con agitación suave, a 20 °C
 - 2.- 10 minutos, en 40 ml de 0.2 X SSC-0.1 % SDS, con agitación suave, a 50 °C
 - 3.- Se remojan las membranas en 2 X SSC dos veces a 20 °C, para quitar el SDS.

Los lavados de posthibridación, en este caso, tienen una importancia especial ya que es el paso encargado de eliminar los híbridos marcados que se generan en solución entre el analito y la sonda biotinilada. Los híbridos generados en la membrana (DNA de idéntica secuencia que el analito/sonda biotinilada) darán una señal que será inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la solución.

6.2.2.5 Marcación enzimática posthibridación

Luego del procedimiento de hibridación y de los lavados posthibridación, en el formato dot-blot de reconocimiento múltiple se han formado los híbridos entre el poli(dA) inmovilizado en la membrana y la sonda funcionalizada con biotina. En el caso del formato competitivo, los híbridos se forman entre el DNA inmovilizado en la membrana (de igual secuencia que el analito) y la sonda biotinilada.

Sea cual fuese el caso, una vez formados estos híbridos funcionalizados con biotina, éstos deben evidenciarse mediante un esquema que involucra la reacción del dúplex formado, a través de la

biotina, con el conjugado enzimático estreptavidina-peroxidasa, mediante la reacción entre la biotina y la estreptavidina.

La peroxidasa es quien genera la señal analítica amperométrica luego de la reacción con un 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 ¹⁸
- temperatura y tiempo de premarcación con solución bloqueante ¹⁸
- temperatura y tiempo de marcación ¹⁸
- agitación durante la marcación ^{17,18,20,27}
- volumen de marcación ^{20,25}

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

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

Las variables utilizadas en el procedimiento de marcación enzimática fueron:

- temperatura y tiempo de premarcación con solución bloqueante: 37 °C, 30 min
- temperatura y tiempo de marcación enzimática: 37 °C, 1h
- agitación durante la premarcación y marcación enzimática: suave
- volumen de marcación enzimática: 450 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 postmarcación 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.

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

- 1.- Inmediatamente después de la hibridación en el formato dot-blot de reconocimiento múltiple y en el formato competitivo (§ 6.2.2.4) y de los lavados de posthibridación, se colocan las membranas en los tubos eppendorf con la cara en la que se ha adsorbido el DNA hacia la luz del tubo, y se agregan 450 µl de solución bloqueante.
- 2.- Se dejan los tubos eppendorf en el incubador con agitación suave y a 37 °C, durante 30 minutos (procedimiento de premarcación con solución bloqueante).
- 3.- Se adiciona un volumen (en µl) de conjugado enzimático.
- 4.- Durante la marcación enzimática, se dejan las membranas en agitación suave y a 37 °C, durante 1 h.
- 5.- Luego de la marcación, se procede a los lavados postmarcación de las membranas, de la siguiente manera:
 - 1.- 10 minutos, en 40 ml de solución de lavado, con agitación suave, a 20 °C
 - 2.- Se repite 2 veces más

6.2.2.6 Procedimiento de hibridación y de marcación enzimática en un solo paso de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el DNA analito

El objetivo del presente procedimiento de un solo paso es acortar los tiempos de reacción mediante la realización simultánea de la hibridación y de marcación enzimática ¹⁶.

En el presente procedimiento, al igual que en § 4.2.3.1 se utiliza también la inmovilización por calor seco ^{17,20-22}.

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 las membranas de nylon fue el mismo que en § 6.2.2.1.

La hibridación y la marcación enzimática se realizan en un solo paso: simultáneamente ocurre la hibridación de la sonda biotinilada con el DNA inmovilizado en la membrana y la reacción del conjugado enzimático con la biotina de la sonda complementaria al analito.

Esto implica compatibilizar las condiciones de la hibridación –que tiene sus particularidades– con las condiciones de la reacción biotina –de la sonda de DNA– con la estreptavidina –del conjugado enzimático–, ya que se debe unificar las condiciones de reacción que implican DNA y una molécula de naturaleza proteica como es una enzima.

En el presente apartado se utiliza una solución bloqueante (para que ocurra la hibridación y la marcación enzimática satisfactoriamente y de manera simultánea) cuya composición fue:

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

Esta solución es acuosa –a diferencia de los procedimientos de hibridación realizadas con anterioridad en los que se utilizaba formamida (véase § 4.2.5.1)–. Se prefirió no utilizar formamida –un

solvente de naturaleza orgánica– para no perjudicar el funcionamiento de la enzima que, debido a su naturaleza proteica, podría desnaturalizarse a altas temperaturas y en presencia de dicho solvente.

Como no se utilizó formamida, se consideró conveniente aumentar la temperatura de reacción de 42 °C a 55 °C, una temperatura de compromiso entre la requerida para una hibridación selectiva en agua como disolvente y para un buen funcionamiento del conjugado enzimático. Además, esa temperatura ya ha sido reportada en la bibliografía ¹⁶.

Las variables utilizadas en el procedimiento simultáneo de hibridación y marcación enzimática fueron:

- temperatura y tiempo de premarcación con solución bloqueante: 55 °C, 15 min
- temperatura y tiempo de reacción: 55 °C, durante una hora
- agitación durante la reacción: suave
- volumen de reacción: 450 µl

La preparación de la sonda biotilada en 5' [dT(50)-biotina] se realizó como se describiera en § 4.2.5.7. La preparación del complejo estreptavidina-HRP se realizó de manera idéntica que en § 4.2.6.8.

El protocolo de hibridación y de marcación enzimática simultáneas de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas en formato de reconocimiento múltiple consistió en:

- 1.- Se colocan las membranas, luego de la fijación del ssDNA (véase protocolo de inmovilización, § 6.2.2.1), en tubos eppendorf con la cara en la que ha sido adsorbido el DNA del lado de la luz del tubo de manera que quede en contacto con la solución.
- 2.- Se agregan 450 µl de solución bloqueante.
- 3.- Se colocan los tubos eppendorf en el incubador, con agitación suave y a 55 °C, durante 15 min.
- 4.- Se adiciona un volumen (en µl) de sonda biotilada en 5' (dT(50)-biotina).
- 5.- Se adiciona un volumen (en µl) de conjugado enzimático.
- 6.- Durante la reacción (hibridación y marcación enzimática simultánea), se dejan las membranas en agitación suave y a 55 °C, durante 1 h.
- 7.- Luego del procedimiento simultáneo de hibridación y marcación enzimática, se procede a los lavados posthibridación-postmarcación de las membranas, de la siguiente manera:
 - 1.- 10 minutos, en 40 ml de solución de lavado, con agitación suave, a 20 °C
 - 2.- Se repite 2 veces más

Debido a que se ha demostrado que el conjugado enzimático influye más en la adsorción inespecífica que la sonda biotilada (§§ 4.3.4 y 5.3.4), se seleccionó la misma solución de lavado que la utilizada anteriormente para los lavados postmarcación enzimática (§ 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

6.2.3 INTEGRACIÓN AL TRANSDUCTOR DE LAS MEMBRANAS MODIFICADAS

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

La membrana circular de 7 mm de diámetro se colocó en la superficie del sensor (mediante pinzas) de manera que la cara modificada quede en contacto con el transductor, según se muestra en la Figura 6.3. Posteriormente, se sujetó mediante una junta tórica a presión que se ajusta perfectamente al cuerpo de PVC del sensor –que tiene 8 mm de diámetro externo y 6 mm de diámetro interno–, y que deja sujeta la membrana dejando un círculo de 6 mm de diámetro que coincide con el diámetro interno del tubo de PVC relleno de material conductor.

Posteriormente, todo el conjunto se incorporó al sistema de detección amperométrico.

Este nuevo sistema de sujeción es mucho más robusto que el descrito en los capítulos anteriores.

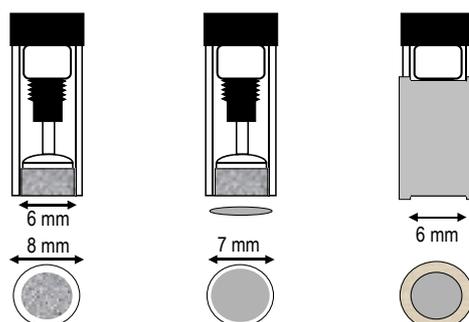


Figura 6.3. Procedimiento de montaje del transductor grafito-epoxi-membrana HYBOND™ con un sistema de junta tórica. Al sensor se le colocó por encima de la superficie una membrana circular HYBOND™ modificada y, posteriormente, se le colocó el sistema de sujeción basado en un sistema de junta tórica a presión.

6.2.4 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 a las membranas.

Para tal fin, la evaluación se llevó a cabo con el sistema amperométrico descrito en § 2.2.2. La celda de medida fue una solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0, utilizándose como electrodo de trabajo el genosensor construido en § 6.2.3. La concentración de hidroquinona en el medio fue de 1.8 mM. A este sistema, se le aplicó el potencial de reducción de la hidroquinona (-0.1 V, vs Ag/AgCl), que fuera optimizado en § 3.3.1.1.

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

6.2.5 OPTIMIZACIÓN DE LOS GENOSENSORES DE MEMBRANAS RECAMBIABLES EN FORMATO DOT-BLOT DE RECONOCIMIENTO MÚLTIPLE

En este formato dot-blot de reconocimiento múltiple se adaptaron las cantidades de reactivos que fueran optimizadas en el capítulo 4 a la naturaleza del material genético que se utiliza en este caso.

Entre algunas de las variables optimizadas en el capítulo 4 se encuentran:

- cantidad de analito inmovilizado en la membrana: 100 pmoles (§ 4.2.10)
- cantidad de sonda biotinilada de la solución de hibridación: 40 pmoles (§ 4.2.11)
- cantidad de peroxidasa-estreptavidina en la solución bloqueante durante la marcación enzimática: 0.8 μ g (§ 4.2.12).

Para este caso, es importante destacar que la longitud del DNA analito que se utiliza en este capítulo es de 260 mer, mientras que los que se utilizaron hasta este momento eran de 45 y 50 mer. Por eso, y teniendo en cuenta las conclusiones que se sacaron en § 4.3.1 –sobre la saturación de la membrana si se coloca material genético en exceso–, se han inmovilizado 11.4 pmoles de poli(dA).

En cuanto a la sonda funcionalizada con biotina (dT(50)-biotina), teniendo en cuenta la posibilidad de hibridación múltiple con el analito, se han adicionado 61.2 pmoles.

Por otro lado, como se ha utilizado el mismo conjugado enzimático que el optimizado en el capítulo 5, se han utilizado 0.49 μ g de HRP-estreptavidina.

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

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

6.2.5.1 Protocolo de preparación de las membranas “genosensoras” en formato dot-blot de reconocimiento múltiple

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización del poli(dA) analito, descrito en § 6.2.2.1.
- 2.- Se continúa con el tratamiento de prehibridación, descrito en § 6.2.2.3.
- 3.- Se sigue el protocolo de hibridación en formato dot-blot de reconocimiento múltiple, descrito en § 6.2.2.4.
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 6.2.2.5.

6.2.5.2 Protocolo de preparación de las membranas “blanco” en formato dot-blot de reconocimiento múltiple

Este lote se realizó de manera idéntica al de las membranas “genosensoras” en formato dot-blot de reconocimiento múltiple (§ 6.2.5.1), pero obviando el paso de adición de ssDNA (analito), es decir, no hay analito –poli(dA)– sobre la membrana.

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

En § 4.2.13 se explicó de manera exhaustiva las posibilidades de adsorción inespecífica en el formato descrito en el capítulo 4, y las mismas consideraciones son válidas para este formato dot-blot de reconocimiento múltiple, ya que su fundamento es básicamente el mismo que el descrito en el capítulo 4. En este caso, al igual que en el formato descrito en el capítulo 4, durante el proceso de hibridación puede adsorberse de manera inespecífica la sonda biotinilada. 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, el conjugado HRP-estreptavidina tiene dos posibilidades de adsorción inespecífica:

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

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

El protocolo que se siguió para su preparación fue:

- 1.- Se sigue el protocolo de preparación de las membranas, descrito en § 6.2.2.1, con la única diferencia que no se adiciona ssDNA –poli(dA)–, es decir, no hay analito sobre la membrana (se obvia el paso 2 del protocolo).
- 2.- Se colocan estas membranas en tubos eppendorf y se continúa con el paso 2 del tratamiento de prehibridación, descrito en § 6.2.2.3.
- 3.- Se sigue con el protocolo de hibridación, descrito en § 6.2.2.4. En este caso, al no haber analito en la membrana, no va a haber hibridación, y si sólo adsorción inespecífica de la sonda biotinilada.
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 6.2.2.5.

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

Una vez preparadas las membranas “genosensoras” y las membranas “blanco”, se integraron al transductor amperométrico, como se explicara en § 6.2.3.

La evaluación de los sensores preparados se realizó basándose en la señal generada, finalmente, por la enzima peroxidasa, según se explicara en § 6.2.4.

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

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

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

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

Esta señal de hibridación está en relación con la cantidad de enzima presente en la membrana pero que se encuentra únicamente unida al híbrido formado en la superficie y directamente relacionada con la cantidad de analito en la membrana (Figura 6.1).

6.2.5.4 Diseño del experimento en formato dot-blot de reconocimiento múltiple

Para evaluar la utilidad del formato dot-blot de reconocimiento múltiple, se realizaron dos lotes de membranas, como se explicara en § 6.2.5, denominados membranas “genosensoras” y membranas “blanco”.

La Tabla 6.1 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.

Cabe destacar que por cada lote se han evaluado replicados de las membranas.

Tabla 6.1. *Diseño del experimento de evaluación del formato dot-blot de reconocimiento múltiple. 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=4	Lote 2 “genosensor” n=3
Poli(dA) -analito- protocolo de adsorción	No se adiciona (-)	11.4 pmoles
dT(50)-biotina protocolo de hibridación	61.2 pmoles	61.2 pmoles
HRP-estreptavidina protocolo de marcación enzimática	0.49 µg	0.49 µg

6.2.6 OPTIMIZACIÓN DE LOS GENOSENSORES DE MEMBRANAS RECAMBIABLES EN FORMATO COMPETITIVO DE RECONOCIMIENTO MÚLTIPLE

En el formato competitivo de reconocimiento múltiple se utilizaron las mismas cantidades de reactivos que las utilizadas en § 6.2.5.

Para tal fin, se realizaron en todos los casos un lote de membranas “blanco” con el objeto de evaluar la adsorción inespecífica. Otro lote de membranas fueron las llamadas “genosensoras”, que evaluaron el proceso de competición. Además, se construyó un lote de membranas “controles”, con el objeto de evaluar la hibridación total de la sonda biotinilada con el DNA –de igual secuencia que el analito– inmovilizado en la superficie, cuando el analito está ausente y que indicaron, por lo tanto, la máxima señal analítica posible de ser obtenida. Por cada lote se procesan normalmente triplicados de las membranas.

La señal analítica de las membranas “genosensoras” debería estar comprendida entre los valores dados por el “blanco” (mínima señal debida a la adsorción inespecífica), y por las membranas “controles” (máxima señal analítica cuando no hay analito en solución y no existe, por lo tanto, competición por la sonda biotinilada).

Al igual que en el formato dot-blot de reconocimiento múltiple, la adsorción inespecífica se utilizó para detectar la verdadera señal de fondo del dispositivo, ya que por diferencia entre la señal de las membranas “genosensoras” y las membranas “blanco” y entre las membranas “controles” y las membranas “blanco” se obtuvo la respuesta analítica debido únicamente a la hibridación en formato competitivo de reconocimiento múltiple.

6.2.6.1 Protocolo de preparación de las membranas “genosensoras” en formato competitivo de reconocimiento múltiple

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización de poli(dA) en la membrana (que en el formato competitivo representa el oligonucleótido sintético de igual secuencia que el analito), descrito en § 6.2.2.1.
- 2.- Se continúa con el tratamiento de prehibridación, descrito en § 6.2.2.3.
- 3.- Se sigue el protocolo de hibridación para el formato competitivo de reconocimiento múltiple, descrito en § 6.2.2.4.
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 6.2.2.5.

6.2.6.2 Protocolo de preparación de las membranas “controles” en formato competitivo de reconocimiento múltiple

Este lote de membranas se realizó de manera idéntica al anterior, pero obviando el paso de adición de poli(dA) en la solución de hibridación (paso 3 del protocolo de hibridación, § 6.2.2.4), es decir, no se adicionó analito.

Como el resto de los reactivos fue el mismo, en estas membranas “controles” se evaluó el proceso de hibridación total, y el resultado representaría la señal analítica máxima cuando la cantidad de analito es nula y no existe competición. El protocolo que se siguió fue:

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización de poli(dA) en la membrana (que en el formato competitivo representa el oligonucleótido sintético de igual secuencia que el analito), descrito en § 6.2.2.1.
- 2.- Se continúa con el tratamiento de prehibridación, descrito en § 6.2.2.3.
- 3.- Se sigue el protocolo de hibridación para el formato competitivo de reconocimiento múltiple, descrito en § 6.2.2.4, con la diferencia de que no se adiciona poli(dA) en la solución de hibridación (que en el formato competitivo representa el analito), es decir, se obvia el paso 3 de este protocolo.
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 6.2.2.5.

6.2.6.3 Protocolo de preparación de las membranas “blanco” en formato competitivo de reconocimiento múltiple.

Este lote se realizó de manera idéntica al de las membranas “genosensoras” en formato competitivo de reconocimiento múltiple (§ 6.2.6.1), pero obviando el paso de adición de poli(dA) –que en el formato competitivo representa el oligonucleótido sintético de igual secuencia que el analito–.

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

En § 4A.2.5.3 y Figura 4A.4 se explicó de manera exhaustiva las posibilidades de adsorción inespecífica en el formato competitivo descrito en el apéndice A del capítulo 4, y las mismas consideraciones son válidas para este formato competitivo de reconocimiento múltiple.

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

El protocolo que se siguió para su preparación fue:

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización de poli(dA) en la membrana (que en el formato competitivo representa el oligonucleótido sintético de igual secuencia que el analito), descrito en § 6.2.2.1, con la única diferencia que no se adiciona ssDNA, es decir, no hay poli(dA) sobre la membrana (se obvia el paso 2 del protocolo).
- 2.- Se colocan estas membranas en tubos eppendorf y se continúa con el paso 2 del tratamiento de prehibridación, descrito en § 6.2.2.3.
- 3.- Se sigue con el protocolo de hibridación para el formato competitivo de reconocimiento múltiple, descrito en § 6.2.2.4. En este caso, al no haber poli(dA) en la membrana, no va a haber hibridación y si sólo adsorción inespecífica.
- 4.- Se termina con el protocolo de marcación enzimática, descrito en § 6.2.2.5.

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

Una vez preparadas las membranas “genosensoras”, “controles” y “blanco”, las mismas se integraron al transductor amperométrico como se explicara en § 6.2.3.

La evaluación de los sensores preparados se realizó basándose en la señal generada, finalmente, por la enzima peroxidasa, según se explicara en § 6.2.4.

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, de los controles y de los genosensores.

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

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

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

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

La señal de hibridación en los genosensores está en relación con la cantidad de enzima presente en la membrana pero que se encuentra únicamente unida al híbrido formado en la superficie e inversamente relacionada con la cantidad de analito en solución (Figura 4A.3). Se espera que la señal de hibridación de los controles (en las que el analito en solución es igual a cero) sea mayor que la señal de hibridación de los genosensores en formato competitivo.

6.2.6.5 Diseño del experimento en formato competitivo de reconocimiento múltiple

La Tabla 6.2 resume las cantidades de reactivos utilizadas en los protocolos de inmovilización, hibridación y marcación enzimática.

Tabla 6.2. *Diseño del experimento de evaluación del formato competitivo de reconocimiento múltiple. 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 2 “genosensor” n=2	Lote 3 “control” n=3
poli(dA) en la membrana -protocolo de adsorción-	No se adiciona (-)	11.4 pmoles	11.4 pmoles
dT(50)-biotina -protocolo de hibridación-	61.2 pmoles	61.2 pmoles	61.2 pmoles
poli(dA) analito en la solución de hibridación -protocolo de hibridación-	10.9 pmoles	10.9 pmoles	No se adiciona (-)
HRP-estreptavidina -protocolo de marcación enzimática-	0.49 µg	0.49 µg	0.49 µg

Para evaluar la utilidad del formato competitivo de reconocimiento múltiple, se realizaron tres lotes de membranas, como se explicara en § 6.2.6, denominados membranas “genosensoras”, membranas “controles” y membranas “blanco”.

Como ya se expresara, las membranas “genosensoras” evaluaron la competencia, las membranas “controles” la hibridación total en la membrana y las membranas “blanco” la adsorción inespecífica global. Por cada lote se evaluaron replicados de las membranas.

Para obtener la información de la presencia de analito en una muestra se requiere procesar los tres lotes de membranas.

6.2.7 OPTIMIZACIÓN DE LOS GENOSENSORES DE MEMBRANAS RECAMBIABLES EN FORMATO DOT-BLOT DE RECONOCIMIENTO MÚLTIPLE EN UN SOLO PASO

En este experimento se pretende llevar a cabo simultáneamente los procedimientos de hibridación y de marcación enzimática, con el objeto de disminuir el tiempo total de análisis.

En el formato dot-blot de reconocimiento múltiple en un solo paso se utilizaron las mismas cantidades de reactivos que en § 6.2.5.

Se realizaron en todos los casos un lote de membranas “blanco” con el objeto de evaluar la adsorción inespecífica –en las que se adicionan todos los reactivos excepto el analito adsorbido en la membrana–. El otro lote de membranas fueron las llamadas “genosensoras”, y evaluaron el proceso de hibridación. Por cada lote se procesaron triplicados de las membranas.

Al igual que en el formato dot-blot de reconocimiento múltiple, la adsorción inespecífica se utilizó para detectar la verdadera señal de fondo del dispositivo, ya que por diferencia entre la señal de las membranas “genosensoras” y las membranas “blanco” se obtuvo la respuesta analítica debido únicamente a la hibridación en formato dot-blot de reconocimiento múltiple en un solo paso.

6.2.7.1 Protocolo de preparación de las membranas “genosensoras” en formato dot-blot de reconocimiento múltiple en un solo paso

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización del poli(dA) (analito), descrito § 6.2.2.1.
- 2.- Se termina con el procedimiento simultáneo de hibridación y marcación enzimática, descrito en § 6.2.2.6.

6.2.7.2 Protocolo de preparación de las membranas “blanco” en formato dot-blot de reconocimiento múltiple en un solo paso

Este lote se realizó de manera idéntica al de las membranas “genosensoras” en formato de reconocimiento múltiple en un solo paso (§ 6.2.7.1), pero obviando el paso de adición de ssDNA, es decir, no hay analito –poli(dA)– sobre la membrana.

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

En este caso, durante el procedimiento simultáneo de hibridación y de marcación enzimática, los posibles mecanismos de adsorción inespecífica serían los siguientes:

- adsorción inespecífica de la sonda biotinilada únicamente (este mecanismo no aumentaría la señal analítica inespecífica);
- adsorción inespecífica de la sonda biotinilada y posterior reacción con el conjugado enzimático;
- adsorción inespecífica de la entidad sonda biotinilada/conjugado enzimático preformado en solución;
- adsorción directa del conjugado enzimático.

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

El protocolo que se siguió para su preparación fue:

- 1.- Se sigue el protocolo de inmovilización del poli(dA) (analito), descrito en § 6.2.2.1, con la única diferencia que no se adiciona poli(dA), es decir, no hay analito sobre la membrana (se obvia el paso 2 del protocolo).
- 2.- Se termina con el procedimiento simultáneo de hibridación y marcación enzimática, descrito en § 6.2.2.6.

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

Una vez preparadas las membranas “genosensoras” y las membranas “blanco”, se integraron al transductor amperométrico como se explicara en § 6.2.3.

La evaluación de los sensores preparados se realizó basándose en la señal generada, finalmente, por la enzima peroxidasa, según se explicara en § 6.2.4.

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

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

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

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

Al igual que en el formato dot-blot de reconocimiento múltiple, esta señal de hibridación está en relación con la cantidad de enzima presente en la membrana pero que se encuentra únicamente unida al híbrido formado en la superficie y directamente relacionada con la cantidad de analito en la membrana (Figura 6.2).

6.2.7.4 Diseño del experimento en formato dot-blot de reconocimiento múltiple en un solo paso

Para evaluar la utilidad del formato dot-blot de reconocimiento múltiple en un solo paso, se realizaron dos lotes de membranas, como se explicara en § 6.2.7, denominados membranas “genosensoras” y membranas “blanco”. La Tabla 6.3 resume las cantidades de reactivos utilizadas en el protocolo de inmovilización y en el procedimiento simultáneo de hibridación y marcación enzimática. Cabe destacar que por cada lote se han evaluado replicados de las membranas.

Tabla 6.3. *Diseño del experimento de evaluación del formato dot-blot de reconocimiento múltiple en un solo paso. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos adicionados en los pasos de inmovilización por adsorción y en el procedimiento simultáneo de hibridación y marcación enzimática.*

REACTIVOS	Lote 1 “blanco” n=3	Lote 2 “genosensor” n=3
Poli(dA) -analito- -protocolo de adsorción-	No se adiciona (-)	11.4 pmoles
dT(50)-biotina -procedimiento simultáneo de hibridación y marcación enzimática-	61.2 pmoles	61.2 pmoles
HRP-estreptavidina -procedimiento simultáneo de hibridación y marcación enzimática-	0.49 µg	0.49 µg

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1 GENOSENSORES EN FORMATO DOT-BLOT DE RECONOCIMIENTO MÚLTIPLE

En la Figura 6.4 se muestran los resultados del experimento realizado en § 6.2.5.4. Este experimento se basa en el diseño de un formato dot-blot de reconocimiento múltiple. Cada barra muestra el valor medio de cada lote de membranas (“blanco” y “genosensoras”), y el error de la barra representa la desviación estándar (ec. 1, § 4B.1.1) de los replicados de cada lote.

La Tabla 6.4 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación de los lotes 1 y 2. La diferencia significativa de señal amperométrica que existe entre los genosensores y los blancos (prueba t) permite afirmar que el procedimiento funciona correctamente, y que la hibridación del analito de 260 mer con una sonda biotinilada de 50 mer ocurre con efectividad. Además, en la Figura 6.4 se muestra el nivel a partir del cual la señal del genosensor es significativamente superior a la señal del blanco, para estas mismas condiciones experimentales (ec. 7, 4B.1.4.4).

En la Figura 6.4 puede observarse que la desviación estándar relativa (ec. 2, § 4B.1.2) para los genosensores en formato de reconocimiento múltiple es del orden del 17 %. La misma es mayor en este formato de reconocimiento múltiple frente al reconocimiento simple (con una desviación estándar relativa del orden del 10 %). Este hecho se puede deber a que la hibridación exitosa en el formato de reconocimiento múltiple depende más de la disposición de las bases de la secuencia del analito y a factores de tipo estérico.

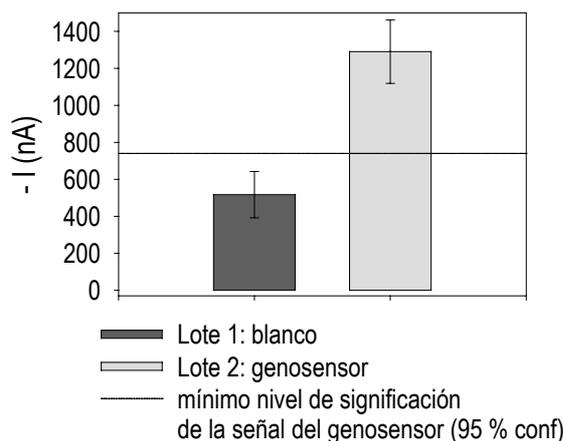


Figura 6.4. Resultados obtenidos en la evaluación del diseño del formato dot-blot de reconocimiento múltiple mediante hibridación con una sonda de 50 mer funcionalizada en 5' con biotina. DNA analito 260 mer [poli(dA)] inmovilizado en la membrana: 11.4 pmoles. Sonda funcionalizada con biotina dT(50-biotina): 61.2 pmoles. HRP-estreptavidina: 0.49 μ g. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H_2O_2 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Electrodo de trabajo grafito-epoxi-membrana HYBOND™ modificada según § 6.2.5.4.

Tabla 6.4. 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 reconocimiento múltiple, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	Lote 1 "blanco" n=4	Lote 2 "genosensor" n=3
s (ec. 1, § 4B.1.1)	$s_1 = 125.3$	$s_2 = 171.4$
Prueba F (bilateral) (ec. 3, § 4B.1.3)	$F_{calc} (1.87) < F_{2,3} (16.04)$	
S_p (ec. 4B, § 4B.1.4.1)	$S_p = 145.5$	
grados libertad (ec. 6B, § 4B.1.4.3)	5	
Prueba t (unilateral) (ec. 5B, § 4B.1.4.2)	$t_{calc} (6.95) > t_5 (2.01)$	

6.3.2 CONSERVACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE NYLON HYBOND™ MODIFICADAS CON DNA

En el presente experimento se pretende determinar el tiempo de conservación de las membranas “genosensoras” modificadas con material genético. Este estudio busca evaluar la posibilidad de utilizar en un futuro las membranas “genosensoras” pre-preparadas –si efectivamente se demuestra su conservación a lo largo del tiempo– en un *kit* genosensor.

Para tal fin, se llevó a cabo la metodología de inmovilización de poli(dA) en las membranas según § 6.2.2.1. Este día se consideró el día 0, y se prepararon 16 membranas “genosensoras” y 16 membranas “blanco”. Posteriormente, las membranas se conservaron según § 6.2.2.2, y se fueron evaluando a lo largo del tiempo –en lotes de 3– según se describe en § 6.2.5.1 para el caso de las membranas “genosensoras”, y en 6.2.5.2 para las membranas “blanco”, pero obviando el paso 1 de ambos protocolos.

En la Figura 6.5 se muestran los resultados obtenidos del experimento llevados a cabo con las membranas pre-preparadas. Cada barra muestra el valor medio de cada lote de membranas (“blanco” y “genosensoras”) y el error representa la desviación estándar (ec. 1, § 4B.1.1) de los replicados de cada lote.

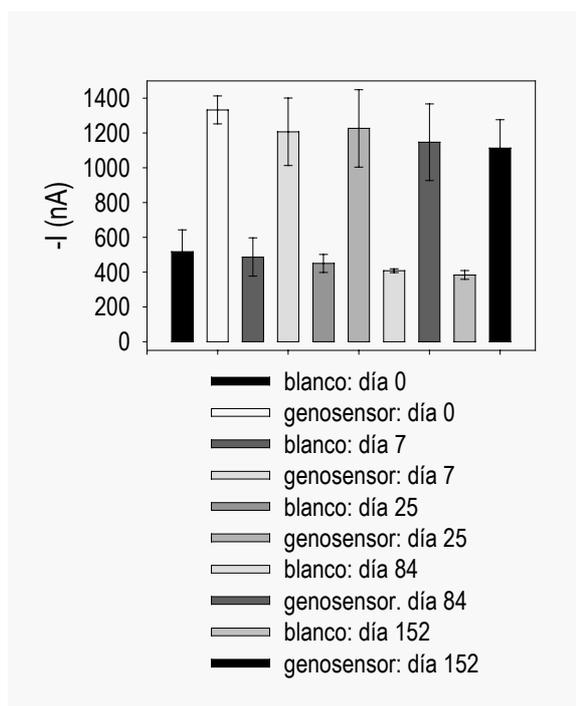


Figura 6.5. Resultados obtenidos en la evaluación del tiempo de conservación de las membranas “genosensoras” preparadas según un formato dot-blot de reconocimiento múltiple mediante hibridación con una sonda de 50 mer funcionalizada en 5' con biotina. DNA analito 260 mer [poli(dA)] inmovilizado en la membrana: 11.4 pmoles. Sonda funcionalizada con biotina dT(50)-biotina: 61.2 pmoles. HRP-estreptavidina: 0.49 µg. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H₂O₂ 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Electrodo de trabajo grafito-epoxi-membrana HYBOND™ modificada según § 6.2.5.4. Día 0 n=4. Resto de los días n=3.

Como puede observarse, existe una ligera tendencia a la disminución de la señal a lo largo del tiempo. Entre el día 0 y el día 152, esta disminución en la señal amperométrica es de 134 nA en los blancos (lo que representa un 25 % menos de señal), mientras que es de 219 nA para el caso de los genosensores (lo que representa un 16 % menos de la señal).

Esta disminución de señal puede deberse a una pérdida de actividad enzimática del conjugado, o bien a modificaciones estructurales del mismo a lo largo del tiempo que hace que la adsorción inespecífica sea menor, hecho que afectaría por igual a blancos y a genosensores.

En este punto es importante destacar que se utilizó la misma solución –conservada en la nevera– de conjugado enzimático para la evaluación de todos los lotes de las membranas.

En la Figura 6.6 se ha graficado sólo la señal de hibridación, obtenida según la siguiente expresión:

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

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

En este caso, se puede observar que la señal de hibridación en sí se mantiene relativamente constante, excepto cuando las membranas se evalúan el mismo día de preparadas, es decir en el día 0.

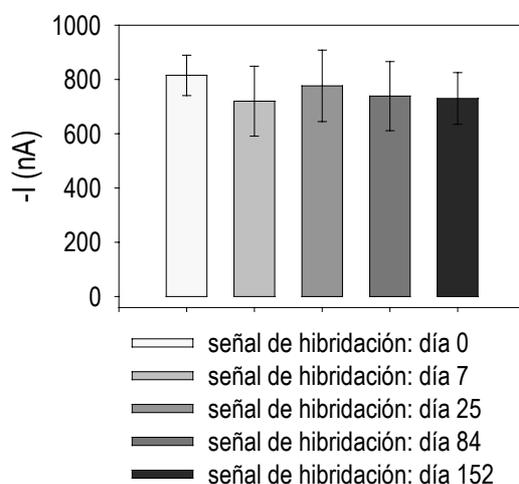


Figura 6.6. Señales netas de hibridación obtenidas en la evaluación del tiempo de conservación de las membranas “genosensoras” preparadas según un formato dot-blot de reconocimiento múltiple mediante hibridación con una sonda de 50 mer funcionalizada en 5' con biotina. Las condiciones experimentales son las que se muestran en la Figura 6.5.

La Tabla 6.5 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación entre las señales de hibridación de las membranas recién preparadas y luego de 152 días de conservación. Se supuso varianzas comparables. Se puede concluir que la diferencia en la señal de hibridación entre el día 0 y 152 no es significativa (prueba t).

Estos resultados permitirían también concluir que la disminución de la señal se debe más bien a la disminución de la adsorción inespecífica más que por la pérdida de actividad del conjugado enzimático debido a que la señal de hibridación permanece constante. Las desviaciones estándar relativas de la señal de los blancos también disminuyen a lo largo del tiempo.

La disminución de la adsorción inespecífica no sólo puede deberse al conjugado enzimático, sino que también puede deberse a modificaciones de la membrana de nylon a lo largo del tiempo. Esta última hipótesis estaría de acuerdo con la disminución más drástica que se observa en la evaluación de las membranas recién preparadas frente a las membranas conservadas.

Como puede observarse, las membranas pueden conservarse a 4 ° C hasta al menos 152 días con material adsorbido sin una pérdida significativa de la señal amperométrica, hecho que favorecería la implementación de esta metodología en forma de *kit*.

Anteriormente, se había reportado en la bibliografía la conservación de las membranas de nylon modificadas a temperatura ambiente por más de dos meses ²⁸.

Tabla 6.5. Pruebas estadísticas para la comparación de los valores medios de la señal de hibridación (prueba *t*) de las membranas procesadas el día 0 y el día 152, realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	Comparación de las señales de hibridación del día 0 y el día 152
<i>S_p</i> (ec. 12, § 4B.2.2.1)	<i>S_p</i> = 109.9
grados libertad (ec. 16, § 4B.2.2.3)	10
Prueba <i>t</i> (bilateral) (ec. 14, § 4B.2.2.2)	<i>t_{calc}</i> (0.66) < <i>t₁₀</i> (2.23)

6.3.3 GENOSENSORES EN FORMATO COMPETITIVO DE RECONOCIMIENTO MÚLTIPLE

En la Figura 6.7 se muestran los resultados del experimento realizado en § 6.2.6.5. Este experimento se basa en el diseño de un formato competitivo. Cada barra muestra el valor medio de cada lote de membranas (“blanco”, “genosensoras”, y “controles”) y el error representa la desviación estándar (ec. 1, § 4B.1.1) de los replicados de cada lote.

Estos valores demuestran que la señal amperométrica de los genosensores en formato competitivo disminuyen en presencia del analito [poli(dA)] en solución (en comparación con la señal observada en los genosensores controles que indican la hibridación total, en ausencia de analito en solución).

El descenso de la señal amperométrica en las membranas “genosensoras” se debe a la formación de híbridos entre el analito y la sonda biotinilada en la solución de hibridación –que son eliminados en los lavados posthibridación–, lo que provoca una disminución de la cantidad de sonda biotinilada disponible para hibridarse con poli(dA) –de igual secuencia que el analito– inmovilizado en la membrana.

Cabe destacar que la reproducibilidad del formato competitivo de reconocimiento múltiple es menor que la obtenida en un formato dot-blot simple –véase apéndice A del capítulo 4– por lo que

este modelo no es tan fiable como aquél. Este hecho se puede deber a que la hibridación en sí sea menos reproducible debido a que es múltiple y que depende en gran medida de factores estéricos y de la disponibilidad de las bases nitrogenadas del DNA inmovilizado en la membrana.

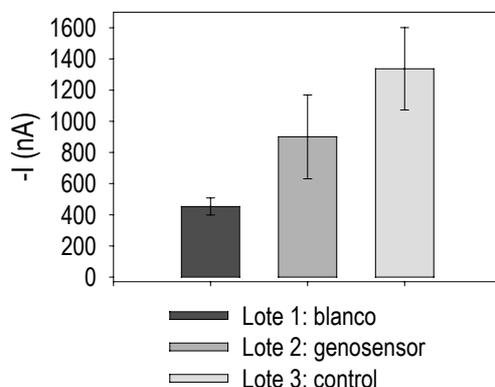


Figura 6.7. Evaluación del diseño del formato competitivo de reconocimiento múltiple mediante hibridación con una sonda de 50 mer biotinilada en 5'. DNA analito 260 mer [poli(dA)] en la solución de hibridación: 10.9. Poli(dA) inmovilizado en la membrana: 11.4 pmoles. Sonda funcionalizada con biotina dT(50)-biotina: 61.2 pmoles. HRP-estreptavidina: 0.49 µg. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H₂O₂ 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Electrodo de trabajo grafito-epoxi-membrana HYBOND™ modificada según § 6.2.6.5.

En la Figura 6.8 se ha graficado sólo la señal de hibridación, obtenida según las siguientes expresiones:

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

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

El error de las barras representa la desviación estándar de la diferencia de los valores medios de las membranas “genosensoras” y “controles” respecto a las membranas “blanco” (ec. 11, § 4B.2.1).

La Tabla 6.6 muestra los resultados de las pruebas estadísticas para la comparación entre las señales de hibridación de las membranas “genosensoras” y de las membranas “controles”. Se supuso varianzas comparables. Se puede concluir que la diferencia de señal de hibridación entre ambas es significativa (prueba t). Además, en la Figura 6.8 se muestra el nivel a partir del cual la señal de hibridación de las membranas “genosensoras” es significativamente inferior a la de las membranas “controles”, para estas mismas condiciones experimentales (ec. 18, § 4B.2.2.4). Como se puede observar, la señal de hibridación de los genosensores obtenida experimentalmente está muy cerca de este límite estadístico, por lo que para poder asegurar un resultado con una confianza del 95 % se deben procesar como mínimo triplicados de las membranas o, eventualmente, incrementar la cantidad de analito en la solución de hibridación para incrementar el nivel de la señal diferencial neta.

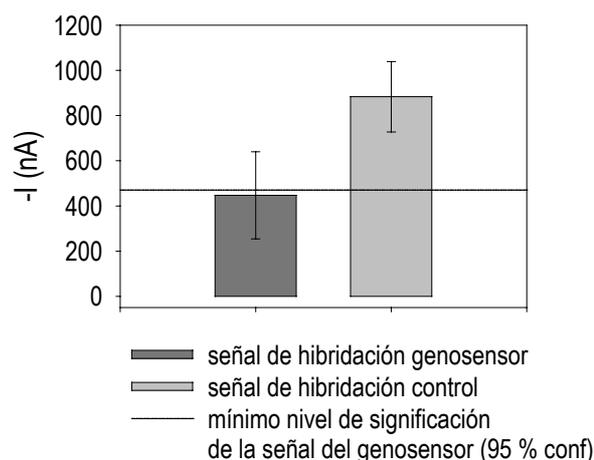


Figura 6.8. Señales netas de hibridación obtenidas en la evaluación del formato competitivo de reconocimiento múltiple. Las condiciones experimentales son las que se muestran en la Figura 6.7.

Tabla 6.6. Pruebas estadísticas para la comparación de los valores medios de la señal de hibridación (prueba *t*) de las membranas "genosensoras" y "controles", realizadas con una confianza del 95 %.

ESTADÍSTICOS	Comparación de las señales de hibridación entre los genosensores y los controles
<i>S_p</i> (ec. 12, § 4B.2.2.1)	$S_p = 178.8$
grados libertad (ec. 16, § 4B.2.2.3)	7
Prueba <i>t</i> (unilateral) (ec. 14, § 4B.2.2.2)	$t_{\text{calc}} (1.99) > t_r (1.89)$

El formato competitivo posee mayor versatilidad que un formato dot-blot, debido a que permite tener el analito en solución. Este hecho, asociado a la posibilidad de conservación de las membranas durante 150 días como mínimo, reforzaría la idea de la posibilidad de implementar este dispositivo en forma de *kit*.

Este formato puede ser muy útil para la detección de transcritos de RNA –es decir, mRNA–. En este caso, se inmovilizaría en la membrana un ssDNA sintético de secuencia idéntica a la del transcripto, con la única diferencia que su naturaleza sería ácido desoxirribonucleico, mientras que el analito es ácido ribonucleico. El analito sería RNA, es decir el esqueleto azúcar fosfato contiene ribosa en lugar de 2-desoxirribosa, y la base T está sustituida por uracilo (U). Pese a su diferencia química, el RNA puede hibridarse con el DNA. El apareamiento de bases en este caso sería idéntico, con la única diferencia que el uracilo es la base que se aparea con adenina. Así, se colocaría en solución la sonda de DNA biotinilada. El DNA inmovilizado en la membrana competiría por el transcripto de RNA en solución (el analito) por la sonda biotinilada, y dicha sonda se distribuiría entre la membrana –hibridándose con el DNA– y en solución –hibridándose con el mRNA–. Los híbridos en solución se eliminan con los lavados, y la señal amperométrica obtenida sería menor, cuanto mayor es la cantidad de transcritos en solución.

6.3.4 FORMATO DOT-BLOT DE RECONOCIMIENTO MÚLTIPLE EN UN SOLO PASO

En la Figura 6.9 se muestran los valores comparativos de la adsorción inespecífica (blanco) y de los genosensores en formato dot-blot de reconocimiento múltiple en un procedimiento que implica la hibridación y la marcación enzimática en un solo paso. Como se puede observar, no existe una diferencia significativa entre los valores de las membranas “blanco” y “genosensoras”, por lo que se puede concluir que no ha habido hibridación en las membranas “genosensoras”.

Este hecho puede deberse a múltiples factores. Como ya se ha dicho, un procedimiento de un solo paso implica compatibilizar dos reacciones de naturaleza diferente de manera de que se lleven a cabo en las mismas condiciones.

En este caso, se puede observar que la actividad enzimática no se ha visto perjudicada, por lo que se puede concluir que el paso que no ha ocurrido ha sido la hibridación, tal vez porque el tiempo de hibridación sea demasiado escaso –sólo una hora–.

Otro punto a discutir, según muestra la Figura 6.2, es qué mecanismo predomina en esta reacción de un solo paso.

Como se había discutido, el mecanismo A es esencialmente el mismo que el que ocurre en un formato dot-blot en el que los pasos de hibridación y de marcación enzimática se realizan de manera secuencial. Si este mecanismo A se hubiese llevado a cabo, algo de hibridación se debería haber observado, ya que se sabe que esta secuencia de reacciones es exitosa, por los resultados mostrados en § 6.3.1. Solo se podría especular con el tiempo de hibridación, pero se sabe que en una hora un porcentaje de hibridación debería haber ocurrido (según la bibliografía, se alcanza un 45-50 % de eficiencia de hibridación entre los 60 y 120 minutos de hibridación ²²) por lo que los resultados podrían confirmar que el mecanismo que ocurre sería el B.

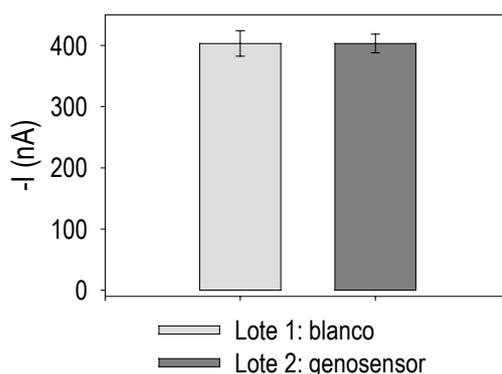


Figura 6.9. Resultados obtenidos en la evaluación del diseño del formato dot-blot de reconocimiento múltiple en un solo paso. DNA analito 260 mer [poli(dA)] inmovilizado en la membrana: 11.4 pmoles. Sonda funcionalizada con biotina dT(50): 61.2 pmoles. HRP-estreptavidina: 0.49 μ g. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Sustrato: H₂O₂ 1.06 mM. Potencial aplicado: -0.1 V (vs Ag/AgCl). Electrodo de trabajo grafito-epoxi-membrana HYBOND™ modificadas según § 6.2.7.4.

En este mecanismo B, primero ocurriría la reacción del conjugado enzimático a través de la estreptavidina con la biotina de la sonda biotinilada. Luego, esta entidad sonda biotinilada/conjugado enzimático debería hibridarse con el analito inmovilizado en la membrana. A priori, parecería también que el mecanismo más favorable es el B, debido a que la reacción biotina/estreptavidina es extremadamente rápida y que la misma ocurriría íntegramente en solución.

Para que se haya podido observar señal amperométrica todo parece indicar, entonces, que se depende de la hibridación de la entidad sonda biotinilada/conjugado enzimático con el analito inmovilizado en la membrana.

Esta sonda marcada con conjugado enzimático podría verse más impedida (tanto por factores estéricos como por factores difusionales) que una sonda sólo funcionalizada con biotina. Los resultados apoyan estas afirmaciones.

Pese a que en este caso no se han obtenido resultados favorables es importante destacar que esta metodología ha sido descrita en la bibliografía ¹⁶.

6.4 CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un genosensor amperométrico en formato dot-blot de reconocimiento múltiple. Mediante este formato se consigue identificar un analito de 260 mer con una sonda biotinilada de 50 mer.
2. La desviación estándar relativa es mayor en un formato de reconocimiento múltiple frente a un reconocimiento simple (17 % frente a menos del 10 % respectivamente). Este hecho se puede deber a que la hibridación exitosa en el formato de reconocimiento múltiple depende más de la disposición de las bases de la secuencia del analito por factores de tipo estérico.
3. El dispositivo desarrollado permite detectar un número mayor de bases en la secuencia del analito (50 mer), lo que incrementa la especificidad del análisis, respecto a los formatos de reconocimiento simple desarrollados hasta el momento.
4. Las membranas modificadas con DNA pueden conservarse a 4° C al menos durante 152 días, sin pérdida significativa de la señal amperométrica.
5. Durante la evaluación de las membranas se observa una disminución de la señal amperométrica, tanto en las membranas "genosensoras" como en las "blanco", pero manteniéndose la señal de hibridación relativamente constante. Esto puede deberse, por lo tanto, a una disminución de la adsorción inespecífica, que a su vez puede deberse o bien a un envejecimiento del conjugado enzimático o bien a modificaciones de la membrana de nylon.
6. El genosensor amperométrico desarrollado en formato competitivo de reconocimiento múltiple permite efectuar análisis genéticos con el analito de 260 mer en solución con un intervalo de confianza del 95 %. Sin embargo, se requiere forzosamente realizar como mínimo triplicados de los controles y de los genosensores para obtener resultados fiables debido al aumento de la desviación estándar relativa respecto a un formato de

reconocimiento simple, o bien, aumentar la cantidad de analito en la solución de hibridación para incrementar el nivel de la señal diferencial neta.

7. La cantidad de analito detectada por el formato competitivo de reconocimiento múltiple es de 10 pmoles para una secuencia de 260 mer.

8. El formato competitivo posee mayor versatilidad que un formato dot-blot, debido a que permite tener el analito en solución. Este hecho, asociado a la posibilidad de conservación de las membranas durante 150 días como mínimo, refuerza la idea de la posibilidad de implementar este dispositivo en forma de *kit*.

9. El formato competitivo sería especialmente útil para el análisis de transcritos de RNA (es decir mRNA) que otorga información sobre la expresión de un gen.

10. La adsorción inespecífica es controlada y reproducible. Puede evitarse el hecho de preparar "ensayos blanco" para evaluarla, si esta señal se mantiene, su magnitud es conocida y no se cambia de producto comercial de conjugado enzimático.

11. El formato dot-blot de reconocimiento múltiple llevado a cabo en un solo paso no ha dado resultados favorables. Estos resultados parecen indicar que primero ocurriría la reacción en solución del conjugado enzimático a través de la estreptavidina con la biotina de la sonda funcionalizada. Luego, esta entidad sonda biotinilada/conjugado enzimático no se hibridaría con el analito inmovilizado en la membrana por factores estéricos, de orientación o difusionales, en el tiempo previsto para el análisis.

6.5 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ K. Povlsen, J. S. Jensen, I. Lind. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 3211-3216.
- ² C. A. Jantos, R. Roggendorf, F. N. Wuppermann, J. H. Hegemann. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 1890-1894.
- ³ A. Lishanski, N. Kurn, E. F. Ullman. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, e42.
- ⁴ J-S. Lin, H-Y. Tsen. *J. Food Protection* 1999, 62, 1103-1110.
- ⁵ C. Soumet, G. Ermel, V. Rose, N. Rose, P. Drouin, G. Salvat, P. Colin. *Lett. App. Microbiol.* 1999, 29, 1-6.
- ⁶ C. M. Gooding, P. V. Choudary. *Mol. Cell. Probes* 1999, 13, 341-347.
- ⁷ C. R. Beuzón, A. Schiaffino, G. Leori, P. Cappuccinelli, S. Rubino, J. Casadesús. *App. Environ. Microbiol.* 1997, 63, 2082-2085.
- ⁸ J. M. Luk, U. Kongmuang, R. S. W. Tsang, A. A. Lindberg. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 714-718.
- ⁹ G. G. Stone, R. D. Oberst, M. P. Hays, D. S. McVey, M. M. Chengappa. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 2888-2893.
- ¹⁰ 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.
- ¹¹ C. H. Chiu, J. T. Ou. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 2619-1622.
- ¹² H. De Beenhouwer, Z. Liang, P. de Rijk, C. van Eekeren, F. Portaels. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 2994-2998.
- ¹³ C. M. Elie, T. J. Lott, E. Reiss, C. J. Morrison. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 3260-3265.
- ¹⁴ T. Cherian, M. K. Latitha, A. Manoharan, K. Thomas, R. H. Yolken, M. C. Steinhoff. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 3605-3608.
- ¹⁵ E. Luneberg, J. S. Jensen, M. Frosch. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 31, 1088-1094.
- ¹⁶ R. K. Saiki, P. S. Walsh, C. H. Levenson, H. A. Erlich. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 6230-6234.
- ¹⁷ K. C. Reed, D. A. Mann. *Nucleic Acids Res.* 1985, 13, 7207-7221.
- ¹⁸ L. J. Kricka. *Nonisotopic DNA Probe Techniques*; Academic Press, Inc.: San Diego, 1992.
- ¹⁹ G. M. Church, W. Gilbert. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 1991-1995.
- ²⁰ J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2th ed.*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989.
- ²¹ J. Meinkoth, G. Wahl. *Anal. Biochem.* 1984, 138, 267-284.
- ²² T. R. Gingeras, D. Y. Kwoh, G. R. Davis. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 5373-5390.
- ²³ M. Renz, C. Kurz. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 3435-3444.
- ²⁴ L. Singh, K. W. Jones. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 5627-2638.
- ²⁵ L. T. Kirby. *DNA Fingerprinting*; Stockton Press: New York, 1990.
- ²⁶ A. C. Syvanen, M. Laaksonen, H. Soderlund. *Nucleic Acids Res.* 1986, 14, 5037-5048.
- ²⁷ S. F. Wolf, L. Haines, J. Fisch, J. N. Krensky, J. P. Dougherty, K. Jacobs. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 2911-2926.
- ²⁸ K. B. Register, R. M. Lee, C. Thomson. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 26, 3342-3346.