

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA

PROGRAMA DE DOCTORADO

Química Física y Analítica

SELECCIÓN DE APTÁMEROS CONTRA PROTEÍNAS ALERGÉNICAS DEL GLUTEN Y APLICACIÓN EN ENSAYOS ELECTROQUÍMICOS

TESIS DOCTORAL

2015

SONIA AMAYA GONZÁLEZ



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Selección de aptámeros contra proteínas alergénicas del gluten y aplicación en ensayos electroquímicos	Inglés: Selection of aptamers against allergenic proteins from gluten and application in electrochemical assays
2.- Autor	
Nombre: Sonia Amaya González	
Programa de Doctorado: Química Física y Analítica	
Órgano responsable: Departamento de Química Física y Analítica	

RESUMEN (en español)

En la presente tesis se aborda el problema de la detección de gluten en alimentos para celíacos, aún no resuelto satisfactoriamente con los inmunoensayos comerciales. Para ello se propone la obtención de receptores no proteicos, concretamente aptámeros, y su empleo en ensayos analíticos que permitan la detección de las proteínas tóxicas. Mediante el procedimiento SELEX y empleando como diana el péptido inmunodominante 33-mer, se obtuvieron varios aptámeros. Su afinidad por el péptido así como por la proteína completa fue evaluada empleando espectroscopia de impedancia farádica, espectroscopia de resonancia de plasmón de superficie y cronoamperometría. Todos ellos mostraron una mayor afinidad por el péptido que por la gliadina, siendo el denominado Gli 4 el de mayor afinidad. Se evaluó también su reactividad hacia otras prolaminas tóxicas. Mientras que Gli 4, Gli 1 y Gli 3 son capaces de enlazarse a las hordeinas de la cebada y las secalinas del centeno, Gli 12 no responde a éste último. El aptámero Gli 4 fue el único capaz de detectar aveninas, cuyo potencial tóxico es controvertido. La selectividad contra proteínas de soja, maíz y arroz, no inmunotóxicas, fue total.

Con el fin de comprobar la idoneidad de desarrollar un método electroquímico de detección de gluten en alimentos, inicialmente se transformó un método ELISA óptico comercial en electroquímico, consiguiéndose características de respuesta análogas o ligeramente superiores a las del método existente.

Por tanto, se desarrollaron dos métodos competitivos de análisis electroquímicos



basados en la inmovilización del péptido 33-mer sobre partículas magnéticas empleando los aptámeros Gli 4 (más afin) y Gli 1 (más abundante). Cuando la calibración se realizó con el patrón recomendado de gliadina, PWG, se obtuvo un límite de detección de 4,9 ppm y 0,5 ppm, respectivamente, en concordancia con la mayor afinidad de Gli 4. Este último es el más bajo obtenido hasta el momento. La reproducibilidad del ensayo para una concentración de 10 ppb es del 8% y 6%, respectivamente. Cuando se empleó 33-mer como patrón, únicamente Gli 1 respondió adecuadamente, por lo que fue el aptámero seleccionado para el análisis de muestras hidrolizadas.

Finalmente, ambos ensayos se aplicaron a la detección de gluten tanto en muestras certificadas como de contenido desconocido, obteniendo resultados que correlacionan bien con los certificados o con los obtenidos mediante dos métodos comerciales. No se obtuvieron falsos negativos y los escasos falsos positivos fueron fundamentalmente debidos a la mayor sensibilidad de los métodos aquí descritos.

RESUMEN (en Inglés)

In this thesis the problem of gluten detection in food for coeliac disease patients, which is not satisfactorily solved by commercial immunoassays yet, is broached. To this aim, the obtaining of non-protein receptors, specifically aptamers, and their use in analytical assays that allows the detection of toxic proteins is proposed. Through a SELEX procedure and using the immunodominant peptide 33-mer as a target, several aptamers were obtained. Their affinities for the peptide and for the whole protein were evaluated using faradaic impedance spectroscopy, surface plasmon resonance and chronoamperometry. All of the obtained aptamers showed higher affinity for the peptide than for the gliadin, being the aptamer called Gli 4 the one with the highest affinity. Their reactivity towards other toxic prolamins was also evaluated. While Gli 4, Gli 1 and Gli 3 were able to bind hordeins from barley and secalins from rye, Gli 12 did not recognize the latter. Gli 4 aptamer was the only one capable of detecting avenins, whose toxic potential is controversial. Selectivity towards non immunotoxic proteins



from soya, maize and rice was complete.

With the aim of testing the suitability of developing an electrochemical method for detecting gluten in food, firstly, a commercial optical ELISA method was converted into electrochemical, obtaining response performance similar or even higher than the one for the existing method.

Therefore, two electrochemical competitive methods based on the immobilization of the 33-mer peptide on magnetic particles using the aptamers Gli 4 (with higher affinity) and Gli 1 (the most abundant) were developed. When the calibration was made using the recommended standard for gliadin, PWG, a detection limit of 4.9 ppm and 0.5 ppm, respectively, was obtained according to the higher affinity of the Gli 4 aptamer. The latter is the lowest obtained so far. Reproducibility of the assay for a concentration of 10 ppb is 8 % and 6 % respectively. When the 33-mer peptide was used as calibration standard, only Gli 1 responded adequately, so this was the aptamer selected to be used for the analysis of hydrolyzed samples.

Finally, both assays were applied for the detection of gluten in samples with certified or unknown content, obtaining results that correlate well with the certified or with the results provided by two commercial methods. False negatives were not obtained the scarce false positives were due, fundamentally, to the higher sensitivity of the methods described here.

*If you're going to try, go all the way.
Otherwise, don't even start.*

Charles Bukowski

AGRADECIMIENTOS

Después de estos años de trabajo, de las largas horas en el laboratorio y de los no-resultados, al final esto se ha logrado. Al final se ha terminado y aquí está. Ha habido muy buenos momentos y han pasado muchas cosas en mi vida que hacen que no sea la misma persona que empezó con más dudas que conocimientos el camino.

Debo agradecer al Dr. Paulino Tuñón porque fue quién me permitió iniciar este trabajo al concederme la beca predoctoral FPI. Sin esa confianza nada de esto habría empezado.

A mis directoras la Dra. María Jesús Lobo Castañón y la Dra. Noemí de los Santos Álvarez, por su apoyo, guía, ánimo y confianza. Por aguantarme cuando entro en crisis, por decirme siempre que “si fuera fácil ya estaría hecho”, por intentar sin fruto que me de un poquito más de importancia y por su trabajo en la revisión de esta memoria.

Al Dr. Arturo Miranda por la motivación, por la positividad, por ser nuestro mejor sensor de gluten, por esas ideas y esas ñapas que solucionan los problemas sin solución y por decirme hace años que el trabajo que estaría aquí sería el 30% de lo que se hizo (o menos), ¡qué razón tenías! Siento mucho lo de aquel pan de prueba no-“gluten free”.

A la Dra. Cristina Delerue del Instituto Superior de Engenharia do Porto por acogerme en su grupo de investigación, por sufrir tanto o más que yo aquellas obras y por ser comprensiva con el momento en

el que estaba. Hizo que el trabajo y mi estancia en Portugal fuese lo mejor de 2012.

Al Dr. Francisco Javier Gómez Pérez del Instituto de Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche por los experimentos de ITC.

Al Dr. José Manuel Pérez Cañadillas del instituto de Química-Física Rocasolano CSIC de Madrid por los experimentos de RMN.

Gracias a todos los compañeros que estuvieron y que están por Oviedo Goretti, Elena, Eva, Rebeca, Daniel, Susana, Laura, Emilio, Miguel, Begoña, Suely, Juanse. Por los cafés compartidos, por soportarme cuando no me soportaba ni yo, por darme ánimos, por darme de comer cuando estaba atrapada delante de la “cafetera” (o Hodor, como lo queráis llamar), por las risas mientras trabajábamos hasta que toda la facultad estaba vacía y por instarme a irme a casa los días festivos. A Daniel especialmente por renunciar a la beca que me financió y por dejar de comer pavipollo.

A los compañeros de Oporto muy especialmente a Fátima, por cuidar de mi como si fuera mi familia cuando estaba lejos de casa en un momento difícil. Pero también a Susana, Joao, Mafalda y tantos más (sois demasiados, me dejaría a alguno si intentase ser exhaustiva). Por hacerme la estancia en ese laboratorio increíblemente agradable y por darme ánimos mientras los obreros nos atacaban.

A mis amigas, lo primero que os agradezco es que me soportéis, de verdad que no entiendo cómo lo hacéis. Todas me animáis, tenéis más

fe en mí de la que yo tendré nunca y aún no habéis llamado al frenopático para que vengan a por mí. Gracias por hacerme reír hasta llorar, por la compañía en la biblioteca mientras esto estaba escribiéndose, por increparme para que salga de casa, por seguir ahí dando ánimos siempre aunque esté infinitamente ocupada y solo tenga huequitos a veces. Muchas gracias a todas y mención especial a Sara, Druky, Kitty, Raquel, Lucía, Elena, Lucía, Yoli, Lore y Carol.

A Paolo que ha llegado por sorpresa a la mitad de este proyecto para sufrir el estrés del final. Mil gracias por los ánimos, por sentirte orgulloso y por estar para lo que venga después.

A toda mi familia que siempre me apoya. Y muy especialmente a ellas que son, con el permiso de todos los demás, las personas más importantes:

A mi madre que aunque no entienda nada siempre está, ha estado y estará ahí sin preguntar. Porque sin ella no sé cómo habría sobrevivido a la carrera y menos aún a la tesis. Gracias por TODO Mami.

A Noelia, Sister, porque eres la mejor persona que conozco y no tendría espacio suficiente aunque emplease las 400 páginas de este tomo para agradecerte lo que haces por mí. Te quiero mucho hermana.

Índice

1	El gluten como problema analítico.....	1
1.1	Origen del problema	3
1.2	Retos que plantea la detección de gluten.....	10
1.2.1	Identidad del alérgeno.....	10
1.2.2	Dificultad en la obtención de un estándar	13
1.2.3	Alteraciones en el procesado de los alimentos	15
1.3	Métodos de detección de gluten en alimentos	18
1.3.1	Métodos directos.....	19
1.3.2	Métodos indirectos.....	29
2	Objetivos.....	33
3	Selección de aptámeros como receptores sintéticos de gluten	41
3.1	Introducción	43
3.2	Proceso de selección	53
3.3	Clonación, secuenciación y análisis de las secuencias	71
3.4	Afinidad de las secuencias seleccionadas	78
3.5	Selectividad frente a otras proteínas alergénicas.....	92
4	Caracterización de la afinidad de los aptámeros seleccionados.....	99
4.1	Introducción	101
4.2	Determinación de la afinidad en disolución	104
4.3	Evaluación del efecto de la inmovilización sobre superficies en la afinidad.....	113
4.3.1	Espectroscopía de impedancia faradaica	113
4.3.2	Espectroscopía de resonancia de plasmón superficial	132

4.4	Efecto del marcaje sobre la afinidad del aptámero	154
4.5	Caracterización estructural	161
4.6	Discusión	170
5	Ensayos electroquímicos de cuantificación de gluten	175
5.1	Introducción	177
5.2	Adaptación de un método óptico a detección electroquímica	178
5.3	Desarrollo de un apta-sensor electroquímico sobre electrodos nanoestructurados de oro	192
5.4	Desarrollo de un apta-ensayo competitivo sobre partículas magnéticas	201
6	Conclusiones/Conclusions	223
	Bibliografía	231
	ANEXO I: Tablas de datos.....	249
	ANEXO II: Publicaciones relacionadas.....	265

1 El gluten como problema analítico

1.1 Origen del problema

Según la definición aprobada en la Cumbre Mundial sobre la Alimentación celebrada en Roma en 1996 “existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico, social y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos que satisfagan sus necesidades dietéticas y sus preferencias alimentarias para desarrollar una vida activa y sana”. Esta definición proporciona cuatro dimensiones en las que se puede evaluar la seguridad alimentaria: acceso, inocuidad, satisfacción de las necesidades nutritivas y satisfacción de las preferencias alimenticias.

La dimensión de la inocuidad de los alimentos abarca la concienciación acerca de las reacciones adversas causadas por los alimentos. Entre estas se encuentran las reacciones debidas a tóxicos (patógenos, toxinas, contaminantes...), las alergias y las intolerancias. Una alergia es una reacción adversa mediada por el sistema inmune contra ciertos componentes, en este caso de los alimentos. Una reacción alérgica a los alimentos desata síntomas que pueden ir desde síntomas gastrointestinales hasta una reacción anafiláctica severa [1], sufriendo los enfermos alérgicos tanto reacciones locales debido al contacto inmediato con el alérgeno como reacciones sistémicas. Por el contrario, una intolerancia es una reacción adversa no mediada por el sistema inmune.

Atendiendo a la gravedad y la extensión de las reacciones adversas a los alimentos se identifican “los ocho grandes” alérgenos alimentarios que son la leche, los huevos, los cacahuetes, los frutos secos, el pescado, el marisco, la soja

y el trigo. La presente tesis se centra en la determinación de proteínas alergénicas procedentes de los cereales en alimentos.

Dentro de las reacciones adversas a los alimentos, la enfermedad celíaca (EC) es uno de los trastornos más frecuentes en occidente con un índice de afectación del 1% sobre la población total [2]. La enfermedad celiaca se desencadena por la ingestión de un grupo de proteínas que originan una reacción inmunitaria en el paciente. Éstas proteínas, ricas en prolina y glutamina, son las proteínas de almacenamiento de ciertos cereales como el trigo, el centeno la cebada y, probablemente, también la avena conocidas globalmente como gluten [3].

La EC es un trastorno inflamatorio crónico de naturaleza autoinmune en el que están involucrados tanto factores genéticos como ambientales. El factor ambiental es bien conocido, la ingesta de las proteínas provenientes de los cereales trigo, centeno, cebada y avena que constituyen el gluten. Desde el punto de vista genético se ha descubierto que hay una fuerte relación entre determinados perfiles del sistema HLA (antígeno leucocitario humano) y la probabilidad de padecer la enfermedad. Los HLA son moléculas que se encuentran en la superficie de los glóbulos blancos y de casi todas las células de los tejidos de un individuo y que se encuentran implicadas en el reconocimiento y señalización del sistema inmune. El 90% de los enfermos celíacos posee la molécula HLA-DQ2 y el 5% posee la HLA-DQ8 [4]. Pero no todos los individuos genéticamente predispuestos desarrollan la enfermedad. Así por ejemplo, los genes que codifican los antígenos HLA-DQ2/8 están presentes en el 35-45 % de la población en Estados Unidos, mientras que la prevalencia de la enfermedad celíaca en el mismo país es del 1 % [2].

La patogénesis de la enfermedad celíaca implica daño en la mucosa intestinal del enfermo ante la ingesta de gluten, lo que conlleva una mala absorción de los nutrientes [5]. Las proteínas de los cereales son hidrolizadas por las enzimas gástricas produciendo una serie de péptidos resistentes a la digestión. Estos fragmentos son reconocidos por las células T cuando son presentados por los HLA. Si bien los péptidos en su forma nativa pueden desencadenar la respuesta inmune, esta es mayor si los péptidos han sufrido la desamidación de alguno de los residuos de glutamina por parte de la enzima transglutaminasa tisular (tTG). La enzima tTG es segregada al intestino debido al daño tisular, ya que esta cumple funciones en la reparación del tejido. Sin embargo, su acción sobre los péptidos del gluten aumenta la respuesta inmune producida por los mismos. Esta respuesta provoca la producción de citoquinas pro-inflamatorias que desencadenan el daño en la mucosa intestinal [6].

Las manifestaciones clínicas de la EC son muy variadas, pudiendo presentarse en individuos de cualquier edad y afectando a diferentes órganos [7]. Los enfermos pueden presentar desde síntomas asociados al sistema gastrointestinal tales como diarreas, distensión o dolor abdominal, anorexia o pérdida de peso hasta anemia, fatiga, dermatitis herpetiforme o artritis. Existe una gran variedad de síntomas no relacionados con el sistema gastrointestinal que pueden llegar a desarrollarse a lo largo de la enfermedad. El diagnóstico se suele basar en la presencia del factor de predisposición genética HLA-DQ2 o HLA-DQ8, así como en una biopsia intestinal que confirme daños en la mucosa del intestino delgado y la presencia de anticuerpos anti-tTG en suero cuando el paciente consume gluten [8].

Dependiendo de los síntomas que se desarrollan, la EC se clasifica en diferentes fenotipos [9]:

- EC clásica: presenta síntomas gastrointestinales y secuelas producidas por la mala absorción de nutrientes.
- EC atípica: se caracteriza por la escasa o nula presencia de síntomas gastrointestinales y la presencia de síntomas sistémicos.
- EC silente: es asintomática, pero los individuos que la padecen presentan test serológicos positivos y daños en la mucosa intestinal.
- EC latente: los individuos que la padecen no presentan sintomatología ni atrofia en la mucosa intestinal, pero el test serológico es positivo. Estos individuos pueden desarrollar síntomas o sufrir cambios histológicos a lo largo del tiempo.

Esta clasificación hace asemejar el diagnóstico de la EC a un iceberg, Figura 1-1. Habitualmente se diagnostica correctamente solo la EC clásica con síntomas, siendo esta la punta del iceberg, mientras que una gran parte de la enfermedad se encuentra sin diagnosticar por causa de la ausencia de síntomas, a pesar de producirse daño en la mucosa intestinal, o se encuentra latente pudiendo desarrollarse los síntomas con posterioridad si se continúa con la ingesta de gluten. De esta forma, a lo largo del tiempo la enfermedad ha permanecido infra diagnosticada por causa de las variaciones sintomatológicas. Debido al reconocimiento de los diferentes cuadros que puede presentar la enfermedad el diagnóstico ha mejorado y, en consecuencia, ha aumentado la prevalencia de la enfermedad a nivel mundial. En décadas anteriores se consideraba que la

prevalencia de la enfermedad era de 1:3000 mientras que en la actualidad se estima que es del 1% [10].

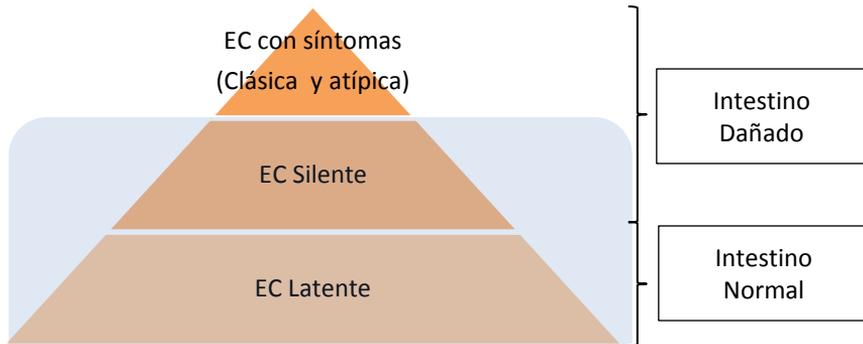


Figura 1-1: Fenotipos de la enfermedad celíaca.

Además de la EC, enfermedad autoinmune, se han descrito otras reacciones al gluten [11]. También mediada por la activación de células T en la mucosa intestinal, se dan casos de alergia al trigo. En estas situaciones, es el entrecruzamiento de IgE por secuencias repetidas del gluten la que desencadena la liberación de determinados mediadores químicos, como la histamina, característicos de un proceso alérgico. Además se han detectado otros casos de reacción al gluten en los que no se identifica un mecanismo autoinmune de alergia y que, de manera general, se denominan sensibilidad al gluten.

El único tratamiento efectivo conocido hasta el momento para la enfermedad celíaca y los otros trastornos asociados descritos es el seguimiento de una dieta libre de gluten a lo largo de toda la vida del enfermo. Esta dieta hace, en la mayoría de los casos, que la enfermedad entre en remisión y desaparezcan los síntomas. En algunos casos, los síntomas de la enfermedad celíaca no llegan a

desaparecer tras el seguimiento de la dieta libre de gluten o vuelven a afectar al enfermo después de un tiempo. Estos casos se conocen como enfermedad celíaca refractaria o resistente [12], y suelen relacionarse con la ingesta involuntaria de gluten por parte del paciente debido a contaminaciones de los alimentos presuntamente libres de gluten.

La gravedad y prevalencia de la enfermedad celíaca, de la alergia al trigo y de las sensibilidades a los cereales no relacionadas con la enfermedad celíaca, unida al tratamiento que deben seguir los enfermos hace importante que los afectados por estas condiciones dispongan de información segura y fiable acerca del contenido o ausencia de gluten en los alimentos a su alcance. De hecho, el gluten está englobado en un grupo de componentes de los alimentos que la Comisión Europea considera necesario etiquetar debido a que son causa de alergias o intolerancias [13].

Existen estudios que intentan determinar la cantidad de alérgeno que se puede considerar segura para los enfermos de la EC [14]. Estos estudios indican que las cantidades seguras para los enfermos celíacos debe ser tomada en cuenta como “ingesta diaria” de proteínas. Teniendo en cuenta la variabilidad de la sensibilidad entre los enfermos celíacos, el nivel más alto tolerable de gluten ingerido está entre 10 y 100 mg al día para que no se ocasionen lesiones intestinales ni síntomas en la mayoría de los enfermos. Al mismo tiempo, también se establece que para los alérgicos al trigo es necesario que se aporte seguridad sobre la cantidad de alérgeno consumido “por toma”. La alergia desencadena síntomas en los niños que ingieren menos de 1 g de proteína mientras que en adultos los síntomas no se desarrollan hasta la ingesta de 10 g

de proteína. Esto quiere decir que, en la mayoría de los casos, es imprescindible un etiquetado apropiado de los alimentos que informe acerca de la cantidad máxima presente en el mismo, de modo que el enfermo celiaco pueda tener seguridad acerca de la cantidad de proteína que puede ingerir.

El seguimiento de la dieta libre de gluten es, en ocasiones, complicado. Uno de los principales inconvenientes es la amplia presencia de cereales en la dieta humana. Tanto el extenso uso de productos derivados de los cereales en la industria alimentaria, como la coexistencia en el mismo entorno de cultivos de cereales que no contienen gluten con cereales que contienen gluten, hace que sea posible la presencia de proteínas alergénicas aun en alimentos que, en principio, no deberían contenerlas. Las causas pueden ser muy diversas, desde contaminaciones en el punto de origen de la materia prima hasta contaminaciones en el procesado de los alimentos. Por esta razón es necesaria la determinación de estas proteínas en productos que, en principio, no contienen ingredientes que aporten el alérgeno.

Ante esto, la legislación vigente apoyándose en la información disponible acerca de los límites máximos tolerables para la mayoría de las personas que sufren reacciones adversas al gluten y en las limitaciones que provienen de la sensibilidad de los métodos de detección de gluten, establece unos límites para que un alimento pueda ser etiquetado como “sin gluten” si su contenido en el alérgeno es inferior a 20 ppm o como “con bajo contenido en gluten” si su contenido en gluten es inferior a 100 ppm [15]. Sin embargo, los límites legalmente establecidos, en ocasiones no son suficientes para enfermos especialmente sensibles. Debido a esto se plantea la necesidad de rebajar los

límites legalmente establecidos y la posibilidad de informar acerca del contenido exacto en proteínas alergénicas. Así, la Federación de Asociaciones de Celíacos de España (FACE) aporta a aquellos productos que, tras un análisis demuestren que su contenido en gluten está por debajo de las 10 ppm, su propio sello “Controlado por FACE”. Este valor es muy cercano al límite de detección de la mayoría de los métodos de detección existentes. Esta circunstancia complica seriamente la disminución de los límites establecidos para el etiquetado.

1.2 Retos que plantea la detección de gluten

Existen una serie de problemas intrínsecos a la detección de gluten en alimentos derivados de la propia naturaleza del analito y de la matriz.

1.2.1 Identidad del alérgeno

El gluten no es una especie química bien definida, sino un conjunto de proteínas de almacenamiento de los cereales. Las proteínas de almacenamiento de los cereales han sido ampliamente estudiadas desde hace siglos y su clasificación proviene de los inicios del siglo XX cuando se planteó la división en fracciones que difieren en la solubilidad en diferentes disolventes [16]. Así se diferencian las albúminas, la fracción soluble en agua, las globulinas son solubles en disoluciones acuosas salinas y un tercer grupo lo forman las proteínas del gluten.

El gluten se define como el residuo gomoso que queda tras el lavado de la harina de trigo para eliminar el almidón. Se trata de la mayoría de las proteínas de almacenamiento de los distintos cereales y está compuesto por prolaminas y

gluteninas en diferentes porcentajes en los distintos cereales. Las prolaminas son solubles en mezclas etanol-agua de entre el 50-70%. Se denominaron prolaminas para reflejar su alto contenido en prolina y en nitrógeno procedente de la glutamina. La prolamina del trigo es conocida como gliadina, la del centeno es la hordeína y la de la cebada es la secalina. Estas fracciones proteicas poseen una estructura similar. Las fracciones insolubles en mezclas alcohólicas se llaman glutelinas de forma general y gluteninas en el caso del trigo [17].

Las prolaminas de los cereales potencialmente tóxicos para los enfermos celíacos se pueden clasificar en tres grupos de fracciones diferentes dependiendo de la composición de los aminoácidos que las conforman: fracción rica en azufre, a la que pertenecen las α , β y γ -gliadinas así como las gliadinas agregadas, las γ -secalinas y las B-hordeínas; fracción pobre en azufre a la que pertenecen las ω -gliadinas, las ω -secalinas y las C-hordeínas y fracción de alto peso molecular [18, 19].

Pese a que se conoce que las prolaminas de centeno y cebada son también tóxicas para los enfermos celíacos, no hay evidencia de que esta toxicidad sea completamente equivalente. A pesar de esto, las prolaminas de los diferentes cereales potencialmente tóxicos y su porcentaje con respecto al contenido de gluten se consideran equivalentes. El nivel legal para la consideración de un producto como libre de gluten, 20 mg de gluten / kg, está basado en la toxicidad del trigo, y para el establecimiento de este límite se asume que la misma concentración de gluten procedente del centeno o la cebada es igualmente segura para los enfermos celíacos. Sin embargo, se ha demostrado

están ausentes en los cereales considerados como seguros [23]. Esta fracción peptídica será pues una diana adecuada para cuantificar el nivel de toxicidad de los alimentos.

1.2.2 Dificultad en la obtención de un estándar

La determinación de los niveles de gluten en alimentos para garantizar la seguridad de los enfermos exige disponer de un estándar de gluten. Sin embargo, su obtención es una tarea complicada. Como ya se ha indicado, el gluten no es una única proteína, sino que existen cientos de proteínas distintas que varían no solo entre los distintos cereales sino también dentro de la misma especie.

La cantidad total de proteína en un grano así como su porcentaje de gluten no solo están determinados genéticamente sino que dependen además del entorno en el que crece la planta [25], viéndose afectados tanto por la meteorología durante el crecimiento del cereal como por la composición del suelo de cultivo.

La mayoría de los métodos actualmente disponibles determinan el contenido de prolaminas tras un proceso de extracción en medios que las solubilicen. Puesto que esta es una de las principales fracciones inmunotóxicas puede ser un marcador adecuado y es el que se ha utilizado para definir los niveles de gluten aceptables para alimentos libres de gluten tanto por el Codex Alimentarius como por diferentes agencias reguladoras. Se han realizado diversos intentos para obtener gliadina (prolamina del trigo) como material de referencia. Actualmente existen en el mercado dos fuentes diferentes de

gliadina: i) comercializada por Sigma Aldrich y ii) preparada con el objetivo de obtener un material de referencia aceptado internacionalmente por un grupo de trabajo del Prolamin Working Group y denominada PWG [26]. Entre estas dos fuentes existen importantes diferencias de solubilidad y de comportamiento [27], siendo la segunda la más ampliamente utilizada [28, 29].

PWG-gliadina es un material obtenido tras el procesado de 28 diferentes cultivos europeos de trigo. Así se consigue homogeneizar el contenido de prolamina minimizando la variabilidad que viene dada por las diferencias en el cultivo. Tras su obtención y caracterización, la PWG-gliadina fue inicialmente aceptada por el Instituto de Materiales de Referencia y Medidas (IRMM por sus siglas en inglés) de la Comisión Europea como material de referencia certificado, suministrándolo bajo la referencia IRMM-480. Sin embargo el PWG no está compuesto solamente de la prolamina del trigo sino que también contiene gluteninas que se extraen conjuntamente con las prolaminas [30]. Debido a la presencia de gluteninas en la gliadina-PWG, se considera que presenta impurezas y tras un corto periodo de tiempo el IRMM revocó su decisión inicial. Pese a que la gliadina PWG no es un material de referencia certificado, sigue siendo el material más empleado para la calibración y validación de métodos analíticos. Además este material no es representativo de todas las muestras, al ser obtenido exclusivamente de trigo, lo que puede conducir a errores significativos (tanto por exceso como por defecto) en la determinación del contenido de prolaminas de otras fuentes [31].

Aunque el estándar utilizado en la cuantificación sea gliadina, el resultado del análisis debe expresarse como contenido de gluten. Se acepta por consenso

que la cantidad de gluten se obtiene multiplicando el contenido de prolamina encontrado en la muestra por 2. Este es un factor promedio, que asume que, en el cereal, el 50 % del gluten está formado por prolaminas. Sin embargo, la proporción de prolaminas a glutelinas no es constante, sino que puede variar en un amplio intervalo dependiendo del cereal tal y como se muestra en la Tabla 1-1 [32]. Esto puede llevar a una sobre- o sub-estimación del contenido de gluten de una muestra dependiendo de la proporción real de prolaminas que contenga.

Tabla 1-1: Variación de la relación prolamina/glutelina en distintos cereales.

Cereal	Trigo	Centeno	Cebada	Avena
Relación Prolamina/glutelina	1,50-3,14	6,27-8,23	1,40-4,98	1,65-3,27

1.2.3 Alteraciones en el procesado de los alimentos

En el procesado de los alimentos por la industria alimentaria se utilizan tanto tratamientos físicos como químicos y enzimáticos que alteran la estructura de las proteínas del gluten, manteniéndose su toxicidad. Estos cambios afectan tanto a la eficacia del proceso de extracción como a la afinidad de la interacción anticuerpo-proteína y, por lo tanto, a los resultados de los ensayos analíticos que utilizan este tipo de receptores, lo que conduce a errores en la cuantificación de los niveles de gluten en alimentos.

Las proteínas del gluten poseen una gran cantidad de aminoácidos con residuos –SH los cuales, en su origen, se encuentran formando puentes disulfuro entre residuos de la misma cadena proteica. Durante el procesamiento térmico en la cocción y horneado de los alimentos, y dependiendo de la temperatura se producen distintos cambios en estas proteínas: hasta 50°C se produce

principalmente la rotura de enlaces intermoleculares de baja energía; entre 50 y 70°C se produce una ruptura de los enlaces S-S intracatenarios y una formación de este mismo tipo de enlaces entre diferentes cadenas de la fracción de las gluteninas; por encima de 70°C se produce el intercambio intercatenario/intracatenario de los enlaces S-S en la fracción de las gliadinas [33]. Estos cambios producen una estructura polimérica de solubilidad reducida, impidiendo la extracción cuantitativa de las proteínas y afectando a su posterior análisis. Adicionalmente la temperatura también induce cambios en la conformación de las proteínas [34].

Se ha comprobado que el procesamiento térmico de las muestras dificulta la detección de las proteínas alergénicas mediante inmunoensayos [35]. La variación en la reactividad inmunoquímica de las proteínas del gluten depende de la temperatura y del tiempo de procesamiento de las mismas, siendo esta una gran fuente de indeterminación en los inmunoensayos de detección de prolaminas.

El tratamiento térmico disminuye la eficacia de la extracción de las proteínas del gluten debido a la formación de agregados. Para mejorar el rendimiento de la extracción con disoluciones alcohólicas se han propuesto diferentes soluciones [36-39]. Estas soluciones se basan en el empleo de distintas combinaciones de reactivos para mejorar la extracción. Para ello se emplea un reductor que rompe los puentes disulfuro intercatenarios formados en el calentamiento del alimento y un agente disgregante, un detergente o un agente caotrópico, que facilite la solubilización de las proteínas. La primera solución propuesta, la más frecuentemente usada, emplea como agente reductor 2-

mercaptoetanol y como agente solubilizador hidrocloreto de guanidina en un tampón, constituyendo el llamado cóctel de extracción [36]. Sin embargo tanto los agentes reductores como los desnaturalizantes empleados en la extracción con el cóctel, pueden dar lugar a interferencias en el reconocimiento de la proteína afectando a los resultados de la cuantificación [40].

Como alternativa al cóctel de extracción, y para mejorar los inconvenientes que presenta el mismo, se propone el empleo de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) como agente reductor manteniendo el hidrocloreto de guanidina como reactivo solubilizador [37]. El rendimiento de la extracción empleando esta disolución es similar al obtenido con el cóctel, sin embargo no se ha comprobado si aporta una mejoría en la detección. También se ha descrito el empleo como reductor del ditioneitol (DTT) en distintas disoluciones alcohólicas, empleando etanol, 1-propanol y 2-propanol [38]. La extracción con DTT en 40 % de 1-propanol presenta un rendimiento cercano al del cóctel, aunque no se observa mejoría en la detección cuando se utiliza esta combinación de reactivos. Más recientemente, se ha desarrollado un método que emplea como reductor TCEP y como agente solubilizante el detergente N-lauroilsarcosina [39]. Esta combinación de reactivos se denomina solución UPEX (Universal Prolamin and gluten EXtractant solution) y permite la extracción de las prolaminas suponiendo además una mejora con respecto al cóctel en la compatibilidad con métodos de cuantificación inmunoquímicos.

Los tratamientos enzimáticos a los que son sometidos los alimentos en su procesamiento conducen a una hidrólisis de las proteínas de los cereales. Esto produce un cambio en la identidad del analito que pasa de ser una proteína de

decenas de KDa de peso molecular a una serie de péptidos pequeños que puede pesar menos de una décima parte que la proteína de la que procede. Estos fragmentos, como ya se ha comentado anteriormente, contribuyen a la toxicidad para los enfermos celíacos o alérgicos y pasarían inadvertidos para el sistema de control produciendo así un etiquetado incorrecto.

Estos tratamientos enzimáticos se emplean principalmente en la producción de alimentos infantiles, cervezas y siropes. Los siropes a su vez pueden ser utilizados en distintos tipos de alimentos procesados, siendo introducidos así en productos que no deberían constituir riesgo para personas hipersensibles, lo que ocasiona problemas de inseguridad a la hora del seguimiento de la dieta libre de gluten.

Para la cuantificación del contenido de gluten en muestras hidrolizadas se hace necesario un estándar de referencia diferente que permita la conversión de unidades hidrolizadas en la muestra en gluten presente en la misma [31]. Idealmente este material debería contener los fragmentos hidrolizados de los distintos cereales, siendo necesario establecer una correspondencia entre la señal proporcionada por los hidrolizados y el contenido en prolamina, que es la cantidad que debe expresarse en el etiquetado.

1.3 Métodos de detección de gluten en alimentos

Como se ha puesto de manifiesto en las secciones anteriores, el correcto etiquetado de los alimentos “sin gluten” es, en este momento, la única forma de garantizar la seguridad de los enfermos celíacos. Para ello se necesitan métodos analíticos de gran sensibilidad y selectividad. Aunque son varios los

tipos de métodos disponibles, no existe aún consenso sobre cuál es más adecuado para resolver este problema.

Los diferentes métodos disponibles para detectar y cuantificar gluten en alimentos pueden dividirse en dos grandes grupos: directos, o basados en la medida de proteínas, e indirectos, o basados en la medida de ADN. Todos tienen sus limitaciones, que se revisan en los siguientes apartados, por lo que su empleo para certificar la seguridad de los alimentos aptos para celíacos debe realizarse con las apropiadas consideraciones.

1.3.1 Métodos directos

En la actualidad los métodos de elección son los métodos inmunoquímicos, aunque no permiten una evaluación directa de la toxicidad del alimento para los pacientes de EC. Están basados en el empleo de elementos de reconocimiento como anticuerpos dirigidos contra las proteínas del gluten.

A lo largo de las últimas décadas se han obtenido anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, dirigidos fundamentalmente contra distintas fracciones de las prolaminas del trigo (gliadina) [41] o de otras prolaminas tóxicas para los enfermos celíacos, como las secalinas [42].

La mayoría de estos métodos son enzimoimmunoensayos con un formato de ensayo heterogéneo donde uno de los reactivos que participa en la reacción inmunológica de reconocimiento está inmovilizado sobre la superficie de un soporte. La etapa final de la detección supone la medida de la actividad del enzima empleado como marcador. Más habitualmente se utilizan ensayos ELISA

tipo sándwich, en los que un primer anticuerpo (anticuerpo de captura) se adsorbe sobre un soporte sólido siendo capaz de enlazar la proteína libre de la muestra (antígeno). Después de que se ha producido la reacción de reconocimiento, se emplea un segundo anticuerpo (anticuerpo indicador) unido a un enzima y capaz de enlazar al antígeno por un sitio de reconocimiento diferente, para llevar a cabo la detección. La validez de estos ensayos depende de que sea posible, sin impedimentos estéricos y con una afinidad parecida, la unión de dos anticuerpos a la molécula diana. Sin embargo, en el caso de alimentos que han sufrido tratamientos enzimáticos, el alérgeno se encuentra en forma de pequeños fragmentos que mantienen la inmunotoxicidad pero no cumplen la condición arriba señalada. Por tanto, los ensayo sándwich conducen normalmente a una subestimación de la concentración de gluten en los alimentos hidrolizados.

Como alternativa para resolver este problema se han desarrollado ensayos competitivos, en los que el analito de la muestra compite con el mismo antígeno inmovilizado sobre el soporte sólido por un anticuerpo marcado con un enzima capaz de reconocerlos y que se añade a la disolución. En este tipo de ensayos las limitaciones provienen de uno de los escollos inherentes al problema analítico, es necesaria la calibración adecuada del ensayo y la extrapolación a unidades de concentración de gluten en la muestra. Para esto se debe establecer un factor que proporcione la equivalencia entre unidades de gluten y fragmentos reconocidos. El tipo de detección más frecuentemente empleada para esta etapa es la medida espectrofotométrica del producto generado por la reacción enzimática, aunque también se ha descrito el desarrollo de métodos inmunoquímicos que emplean detección electroquímica.

El primer método en ser validado por AOAC International en el año 1991, fue el basado en el anticuerpo desarrollado por Skerrit [43]. Este método es un ELISA de tipo sándwich con detección óptica y se basa en un anticuerpo seleccionado contra las ω -gliadinas. Concretamente el epítipo de reconocimiento de este anticuerpo es el péptido PQQPFPQE [44]. Esta fracción de las gliadinas, si bien es resistente a tratamientos térmicos, lo que permite su detección en productos que hayan sufrido estos tratamientos, está presente en el gluten en diferentes porcentajes dependiendo de la especie de trigo. El contenido de ω -gliadinas del gluten de trigo puede variar desde el 6 al 20 % lo que dificulta la cuantificación real del gluten. El método basado en el anticuerpo de Skerrit posee un límite de detección de gluten de 1 ppm, aunque la cuantificación sólo es fiable a partir de 16 ppm. También presenta como limitación la incapacidad de detectar de forma precisa prolaminas provenientes de la cebada y la sobreestimación de las prolaminas del centeno [45]. Empleando este anticuerpo, además de kits ELISA sobre placas, se ha desarrollado y comercializado por la empresa ELISA Technologies un ensayo sobre tiras inmunocromatográficas [46]. Estas tiras permiten el análisis cualitativo de muestras alimentarias proporcionando una respuesta positiva si la muestra contiene una concentración de gluten superior a las 10 ppm.

En la actualidad, y desde 2006, el método de referencia, considerado por el Comité del Codex Alimentarius para métodos de análisis y muestreo como “Método de Tipo I” para el análisis de gluten en alimentos [47], está basado en un anticuerpo desarrollado contra secalinas denominado R5 [42]. Este anticuerpo reconoce además de las secalinas, contra las que ha sido desarrollado, las gliadinas y hordeínas, aunque no reconoce las aveninas. Esto

es debido a que el epítipo de reconocimiento de este anticuerpo es un pentapéptido QQFPF presente tanto en gliadinas como en hordeínas y secalinas [48]. El formato del ensayo de referencia es un ELISA tipo sándwich [49], aunque está disponible comercialmente también un ensayo basado en el mismo anticuerpo con diseño competitivo [39, 50] para cuya calibración se emplea un preparado de proteínas digeridas trópticamente [51]. Del mismo modo, se ha comercializado, basada en este anticuerpo, una tira inmucromatográfica para el análisis cualitativo de alimentos, que proporciona un resultado positivo si la concentración de gluten en la muestra es superior a 5 ppm.

Otro péptido inmunotóxico, comprendido entre los aminoácidos 56 y 75 de la α -gliadina es la diana del anticuerpo CDC5. Se ha desarrollado empleando este anticuerpo un método ELISA de tipo sándwich, validado en un ensayo interlaboratorio siguiendo las directrices de AOAC International [52]. Los resultados obtenidos con este ensayo son similares a los que se obtienen mediante el método basado en el anticuerpo R5. Empleando este anticuerpo se han desarrollado además varios ensayos, también de tipo sándwich, con detección electroquímica [53, 54]. Para los ensayos electroquímicos se emplean electrodos de oro modificados con una monocapa autoensamblada de mercapto ácidos inmovilizando covalentemente un anticuerpo policlonal de captura, con un límite de detección de 3,29 ppb de gliadina [53], o por quimisorción directa de fragmentos Fab del anticuerpo CDC5 con un límite de detección de 2,75 ppm de gluten en muestra [54].

Cabe destacar por su reciente desarrollo los anticuerpos G12 y A1 que fueron obtenidos contra el fragmento 33-mer de la α 2-gliadina, un fragmento peptídico de conocida inmunotoxicidad [55]. El epítipo de reconocimiento para el anticuerpo G12 es un hexapéptido presente en dicho fragmento de secuencia QPQLPY [56]. Empleando el anticuerpo G12 se han desarrollado dos ensayos ELISA, uno competitivo, con un límite de detección de 0,88 ppm de gluten, y otro de tipo sándwich, con un límite de detección de 1,2 ppm de gluten, ambos con detección óptica. El anticuerpo G12 reconoce, además de las gliadinas procedentes del trigo, prolaminas procedentes de centeno, cebada y, con menor sensibilidad, de avena. Basado en este anticuerpo se encuentra disponible comercialmente un kit de análisis de tipo sándwich considerado como un buen indicador de la toxicidad de los alimentos para los enfermos celíacos [57]. Esto es así porque el ensayo detecta el péptido responsable de la mayor parte de la inmunotoxicidad de la gliadina, con un límite de detección de gluten en muestra de 3 ppm para el método de tipo competitivo y de 0,6 ppm para el método de tipo sándwich. La misma casa comercial ofrece además tiras inmucromatográficas que utilizan el anticuerpo para el análisis semi-cuantitativo de muestras alimentarias que ha sido validado por AOAC [58].

Basados en los anticuerpos de Skerrit, en el R5, el G12 y el CDC5, además de en un anticuerpo obtenido por la casa comercial se encuentran comercialmente disponibles kits de análisis para su uso en la industria alimentaria o en laboratorios independientes. En la Tabla 1-2 se recogen algunos de estos kits.

Tabla 1-2 Ensayos comerciales para detección de gluten en alimentos

Anticuerpo	Fabricante	Nombre Comercial	Formato	L.D. (ppm gluten)	
Skerrit [43]	Neogen	Biokits	Sándwich	1	
	Bio Check	Gluten Check	Sándwich	5	
	ELISA technologies	EZ-Gluten	Tiras inmunocromatográficas	10	
R5 [42]	Bio Control Systems	TransiaPlate Prolamins	Sándwich	3	
	R-Biopharm	Neogen	Veratox	Sándwich	5
		Rida Screen	Sándwich	5	
		Rida Screen Gliadin competitive	Competitivo	5	
		Rida Quick	Tiras inmunocromatográficas	5	
	Ingenasa	Ingezim gluten	Sándwich	3	
	G12 [55]	Biomedal	Gluten Tox Sándwich	Sándwich	0,6
Gluten Tox Competitivo			Competitivo	3	
Gluten Tox ELISA Sticks			Tiras inmunocromatográficas	3	
Romer Lab		Agra Quant	Sándwich	2	
		Agra-Strip	Tiras inmunocromatográficas	5	
CDC5 [59]	Europroxima	Gluten Tec	Sándwich	2,5	
Propio	Morinaga	Wheat protein ELISA kit	Sándwich	3	

Además de estos anticuerpos que están disponibles comercialmente, se han desarrollado otros contra diferentes epítomos de la gliadina.

Se ha desarrollado un anticuerpo contra un péptido de 19 aminoácidos de la α -gliadina, LGQQQPFPPQQYPQPQPF, denominado PN3, cuyo epítipo de reconocimiento se encuentra en la región QQQFPF [60]. Este anticuerpo reconoce con menor afinidad tanto centeno como cebada dado que en las secuencias de las proteínas de estos cereales sólo se encuentra presente una parte del hexapéptido que es el epítipo de reconocimiento. Empleando el anticuerpo PN3 se han diseñado un ensayo de tipo sándwich, en el que se utiliza un antisuero policlonal como elemento de la captura, y un ensayo ELISA de tipo competitivo con detección espectrofotométrica con un límite de detección de 25 ppm de gluten en muestra [61].

Otro anticuerpo utilizado en el diseño de métodos analíticos es el anticuerpo contra un epítipo estimulante de las células T presente en la α -gliadina cuya secuencia es RPQQPYP [59]. Este epítipo tiene secuencias homólogas en las prolaminas del centeno y la cebada [62]. Se emplea este anticuerpo en un ensayo competitivo en el que la gliadina presente en la muestra compite con un péptido marcado con biotina por el anticuerpo fijado sobre la superficie de una placa ELISA. Se obtiene un límite de detección de 5 ppm de gluten en muestra.

También se ha descrito el diseño de un ensayo electroquímico basado en partículas magnéticas modificadas con gliadina [63] en el que se emplean gliadina y anticuerpo obtenidos de la empresa Sigma-Aldrich. Se valida este ensayo en muestras alimentarias, leche desnatada y cerveza enriquecidas y se obtiene un límite de detección de 4,56 ppm de gluten.

Otro de los anticuerpos generados contra la gliadina completa es una inmunoglobulina de tipo Y, obtenido de la yema de huevo tras la inmunización de gallinas con la gliadina de Sigma completa. Se emplea en un ensayo ELISA de tipo sándwich con detección óptica junto con el anticuerpo HYB-314, anticuerpo comercial desarrollado contra el péptido 58-73 de la α -gliadina comercializado por Fisher. Este ensayo tiene un límite de detección de 1,6 ppm de gluten y se emplea para la detección de gluten en diferentes muestras alimentarias [64].

En la Tabla 1-3 se resumen los anticuerpos más utilizados así como las características más destacables de los métodos que los utilizan.

Tabla 1-3: Métodos de análisis de gluten en alimentos desarrollados desde 1990 y sus características analíticas.

Anticuerpo	Referencia	Formato de ensayo	Tipo de detección	L.D (ppb gliadina)	L.D (ppm gluten)
Skerrit	[43]	Sándwich	Óptica	100	10
R5	[49]	Sándwich	Óptica	1,56	3,2
	[39]	Competitivo	Óptica	0,36	0,72
CDC5	[54]	Sándwich	Electroquímica	3,29	--
	[53]	Sándwich	Electroquímica	5,5	2,75
G12	[55]	Sándwich	Óptica	0,6	1,2
		Competitivo	Óptica	0,44	0,88
PN3	[61]	Competitivo	Óptica	128	25
glia- α 2/9	[59]	Competitivo	Óptica	2,5	5
Antigliadin	[63]	Competitivo	Electroquímica	5,7	4,56
IgY/HYB314	[64]	Sándwich	Óptica	4	1,6

Otro importante grupo de métodos es el formado por los métodos de análisis proteómico en los que se emplean técnicas que permiten la separación de las

diferentes proteínas que componen el gluten, bien cromatografía o electroforesis, seguido de la identificación de cada una de las proteínas separadas. Estas son herramientas indispensables para identificar y caracterizar las diferentes fracciones del gluten y relacionarlas tanto con la calidad del cereal, como con sus posibles implicaciones en la toxicidad para los enfermos celíacos [65].

Se ha descrito el empleo de técnicas electroforéticas para la obtención de perfiles proteicos de las proteínas de harina de trigo. La eficacia y especificidad de la separación dependen de la metodología de extracción aplicada. Para obtener mejor resolución de los perfiles proteicos se emplean protocolos de extracción secuenciales. En primer lugar se realizan extracciones sucesivas de las distintas fracciones proteicas basándose en la diferente solubilidad de las mismas comentada en la sección 1.1. Estos extractos se separan por cromatografía líquida y las fracciones recolectadas se separan mediante SDS-PAGE e identifican mediante espectrometría de masas. Esta identificación se emplea para diferenciar cultivos de trigo [66].

Adicionalmente a la identificación de las diferentes subunidades de gliadina se han realizado también procedimientos de extracción y separación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para la cuantificación de sus porcentajes dentro de las proteínas del cereal. De esta forma se caracteriza la proporción de las diferentes fracciones del gluten dentro de la proteína total del trigo, partiendo de una cantidad grande de proteína se identifican los porcentajes pero no se emplea como técnica de cuantificación [67].

Mediante el acoplamiento de las técnicas de separación a técnicas de espectrometría de masas se logra la cuantificación de las proteínas del gluten, con este objetivo se utilizan técnicas de ionización suave que no producen excesiva fragmentación de las proteínas, desorción láser asistida por matriz (MALDI) o ionización por electrospray (ESI) [68].

Para la cuantificación de fragmentos peptídicos, tras una hidrólisis enzimática de las proteínas que simula la digestión humana, se realiza una separación de los péptidos obtenidos por cromatografía líquida y una posterior determinación de los mismos mediante un analizador espectrómetro de masas triple cuadrupolo masas-masas. Se detectan seis péptidos de diferente longitud, ya identificadas previamente como resistentes a la hidrólisis a concentraciones entre 0,01 y 100 ppm. Sin embargo, este método no se aplica a muestras reales ni se obtiene una equivalencia entre este límite de detección y la cantidad de gluten en muestra [69].

Se ha desarrollado un procedimiento de análisis que emplea la ionización MALDI acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF) que permite la cuantificación de gliadinas en muestras alimentarias [70]. Esta metodología cuantifica gluten en muestra en un intervalo de calibración de 4 a 100 ppm. El procedimiento requiere de una preparación de muestra que implica la extracción, con etanol 60 %, de las prolaminas y mezcla del extracto con la matriz que asiste la desorción [71]. La proporción de mezcla del extracto etanólico de muestra con la matriz es un factor crucial que incrementa la detectabilidad de gluten en la muestra a niveles de entre 1 y 10 ppm.

Pese al potencial para caracterizar las proteínas y la información que aportan, este grupo de métodos no son considerados como métodos adecuados para análisis de rutina. Estas metodologías aportan mucha información para la caracterización de las distintas fracciones de las proteínas. Es por ello que son más útiles para afrontar el problema de la detección desde el reto que plantea la identidad del analito y no desde el frente de la cuantificación de la proteína en la muestra.

1.3.2 Métodos indirectos

Un grupo de métodos complementarios son los que se basan en la detección de secuencias de ADN específicas de los cereales que contienen gluten. La detección de estas secuencias en alimentos es indicativo de la presencia del cereal aunque no de la proteína alergénica, de ahí que se denominen métodos indirectos.

La detección de ADN se realiza mediante métodos basados en la reacción en cadena de la polimera (PCR), que permite la multiplicación de pequeñas cantidades de ADN con gran sensibilidad y especificidad. En la PCR se emplea una enzima polimerasa que replica ADN a partir de unos oligonucleótidos, cebadores, complementarios a los extremos de la secuencia a amplificar, amplicón, y los cuatro desoxiribonucleótidos trifosfato. La enzima polimerasa añade nucleótidos al cebador empleando la hebra a replicar como molde.

Se propone una PCR para amplificar una secuencia presente en trigo, centeno y cebada para identificar la presencia de cereales alergénicos en la muestra como comprobación tras los análisis de tipo ELISA [72]. Sin embargo, no se establece

la correlación entre el contenido de ADN y de proteína por lo que este método no permite informar sobre la cantidad de proteína alergénica en la muestra. El mismo diseño de PCR se emplea para analizar diversos productos de panadería en un ensayo interlaboratorio, con el que se demuestra que es posible detectar un 0,1 % de harina de trigo en harina de soja. Con este diseño de PCR se pudo identificar la presencia de cereales alergénicos, pero no se diferencia entre ellos [73].

Con fines cuantitativos es posible realizar un seguimiento en continuo del proceso de replicación del ADN mediante medidas de fluorescencia en la denominada PCR en tiempo real o cuantitativa (q-PCR). Para ello se emplean moléculas que emiten fluorescencia solo cuando se encuentran intercaladas entre dos hebras hibridadas de ADN, por lo que cuanto más ADN se haya replicado mayor será la fluorescencia medida. Otra forma de seguimiento del transcurso de la amplificación de ADN por PCR es el empleo de sondas específicas de hibridación (Figura 1-2). Estas sondas tienen en un extremo un fluoróforo, amarillo en la figura y en el otro extremo un sistema de desactivación de la fluorescencia, azul en la figura. Inicialmente (1) la sonda específica se hibrida con la hebra diana a replicar y durante la replicación (2), la polimerasa desaloja esta sonda para poder seguir copiando la hebra molde (3). La sonda específica libre en disolución emite fluorescencia, por lo que ésta crece a medida que avanza la amplificación.

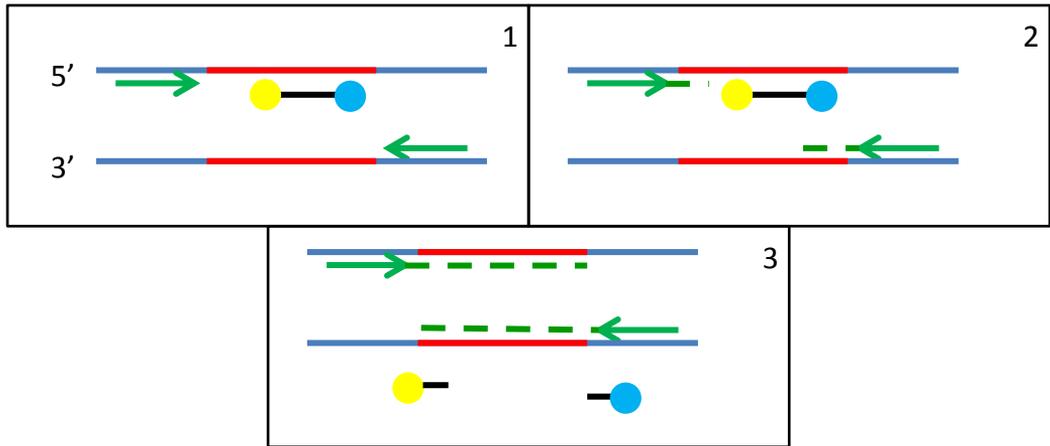


Figura 1-2: Esquema del funcionamiento de la q-PCR empleando sondas específicas de hibridación.

La q-PCR se ha empleado para determinar la contaminación de muestras de avena por otros cereales. En este caso la estrategia se basó en el diseño de cebadores específicos de cada prolamina. Utilizando esta técnica se diseñaron métodos de amplificación específicos para las prolaminas de trigo, cebada, centeno y avena. Se cuantifica la cantidad de ADN procedente de cereales alergénicos presente en la muestra inicial, identificándose la procedencia del cereal contaminante, comparando los resultados con los obtenidos mediante un inmunoensayo de detección de proteínas. Este diseño de PCR permite identificar la presencia de trigo, centeno o cebada en una muestra, a priori, de avena [74].

Recientemente se ha propuesto el uso de ensayos de hibridación como alternativa a los costosos análisis basados en qT-PCR. Se ha descrito un método de detección indirecto que cuantifica la cantidad de ADN que codifica el péptido 33-mer inmunotóxico para los enfermos celíacos [75]. El genosensor propuesto permite la detección de ADN genómico de trigo tras una etapa de PCR

convencional. Sin necesidad de purificación tras la extracción del ADN de la harina ni del amplicón tras el proceso de PCR para su cuantificación. Sin embargo, manifiesta una pequeña reactividad cruzada con la cebada y el centeno. Esta limitación ha sido superada empleando sondas de ADN de captura estructuradas (con forma de horquilla). Estas sondas aportan una mayor selectividad, ya que sólo se hibridan con una secuencia diana perfectamente complementaria [76].

Los métodos indirectos de detección de gluten en alimentos, exigen el establecimiento de una correlación entre el contenido en ADN y de proteína en la muestra. Esta correlación depende de la expresión de los genes que codifican las proteínas alergénicas y esta varía en cada especie de cereal así como con las condiciones de crecimiento de la planta, de almacenamiento del grano o del tipo de procesamiento. Ninguno de los métodos indirectos desarrollados hasta el momento permite establecer la cantidad de las proteínas inmunotóxicas en la muestra, con lo que no son adecuados para verificar el cumplimiento de la normativa vigente sobre etiquetado de productos sin gluten. Se considera generalmente que estos métodos basados en PCR o sensores de hibridación son más apropiados para identificar las especies de cereales presentes en la muestra [77].

2 Objetivos

El etiquetado de alérgenos en alimentos es un problema crucial que depende de la disponibilidad de técnicas analíticas que permitan la cuantificación de los mismos. Las proteínas que conforman el gluten son uno de los alérgenos prioritarios ya que pueden provocar diferentes reacciones adversas en un sector considerable de la población. Estas reacciones adversas, como la enfermedad celiaca y las diferentes alergias e intolerancias al gluten en general tienen como denominador común que su único tratamiento es el seguimiento de una dieta libre del alérgeno durante toda la vida del paciente. Por esta razón la normativa vigente en la Comunidad Europea exige el etiquetado de todos aquellos alimentos que contengan gluten. Para que un alimento sea considerado libre de gluten debe contener menos de 20 ppm de estas proteínas. Debido a la hipersensibilidad que presentan determinadas personas, este límite es en ocasiones insuficiente. Sin embargo, no es posible la rebaja de los límites legalmente establecidos sin disponer de una técnica de cuantificación de gluten en alimentos precisa y lo suficientemente sensible. A pesar de todos los avances que se han producido hasta el momento, el desarrollo de métodos de cuantificación de gluten tropieza aún con dificultades importantes derivadas de la identidad del alérgeno y de la falta de receptores de suficiente afinidad y selectividad que aporten al método analítico las características deseadas. El empleo de aptámeros como elementos de reconocimiento para el desarrollo de métodos analíticos de control de la seguridad alimentaria es un campo en expansión. Pese a que los aptámeros han sido ampliamente utilizados por su capacidad de enlace a proteínas, su uso en la detección de proteínas alergénicas en alimentos es escaso. Al comienzo de la presente tesis no se había desarrollado ningún aptámero que reconociese ninguna proteína del gluten.

El objetivo general de la tesis es la obtención de un aptámero capaz de reconocer las diferentes proteínas responsables de las reacciones adversas del gluten y su uso para el desarrollo de métodos analíticos de detección de gluten en alimentos. Para ello se han propuesto una serie de objetivos concretos que son:

1. Seleccionar mediante un proceso SELEX un aptámero que reconozca a las proteínas del gluten, empleando como diana de reconocimiento el péptido inmunodominante 33-mer perteneciente a la α 2-gliadina. Partiendo de una biblioteca aleatoria de secuencias de ADN se seleccionarán aquellas que se enlacen al péptido diana seleccionado, uno de los principales responsables de la toxicidad del gluten en los enfermos celíacos.
2. Comprobar que los aptámeros seleccionados reconocen el péptido en la proteína completa y en las proteínas alergénicas que componen el gluten procedentes de otros cereales.
3. Caracterizar la reacción de reconocimiento aptámero-péptido y aptámero-proteína para seleccionar el aptámero con mejores características de enlace tanto en disolución como con una de las especies que interaccionan fijada en una superficie y evaluar el efecto de la presencia de marcas en el aptámero y en la molécula diana (péptido).
4. Desarrollar un método de detección de gluten en alimentos con detección electroquímica empleando los aptámeros seleccionados.

5. Validar el método desarrollado, empleándolo para cuantificar niveles de gluten en muestras con contenido certificado o que han sido analizadas por laboratorios externos.

Labeling of allergens in food is a crucial problem that depends on the availability of analytical techniques for quantitation. The proteins composing gluten are one of the priority allergens because of their adverse reactions in a substantial sector of the population. These adverse reactions, like coeliac disease and different allergies and intolerances to gluten in general, have in common that their only treatment is the following of a strict lifelong gluten free diet. For this reason, European Union legislation in force requires the labeling of all gluten containing food products. For being considered as “gluten free”, a food product must contain less than 20 ppm of gluten proteins. Since there are hypersensitized individuals, this limit is insufficient in some cases. Unfortunately, it is not possible to reduce the legal established limits without having a sufficiently precise and sensitive quantitation method. Despite recent advances, the development of methods for gluten quantitation still encounter with important difficulties derived from the allergen identity, and the lack of receptors with enough affinity and selectivity that provides the desired characteristics to the analytical methods.

The use of aptamers as recognition elements to develop analytical methods for food safety control is a growing field. Although aptamers have been widely used for their ability to bind proteins, their use for the detection of allergenic proteins in food is scarce. At the beginning of the present thesis no aptamers recognizing gluten proteins had been developed.

The general objective of the thesis is obtaining an aptamer capable of recognizing the different proteins responsible for the adverse reactions of

gluten and their use for the development of analytical detection methods of gluten in food. For this purpose, a number of specific objectives are proposed:

1. Selecting through a SELEX process an aptamer that recognizes the proteins of gluten, using as recognition target the immunodominant peptide 33-mer belonging to the $\alpha 2$ gliadin. Starting from a random library of DNA sequences the ones that bind the target, one of the main peptides triggering the toxicity of gluten in coeliac patients, will be selected.
2. Verifying that the selected aptamers recognize the peptide in the wheat whole protein and in other gluten composing proteins from related toxic cereals.
3. Characterizing the binding reaction aptamer-peptide and aptamer-protein for selecting the best binding aptamer, in solution and when one of the interacting species is attached to a surface and evaluate the effect of the presence of labels in the aptamer and in the target molecule (peptide).
4. Developing a method for the determination of gluten in foods based on the selected aptamers and electrochemical detection.
5. Validating the developed method, applying it to quantify gluten in samples with certified content or analyzed by external laboratories.

3 Selección de aptámeros como receptores sintéticos de gluten

3.1 Introducción

Tradicionalmente, se han empleado secuencias nucleotídicas como elemento de reconocimiento de otras secuencias, usando como reacción de reconocimiento la hibridación por complementariedad de las bases. Sin embargo, las secuencias de ácidos nucleicos son capaces de reconocer una gran variedad de moléculas entre ellas a las proteínas, actuando por tanto como elementos de reconocimiento que emplean un enlace de afinidad distinto de la hibridación. A estos ácidos nucleicos se les denomina aptámeros, y son secuencias cortas de ARN o de ADN de cadena sencilla que, en presencia del ligando, pueden adoptar alguna estructura tridimensional que permite el enlace de afinidad con su diana. Este enlace de afinidad se puede producir como resultado de una o varias interacciones débiles no covalentes, tales como interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, apilamiento de anillos aromáticos o interacciones de van der Waals.

Como moléculas sintéticas, la obtención de los aptámeros se realiza mediante un procedimiento *in vitro*, que simula la selección natural, conocido como SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment), descrito por primera vez en 1990 [78, 79]. En este proceso, partiendo de una biblioteca aleatoria de secuencias de ácido nucleico diferentes que se hacen interaccionar con la diana y mediante iteraciones de un ciclo de selección y amplificación, se pueden obtener secuencias de ácidos nucleicos que enlacen específicamente la diana escogida con gran afinidad.

Se pueden llevar a cabo procesos SELEX de selección de aptámeros de ADN o de aptámeros de ARN. La biblioteca inicial de secuencias, generalmente, posee una

zona variable central, de entre 20 y 80 nucleótidos, y unas zonas constantes en los extremos de entre 18 y 21 nucleótidos, para hacer posible la amplificación. Para la selección de aptámeros de ADN se llevan a cabo varios ciclos repetidos, en cada uno de los cuales se incluyen las etapas esquematizadas en la Figura 3-1. Estas etapas básicas son: incubación de la biblioteca de ácidos nucleicos con la diana (1); separación de las secuencias no enlazadas (2); elución de las secuencias enlazadas (3); amplificación de las secuencias enlazadas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (4). Tras esta etapa se obtienen hebras dobles de ADN, por lo que es necesario un acondicionamiento (5) previo al siguiente ciclo para obtener de nuevo una colección de hebras sencillas con la que iniciar una nueva etapa de interacción y, con ella, un nuevo ciclo en condiciones idénticas o más restrictivas para favorecer el enlace y, por tanto, la selección de las secuencias más afines. Se han propuesto varias estrategias para el acondicionamiento: llevar a cabo una amplificación PCR asimétrica de forma que se copie preferentemente una hebra frente a la otra [80], digestión enzimática de una de las hebras que tiene su extremo 5' fosforilado con una exonucleasa [81] y, más habitualmente, realizar la PCR con un cebador biotinilado que permita atrapar el amplicón sobre superficies modificadas con estreptavidina como partículas magnéticas y posterior separación de una de las hebras por desnaturalización del dúplex de ADN en medio alcalino [82].

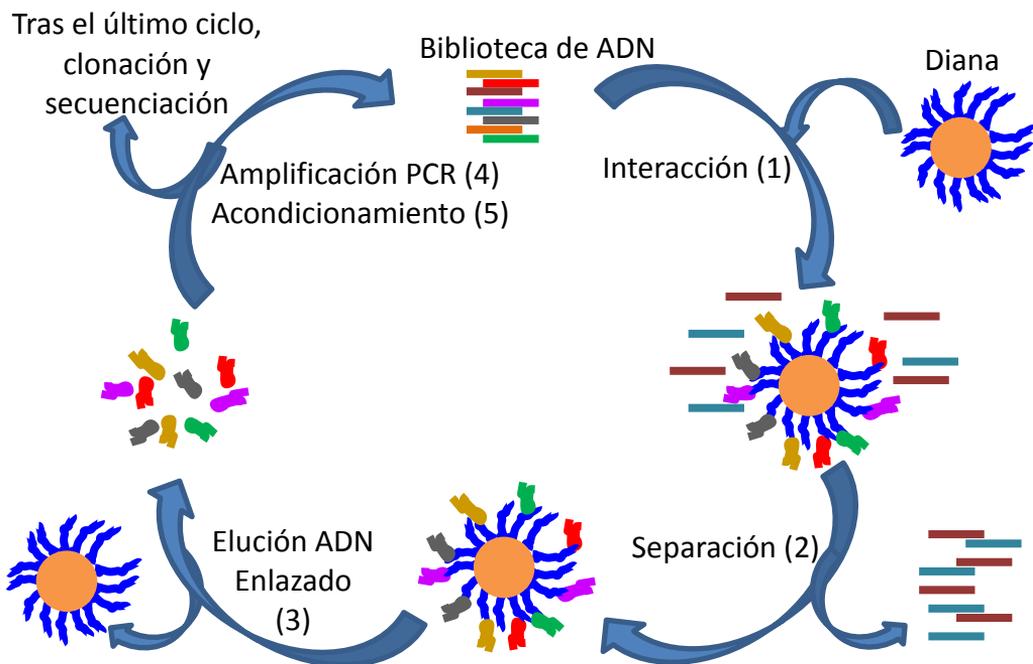


Figura 3-1: Esquema del proceso SELEX

El proceso SELEX proporciona secuencias con funciones típicas del ADN. Sin embargo se ha planteado la posibilidad de seleccionar ácidos nucleicos con actividades que no se encuentran en los oligonucleótidos naturales. Para ello es necesario introducir en el proceso nucleótidos modificados con grupos funcionales que los doten de mayor afinidad hacia dianas, especialmente aquellas consideradas más difíciles [83], o de actividad catalítica específica [84].

Aunque existen una gran variedad de nucleótidos modificados [85], aún hoy es un tema activo de investigación como refleja la reciente propuesta que mejora en más de 100 veces la afinidad del aptámero contra el factor de crecimiento endotelial vascular y el interferón [86]. También se han utilizado bases

modificadas para mejorar la resistencia a la degradación por nucleasas [87]. Todas estas modificaciones deben ser reconocidas por las ADN polimerasas para poder ser utilizadas en el proceso SELEX. En el caso de que no sean reconocidas, se pueden usar en procesos de modificación de aptámeros post-SELEX, lo que obligaría a volver a ensayar su afinidad contra la diana para asegurar que la modificación no afecta negativamente a la misma.

Las diferentes etapas del proceso SELEX se pueden afrontar empleando distintas estrategias, lo que proporciona una elevada versatilidad pero impide la aplicación de protocolos generales. Del mismo modo, se pueden aplicar modificaciones a estas etapas o incluir etapas adicionales que supongan una mejora en el proceso.

En los primeros procedimientos SELEX la separación se llevó a cabo mediante membranas de nitrocelulosa, lo que evita la necesidad de inmovilización de la diana a un soporte sólido. La mayoría de estas selecciones se realizaron con colecciones de ARN aunque es posible llevarla a cabo con ADN [88]. Sin embargo este método tiene limitaciones para moléculas pequeñas y péptidos que pueden llegar a atravesar la membrana y normalmente requieren un elevado número de ciclos de selección.

Se han propuesto métodos alternativos de separación en disolución como la citometría de flujo [89, 90] y especialmente la electroforesis capilar (CE). Esta técnica presenta una serie de características que la hacen muy atractiva para realizar el procedimiento SELEX completo: rapidez, resolución, dilución mínima de la muestra y pequeño volumen de muestra. De hecho, actualmente se

conoce como CE-SELEX a la variante del proceso SELEX que la utiliza. Tiene la importante ventaja de requerir muy pocos ciclos de selección, típicamente menos de 5 ciclos [91]. El primer CE-SELEX permitió obtener un aptámero contra IgE en únicamente 2 ciclos [92] y posteriormente en único ciclo [93]. Sin embargo, presenta el inconveniente de que la cantidad de secuencias a ensayar es mucho menor que en el SELEX convencional debido a la limitación de volumen de la técnica que implica que las probabilidades de encontrar al mejor aptámero (con mayor afinidad) son menores.

Recientemente se ha propuesto aprovechar la capacidad del grafeno oxidado (GO) para separar hebra doble de ADN (dsADN) de hebra simple de ADN (ssADN). El GO adsorbe fuertemente al ssADN mientras que el dsADN no se adsorbe. Por tanto, una vez que el ssADN se ha unido al GO solo se puede desorber por hibridación o por enlace a aptámeros. En este tipo de SELEX, tras la etapa de interacción ADN-diana, únicamente las hebras no enlazadas se pueden unir al GO, por lo que el GO con estas hebras se puede separar por centrifugación quedando en disolución el complejo [94].

Muchos procedimientos SELEX inmovilizan la diana sobre un soporte sólido para facilitar la etapa de separación. Para ello se han propuesto columnas de afinidad muy usadas para moléculas diana pequeñas como los antibióticos aminoglicósidos [95, 96]. Su mayor inconveniente es la gran cantidad de diana necesaria para rellenar la columna. Una alternativa para la inmovilización de la diana es su fijación en la superficie de sensores de espectrometría de resonancia de plasmón superficial (SPR) [81, 97]. Empleando esta estrategia además de disponer de un soporte sobre el que se fija la diana se puede

caracterizar el enlace aptámero-diana mientras se lleva a cabo el SELEX. Otro soporte frecuentemente empleado para la inmovilización de la diana son las partículas magnéticas funcionalizadas, debido a la facilidad de manejo y separación en comparación con filtración y centrifugación. Estas partículas pueden estar recubiertas con estreptavidina, para la unión a la diana biotinilada [82, 98] o Ni^{2+} -NTA [99, 100] que permite el enlace de péptidos o proteínas que contienen una cola de histidinas. La combinación del uso de partículas magnéticas con una biblioteca de ácidos nucleicos biotinilados constituye el denominado Flu-Mag SELEX, una de las variantes de más éxito [82].

Habitualmente se incluyen en el proceso SELEX etapas de selección negativa [101], que eliminan las secuencias que pueden ser adsorbidas por la matriz sobre la que se inmoviliza la diana. Con este fin se lleva a cabo un ciclo de SELEX empleando solamente la matriz, sin diana y conservando e introduciendo en el ciclo siguiente la fracción de la biblioteca no enlazada a la misma. De igual modo se pueden incluir etapas de contra-selección, que permiten eliminar secuencias que presentan afinidad por secuencias parecidas a la diana [102]. Para ello se lleva a cabo un ciclo de SELEX empleando el análogo a la diana que se quiere descartar como si fuese la diana y conservando e introduciendo en el siguiente ciclo la fracción no enlazada.

Cuando el fin del proceso SELEX es obtener un aptámero de ARN, para llevar a cabo la etapa de amplificación por PCR y tras la misma son necesarias etapas de transcripción. Previamente a la PCR es necesaria una etapa de transcripción inversa para obtener ADN amplificable por PCR. Por lo tanto, es necesario que uno de los cebadores empleados cuente con una secuencia promotora de la T7

ARN polimerasa en su extremo 5'. Las hebras de ADN amplificadas han de ser de nuevo transcritas a ARN por la T7 ARN polimerasa como etapa de acondicionamiento previo al comienzo del siguiente ciclo de SELEX.

Durante el proceso SELEX es necesaria la monitorización del enriquecimiento de la biblioteca inicial en secuencias afines a la diana para confirmar el buen curso del mismo. Para ello se realizan ensayos de enriquecimiento con una alícuota de las fracciones enlazadas eluidas en cada ronda de selección. En estos ensayos se cuantifica el porcentaje de secuencias que se enlazan y el porcentaje de las mismas que no se enlazan en cada ronda. Si el proceso se lleva a cabo con éxito, la fracción enlazada se incrementará en cada ronda mientras que la fracción no enlazada disminuirá. Tras una serie de rondas de selección este incremento dejará de ser apreciable y se puede dar por concluido el proceso.

Tras el proceso SELEX se dispone de una serie de secuencias oligonucleotídicas que es necesario identificar. Para ello, el panel de aptámeros que se obtiene tras la última ronda de selección se clona en un vector bacteriano y las colonias individuales se secuencian y se analizan las secuencias identificadas de los aptámeros con el fin de identificar homologías entre ellos. Alineando las secuencias, los aptámeros con más alto grado de homología se pueden agrupar en familias. En ocasiones es posible la identificación de secuencias altamente conservadas entre las diferentes familias. La existencia de zonas conservadas en todos los clones se suele asociar a zonas involucradas en la unión a la diana. Además, estas zonas suelen situarse en regiones con similar estructura secundaria. Es posible establecer las estructuras que adoptan las secuencias de ADN mediante algoritmos accesibles gratuitamente en internet [103]. Esta

herramienta informática proporciona información acerca de zonas de autohibridación que se pueden formar a una temperatura y en unas condiciones salinas determinadas. Es común que las regiones conservadas identificadas en los aptámeros se encuentran en las estructuras secundarias que se forman en la secuencia de ADN [104].

Debido al número de etapas y a la iteración de las mismas que requiere el proceso SELEX se ha propuesto la automatización del mismo [105]. Los sistemas automáticos se diseñan de forma que sean versátiles, incluyendo la posibilidad de emplear diferentes condiciones de selección. Estos sistemas incorporan la capacidad de manejar varios procesos SELEX simultáneos contra diferentes dianas, de forma que el tiempo empleado en la obtención de aptámeros se reduzca notablemente, de meses a días.

Existen aptámeros desarrollados contra una gran diversidad de dianas [106]. Esto es comprensible teniendo en cuenta que, teóricamente es posible desarrollar el proceso SELEX empleando como diana cualquier molécula. Sin embargo, la capacidad de una molécula para generar un aptámero es impredecible [107]. Pese a eso, se sabe que es más favorable la obtención de aptámeros mediante proceso SELEX si la molécula diana posee cargas positivas en las condiciones de selección, anillos aromáticos planos y grupos que puedan dar lugar a enlace de hidrógeno. Del mismo modo, se ha comprobado que existen dificultades para seleccionar secuencias afines selectivamente a dianas muy apolares o hidrofóbicas.

No obstante, el ADN es capaz de plegarse dando lugar a sitios de unión hidrofóbicos, lo que indica que se pueden formar interacciones hidrofóbicas favorables [108]. Un ejemplo es el aptámero de la cocaína, cuya estructura en forma de unión en T deja una cavidad central donde la cocaína se introduce [109]. Aunque la aparición de sitios de unión de naturaleza hidrófoba es poco frecuente, es posible obtenerlos [110, 111]. También se han obtenido aptámeros que presentan afinidad por regiones apolares de varias moléculas [112, 113]

El empleo de aptámeros como elementos de reconocimiento y el desarrollo de ensayos y sensores que los empleen presenta una serie de ventajas: pueden ser seleccionados contra, teóricamente, cualquier molécula incluidas moléculas tóxicas o no inmunogénicas; su selección no implica el uso de animales; se pueden seleccionar y aplicar en condiciones no fisiológicas, se obtienen químicamente de forma muy reproducible, minimizando las variaciones entre lotes de reactivo, son baratos y su desnaturalización es reversible.

En su mayoría, los métodos descritos para el análisis de proteínas en alimentos empleando receptores de afinidad se basan en anticuerpos. Recientemente se han desarrollado algunos aptámeros para la detección de proteínas alergénicas. Uno de ellos ha sido seleccionado contra las proteínas del altramuza [114], alérgeno que ha sido recientemente incorporado a la legislación Europea como tal. Se empleó para la selección la proteína β -conglutina como diana y el aptámero obtenido se utiliza en el diseño de un ensayo de tipo ELISA que permite la detección de la proteína a concentraciones superiores a 153 nM en

medio acuoso. Sin embargo, no se comprueba el comportamiento del método en matrices alimentarias.

Se ha obtenido también un aptámero contra la proteína Ara H1 del cacahuete [115]. Se aplica el aptámero seleccionado como elemento de captura en un ensayo de tipo sándwich, fijando el aptámero en una fibra óptica recubierta de oro para medidas de SPR. El formato sándwich se completa con la adición de un anticuerpo específico de la proteína a detectar como elemento de reconocimiento secundario. No obstante, pese al diseño de tipo sándwich la señal medida por SPR es demasiado baja y para incrementarla se emplean nanopartículas de oro modificadas con proteína A que se unen al anticuerpo. Se comprueba el comportamiento del ensayo frente a muestras de alimentos empleando una barra de golosina fortificada con el alérgeno. La muestra ha de ser diluida cinco veces para disminuir la viscosidad y así minimizar los efectos negativos que tiene la matriz de la muestra sobre la sensibilidad. El sándwich mixto tiene menor sensibilidad, con un límite de detección de 75 nM, que un sándwich empleando únicamente anticuerpos desarrollado previamente que presenta un límite de detección de 1,4 nM [116].

También se ha descrito la obtención de aptámeros que reconocen uno de los alérgenos del huevo, la lisozima. Uno de estos aptámeros fue seleccionado empleando SELEX automático [105] y se empleó con éxito en el desarrollo de metodología analítica para la detección de lisozima [117]. Sin embargo, investigaciones posteriores revelaron que la interacción ADN-lisozima está regida por interacciones electrostáticas en lugar de por interacciones

específicas [118]. Recientemente se ha desarrollado otro aptámero que reconoce con elevada afinidad a la lisozima [119].

3.2 Proceso de selección

Como se ha comentado en la sección anterior, el proceso SELEX consiste en la sucesión de varias etapas que pueden realizarse mediante estrategias muy diversas. Para llevar a cabo la selección de aptámeros contra el péptido inmunotóxico dominante 33-mer [23], se decidió inmovilizar la molécula diana sobre partículas magnéticas dada la facilidad de manejo que proporcionan, lo que facilita enormemente las numerosas etapas de separación del procedimiento.

La molécula diana, el péptido 33-mer, se puede obtener mediante síntesis química en fase sólida o mediante la técnica del ADN recombinante, es decir, expresando la proteína en un organismo diferente al de origen (trigo). Se eligió esta última opción por su menor coste y porque permite el marcaje del péptido con una cola de 6 histidinas, una etiqueta muy habitual en la obtención de péptidos y proteínas, ya que permite su purificación mediante cromatografía de afinidad.

El proceso fue realizado usando un péptido recombinante que contenía el péptido inmunodominante y resistente a proteólisis 33-mer con una marca de polihistidina (His₆-Tag) enlazada en su extremo C-terminal y un espaciador de 57 aminoácidos entre ellos.

El empleo de la marca de poli-histidina está ampliamente extendido para procedimientos de separación de proteínas o péptidos. Se aprovecha el enlace de coordinación entre el complejo níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) y el sexteto de histidinas que marca al péptido recombinante para llevar a cabo la inmovilización de la diana sobre las partículas magnéticas.

Para expresar el péptido en bacterias *E. coli*, es necesario conocer la secuencia nucleotídica que lo codifica, amplificar dicha secuencia por PCR e insertarla en el vector para posteriormente introducirlo en la bacteria. La secuencia de la α 2-gliadina está descrita en el GenBank con el número de acceso AJ 133612.1 (Figura 3-2).

```
1 atggttagag ttccagtgcc acaattgcag ccacaaaatc catctcagca acaaccacaa gagcaagttc cattgtaca
81 acaacaacaa tttccagggc agcaacaacc atttccacca caacagccat atccgcagcc gcaaccattt ccatcacaac
161 aaccatattct gcagctgcaa ccatttccgc agccgcaact accatatccg cagccgcaac taccatatcc gcagccgcaa
241 ctaccatattc cgagccgca accatttcga ccacaacaac catatccaca atcgcaacca cagtatttcgc aaccacaaca
321 accaatttcg cagcagcagc agcagcagca acaacaacaa caacaaaaac aacaacaaca acaacaacaa
cagatccttc
401 aacaaattht gcaacaacaa ctaattccat gcagggatgt tgtattgcaa caacacagca tagcgtatgg aagctcacia
481 gttttgcaac aaagtactta ccagctgggtg caacaattgt gttgtcagca gctgtggcag atccccgagc agtcgcggtg
561 ccaagccatc cacaatgttg ttcatgctat tattctgcat caacagcaac aacaacaaca acaacaacaa caacaaccgt
641 tgagccaggt ctcttcca cagcctcaac aacaatatcc atcaggccag ggctccttcc agccatctca gcaaaaccca
721 caggcccagg gctctgtcca gcctcaacaa ctgccccagt ttgaggaaat aaggaaccta gcgctagaga cgctacctgt
801 aatgtgcaat gtctatatcc ctccatattg caccattgct ccagttggca tcttcggtac taactatcga tga
```

Figura 3-2: Secuencia que codifica la α -gliadina, resaltada la secuencia que codifica al péptido 33-mer.

La región comprendida entre la posición 168 y 267 (resaltada en amarillo) es la que codifica el péptido 33-mer. Esta secuencia de 99 nucleótidos fue amplificada por PCR usando los cebadores ExpF y ExpR (Tabla 3-1). En el vial de PCR se colocan 1 μ M de cada uno de los cebadores, 2 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs en 1 \times del tampón de PCR en presencia de 2,5 U de Taq Polimerasa y 4 μ g de la sonda a amplificar.

Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: tras 10 minutos a 95°C para activar la enzima, se llevaron a cabo 35 ciclos de 60 segundos a 95°C, 60 segundos a 60°C y 60 segundos a 72°C seguidos de una elongación final a esta temperatura. Los amplicones fueron clonados y expresados utilizando el sistema pETBlue-2 de Novagen, que consiste en la conversión de los extremos del amplicón en romos y su fosforilación para permitir su inserción en el vector (plásmido). Se comprobó mediante secuenciación que el ADN recombinante insertado tiene la secuencia en pauta. La construcción obtenida se introduce en las células competentes generando colonias recombinantes fácilmente observables a simple vista.

Tabla 3-1 Secuencias empleadas en el proceso SELEX

Descripción (Abreviatura)	Secuencia
Secuencia que codifica al péptido 33-mer	CT GCA GCT GCA ACC ATT TCC GCA GCC GCA ACT ACC ATA TCC GCA GCC GCA ACT ACC ATA TCC GCA GCC GCA ACT ACC ATA TCC GCA GCC GCA ACC ATT T
Cebador directo para la expresión de R-33-mer (ExpF)	GCT GCA GCT GCA ACC ATT TC
Cebador inverso para la expresión de R-33-mer (ExpR)	ATA AAT GGT TGC GGC TGC GGA T
Péptido recombinante 33-mer (R-33-mer)	LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQP QPFISRELVDPNVQARLQDVDGTIDTRSKL AAAQLYTRASQPELAPEDPEDLEHHHHHH
Péptido control	ISRELVDPNVQARLQDVDGTIDTRSKLAAA QLYTRASQPELAPEDPEDLEHHHHHH
Biblioteca inicial de ADN monocatenario	AGG GTT GAT AGG TTA AGA GC-40N- CGA TGT CAA CTA GCT GTT GG
Cebador inverso biotinilado (SelR-Biot)	biotina-(CH ₂) ₆ -CCA ACA GCT AGT TGA CAT CG
Cebador directo marcado 6-FAM (Self-6-FAM)	6-FAM-AGG GTT GAT AGG TTA AGA GC
Cebador inverso (Self) Cebador directo (Self)	CCA ACA GCT AGT TGA CAT CG AGG GTT GAT AGG TTA AGA GC

Tras cultivar las bacterias, se recogieron aquellas que habían crecido y se lisaron. El lisado se purificó por cromatografía de afinidad usando una columna HisTrap FF de 1 mL. Esta contiene un relleno de sefarosa modificada con un compuesto quelante, ácido nitrilotriacético (NTA) al cual se ha unido iones Ni²⁺. La cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC por sus siglas en inglés, immobilized-metal affinity chromatography) es una técnica de

purificación de proteínas por la capacidad de estos de formar complejos de coordinación con iones metálicos. Los iones están retenidos en una matriz mediante compuestos quelantes como el NTA que tienen múltiples puntos de interacción con el metal. Estos iones metálicos como Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , etc deben tener sitios de coordinación libres o intercambiables para poder coordinarse con las proteínas, en este caso a través de su unión a dos histidinas. De esta forma la proteína o péptido queda enlazada a la columna. La elución se puede realizar mediante reducción del pH, incrementando la fuerza iónica, mediante la adición de agentes competidores como el imidazol o AEDT, o por combinación de estas tres estrategias [120]. En nuestro caso, la fracción enlazada se eluyó en un gradiente de imidazol (desde 40 a 250 mM) recogiendo 25 fracciones de 2 mL. El imidazol es un análogo de la histidina con mayor afinidad por el Ni^{2+} y que lo desplaza de su sitio de coordinación. Las fracciones se analizaron mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE al 15%) (Figura 3-3), obteniéndose el péptido purificado en las fracciones 4 a 6. En estas fracciones 4-6 se observa un péptido de unos 10 KDa de tamaño que coincide con el tamaño esperado para el péptido recombinante. Debe considerarse que el vector empleado introduce un espaciador de 51 aminoácidos además de la cola de histidinas en el extremo C terminal, por lo que el péptido recombinante contiene 91 aminoácidos (Tabla 3-1). La última columna corresponde al lisado celular antes de la purificación.

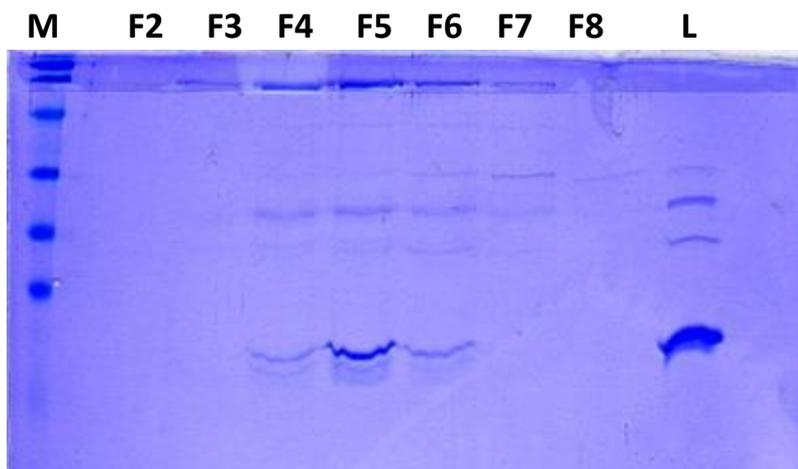


Figura 3-3: SDS-PAGE de las fracciones 2 a 8 eluidas de la columna HisTrap FF (F2-F8), del lisado completo (L) y marcadores de tamaño (M)

La presencia del espaciador y la cola de histidinas puede provocar la obtención de aptámeros con afinidad por estas regiones en vez de por el 33-mer, por lo que se expresó también un péptido de 58 aminoácidos, es decir, sin 33-mer, para llevar a cabo etapas de selección negativa, que se denomina péptido control (Tabla 3-1). La separación del péptido control de las demás proteínas bacterianas se llevó a cabo de forma totalmente análoga a la separación del péptido 33-mer recombinante.

Las fracciones que contenían mayor cantidad de ambos péptidos se concentraron por diacentrifugación y su concentración se midió por absorbancia a 280 nm resultando ser de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para el R-33-mer y 0,75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para el péptido control. La pureza final se comprobó de nuevo mediante Western Blot. Esta técnica consiste en una separación previa mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE) de las proteínas de la muestra debido fundamentalmente a su tamaño, ya que todas las proteínas están

desnaturalizadas por acción del mercaptoetanol que reduce los puentes disulfuro que mantienen la conformación tridimensional de la proteína y recubiertas del polianión dodecilsulfato sódico (SDS), que unifica su carga neta. Los péptidos purificados en la columna HisTrap se cargaron en el gel de poliacrilamida con un 15 % de SDS y tras la separación electroforética, se visualizaron por tinción con azul de Coomassie. Una vez separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por migración en el campo eléctrico aplicado (400 mA durante 1 h). Posteriormente la membrana se bloqueó para su conservación con 3 % de BSA y azida de sodio a 4°C durante 1 h y se hizo reaccionar con un anticuerpo contra la cola de histidinas (antiHis₆-tag) en tampón de tris 50 mM y NaCl 150 mM (TBS) con 1 % de BSA y azida de sodio a temperatura ambiente bajo agitación durante 1 h. Tras dos lavados con TBS con 0,05 % de Tween-20, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina en TBS con 1 % de BSA y azida de sodio a temperatura ambiente con agitación suave durante 1 h. Finalmente, tras tres etapas de lavado con TBS con 0,05 % de Tween-20 se adicionó el sustrato de la enzima nitro cloruro de nitroazultetrazoilo para revelar la membrana.

En la Figura 3-4 A se muestra la electroforesis en gel. En la línea en la que se añadió el péptido control (L2) se observan varias bandas aunque la de menor tamaño es la más intensa, lo que indica que no está completamente puro. En L3, donde se introdujo el péptido recombinante diana, sólo se observa una banda a tamaños mayores que los observados en la banda más intensa en L2. Este resultado es concordante con el hecho de que el péptido 33-mer tiene un tamaño bastante mayor que el péptido de control. En el panel B se muestra el Western-Blot. En ambas líneas se observa una única banda, puesto que con esta

técnica únicamente se observan aquellas proteínas que tienen una cola de histidinas, lo que confirma el éxito en la obtención y purificación de ambos péptidos.

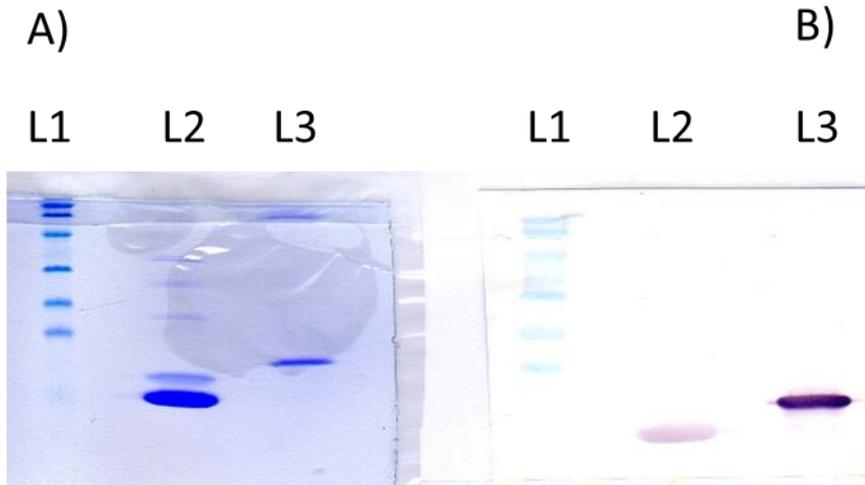


Figura 3-4 Visualización de SDS-PAGE (A) y Western Blot (B) de: marcador de proteínas L1; péptido recombinante control L2 y péptido recombinante diana L3

La secuencia del péptido recombinante fue confirmada por espectrometría de masas. Una muestra del péptido se sometió a digestión trípica y se analizó su secuencia mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF). Como se puede ver en la Figura 3-5 se obtienen dos fragmentos de $m/z=4468,43$ y $4484,44$ respectivamente.

El pico principal $m/z=4468,43$ permite asignar dos secuencias posibles:

MoxLQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPFISR(+55Da)

MALQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPFISR

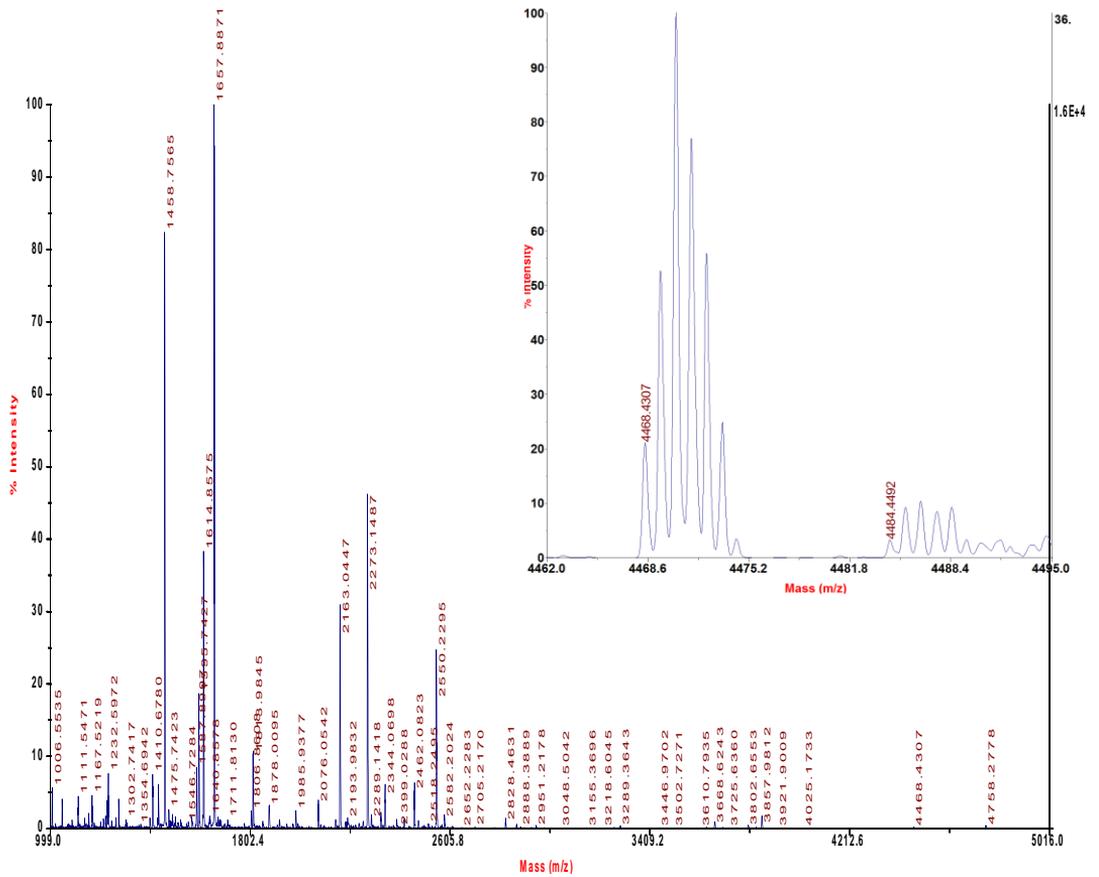


Figura 3-5: Espectros de masas del péptido recombinante.

El vector introduce tres aminoácidos (MAM) al inicio del péptido de interés. Al contener dos M que son el codón de iniciación, la expresión se puede iniciar tanto en la primera metionina como en la segunda, pero en ningún caso puede estar presente la secuencia MAL. Por lo tanto, lo más probable es que la secuencia sea la primera, ya que la oxidación de metionina es relativamente frecuente. En cualquier caso se confirma la síntesis del fragmento 33-mer.

Para iniciar el proceso de selección es necesario modificar las partículas magnéticas con el péptido diana o control, según corresponda en cada caso. Para ello, se equilibraron 6 μL de partículas magnéticas Ni^{2+} -NTA MagneHis™ Ni, de Promega, en 500 μL de tampón de modificación que contiene 100 mM de HEPES pH 7,5; 10 mM de imidazol y 0,5 M de NaCl. Para proceder a la separación se colocó el tubo con la suspensión de partículas durante 2 minutos en un imán que atrapa las partículas y, tras descartar el sobrenadante, se incubaron con 10 μL de péptido recombinante 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para péptido diana y 0,75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para el péptido control.

En ambos casos la modificación se efectuó incubando la suspensión de partículas durante 15 min con agitación en una rueda de mezcla a temperatura ambiente. Tras la separación magnética se llevaron a cabo dos etapas de lavado con el tampón de modificación con 0,01 % de Tween-20 y una etapa de lavado con el tampón de selección que contiene 50 mM de Tris pH 7,4, 250 mM de NaCl y 5 mM de MgCl_2 . Finalmente las partículas fueron reconstituidas a una concentración de 5 pmol de péptido / μL en el tampón de selección, asumiendo que todo el péptido (1 nmol) se inmovilizó sobre las partículas magnéticas, y se almacenaron a 4°C.

Para verificar la inmovilización del péptido 33-mer sobre las partículas magnéticas a través de la cola de histidinas, una alícuota de las partículas modificadas fue sometida a elución con una disolución con una concentración elevada de imidazol (500 mM) en HEPES 100 mM de pH 7,5 durante cinco minutos. Se recogió el sobrenadante y se repitió la operación para asegurar la total elución del péptido. Ambos sobrenadantes se mezclaron y con ellos se

realizó un Western-Blot análogo al realizado para comprobar la pureza de los péptidos. En la Figura 3-6 se muestra el resultado obtenido. Como medida de control en L1 se introdujo una alícuota de la disolución de péptido que estuvo en contacto con las partículas magnéticas (fracción no enlazada) y en la L2 se introdujo la fracción enlazada y eluída. Como se puede observar en ambas líneas aparece una banda intensa de idéntico tamaño en la zona de bajo peso molecular. Esto indica que el péptido recombinante es capaz de coordinarse al Ni^{2+} de las partículas aunque no todo el péptido se unió a las partículas como se asumió. La misma experiencia se repitió con el péptido control observándose idéntico resultado.

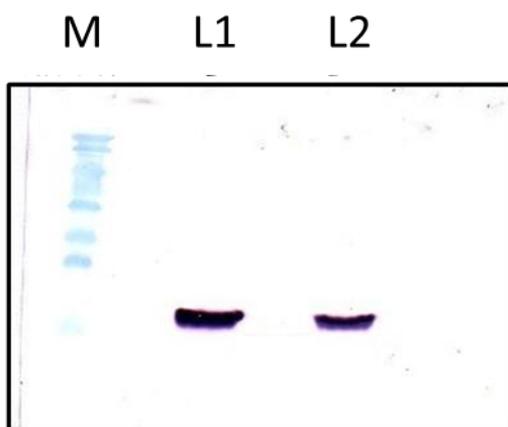


Figura 3-6: Western blot de la fracción no enlazada en las partículas L1 y la fracción enlazada y eluída L2 frente a un marcador de peso molecular de proteínas M.

El péptido diana, inmovilizado sobre partículas de Ni^{2+} -ácido nitrilo triacético a través de la cola de histidinas, fue expuesto a una biblioteca de ADN de 80 bases que contenía 6×10^{14} secuencias diferentes. Se diseñó una biblioteca aleatoria con 20 bases fijas en cada extremo, para permitir la amplificación en una etapa de PCR y una secuencia central aleatorizada de 40 bases (Tabla 3-1).

En la etapa inicial de selección se empleó 1 nmol de esta biblioteca de ADN en tampón de selección (BS), que contiene 50mM de Tris-HCl de pH 7,4 con 250 mM de NaCl y 5 mM de MgCl₂, se calentó a 98°C durante 5 minutos y, posteriormente, se enfrió en hielo durante 5 minutos. A continuación, se añadió esta disolución sobre las partículas modificadas con el péptido y se añadió BSA 1 µg/mL y t-RNA en una concentración 10 veces menor que ADN. La adición de BSA evita adsorciones inespecíficas, mientras que t-RNA se añadió como competidor para hacer la selección más exigente. Se empleó una cantidad de péptido 10 veces menor que la de ADN con el fin de favorecer la competición de las secuencias por el mismo. Tras la etapa de interacción se llevó a cabo la separación magnética, el sobrenadante es descartado y las partículas fueron lavadas dos veces con BS que contiene 0,01 % de Tween-20 (BSL).

La elución de las secuencias enlazadas a las partículas modificadas con el péptido se llevó a cabo mediante la interacción de las mismas con un tampón con alto contenido en imidazol 100 mM de HEPES de pH 7,5 con 500 mM de imidazol. El imidazol actúa como un análogo a la histidina desplazando de las partículas el péptido unido. Tras la elución de los complejos péptido recombinante-oligonucleótido, se llevó a cabo la amplificación de las secuencias enlazadas mediante PCR. Se comprobó que la presencia del péptido o de imidazol en la mezcla no afecta a la eficacia del posterior proceso de amplificación mediante PCR. Se empleó el cebador inverso marcado con biotina para poder llevar a cabo un posterior proceso de acondicionamiento de las secuencias dúplex, previo a la siguiente etapa de selección. Cada mezcla de PCR de 100 µL contenía 2 µL del eluato, 1 µM de cada uno de los cebadores Self y

SelR-Biot (Tabla 3-1), 0,2 mM de dNTP, 3 mM de Mg^{2+} y 2,8 U de ADN polimerasa Start Inmolasa™ todo ello en tampón de PCR 1×.

Las condiciones de la amplificación fueron: una etapa inicial de 10 minutos a 37°C; 20 minutos a 95°C para activar la enzima; 15 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 57°C y 45 segundos a 72°C; se lleva a cabo una etapa final de extensión de 10 minutos a 72°C. Se comprobó que este protocolo genera un producto del tamaño apropiado llevando a cabo una electroforesis en gel de agarosa del 2 % utilizando un marcador de tamaños de ADN de 20 pares de bases.

Teniendo en cuenta que antes de iniciar el siguiente ciclo de selección es necesario que la biblioteca de secuencias de ADN sea monocatenaria y sabiendo que tras la PCR se obtienen secuencias dúplex, es necesario un proceso de acondicionamiento previo. De entre las alternativas posibles anteriormente comentadas se escogió por su simplicidad, rapidez y bajo coste, la inmovilización del dúplex sobre partículas magnéticas modificadas con estreptavidina y posterior separación en medio básico. Para esto se incubaron 250 pmol de ADN de doble hebra biotinilada, obtenido tras la PCR, con partículas magnéticas modificadas con estreptavidina, Dynabeads® MyOne™ streptavidin C1 de Life Technologies. La cantidad de partículas necesarias para enlazar las secuencias biotiniladas y los cebadores restantes son calculadas tras cada etapa de amplificación. Se utilizó un exceso de partículas magnéticas para asegurar la completa captura de las secuencias marcadas con biotina. La cantidad de partículas calculada en cada caso se lavó dos veces con un tampón (BLstrep) que contiene 5 mM de Tris-HCl pH 7,4 con 1 M de NaCl y 0,01 % de

Tween-20 y se resuspende en 250 pmol de ADN en 10 mM de Tris-HCl pH 7,4 con 2 M de NaCl. Tras una incubación de 15 minutos con agitación se procedió a la separación magnética y a tres etapas de lavado con BLstrep. A continuación, la doble hebra de ADN enlazada a la superficie de las partículas se desnaturalizó empleando 50 μ L de NaOH 100 mM durante 10 minutos bajo agitación. Tras un proceso de separación magnética, el sobrenadante que contiene las secuencias de hebra simple no biotiniladas se neutralizó con 6 μ L de HCl 1 M y se diluyó en BS para ser utilizado en el siguiente ciclo de selección.

Tabla 3-2: Condiciones de los ciclos de SELEX.

Ciclo	Selección negativa	Incubación (min)	Nº de lavados
1		60	2
2		60	2
3	Si	60	2
4		30	2
5		30	5
6	Si	30	5
7		15	5
8		15	10
9	Si	15	10
10		15	15

Se repitió el ciclo completo descrito 10 veces. Para llevar a cabo la selección se fue incrementando la exigencia en los diferentes ciclos. En la Tabla 3-2 se presenta un resumen de las condiciones de cada uno de los ciclos de SELEX realizados. Se comenzó con un tiempo de incubación entre la biblioteca y las partículas modificadas con el péptido de 60 minutos en los ciclos 1-3, siendo reducido a 30 minutos en las rondas 4-6 y finalmente ajustado a 15 minutos en las rondas 7-10. Con el mismo propósito se ajustaron los lavados tras esta etapa

de interacción, que pasaron de 2 en las etapas 1-4, a 5 en las etapas 5-7, 10 en las etapas 8-9 y finalmente 15 en la última etapa.

Teniendo en cuenta el contenido en aminoácidos apolares y la baja carga neta del péptido 33-mer es imprescindible evitar la selección de aptámeros contra el espaciador, que sí que contiene cadenas laterales hidrofílicas así como grupos ionizables. Para ello se llevaron a cabo etapas de selección negativa usando las mismas partículas modificadas con un péptido de control que constaba del espaciador de 57 aminoácidos marcado con una cola de histidinas. Estas etapas de selección negativa se introdujeron previamente a las etapas 3, 6 y 9 del proceso. En estas etapas se incubó el ADN obtenido tras la amplificación y acondicionamiento de la etapa anterior con las partículas modificadas con el péptido control. En este caso el sobrenadante, las secuencias no enlazadas, se utilizan en la posterior etapa de selección. De esta forma, las secuencias con afinidad por la marca de poli-histidina y/o a la secuencia peptídica separadora quedan enlazadas a las partículas y no se incluyen en el siguiente ciclo de la selección.

La cantidad de ADN recuperada tras cada ciclo de selección se midió fluorimétricamente empleando el kit Quant-iT™ PicoGreen de Life Technologies en un minifluorímetro TBS-380 de Turner Biosystems después de 15 ciclos de PCR (Figura 3-7). Como puede apreciarse después de cada selección negativa (etapas 3, 6 y 9), la cantidad de ADN amplificada es mucho menor que en la etapa inmediatamente anterior. Esto indica que la selección negativa ha sido efectiva eliminando aquellas secuencias que se unen inespecíficamente al espaciador o a las partículas magnéticas.

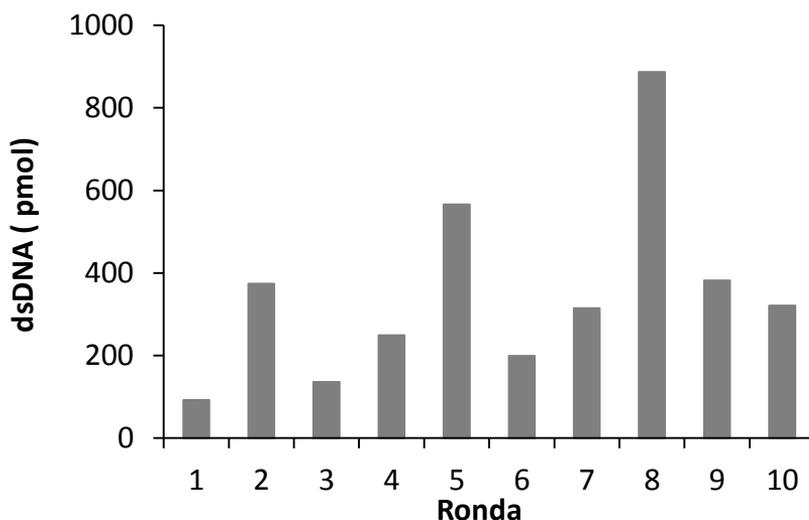


Figura 3-7: Cantidad de ADN amplificada tras cada ciclo.

En los casos en los que no se obtuvo un mínimo de 250 pmol para iniciar la siguiente ronda se repitió el proceso de amplificación por PCR en diferentes alícuotas hasta alcanzar o superar dicha cantidad. Alternativamente se podrían haber efectuado un número superior de ciclos de PCR. Sin embargo, se ha demostrado que esta práctica conduce a amplificaciones de productos no deseados. Hay que tener en cuenta que se está amplificando una colección de ADN con secuencias aleatorias por lo que la probabilidad de que haya hibridación entre los productos de amplificación es mucho mayor que en una PCR convencional donde la molécula molde tiene una secuencia única y bien definida. Se ha descrito que el principal subproducto en PCRs de secuencias aleatorias no es la formación de dímeros de cebadores sino la formación de productos debidos a la interacción entre amplicones. En cada ciclo de amplificación se van acumulando estos subproductos, por lo que no es recomendable hacer más de 20 ciclos [121].

Para comprobar si, como se pretendía, en los sucesivos ciclos se está enriqueciendo la biblioteca inicial en secuencias que se unan de forma específica al péptido diana, se llevó a cabo un ensayo de enriquecimiento en el que, mediante medidas de fluorescencia, se evaluó el grado de enlace de las secuencias seleccionadas al péptido diana. Para este ensayo se empleó una alícuota del eluato de cada ronda, sobre la que se llevó a cabo una amplificación por PCR con un cebador directo marcado con 5'-6'-carboxifluoresceína (Self-6-FAM, Tabla 3-1). Las condiciones de amplificación son idénticas a las utilizadas tras cada ronda, empleando en este caso el cebador Self-6-FAM y el cebador SelR-Biot. La separación de las hebras marcadas con 6-FAM se realizó del mismo modo que se lleva a cabo el acondicionamiento de las secuencias tras la PCR posterior a cada etapa de selección, aprovechando la etiqueta de biotina que se incorpora a través del cebador inverso. La concentración final de ADN marcado con el fluoróforo fue determinada en un lector fluorimétrico de micro placas FLX800 de Biotek Instrument.

El ensayo de enlace se llevó a cabo equilibrando una cantidad equimolar de hebras simples marcadas con 6-FAM obtenidas como se indicó anteriormente, con partículas magnéticas modificadas con el péptido diana. El enlace se prolongó durante 10 minutos en BS con agitación a temperatura ambiente. Seguidamente se llevó a cabo la separación magnética, se reservó el sobrenadante para realizar medidas de fluorescencia (fracción no enlazada) y se procedió a realizar dos etapas de lavado con BSL. La fracción de hebras de ADN unidas al péptido (fracción enlazada) se eluyó del mismo modo que tras cada etapa de selección, con BME durante 10 minutos con agitación. Se cuantificaron fluorimétricamente tanto la fracción enlazada como la fracción no enlazada

empleando como estándar disoluciones de hebras sencillas de ADN marcadas con 6-FAM de concentración conocida. Paralelamente se llevó a cabo un ensayo de enlace análogo empleando partículas modificadas con el péptido control (blanco).

Tal y como se esperaba solo una pequeña cantidad de ADN manifestó afinidad por la molécula diana en los primeros ciclos, pero esta cantidad fue en aumento en los ciclos siguientes. La fracción de oligonucleótidos enlazada aumenta progresivamente entre los ciclos 5 y 10 del mismo modo que la fracción no enlazada decrece (Figura 3-8). Tras el décimo ciclo, no se detecta unión al péptido de control, lo que confirma el éxito de las etapas de selección negativa. Los ciclos adicionales no aumentan el enriquecimiento de la fracción enlazada por lo que las secuencias obtenidas tras el ciclo 10 se clonaron y se secuenciaron.

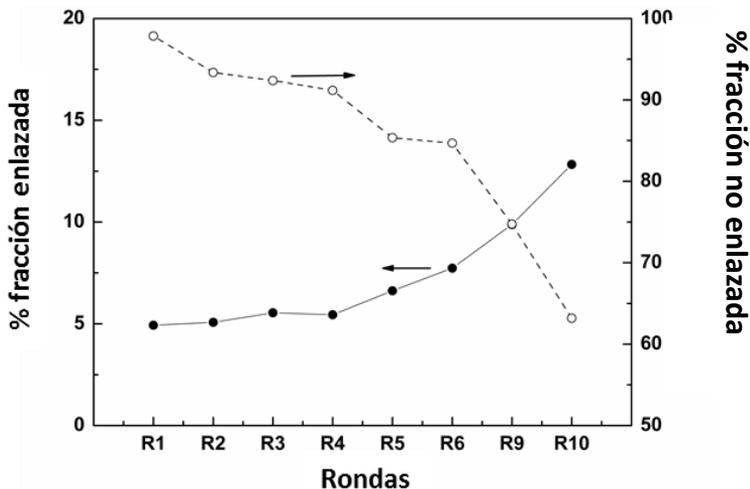


Figura 3-8: Porcentaje de ADN monocatenario enlazado (●) y no enlazado (○) cuantificado fluorimétricamente tras los sucesivos ciclos de selección.

3.3 Clonación, secuenciación y análisis de las secuencias

Después de la selección in vitro descrita fue necesario conocer las secuencias de las hebras de ADN “ganadoras”, que permanecieron enlazadas al péptido en la última ronda. Para ello se amplificó el ADN enlazado después del ciclo 10 de selección por PCR, siguiendo el procedimiento ya descrito y empleando los cebadores Self y SelR (Tabla 3-1). Los productos fueron clonados usando el kit pETBlue-1 Acceptor Vector de Novagen y transformados en células Nova Competent. Después del crecimiento, se seleccionaron al azar 25 colonias, purificando los plásmidos correspondientes mediante el sistema de purificación Wizard Plus minipreps DNA de Promega de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Finalmente, se obtuvo su secuencia completa usando el kit BigDye Terminator y el instrumento Abi PRISM 3130xl Genetic Analyzer de Applied Biosystems. En la Figura 3-9 se pueden observar las secuencias obtenidas para de los 25 clones seleccionados, incluidas las secuencias de los cebadores. Las regiones aleatorias se pueden observar separadas de los cebadores por un espacio. Se emplea un código de colores para cada uno de los nucleótidos a fin de que sea más fácil de identificar las homologías entre cada uno de ellos. Los puntos indican coincidencia con la secuencia que contiene las letras.

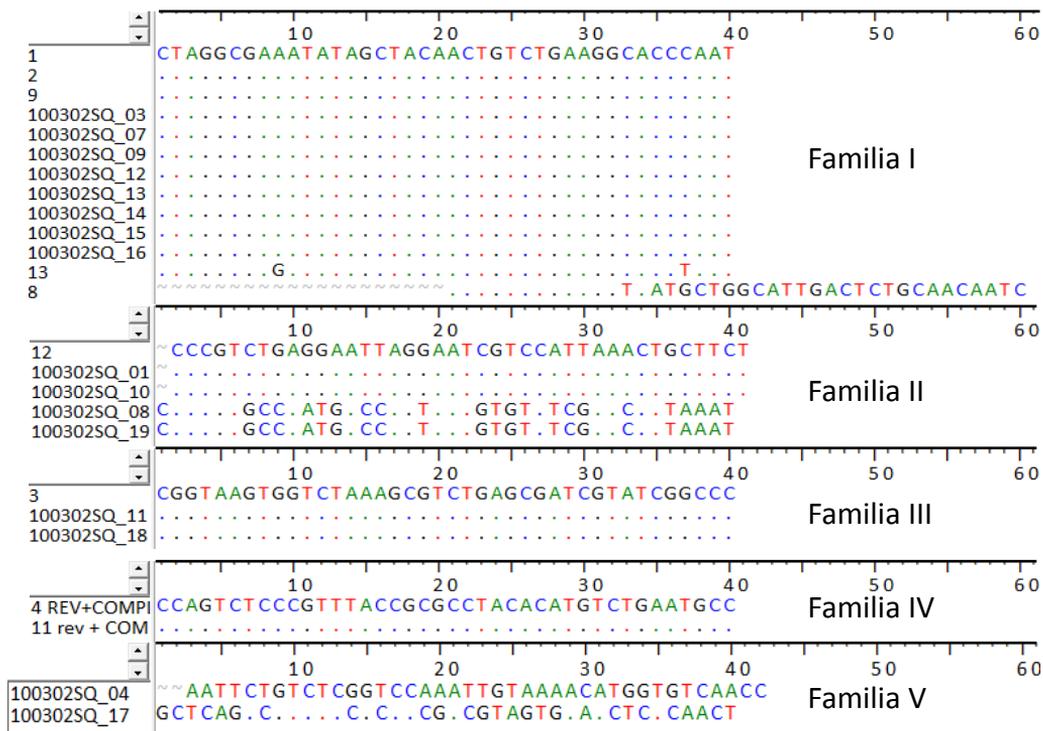


Figura 3-9: Secuencias completas de los 25 clones escogidos al azar procedentes del ADN enlazado tras los 10 ciclos de selección.

El análisis de la región central de 40 bases de estas secuencias mediante el software BioEdit reveló importantes homologías y regiones conservadas entre ellas, lo que permitió la agrupación de las mismas en cinco familias.

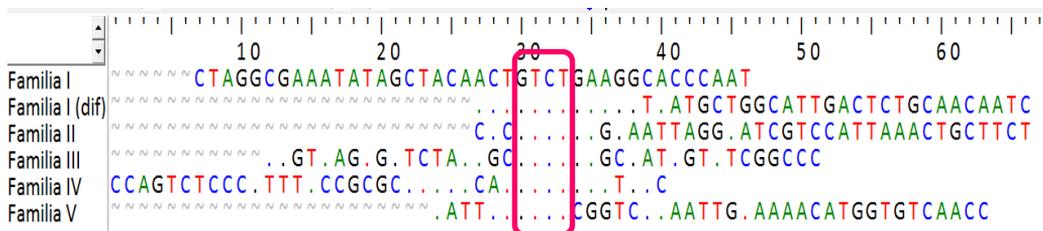


Figura 3-10: Alineamiento de las secuencias representativas de cada una de las familias obtenidas tras la clonación.

Familia I: Esta es la más numerosa de todas ya que incluye el 52 % de las secuencias clonadas. Sorprendentemente 12 de las 13 secuencias que la componen son completamente idénticas. El clon diferente posee una región de 12 nucleótidos idéntica a los demás, pero desplazada hacia el extremo 5'.

Familia II: Contiene 5 miembros con un 65 % de homología entre ellos.

Familias III y IV: Contiene 3 y 2 miembros idénticos cada una.

Familia V: Contiene 2 miembros con un 60% de homología entre ellos.

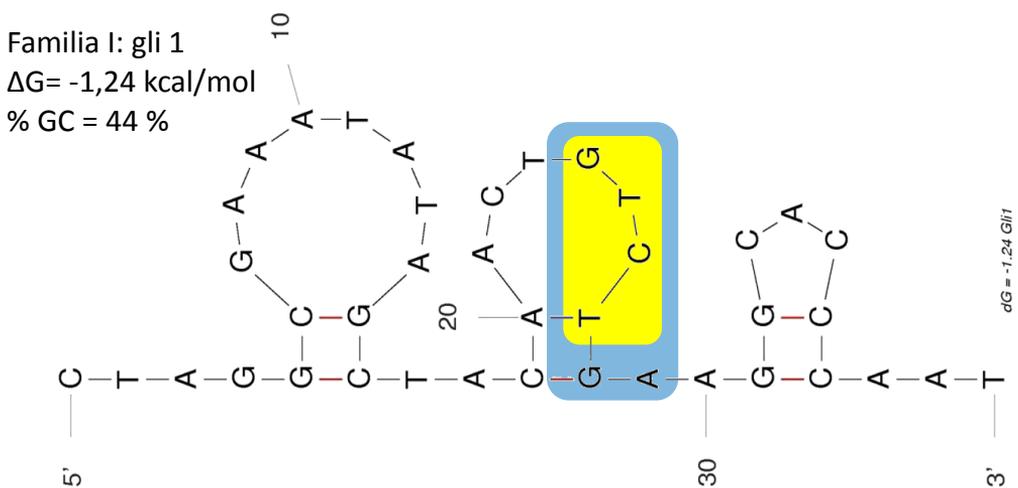
En la Figura 3-10 se puede ver el alineamiento de los miembros representativos de cada familia identificada, llevado a cabo con el software diseñado al efecto Bioedit, de acceso libre, tomando como referencia la secuencia común de los clones de la Familia I. Se mantiene el código de colores para cada base y se han representado las bases comunes mediante puntos.

Cabe destacar de este análisis que la zona de doce nucleótidos que comparten los clones que componen la Familia I está presente con pequeñas variaciones en el resto de familias, siendo común a todas ellas, como mínimo, un grupo de cuatro nucleótidos GTCT. Esta coincidencia es reseñable e indica la presencia de una zona conservada en todas las secuencias. Más aún si se realiza un análisis familia a familia comparándolas con la Familia I la zona conservada puede considerarse mayor.

Entre la Familia I y las Familias II y III la región conservada se amplía a seis nucleótidos GTCTGA. En el caso de la Familia II esta secuencia se encuentra localizada más próxima al extremo 5', mientras que en la Familia III se encuentra en la región central de la secuencia. Esta región también es común a

la Familia IV, ampliándose más aún en este caso, puesto que comparte una secuencia extendida de hasta ocho nucleótidos con la Familia I: TGTCTGAA, situándose esta secuencia compartida hacia el extremo 3'. En el caso de la Familia V la secuencia compartida ampliada, que contiene la secuencia consenso de cuatro nucleótidos se desplaza en sentido 5' y comparte seis nucleótidos CTGTCT.

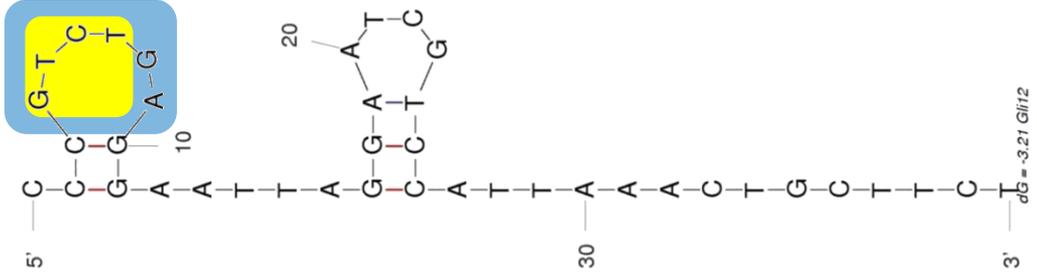
Tras la identificación de las regiones conservadas entre las familias y con ayuda de la herramienta informática Mfold [103] se predijo la estructura secundaria más estable de las secuencias oligonucleotídicas a una temperatura concreta teniendo en cuenta la concentración de sales del medio. Para este análisis se tomó como temperatura 25°C y se consideró la concentración salina del tampón de selección, 250 mM de NaCl y 5 mM de MgCl₂. En estas condiciones se obtuvieron diferentes estructuras posibles para un representante de cada familia, de las cuales se presentan a continuación aquellas cuya energía libre es más favorable.



Familia II: Gli 12

$\Delta G = -3,21$ kcal/mol

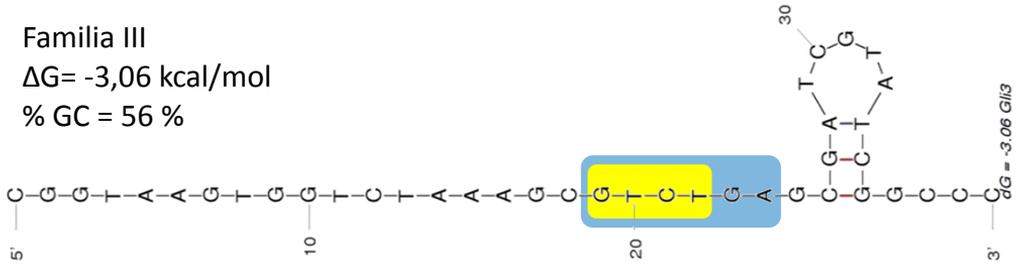
% GC = 44 %



Familia III

$\Delta G = -3,06$ kcal/mol

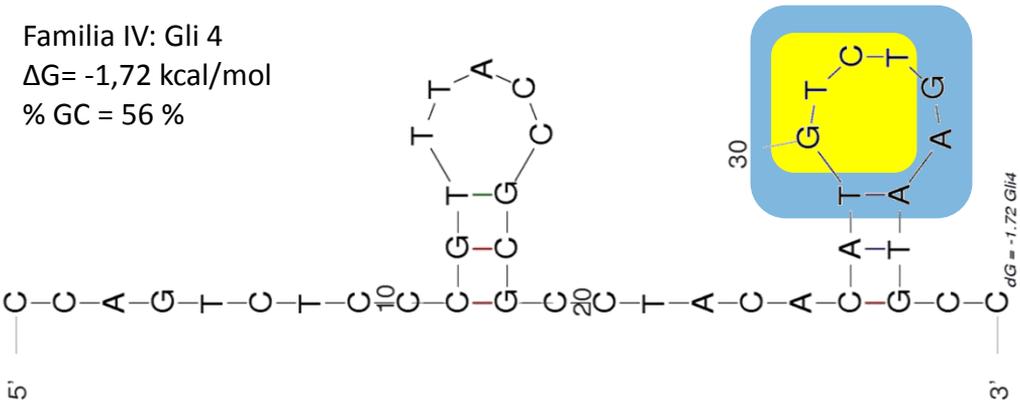
% GC = 56 %



Familia IV: Gli 4

$\Delta G = -1,72$ kcal/mol

% GC = 56 %



Familia V: Gli sq04
 $\Delta G = -2,95 \text{ kcal/mol}$
 % GC = 39 %

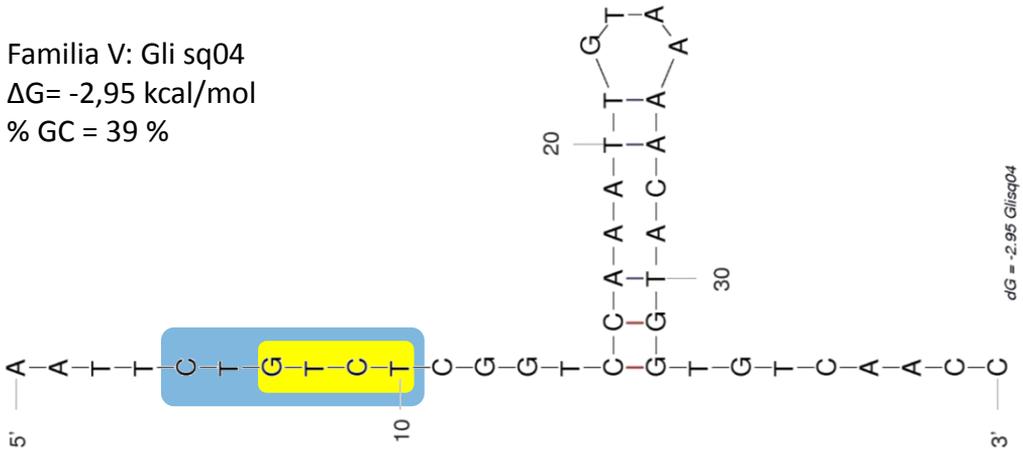


Figura 3-11: Estructura secundaria de los aptámeros seleccionados calculadas empleando el programa mfold.

A la vista de las estructuras de las distintas familias y teniendo en cuenta sus energías libres de formación, se puede afirmar que todas las secuencias seleccionadas presentan una débil estructura secundaria. Es significativo el hecho de que ninguna de las secuencias potencialmente aptaméricas presente fuerte estructura secundaria dado que es muy habitual la presencia de las mismas en los distintos aptámeros descritos. No obstante debe resaltarse que todos los aptámeros obtenidos comparten una estructura similar. De hecho en muchos casos se observa la formación de estructuras en forma de horquilla en las cuales suelen aparecer las secuencias conservadas. En el caso de Gli 1, Gli 12 y Gli 4 la secuencia conservada se encuentra en el bucle de la horquilla, mientras que esto no ocurre en los aptámeros Gli 3 y Gli sq04

Previamente a la realización del presente trabajo no había en la bibliografía ningún aptámero descrito contra las proteínas alergénicas del gluten. Finalizando la presente tesis se publicó la obtención de un aptámero

empleando como diana la gliadina de Sigma [122]. La secuencia de este aptámero, denominado G33, es AAATACTAACTAGGTAAGATCACGCAGCACTAAACGACGTAGTTGCCA. Tiene un 42 % de GC y presenta la estructura secundaria mostrada en la Figura 3-12 con $\Delta G = -4,12$ kcal/mol.

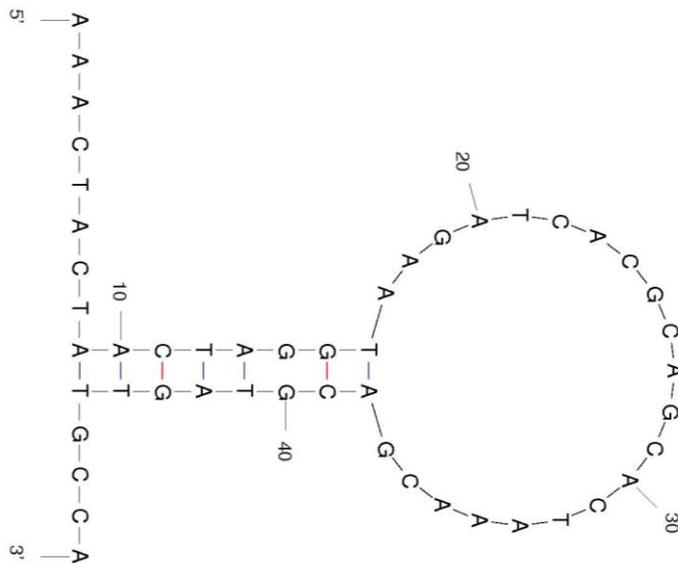


Figura 3-12: Estructura secundaria calculada mediante el programa mfold para el aptámero G33 contra gliadina Sigma.

Este aptámero no contiene la región altamente conservada presente en los aptámeros obtenidos en este trabajo. Sin embargo sí que se observan algunas similitudes llamativas como es el relativamente bajo porcentaje de GC y una estructura secundaria débil así como algunas regiones homólogas que se pueden ver resaltadas en la Figura 3-13.



Figura 3-13: Alineamiento del aptámero G33 con los aptámeros de las diferentes familias.

3.4 Afinidad de las secuencias seleccionadas

Una vez conocidas las secuencias de las 5 familias de aptámeros es necesario evaluar su capacidad de reconocimiento tanto frente al péptido contra el que han sido seleccionadas, como contra la proteína completa procedente del trigo donde se encuentra esa secuencia peptídica y contra las proteínas que conforman el gluten provenientes de otros cereales. En la Figura 3-11 que muestra la estructura del aptámero se identifica el clon seleccionado para cada familia. En adelante se empleará la nomenclatura que identifica a cada secuencia como “aptámero Gli X”.

Para comprobar que las secuencias seleccionadas enlazan efectivamente al péptido 33-mer empleado como diana se realizaron una serie de ensayos de unión. Con este fin se inmovilizó el péptido, modificado con una marca de biotina, en la superficie de partículas magnéticas modificadas con estreptavidina. Una cantidad fija del péptido inmovilizado se hizo interaccionar con concentraciones crecientes de los distintos aptámeros, entre 0,5 nM y 5µM. La medida de la cantidad de aptámero enlazada a la superficie después de esta interacción permitió obtener las curvas de enlace que se presentan en la Figura 3-17.

Para obtener estas curvas de enlace se empleó un péptido 33-mer sintético, con una marca de biotina en su extremo C-terminal y un espaciador de 6 aminoácidos entre la biotina y la secuencia del péptido. El separador empleado es un sexteto de histidinas que también fue utilizado durante el proceso SELEX. Esto ayuda a alejar de la superficie de las partículas la molécula diana, evitando impedimentos estéricos por la cercanía de la superficie. De esta forma se favorece una mayor libertad del péptido para que se pueda producir el enlace de reconocimiento del mismo por parte de los aptámeros. Además se consigue así una orientación similar a la que tenía durante el proceso SELEX. Este péptido es sintetizado químicamente por la empresa Biomedal, que lo proporciona con una elevada pureza (>90%). Por medio de la marca de biotina, incorporada a la secuencia del péptido, es posible inmovilizarlo sobre partículas magnéticas comerciales recubiertas con estreptavidina. Las secuencias de ADN empleadas son las correspondientes a la zona variable de 40 nucleótidos que se secuenció tras el proceso SELEX, obtenidas comercialmente mediante síntesis química marcadas con una biotina en su extremo 5'. La etiqueta de biotina se introduce en los oligonucleótidos con el fin de poder incorporarles posteriormente una marca enzimática que haga posible la cuantificación.

El enlace del péptido 33-mer a las partículas magnéticas modificadas con estreptavidina se realizó siguiendo el protocolo, esquematizado en la Figura 3-14, detallado a continuación.

Se lavaron 50 μ L de partículas, de concentración 10 mg/mL, con 950 μ L de PBS 1 \times con 0,01 % de tween-20 (BLmodstrep) dos veces, incubando cada vez 2

minutos en la rueda mezcladora a temperatura ambiente seguido de 2 minutos de separación magnética.

Inmovilización del péptido: se resuspendieron las partículas en 1 mL de PBS (BMstrep) con 2 μM de péptido biotinilado y se hicieron interaccionar en el Thermomixer de Eppendorf a 1300 rpm a 30°C durante 30 minutos. Tras esto se lavaron dos veces durante dos minutos con 1 mL BLmodstrep.

Bloqueo: a continuación las partículas se resuspendieron en BMstrep con 500 μM de biotina para bloquear los posibles sitios de enlace libres de las estreptavidinas de la superficie de las partículas. Esta interacción se realizó durante 30 minutos, a 1300 rpm, 30 °C y tras ello se lavaron con 1 mL de BSL primero y luego con 1 mL de BS para resuspenderlas finalmente en 500 μL de BS para su uso.

Las partículas se modificaron y usaron en el mismo día.

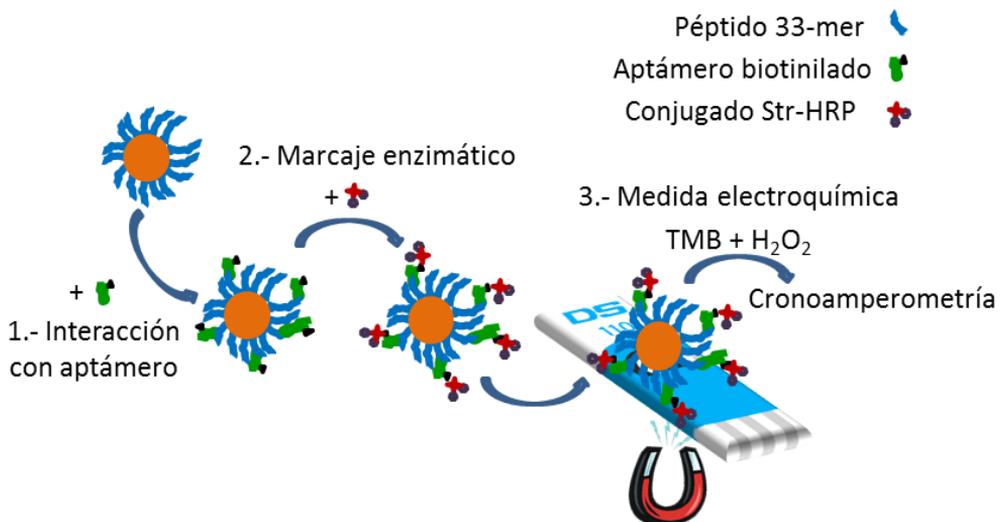


Figura 3-14: Esquema del ensayo para la obtención de la curva de enlace

Para la interacción de estas partículas con los diferentes aptámeros y medida de la fracción enlazada se utilizó el siguiente protocolo:

1. Interacción con los aptámeros seleccionados (etapa 1): 30 μg de partículas modificadas con el péptido se hicieron reaccionar durante 30 min a 30°C con 500 μL de disoluciones con concentración creciente de los aptámeros marcados con biotina, en un intervalo desde 0,5 nM hasta 5 μM en BS. Posteriormente se procedió a lavar dos veces las partículas con 500 μL de BSL.
2. Marcaje enzimático (etapa 2): las partículas se resuspendieron en 500 μL de BS con 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de conjugado enzimático estreptavidina-peroxidasa de rábano silvestre (Str-HRP). Se dejaron interaccionar durante 30 minutos a 30°C , y tras la separación magnética se lavaron dos veces con 500 μL de BSL y una vez con BS. Finalmente se resuspendieron en 30 μL de BS.
3. Medida electroquímica (etapa 3): para la cuantificación de la cantidad de aptámero enlazado sobre las partículas se llevó a cabo una medida electroquímica del producto generado enzimáticamente por la HRP. Con este fin se empleó como sustrato de la enzima la mezcla tetrametilbencidina (TMB) y H_2O_2 . La TMB se oxida por acción del peróxido de hidrógeno en presencia de peroxidasa para dar lugar a la especie oxidada de TMB (TMB_{ox}). Este sustrato es habitualmente empleado en ensayos enzimáticos tanto ópticos como electroquímicos y se encuentra comercialmente disponible en preparados listo para su uso, en los que se incluye TMB, peróxido de hidrógeno y conservantes en un tampón de pH adecuado para que tenga lugar la reacción enzimática.

Las medidas se llevaron a cabo en una celda serigrafiada bajo cuyo electrodo de trabajo, de carbono, se adhirió un imán de igual diámetro que el electrodo con

el fin de que las partículas magnéticas queden atrapadas únicamente sobre la superficie del electrodo de trabajo. Para ello se depositaron 10 μL de las partículas resuspendidas, 10 μg de partículas, sobre el electrodo. Tras dos minutos, para que el imán atrapase las partículas, se añadieron 40 μL de sustrato enzimático y se dejó que tuviese lugar la reacción enzimática durante 1 minuto. Al cabo de ese tiempo se midió electroquímicamente la cantidad de producto generado enzimáticamente.

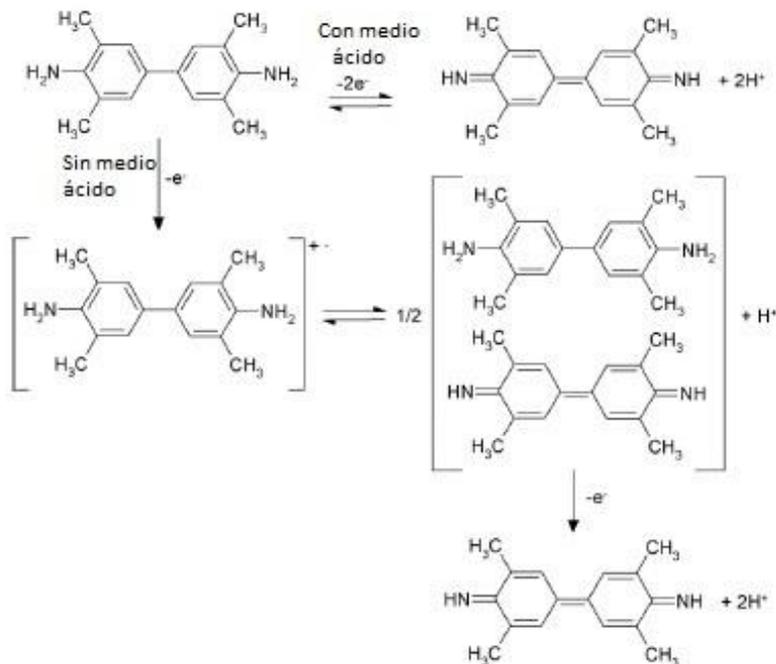


Figura 3-15: Mecanismo de oxidación de TMB.

Se ha descrito que la oxidación de TMB es un proceso que origina un catión radical (Figura 3-15) y un complejo de transferencia de carga de la diamina y la diimina [123]. El producto de la reacción enzimática es el mismo que el de la reacción electroquímica. Por esta razón, no es posible emplear para la medida

de la actividad enzimática inmovilizada una técnica que requiera de la aplicación de un potencial de acondicionamiento que generaría electroquímicamente el $\text{TMB}_{(\text{Ox})}$. En la Figura 3-16 se muestra el comportamiento voltamétrico del TMB sobre la superficie de electrodos serigrafiados de carbono. La aplicación de un potencial de 0 V permite reducir $\text{TMB}_{(\text{Ox})}$ generado enzimáticamente. Fijando el potencial del electrodo de trabajo en este valor se siguió la evolución de la corriente con el tiempo, registrando una medida cada 0.2 segundos durante 60 segundos, tiempo en el cual la corriente se estabiliza. Se toma como señal el valor absoluto del promedio de la corriente medida durante los últimos 10 segundos. La corriente generada durante la reducción del producto de reacción enzimático es una medida de la actividad enzimática inmovilizada sobre las partículas magnéticas y, por tanto, de la cantidad de aptámero enlazado.

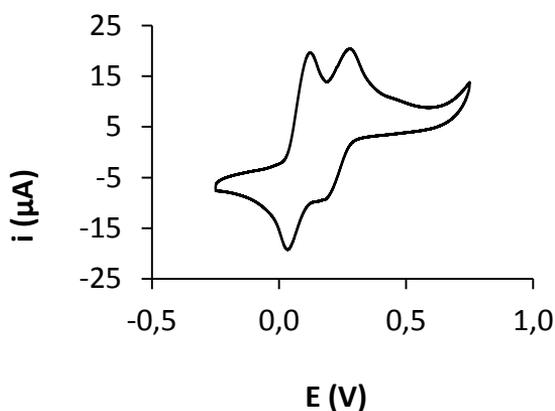


Figura 3-16: Voltagrama cíclico del sustrato TMB obtenidos sobre un electrodo serigrafiado de carbono a una velocidad de barrido de 50 mV/s

Siguiendo este procedimiento se obtuvieron las curvas de enlace oligonucleótido-péptido inmovilizado para los diferentes aptámeros que se muestran en la Figura 3-17. En esta figura se ha representado la intensidad de corriente medida en μA frente a la concentración de aptámero en nM en una escala logarítmica. En la misma figura se representan los resultados de un experimento análogo con una librería aleatoria de 40 bases marcada con biotina. Las curvas de enlace para los diferentes aptámeros identificados adoptan una forma sigmoidea, característica de los ensayos de afinidad. Para obtener una medida cualitativa de la afinidad de enlace de cada aptámero por el péptido 33-mer, se realizó un ajuste no lineal de las curvas utilizando como modelo la función logística de cuatro parámetros con el software matemático Origin 8.6:

$$y = A + \frac{(B - A)}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^p}$$

donde A representa la máxima señal o señal de saturación (asíntota máxima), B es el valor de la respuesta a concentración cero o asíntota mínima, p es la pendiente de la curva en el punto de inflexión y EC_{50} representa la concentración de aptámero que se necesita para obtener la mitad de la señal máxima. De los parámetros que se obtienen del ajuste, es habitual utilizar el valor de EC_{50} como una indicación de la afinidad del ligando por su diana [124]. En la Tabla 3-3 se resumen todos los parámetros de ajuste.

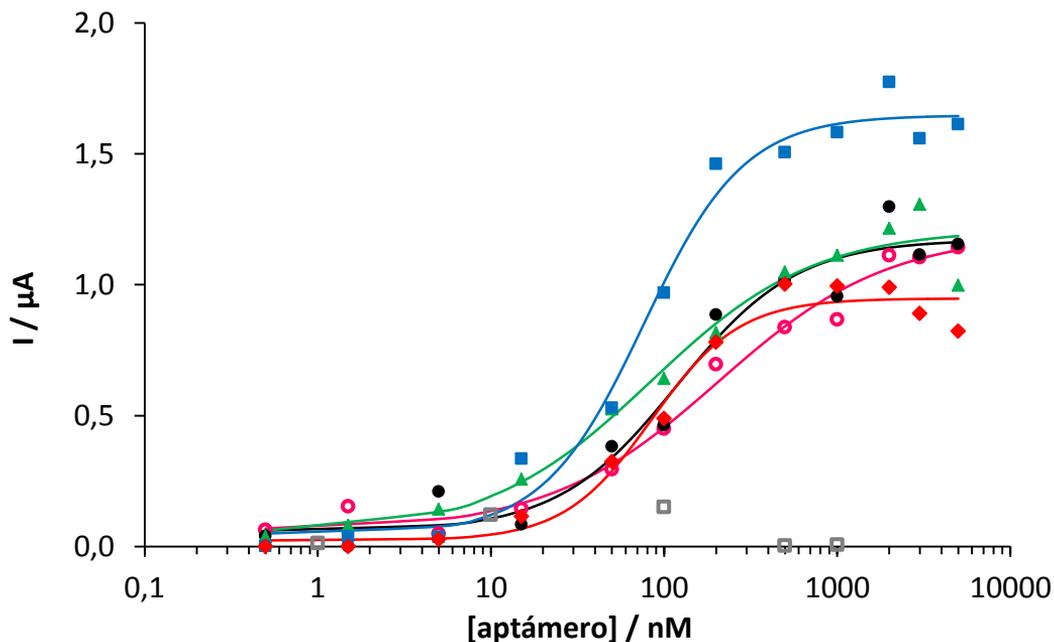


Figura 3-17: Curvas de enlace de los aptámeros Gli 1 (rosa), Gli 12 (negro), Gli 3 (verde), Gli 4 (azul) y Gli sq04 (rojo) seleccionados y de la biblioteca aleatoria (gris) al péptido 33-mer.

Se puede apreciar que, mientras que las señales obtenidas para la biblioteca aleatoria son indistinguibles del blanco (datos no ajustados), todos los aptámeros son capaces de enlazar al péptido 33-mer. Este resultado permite demostrar que existe una afinidad de los aptámeros seleccionados mediante el proceso SELEX por el péptido inmunotóxico utilizado como diana, descartándose interacciones inespecíficas del ADN o del conjugado enzimático con las partículas modificadas. Sin embargo existen ciertas diferencias entre las diferentes familias de secuencias. El aptámero Gli 4 presenta una señal máxima mayor que el resto de las secuencias así como el menor valor de EC_{50} . Por tanto, Gli 4 es el aptámero que muestra una mayor afinidad por el péptido. Entre los aptámeros Gli 1, Gli 12, Gli 3 y Gli sq04 las diferencias de comportamiento son menos apreciables, dado que la señal máxima que proporcionan cada una de

ellas no difieren significativamente. Curiosamente es el aptámero Gli 1, perteneciente a la familia con mayor número de secuencias, el que presenta mayor valor de EC₅₀. Este hecho, aparentemente contradictorio, ha sido previamente descrito en procesos de selección de aptámeros frente a otras dianas [125, 126] y puede atribuirse a una cierta preferencia durante la selección por secuencias que se unen más rápidamente al péptido, más que por las que presentan una mayor afinidad de enlace.

Tabla 3-3: Parámetros de ajuste de las curvas de enlace de los diferentes aptámeros al péptido 33-mer

	A	B	EC₅₀	p	r
Gli 1	1,20±0,08	0,06±0,04	206±51	0,9±0,2	0,99
Gli 12	1,17±0,07	0,06±0,06	119±30	1,2±0,4	0,98
Gli 3	1,21±0,08	0,05±0,07	84±24	0,9±0,3	0,96
Gli 4	1,65±0,05	0,05±0,06	76±11	1,5±0,3	0,98
Gli sq04	0,95±0,04	0,02±0,04	85±13	1,7±0,4	0,97

Una vez que se comprueba que las diferentes secuencias presentan afinidad, en mayor o menor medida, contra el péptido seleccionado como diana es necesario determinar si presentan también afinidad frente a la proteína completa. El reconocimiento del fragmento 33-mer no es suficiente para el desarrollo de un ensayo de detección de gluten en alimentos si el receptor no es capaz de detectar la proteína en su forma nativa, que es el alérgeno a determinar.

Se ha descrito en la bibliografía que, en ocasiones, algunas secuencias seleccionadas frente a un fragmento de una proteína no son capaces de reconocer la proteína completa o lo hacen con una menor afinidad [127]. Esto es así porque la libertad que el fragmento peptídico libre tiene para adaptar

conformaciones secundarias desaparece cuando se encuentra incluido en la proteína completa. Las conformaciones secundarias tanto del péptido como de la secuencia oligonucleotídica seleccionada como receptor, pueden ser cruciales en la formación del complejo de reconocimiento ligando-diana.

Con el fin de determinar la capacidad de enlace de las secuencias seleccionadas frente a la proteína completa se llevó a cabo un ensayo análogo al desarrollado para la determinación del enlace al péptido. Para ello se empleó la gliadina-PWG que es un material preparado por el Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Esta proteína, comentada anteriormente, ha sido utilizada en la validación de diferentes métodos de análisis y en la presente tesis se emplea como estándar de gliadina. Sobre la superficie de partículas magnéticas se inmovilizó esta proteína y se llevaron a cabo incubaciones con concentraciones crecientes de los aptámeros biotinilados. La inmovilización de la proteína en este caso se realizó sobre partículas magnéticas disponibles comercialmente que se encuentran modificadas en superficie con grupos tosilo activados. Estos grupos permiten la formación de un enlace covalente con grupos amino disponibles en la proteína.

Se hacen interaccionar las partículas modificadas con la proteína gliadina PWG, siguiendo el protocolo siguiente:

Las partículas se presentan en una concentración de 100 mg/mL.

Se lavaron 5 μ L de partículas con 1 mL de tampón de H_3BO_3 0,1 M pH 9,5 (BMtos1) y se resuspendieron en 1 mL con: 647 μ L de BMtos1; 333 μ L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 M y 20 μ L de proteína 1 mg/mL. De esta forma se el medio de

modificación contiene 40 μg de ligando por cada μg de partículas. Se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Tras la incubación, se lavaron con 1 mL de BLmod y se procedió al bloqueo de los sitios activos que no han reaccionado. Para ello se resuspendieron en 1 mL de BLmod y se incubaron toda la noche a 37°C.

Tras el bloqueo, se lavaron tres veces con 1 mL de BLmod cada vez y se resuspendieron en 500 mL de BLmod.

Las partículas preparadas se conservaron en nevera y se emplearon durante 2 días tras su modificación.

El ensayo de unión de los aptámeros a las partículas modificadas es análogo al descrito para el péptido 33-mer y esquematizado en la Figura 3-14. En este caso se emplearon 300 μg de partículas. Esto es así debido a que la capacidad de enlace de las partículas tosil-activadas es de 40 pmol de proteína/mg de partículas, correspondiéndose a 1/10 de la capacidad de las partículas modificadas con estreptavidina. De esta forma se tiene teóricamente la misma cantidad de gliadina-PWG en el medio de interacción que de péptido en el estudio anterior.

Tras llevar a cabo el ensayo, se obtuvieron las curvas de enlace que se pueden ver en la Figura 3-18. Al igual que en el caso de la unión péptido-aptámeros, se utilizó la función logística de 4 parámetros para ajustar las curvas sigmoideas obtenidas, usando el programa Origin 8.6. Para realizar el ajuste correspondiente a los aptámeros Gli 1 y Gli 12 fue necesario fijar la asíntota inferior, B, como 0 para que esta no tomase valores negativos es por eso que no

se indica en la Tabla 3-3 donde se muestran los valores de los parámetros de ajuste.

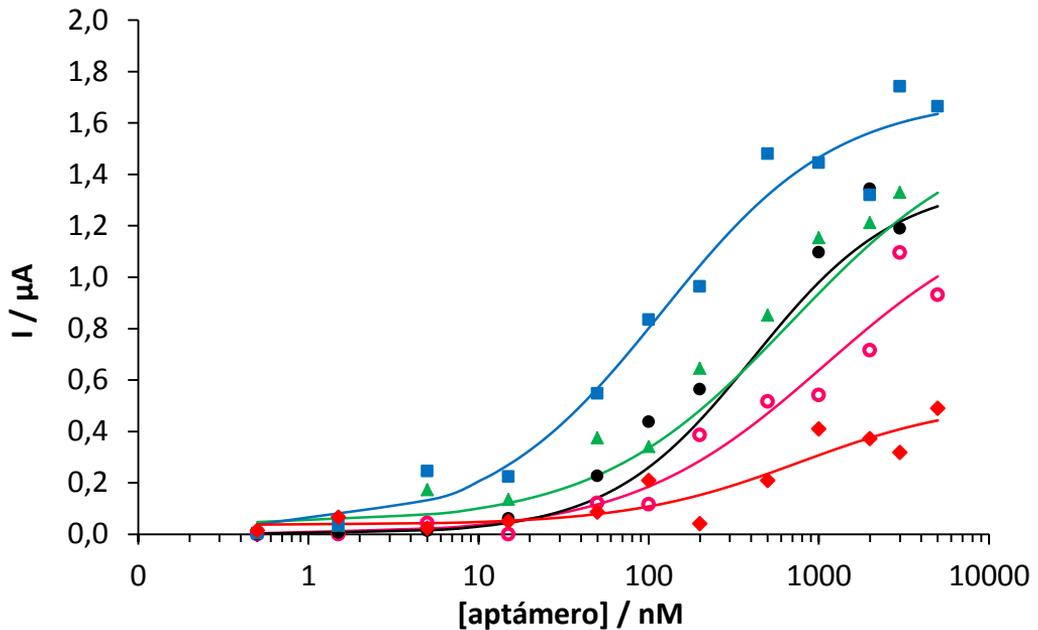


Figura 3-18: Curva de enlace de los aptámeros Gli 1 (rosa), Gli 12 (negro), Gli 3 (verde), Gli 4 (azul) y Gli sq04 (rojo) a la gliadina-PWG

Se observa que los valores para la EC_{50} son bastante similares para Gli 12, Gli 3 y Gli 4, siendo superior para Gli 1. El aptámero Gli sq04 (datos no mostrados) presenta unos valores de corriente medidos mucho menores a concentraciones elevadas y un mal ajuste al modelo logístico. La limitada capacidad de enlace de este aptámero por la proteína hizo que se descartase su empleo para el posterior desarrollo de un método de detección de gluten.

Tabla 3-4: Parámetros de ajuste de los diferentes aptámeros a la proteína gliadina-PWG

	A	B	EC50	p	r
Gli 1	1,32± 0,44	0	1091±1140	0,757±0,251	0,97
Gli 12	1,37±0,10	0	247±65	1,027±0,186	0,99
Gli 3	1,62±0,26	0,038±0,053	416±213	0,756±0,192	0,99
Gli 4	1,70±0,15	0,022±0,106	119±39	0,846±0,258	0,99

Comparando las curvas de enlace obtenidas para cada aptámero con el péptido 33-mer y con la proteína completa (Figura 3-19) se puede observar que para el aptámero Gli 4 ambas curvas de enlace coinciden, indicando que este aptámero tiene una afinidad similar al péptido 33-mer aislado o formando parte de la proteína completa. Para los demás aptámeros se observa una separación de las dos curvas, que apunta a una menor afinidad de los mismos hacia la proteína completa. La capacidad de reconocer al péptido diana en la proteína completa pero con menor afinidad por esta ha sido descrita [127]. Los aptámeros pueden enlazar una conformación sin estructura del fragmento peptídico que no está presente en la proteína natural y que no puede ser fácilmente reconocido. De acuerdo con esto, se puede pensar que cuanto más cercana a la forma nativa sea la conformación reconocida, menor será la pérdida de afinidad.

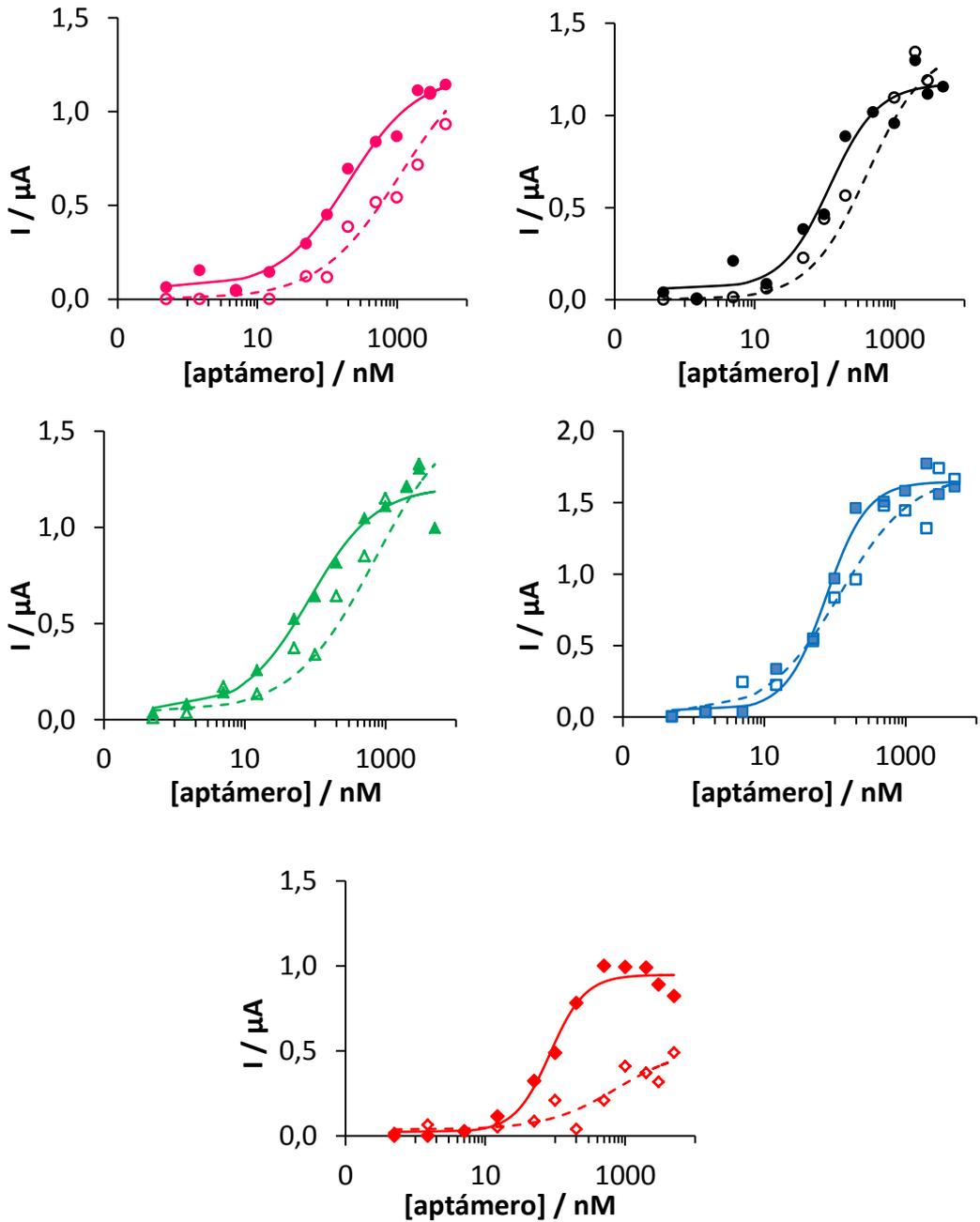


Figura 3-19: Comparación de las curvas de enlace del aptámero Gli 1 (rosa), Gli 12 (negro), Gli 3 (verde), Gli 4 (azul) y Gli sq04 (rojo) frente a 33-mer (símbolos rellenos) y frente a PWG (símbolos vacíos).

3.5 Selectividad frente a otras proteínas alergénicas

Teniendo en cuenta que no solo el gluten procedente del trigo, sino también el que procede de otros cereales es tóxico para los enfermos celíacos, es necesario caracterizar el comportamiento de los aptámeros ante otras proteínas alergénicas diferentes de la gliadina.

La primera dificultad a superar es obtener dichas proteínas, debido a que no se encuentran disponibles comercialmente estándares de las diferentes prolaminas de la cebada, centeno o avena. Por esta razón se procedió a su extracción a partir de harinas de estos cereales, realizando la extracción siguiendo el protocolo detallado a continuación.

Se pesaron 0,8 g de harina y se lavaron tres veces con 4 mL de una disolución acuosa de NaCl 0,4 M. Se agitó durante 30 minutos y se centrifugó durante 45 minutos a 2500 g descartándose el sobrenadante. De esta forma se eliminaron albúminas y globulinas.

Se añadieron 4 mL de una disolución acuosa de etanol 60 % y se incubó agitando durante 30 minutos. Se centrifugó durante 45 minutos a 2500 g conservando el sobrenadante. Se llevó a cabo el proceso dos veces y se combinaron los extractos.

Para evaluar la capacidad de los diferentes aptámeros para enlazarse a estas proteínas se diseñó un ensayo análogo al realizado con la gliadina PWG. Una cantidad fija de cada proteína se inmovilizó sobre partículas magnéticas tosil-activadas y, posteriormente, estas se expusieron a cantidades crecientes de los aptámeros, marcados con biotina en su extremo 5'. Se observó que la cantidad

de proteína empleada durante la inmovilización sobre partículas magnéticas es determinante para garantizar el éxito del ensayo. Se observó que una cantidad de proteína superior o inferior a la empleada en la modificación de las partículas ocasionaba agregación de las mismas. Por tanto, fue necesario cuantificar la concentración de proteínas obtenida en cada extracto. Para ello se utilizó un método general de determinación de proteínas, el método de Bradford [128]. Este método está basado en el cambio de color del reactivo azul de Coomassie que se produce cuando el colorante se une a aminoácidos básicos o aromáticos de las proteínas. El colorante unido a las proteínas presenta un máximo de absorbancia a 595 nm. A esta longitud de onda se realiza un calibrado con concentraciones crecientes y conocidas de una proteína. Habitualmente el calibrado al que se refieren las medidas de este método de cuantificación es la albúmina de suero bovino, BSA. Sin embargo, las proteínas que se quieren cuantificar tienen una composición aminoacídica y unas características que las hacen diferentes. Es por esto que se comprueba la idoneidad de emplear como estándar de calibración la BSA. Para ello, se traza la recta de calibrado empleando por un lado BSA y por otro PWG, para comprobar si el comportamiento frente al reactivo colorante es el mismo.

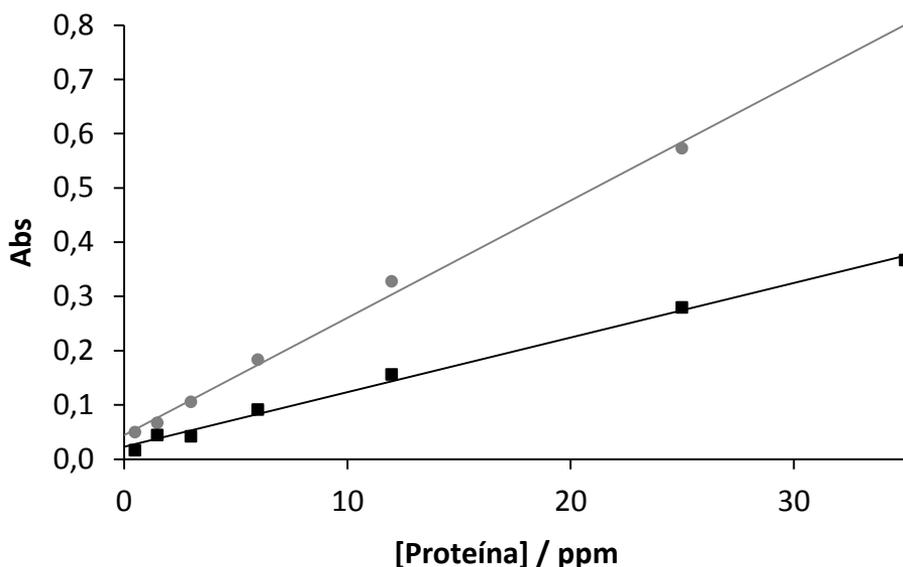


Figura 3-20: Variación de absorbancia respecto a la concentración de proteína empleando el método de Bradford para la BSA (gris) y el PWG (negro).

En la Figura 3-20 se muestran las rectas de calibrado obtenidas en cada caso. Las pendientes de ambos calibrados son muy diferentes. A la vista de estos resultados, la cuantificación de la proteína extraída empleando el método de Bradford referida a un calibrado con BSA conduciría a una subestimación de la cantidad de proteína. Es por esto que para la cuantificación de la misma se decidió emplear el calibrado con PWG como estándar.

Tras el proceso de extracción, en el extracto etanólico están presentes idealmente solo las prolaminas, dado que constituyen la fracción soluble en la mezcla empleada tras el lavado para eliminar albúminas y globulinas. Considerando esto, se tomó la concentración de proteína cuantificada por este método general como concentración de prolaminas. La concentración de prolamina extraída fue: centeno 4.6 mg mL^{-1} y avena 4.7 mg mL^{-1} .

La modificación de las partículas se hizo de la misma forma que en el caso del ensayo con la gliadina-PWG, enlazando covalentemente las proteínas extraídas a las partículas modificadas con grupos tosilo activados. La concentración de proteína para la modificación de las partículas fue de 20 µg/mL. El ensayo de interacción aptámero-proteína es análogo a los descritos anteriormente para el péptido 33-mer y la gliadina-PWG y esquematizado en la Figura 3-14.

En la Figura 3-21 se muestran las curvas de enlace de los aptámeros Gli 1, Gli 12, Gli 3 y Gli 4 a las prolaminas del centeno. Como puede observarse el aptámero Gli 12 no es capaz de reconocer este tipo de proteínas, mientras que el aptámero Gli 3 es el que manifiesta una mejor afinidad pues se necesitan menos cantidades del mismo para obtener una misma fracción enlazada a la proteína. El comportamiento de Gli 4 es intermedio y finalmente, y como se ha venido observando en los otros ensayos, la curva de enlace que se corresponde con la familia más numerosa está más desplazada hacia concentraciones mayores de aptámero, lo que indica una menor afinidad.

Puesto que el aptámero Gli 12 no es capaz de reconocer a las prolaminas del centeno, tóxicas para los celíacos, se descarta este aptámero para estudios posteriores.

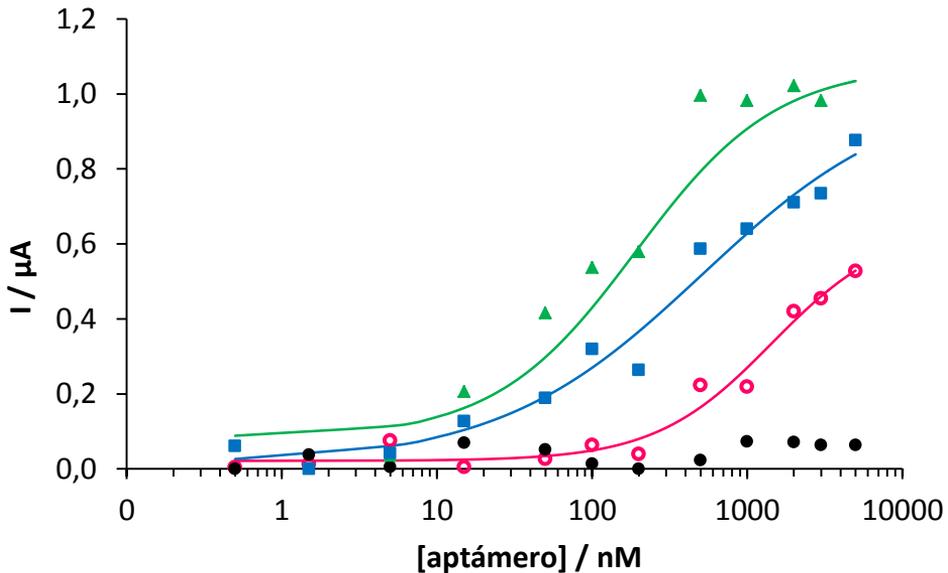


Figura 3-21: Curva de enlace de los aptámeros aptámero Gli 1 (rosa), Gli 12 (negro), Gli 3 (verde), Gli 4 (azul) a la prolamina del centeno.

Del mismo modo que se ha realizado el ensayo con la proteína proveniente del centeno, se verificó un ensayo empleando proteína extraída de la avena. Se sabe que la avena es una proteína fuente de controversia para los expertos en cuestión de si es o no tóxica para el enfermo celíaco. A la vista de este punto y conociendo que varios de los anticuerpos disponibles comercialmente no presentan reactividad con las proteínas de la avena, es interesante la determinación de la capacidad de enlace de los aptámeros en desarrollo en el presente trabajo por estas proteínas.

Tras la realización de los diferentes ensayos con los tres aptámeros, solo el aptámero Gli 4 permite la obtención de la curva de enlace con la proteína de la avena. En la Figura 3-22 se puede observar la curva de enlace obtenida para el aptámero Gli 4. Cabe destacar, que en este caso, a diferencia de lo obtenido para el PWG y para la proteína de centeno, las intensidades de corriente netas

son menores. También se puede apreciar que, a las concentraciones de ADN ensayadas, idénticas a las de estudios anteriores, no se alcanza la saturación. Sería necesaria una concentración de aptámero mucho mayor a la que se emplea para se produzca la ocupación de todos los sitios de unión disponibles. Esto es una indicación de que el reconocimiento de la avena por parte del aptámero Gli 4 se produce con menor afinidad que el enlace del mismo aptámero a las otras proteínas ensayadas. Este resultado no es inesperado puesto que como se ha comentado anteriormente, ni siquiera algunos de los anticuerpos disponibles comercialmente son capaces de reconocer a las proteínas de la avena. Esto es interesante debido a que disponemos de aptámeros que detectan avena (Gli 4) y otros que no la detectan (Gli 1 y Gli 3) lo que permitiría, en un ensayo con ambos tipos de aptámero, determinar la presencia/ausencia de avena.

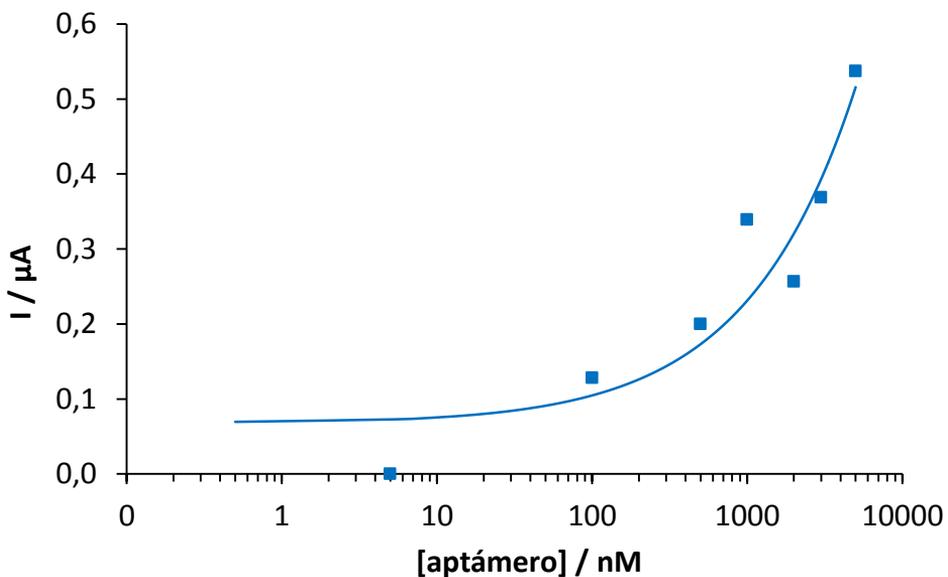


Figura 3-22: Curva de enlace de Gli 4 a la prolamina de avena.

En resumen, tras el cribado de los diferentes aptámeros se comprueba que todos ellos presentan afinidad contra el péptido 33-mer contra el que fueron seleccionados. Cuando se estudia el reconocimiento de la gliadina o diferentes proteínas alergénicas, solo dos de ellos no presentan afinidad suficiente para el diseño de un ensayo analítico. Es por esto por lo que se descartan los aptámeros Gli 12 y Gli sq04. Los resultados más prometedores son los obtenidos para el aptámero Gli 4, siendo del mismo modo interesante la caracterización de Gli 1, que se corresponde con el clon de la familia más numerosa.

4 Caracterización de la afinidad de los aptámeros seleccionados

4.1 Introducción

Con el objetivo de desarrollar herramientas analíticas para determinar gluten en alimentos empleando los aptámeros seleccionados como receptores selectivos de la proteína alergénica o sus fragmentos, es necesario caracterizar la interacción de afinidad que se produce entre ellos. El reconocimiento molecular entre el aptámero (apt) y el péptido 33-mer empleado en su selección o la proteína completa (diana, D) es un proceso reversible en el que pueden intervenir múltiples interacciones no covalentes como interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas.

En el caso más simple, la unión del aptámero al péptido, se puede asumir que el pequeño tamaño de este impedirá la unión de varias moléculas de aptámero. Por lo tanto, se puede representar esta interacción mediante el siguiente equilibrio: $\text{apt} + \text{D} \rightleftharpoons \text{apt} - \text{D}$

Este equilibrio viene descrito por la constante de equilibrio correspondiente, bien en forma de constante de asociación

$$K_A = \frac{[\text{apt} - \text{D}]_{\text{Eq}}}{[\text{apt}]_{\text{Eq}}[\text{D}]_{\text{Eq}}} \quad \text{Ecuación 4-1}$$

o como constante de disociación

$$K_D = \frac{[\text{apt}]_{\text{Eq}}[\text{D}]_{\text{Eq}}}{[\text{apt} - \text{D}]_{\text{Eq}}} = \frac{1}{K_A} \quad \text{Ecuación 4-2}$$

La constante de asociación, con dimensiones de inverso de concentración (M^{-1}) es una medida directa de la fuerza de la interacción; a mayor constante de asociación mayor afinidad de unión receptor-ligando. Por el contrario, la

constante de disociación, con unidades de concentración (M) es tanto menor cuanto mayor sea la afinidad de la interacción en estudio.

Una de las estrategias más comunes para medir la constante de afinidad es utilizar el modelo de equilibrio.

El protocolo experimental en este tipo de ensayos es muy simple. Se incuba una cantidad constante de uno de los componentes que interaccionan con cantidades crecientes del otro. Una vez que la reacción ha alcanzado el equilibrio se debe medir la concentración del complejo formado. Así si es el péptido el que se mantiene constante en el ensayo a un nivel de concentración $[D]_{Tot}$, considerando el balance de masa:

$$[D]_{Tot} = [D]_{Eq} + [apt - D]_{Eq} \quad \text{Ecuación 4-3}$$

Y sustituyendo $[D]_{Eq}$ en la expresión de la constante de afinidad (Ecuación 4-2) se puede obtener la relación:

$$[apt - D]_{Eq} = \frac{[apt]_{Eq} [D]_{Tot}}{[apt]_{Eq} + K_D} \quad \text{Ecuación 4-4}$$

De la misma forma si se mantiene constante la cantidad de aptámero $[apt]_{Tot}$ teniendo en cuenta que

$$[apt]_{Tot} = [apt]_{Eq} + [apt - D]_{Eq} \quad \text{Ecuación 4-5}$$

Se obtiene que:

$$[\text{apt} - \text{D}]_{\text{Eq}} = \frac{[\text{D}]_{\text{Eq}}[\text{apt}]_{\text{Tot}}}{[\text{D}]_{\text{Eq}} + K_{\text{D}}}$$

Ecuación 4-6

Ambas expresiones representan la isoterma de Langmuir. Si el ensayo se diseña convenientemente, empleando concentraciones de la especie que se varía (aptámero en el primer caso y péptido en el segundo) significativamente menor que K_{D} , se puede asumir que la concentración de dicha especie que permanece libre en el equilibrio no es significativamente diferente de la concentración inicial. Por tanto, la representación de la cantidad de complejo formado en el equilibrio frente a la concentración de la especie valorante adoptará la forma de una hipérbola rectangular y el ajuste no lineal de esta curva a las ecuaciones Ecuación 4-4 y Ecuación 4-6, permite obtener el valor de la constante de afinidad K_{D} . En este trabajo se ha optado por emplear diferentes técnicas que permiten medir la cantidad de complejo formado sin necesidad de llevar a cabo una separación de las fracciones enlazada y libre del aptámero o péptido una vez que la reacción ha alcanzado el equilibrio.

Entre estas, la calorimetría isotérmica de valoración es la técnica de elección si se pretende evaluar la afinidad de la interacción en disolución sin necesidad de marcar ninguno de los componentes que intervienen en la misma. Por otro lado, se prevé que el desarrollo de ensayos analíticos exigirá el uso de alguno de los dos reactivos: aptámero o péptido marcados o su inmovilización. Por esta razón se han seleccionado la espectroscopía de impedancia faradaica (FIS) y la espectroscopía de resonancia de plasmón de superficie (SPR) para evaluar si la afinidad de la interacción se ve alterada por la inmovilización de alguno de los componentes que participan en ella.

De igual modo se han empleado los datos obtenidos en la obtención de la curva de enlace, donde sí que se sigue un procedimiento que supone la separación de las fracciones libre y enlazada, para la evaluación de la influencia del marcaje del aptámero en la afinidad.

4.2 Determinación de la afinidad en disolución

Para obtener la constante de la reacción de reconocimiento entre los aptámeros Gli 1 y Gli 4 y el péptido 33-mer en disolución se empleó la calorimetría isotérmica de valoración (ITC por sus siglas en inglés) una técnica ampliamente empleada para la caracterización de interacciones entre biomoléculas [129]. Permite monitorizar las interacciones entre biomoléculas y obtener diferentes parámetros que caracterizan las uniones de afinidad midiendo el calor absorbido o liberado durante la reacción. Se ha descrito ampliamente en la bibliografía el empleo de medidas de ITC para caracterizar enlaces aptámero-ligando [130].

Mediante esta técnica es posible medir directamente constantes de disociación, K_D , desde 10^{-3} a 10^{-9} M. No es posible medir constantes de disociación cuyos valores se encuentra por debajo de 10^{-9} M debido a que la señal proporcionada por la fracción no enlazada estaría por debajo del ruido instrumental. Tampoco es posible la medida de afinidades más débiles, cuyas constantes de disociación se sitúen por encima de 10^{-3} M por el requerimiento de grandes cantidades de reactivos que conllevan problemas de solubilidad y/o disponibilidad.

La instrumentación requerida para un análisis por ITC es un calorímetro de flujo de calor que trabaja siguiendo el principio de compensación dinámica de la

potencia. Esto es, mide la potencia calorífica ($\mu\text{cal/s}$) que se necesita para mantener constante la diferencia de temperatura entre la celda de medida y la celda de referencia, siendo esta diferencia de temperatura próxima a cero. Inicialmente el sistema aplica una pequeña potencia a la celda de medida en la que se encuentra la especie valorada, lo que determina el nivel de la línea de base. Cada inyección de la disolución de valorante desde la jeringa, desencadena la reacción de reconocimiento molecular y, dependiendo de la afinidad y la concentración de los reactivos en la celda se forma una cierta cantidad de complejo de afinidad, aptámero-péptido en nuestro caso. La formación del complejo va acompañada de una liberación o de una absorción de calor que provoca una diferencia de temperatura entre las dos celdas. Para igualar la temperatura de las dos celdas el sistema requiere de la aplicación de una potencia calorífica para compensar la diferencia. Después de cada inyección el sistema vuelve a alcanzar el equilibrio térmico.

La señal obtenida, potencia calorífica, en cada inyección adopta la forma de un pico. Integrando el área bajo el pico y asumiendo la línea de base como referencia, se obtiene la cantidad de calor asociada a la inyección. El experimento, en el que se mide la interacción entre el ligando ensayado y su molécula diana constituye un sistema termodinámico cerrado.

Para cada inyección el calor absorbido o liberado viene dado por:

$$q = V \Delta H \Delta[D]_E$$

Donde V es el volumen de reacción, ΔH es el cambio de entalpía expresado en $\text{kcal} \times (\text{mol de ligando})^{-1}$ y $\Delta[D]_E$ en este caso, el péptido, es el cambio de la concentración de ligando enlazado, que suponiendo una estequiometría 1:1 se

correspondería con $\Delta[\text{apt} - \text{D}]$. La acumulación total de calor emitido o absorbido es:

$$Q = V\Delta H \sum \Delta[\text{apt} - \text{D}] = V\Delta H[\text{apt} - \text{D}] \quad \text{Ecuación 4-7}$$

Durante el experimento se mantiene constante la cantidad de aptámero en la celda de medida mientras que se añaden cantidades crecientes de péptido 33-mer desde la jeringa. El tampón que se emplea en el ensayo es el tampón de selección, BS. La concentración inicial de aptámero en la celda es de 33.4 μM y la concentración de péptido en la jeringa es de 338 μM . En la realización del experimento se hace una primera inyección de 4 μL de péptido seguida de 18 inyecciones de 15 μL , lo que da lugar a un incremento de su concentración en celda desde 0,95 μM hasta 59 μM . En el experimento de ITC se obtiene una línea de base estable cuando el contenido de la celda calorimétrica alcanza el equilibrio al ser la temperatura de la celda de medida y la de referencia igual. Es necesario que la concentración de péptido, cargado en la jeringa, sea mucho mayor que la de aptámero, situado en la celda calorimétrica, para poder variar la relación molar péptido/aptámero desde 0 hasta un valor superior a 1 para asegurar que todo el aptámero en la celda esté enlazado a péptido.

En cada caso se recalculan las concentraciones de aptámero y de péptido teniendo en cuenta la dilución que se produce tras la adición de cada una de las inyecciones. Se registra la potencia calorífica necesaria para mantener la diferencia de temperatura entre la celda de medida y la celda de referencia, obteniéndose las medidas que se pueden ver en el inserto la Figura 4-1 de potencia calorífica en función del tiempo para los experimentos realizados a

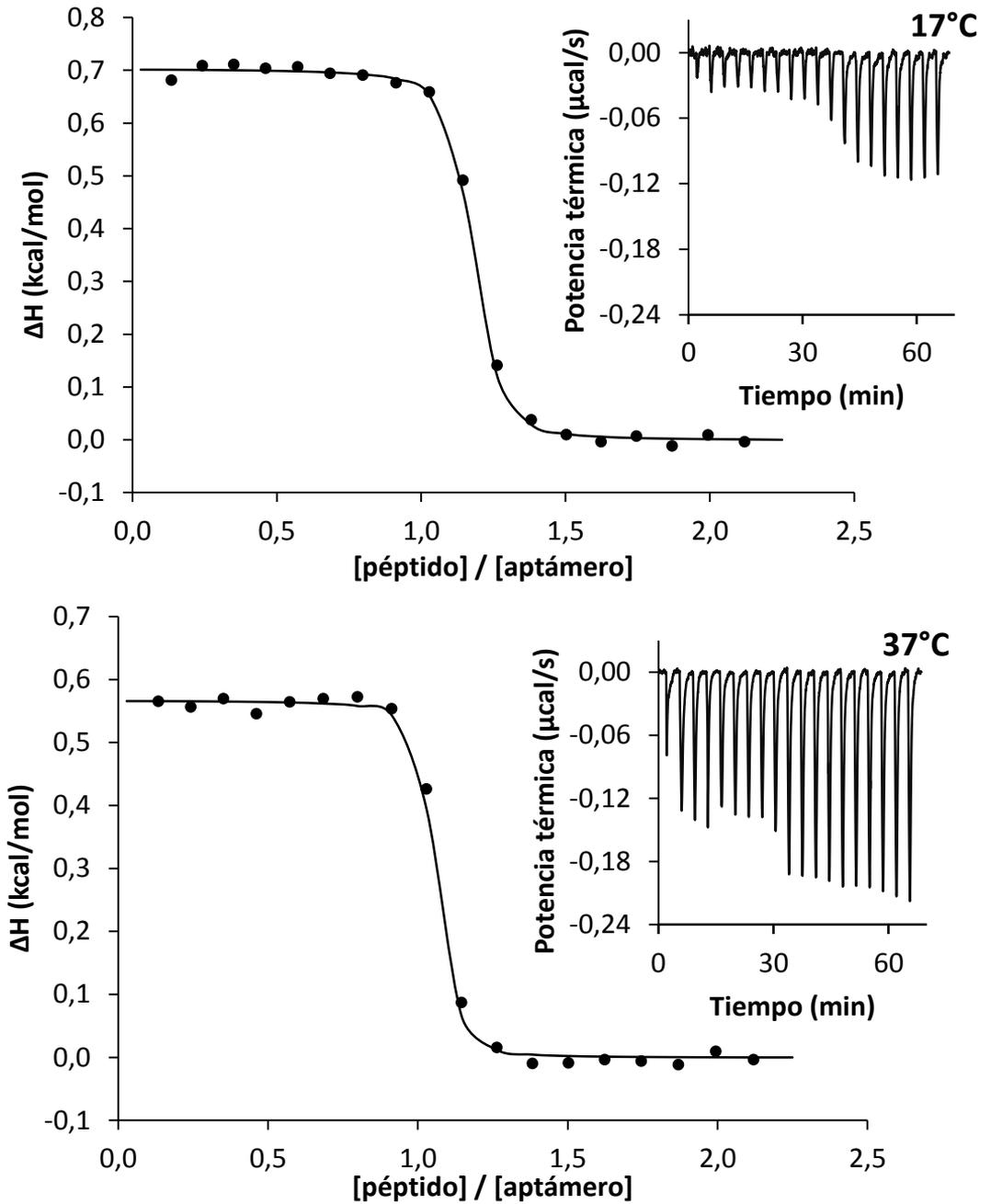


Figura 4-1: Curvas de ajuste del calor integrado para cada inyección en función de la relación molar, insertos medidas de ITC, potencia calorífica en función del tiempo para la reacción de reconocimiento péptido-Aptámero para el Gli 1.

17°C y a 37 °C. En el mismo gráfico se puede ver la representación de los datos de la entalpía, ΔH , en unidades de kcal/mol para cada inyección frente a la relación de concentraciones [péptido]/[aptámero], que se ajustan a un modelo de enlace, obteniéndose los parámetros de ajuste K_D y n (estequiometría de la reacción. Además teniendo en cuenta que $RT \ln K_D = \Delta H - T \Delta S$, se pueden también obtener los valores de ΔG y ΔS para la interacción estudiada. De esta forma se tiene que los datos termodinámicos para la unión péptido-ADN son los detallados en la **¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.**

El proceso es exotérmico y el área integrada bajo cada pico representa el calor liberado tras cada inyección de péptido en la celda. El cambio total de entalpía de la celda tras cada inyección se obtiene dividiendo el calor liberado para cada inyección entre el número de moles de ligando añadidos. Esta entalpía global está formada por dos componentes, la entalpía correspondiente a la dilución del péptido, al variar su concentración de la original en la jeringa a la final en la celda, y la entalpía correspondiente al enlace. La entalpía correspondiente a la dilución se obtiene cuando todo el aptámero en la celda ha sido saturado de péptido. En la Figura 4-2 se puede ver la entalpía total para el experimento realizado a 17°C. En las inyecciones con una relación molar superior a 1,4, se tiene todo el aptámero en la celda saturado de péptido y la entalpía de estas inyecciones se corresponde con la entalpía de dilución. El promedio de la entalpía de las últimas siete inyecciones es $\Delta H = -0.91 \pm 0.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ y se considera esta como una buena estimación de la entalpía de dilución.

Tabla 4-1: Datos termodinámicos de la unión péptido-Aptámero para el Gli 1 medidos por ITC.

	17°C	37°C
Cambio de energía libre de unión $\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K_b$	-9,75 kcal/mol	-10,6 kcal/mol
Cambio de entalpía de unión, ΔH	$0,70 \pm 0,01$ kcal/mol	$0,57 \pm 0,01$ kcal/mol
Cambio de entropía de unión, ΔS	36,0 cal/(K·mol)	37,4 cal/(K·mol)
n	$1,12 \pm 0,01$	$1,07 \pm 0,01$
Constante de disociación K_D	45 ± 10 nM	17 ± 6 nM

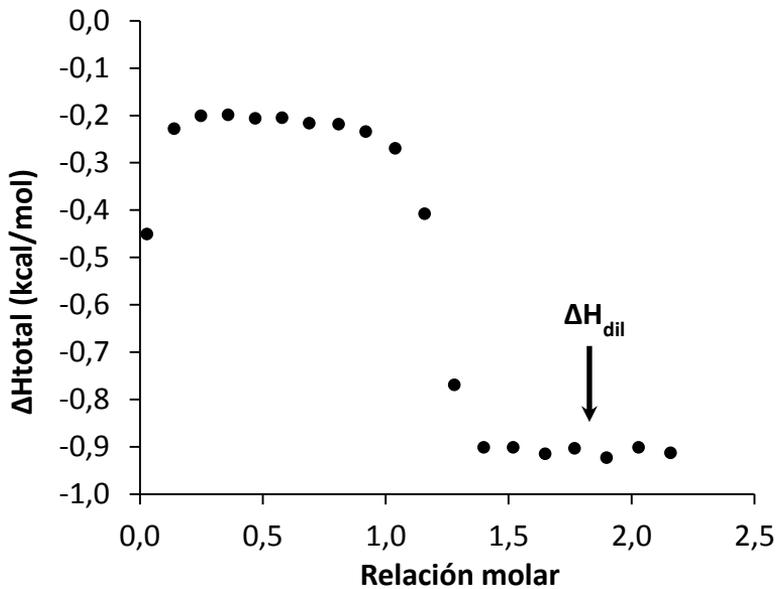


Figura 4-2: Entalpía total del experimento de ITC realizado a 17°C.

La interpretación de los datos de ΔH y de su dependencia con la temperatura es habitualmente cualitativa debido a las complejas contribuciones de los equilibrios adyacentes a la reacción de reconocimiento. Para que se dé lugar la reacción de afinidad pueden darse cambios en la estructura de cualquiera de las

especies implicadas que pueden ocasionar la modificación de varias propiedades fisicoquímicas.

El enlace aptámero-péptido está dominado por la entropía dado que se han medido entropías altas y positivas para los experimentos realizados a ambas temperaturas, mientras que la contribución de la entalpía es pequeña pero positiva. Esta contribución de la entalpía es desfavorable para el enlace. Este comportamiento termodinámico está habitualmente asociado al llamado efecto hidrofóbico, debido principalmente a una reorganización del disolvente. Las variaciones de la entropía relacionadas con la formación de un complejo ligando-diana tienen principalmente dos contribuciones: la reducción de grados de libertad de ambas moléculas, que es una contribución generalmente negativa y los efectos de solvatación [131]. Cuando una molécula hidrofóbica está involucrada, la hidratación es entrópicamente desfavorable debido a la ruptura de puentes de hidrógeno estables del agua y la formación de una capa de moléculas de agua alrededor de la molécula hidrófoba [132]. Esto conlleva una entropía desfavorable. Sin embargo, si en el enlace supone la retirada de grupos no polares del agua, el proceso de desolvatación puede contar con un cambio favorable en la entropía [131, 133]. Por lo tanto, un cambio positivo en la entropía es una evidencia de la liberación de moléculas de agua de solvatación desde la esfera de solvatación de la molécula hacia el seno de la disolución [134]. La capacidad calorífica despreciable obtenida minimiza el papel de las interacciones hidrofóbicas en el enlace aptámero-péptido.

Las interacciones de ADN dominadas por la entropía no son inusuales incluso para enlaces con agentes intercalantes, cuyas interacciones de apilamiento se

espera que contribuyan mayoritariamente a la entalpía de enlace con una entropía negativa [135]. Se ha descrito que la interacción de aptámeros con antibióticos [136, 137], adenosina [138] o L-tirosinamida [139] están controladas por cambios negativos en la entropía. De igual forma, la interacción de los aptámeros con la trombina [140], lisozima [118], y un péptido priónico [141] están también dominadas por la entropía. En el caso de la lisozima, este comportamiento está acompañado por un incremento de la constante de disociación con la temperatura, que se explica por una progresiva ruptura de la débil estructura secundaria del aptámero. En el caso del aptámero Gli 1, la estructura secundaria es muy débil a temperatura ambiente, pero se observa la tendencia opuesta.

Este mismo experimento se ha llevado a cabo también para el aptámero Gli 4. Sin embargo los resultados de ITC, que se pueden ver en la Figura 4-3. Realizando inyecciones de péptido en la celda, se mide una absorción de calor correspondiente a cada inyección que no varía con la relación molar aptámero/péptido. Estas medidas no hacen posible la obtención de la constante de disociación ni de ningún parámetro de enlace.

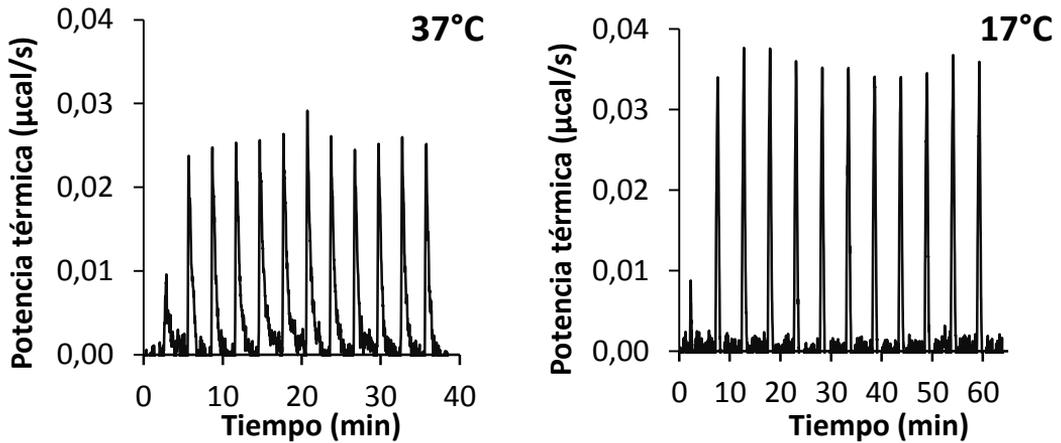


Figura 4-3: Medidas de calorimetría de valoración isotérmica para la interacción péptido 33-mer con el aptámero Gli 4

Las hebras de ADN del aptámero Gli 4 en disolución, presentes en la celda, pueden estar formando dúplex imperfectos pero termodinámicamente favorables. Así, las moléculas de aptámero estarían enlazadas entre sí por hibridación. Los parámetros para esta hibridación son los indicados en la Tabla 4-2.

Tabla 4-2: Características termodinámicas de la hibridación de dos hebras de aptámero Gli 4.

ΔG	ΔH	ΔS	T_m
-6,6 kcal/mol	-43,2 kcal/mol	-122,7 cal/(K·mol)	23,6°C

Donde T_m la temperatura de fusión del híbrido, que es aquella a la que la mitad de las hebras están en forma de dúplex. Al ser la temperatura de fusión de 23,6°C, a una temperatura inferior, más de la mitad de las hebras estarán hibridadas. Por ello, en el experimento a 17°C una mayoría de las secuencias de ADN en la celda estarían formando dúplex. De esta forma, al añadir el péptido 33-mer a la celda para que se produzca el reconocimiento deben deshibridarse los dúplex de Gli 4. Así se produciría la liberación/absorción de calor en varios

procesos simultáneos, siendo imposible la medida del proceso de unión aptámero-péptido.

Es llamativo el hecho de que no se pueda monitorizar el enlace del aptámero Gli 4 con el péptido en disolución teniendo en cuenta que es el que mejores características parecía tener atendiendo a los resultados de las curvas de enlace frente al péptido 33-mer inmovilizado en las partículas magnéticas realizadas en los ensayos de cribado.

4.3 Evaluación del efecto de la inmovilización sobre superficies en la afinidad

En el desarrollo de ensayos analíticos puede ser necesario inmovilizar uno de los dos reactivos que participa en la reacción sobre una superficie. La superficie puede provocar impedimentos estéricos que dificulten la unión, es decir, puede hacer disminuir la afinidad del receptor por el ligando. En los ensayos tipo sándwich se inmoviliza el receptor mientras que en los ensayos competitivos se inmoviliza la diana. Con el fin de evaluar la influencia de la inmovilización de ambas moléculas sobre la afinidad se deben emplear técnicas que no requieran el uso de marcas. Por ello, se emplean la espectroscopía de impedancia faradaica y la espectroscopía de resonancia de plasmón superficial.

4.3.1 Espectroscopía de impedancia faradaica

La espectroscopía de impedancia es una técnica electroquímica que estudia la respuesta del sistema a la aplicación de una corriente alterna periódica de pequeña amplitud a diferentes frecuencias. El análisis de la respuesta del

sistema proporciona información acerca de la interfase electródica, su estructura y las reacciones que tienen lugar en ella [142].

La impedancia se calcula como la relación entre las funciones voltaje $V(j\omega)$ del sistema y la función corriente $I(j\omega)$ generada por la perturbación del sistema por acción de la corriente alterna aplicada. La medida se puede llevar a cabo realizando empleando diferentes técnicas, una de las cuales utiliza un analizador de frecuencias de respuesta.

La impedancia de un sistema se describe como:

$$Z(j\omega) = \frac{V(j\omega)}{I(j\omega)} = Z_{re}(\omega) + jZ_{im}(\omega) \quad \text{Ecuación 4-8}$$

De esta forma se presenta la impedancia como suma de una parte real $Z_{re}(\omega)$ originada por la resistencia de la celda y una parte imaginaria $Z_{im}(\omega)$ originada por la capacitancia de la celda. Siendo en la Ecuación 4-9: $j = \sqrt{-1}$; $\omega = 2\pi f$ con unidades de rad/s y f , frecuencia de excitación, con unidades de Hz (s^{-1}).

Una celda electroquímica en la cual una especie en disolución sufre un proceso redox sobre la superficie de un electrodo sólido (reacción de transferencia electrónica heterogénea) puede modelizarse como el denominado circuito equivalente de Randles-Ershler [143] esquematizado en la Figura 4-4. La corriente total de la celda está formada por dos componentes que se suman: la corriente del proceso faradaico y la del proceso de carga de la doble capa. Por ello, ambos componentes están colocados en paralelo. La capacitancia de la doble capa está representada en la rama superior por C_{DC} , mientras que el proceso faradaico no puede representarse por un único elemento. El

tratamiento más simple de la impedancia faradaica consiste en separarla en dos contribuciones: la resistencia a la transferencia de carga (R_{TE}) y la impedancia general, también denominada impedancia de Warburg, Z_W , que es la resistencia a la transferencia de masa desde el seno de la disolución al electrodo. Como toda la corriente debe pasar a través de la disolución, la resistencia de la misma, R_D , se coloca en serie. En un electrodo modificado C_{DC} se representa como la capacitancia del electrodo no modificado y la capacitancia originada por la capa del modificador colocadas en serie. Si la superficie del electrodo es rugoso, C_{DC} no describe adecuadamente la capacitancia, por lo que se suele utilizar el denominado “elemento de fase constante” que refleja la heterogeneidad del electrodo y la desviación del modelo de Randles-Ershler. En cualquier caso cualquier modificador que actúe como aislante sobre la superficie electródica retardará la cinética de la transferencia electrónica e incrementará R_{TE} .

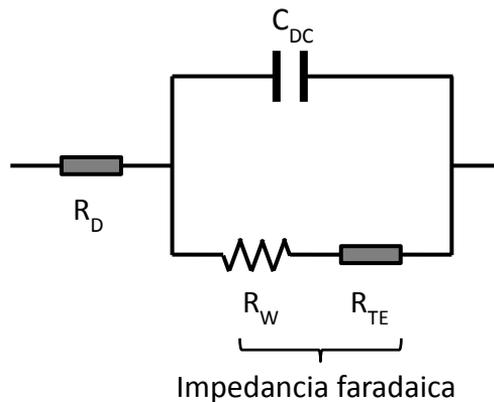


Figura 4-4: Circuito equivalente general

De esta forma, R_D y Z_W dependen de las propiedades de la disolución y no se ven afectadas por cambios en la interfase electroquímica. Sin embargo, C_{DC} y R_{TE} dependen de la naturaleza de la interfase electrodo electrolito.

Para la obtención de un espectro de impedancia se aplica un voltaje de corriente alterna a diferentes frecuencias y se mide la intensidad de la corriente alterna generada a las distintas frecuencias. Dividiendo V entre I se obtiene la impedancia a cada frecuencia. Como representación de la respuesta de estos experimentos de FIS se obtiene el diagrama de Nyquist que representa, la parte imaginaria de la impedancia $Z_{im}(\omega)$ como $(-Z'')$ frente a la parte real $Z_{re}(\omega)$ como (Z') obtenida a cada frecuencia aplicada.

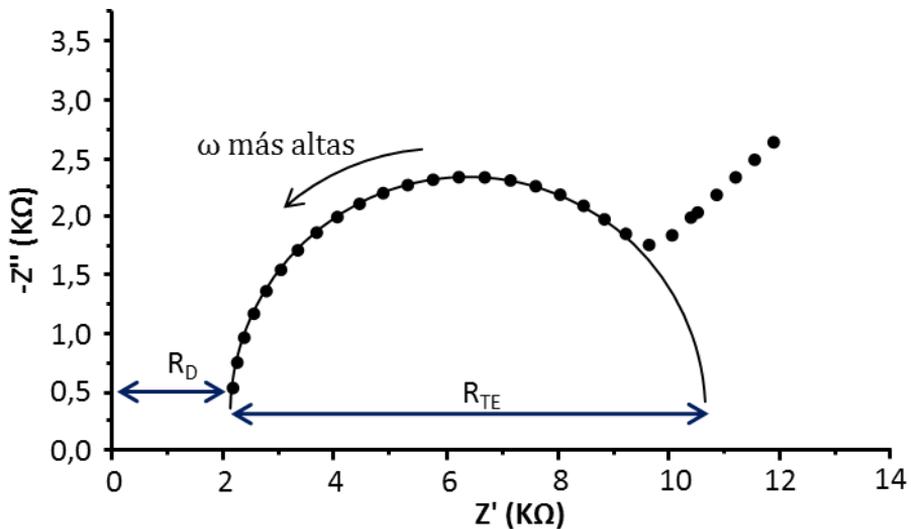


Figura 4-5: Diagrama de Nyquist.

En la Figura 4-5 se muestra un diagrama de Nyquist típico. Una desventaja de esta representación es que no refleja las frecuencias a las que se han obtenido los datos. El diagrama presenta dos regiones claramente diferenciadas. La parte

semicircular, obtenida a las frecuencias más altas, se corresponde con los procesos limitados por la velocidad de la transferencia electrónica. Del mismo modo, la parte lineal que característicamente se encuentra a menores frecuencias se corresponde con los procesos electroquímicos limitados por la difusión. Esto es así porque cuando se emplean altas frecuencias, la medida es tan rápida que la corriente medida es debida a los procesos de transferencia electrónica más rápidos. Cuando la frecuencia disminuye, el tiempo de medida se alarga, por lo que la transferencia electrónica es suficientemente rápida respecto al tiempo de medida y por tanto, deja de ser la etapa limitante de la reacción heterogénea. En este punto la reacción pasará a estar limitada por la difusión de las moléculas electroactivas desde el seno de la disolución al electrodo. El diámetro del semicírculo es igual a la resistencia de la transferencia electrónica, R_{TE} mientras que la intersección del semicírculo con el eje X a altas frecuencias se corresponde con la resistencia de la disolución R_D . Cuanto más aislada o bloqueada esté la superficie del electrodo, mayor será el diámetro del semicírculo, es decir R_{TE} .

La técnica de espectroscopía de impedancia faradaica (FIS por las siglas inglesas Faradaic Impedance Spectroscopy) aporta información acerca de los cambios ocurridos en la superficie electródica que produzcan un cambio en la resistencia a la transferencia electrónica de la misma en presencia de una especie electroactiva en el medio. Por ello se propone como técnica para estudiar la interacción aptámero-péptido.

Para esto, se modifica la superficie de electrodos de oro con el aptámero Gli 1, marcado en su extremo 5' con un tiol que permite la fijación de la hebra de

ADN tiolada sobre la superficie de oro por quimisorción y se hacen interaccionar con el péptido 33-mer en disolución. Al pH de medida (pH=7,4) se encuentra (7,4), el péptido neutro tal y como se puede ver en la Figura 4-6, obtenida empleando una herramienta informática disponible online que permite el cálculo de propiedades de péptidos a partir de su secuencia [144]. Debido a esto se espera que la unión del péptido a la superficie modificada con aptámero aumente la resistencia a la transferencia electrónica de una especie electroactiva, en este caso $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ un anión. Si estuviese cargado positivamente se esperaría el comportamiento contrario.

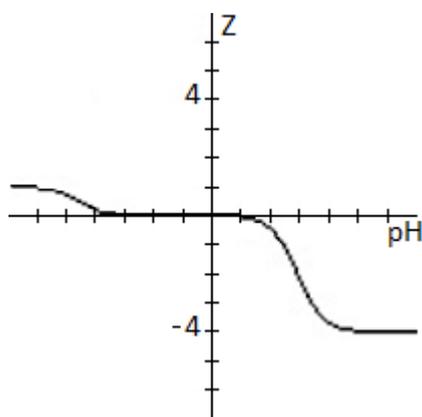


Figura 4-6: Representación de la carga neta (Z) frente al pH, para el péptido 33-mer.

La quimisorción de compuestos tiolados sobre oro conduce a la formación de monocapas autoensambladas (SAM por sus siglas en inglés, Self Assambled Monolayer). Sin embargo, si los compuestos tiolados están cargados, como en el caso del polianión ADN, no se forman verdaderas SAM, ya que no es posible alcanzar un empaquetamiento tan compacto como el logrado con cadenas hidrocarbonadas [145]. Por ello, la monocapa de ADN presenta regiones sin recubrir que pueden actuar como puntos de adsorción de moléculas en

disolución. Debido a esto, es necesario introducir una molécula pequeña tiolada para bloquear estos sitios de adsorción.

La introducción de un segundo reactivo tiolado que minimice adsorciones inespecíficas es necesaria y beneficiosa [146] porque el ADN puede enlazarse a la superficie por los átomos de nitrógeno de sus bases, dando como resultado que no se podría producir reconocimiento entre el aptámero y el péptido. El compuesto tiolado adicional desplaza estas interacciones débiles obligando al ADN a mantener una posición más vertical, favoreciendo su interacción con otras moléculas. Tarlov y col. propusieron el empleo de 6-mercapto-1-hexanol como reactivo tiolado secundario [146]. Aunque se han propuesto varias alternativas sigue siendo el más ampliamente utilizado. A pesar de los buenos resultados obtenidos con SAM binarias se ha comprobado que la construcción de monocapas de ADN de tres componentes en las que se inmoviliza, junto con una hebra de ADN, mercaptohexanol y un ditiol presentan aún menores adsorciones inespecíficas debido a un bloqueo más efectivo de la superficie [147]. Por ello se decidió emplear una monocapa ternaria para estudiar la interacción entre el aptámero y el péptido. El procedimiento empleado fue el siguiente:

1. Limpieza del electrodo. La formación del enlace azufre-oro, que da lugar a la monocapa autoensamblada, requiere que la superficie esté libre de materia orgánica e impurezas y lo menos rugosa posible para que no se vea afectada la reacción de quimisorción y la reproducibilidad de la SAM formada. Con este fin, se siguió un protocolo que elimina la materia orgánica de la superficie del oro sumergiendo los electrodos en disolución 1:3 de H_2O_2 y H_2SO_4 , disolución piraña

jaltamente corrosiva!, durante 10 minutos. Tras ese tiempo se lavaron con agua Milli-Q. Posteriormente, se pulieron los electrodos sobre alúmina de tres tamaños de partícula $1\mu\text{m}$; $0,5\mu\text{m}$, $0,03\mu\text{m}$. Se comenzó por la alúmina de mayor tamaño. Entre cada pulido los electrodos se lavaron con agua Milli-Q. Después de la última etapa de pulido los electrodos se sumergieron en agua Milli-Q y se trataron en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. Como paso final de limpieza química de la superficie se llevaron a cabo tratamientos alcalinos y ácidos de los electrodos, entre cada uno de las diferentes etapas los electrodos se lavaron con agua Milli-Q. Se sumergieron los electrodos en KOH 2 M a 60°C durante una hora en thermoblock. Finalmente se sumergieron en HNO_3 y luego en H_2SO_4 concentrados durante 10 minutos. Por último se procedió a la limpieza electroquímica de la superficie, paso que también permite comprobar el estado electroquímico de la misma. Para ello se llevaron a cabo 15 ciclos de potencial desde 0 a 1,6 V en H_2SO_4 0,1 M a una velocidad de barrido de 100 mV/s

2. Desprotección del aptámero tiolado. La secuencia de ADN correspondiente al aptámero Gli 1 se obtiene comercialmente sintetizada químicamente con la modificación requerida en el extremo 5'. Esta modificación se comercializa en forma de ditiol que ha de ser reducida previamente a su puesta en contacto con la superficie de oro. La secuencia de ADN es suministrada liofilizada. Tras su llegada se reconstituye en agua Milli-Q a una concentración de $50\mu\text{M}$. Se toman $900\mu\text{L}$ de la disolución de secuencia tiolada protegida con el ditiol, se le añaden $100\mu\text{L}$ de ditiotreitól 100 mM y se incuban en nevera a 4°C durante 18 horas. Tras este proceso el ditiol se encuentra ya reducido y es necesario separar la secuencia de ADN de los productos originados durante la reducción así como del exceso de ditiotreitól.

Para la separación se lleva a cabo una purificación de la secuencia de ADN en columnas de exclusión por tamaños NAP-10 de GE-Healthcare. La elución del ADN de la columna se lleva a cabo con agua Milli-Q y se comprueba la concentración llevando a cabo una medida espectrofotométrica a 260 nm. Tras esto la secuencia de ADN tiolada desprotegida se conserva alicuotada en el congelador a -20°C .

3. Los electrodos limpios se introdujeron en una disolución de 50 nM del ADN tiolado con 300 nM de hexanoditiol y se incubaron durante 16 horas con agitación. Tras esto, se lavaron con agua Milli-Q y se procedió al bloqueo de los sitios libres de la superficie mediante una incubación con mercaptohexanol en agua a concentración 1 mM durante 50 minutos. Tras este proceso los electrodos modificados con la monocapa ternaria se sumergieron en tampón BS y se conservaron en nevera hasta su uso.

Se realizaron medidas de impedancia previas a los ensayos de enlace. El medio de medida fue Tris HCl 10 mM de pH 7,4 con KCl 100 mM y 5 mM de una mezcla equimolar de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Las medidas se llevaron a cabo a 0,223 V, que es el potencial formal medido del par redox que permite monitorizar la resistencia al paso de los electrones de la superficie. El intervalo de frecuencias empleado fue: desde 10 KHz a 100 mHz y amplitud de tensión alterna superpuesta de 5 mV. Todas las medidas fueron realizadas a temperatura ambiente con la celda desoxigenada y protegida de la luz.

La impedancia de la monocapa ternaria fue enorme ($Z' > 400 \text{ k}\Omega$ a frecuencias bajas). No se pudo observar la semicircunferencia completa. Esto indica que la monocapa está muy bloqueada por lo que no es posible la realización del

ensayo, que implicaría un mayor aumento de la impedancia. Debido a esto se decidió trabajar con monocapas construidas solo con dos componentes.

Para ello, se inmovilizó en primer lugar el ADN tiolado y posteriormente se bloqueó la monocapa con mercaptohexanol. Se ensayaron dos procedimientos alternativos.

Inmovilización del ADN tiolado sobre la superficie de oro a potencial abierto con agitación, es el método más común. Para ello se sumergió el electrodo en una disolución de aptámero tiolado de concentración 500 nM en tampón de ensayo BS y se incubó bajo agitación durante 16 horas. Posteriormente se lavó con agua milli-Q y se bloqueó la superficie incubando con mercaptohexanol en agua a concentración 1 mM durante 50 minutos. Tras este proceso los electrodos modificados con la monocapa binaria se sumergieron en tampón BS y se conservaron en nevera.

Para medir la formación del complejo aptámero-péptido se sumergió el electrodo en una disolución de 100 nM de péptido 33-mer en BS, con agitación y se dejó interactuar 5 minutos. Tras esto se lavó el electrodo con BS, se introdujo en la disolución de medida y se mide la impedancia del electrodo tras la interacción.

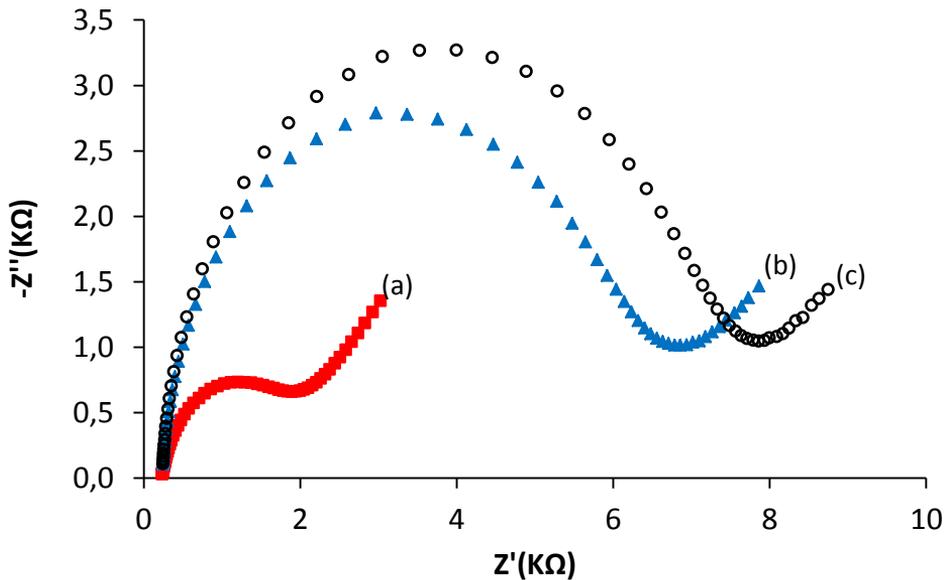


Figura 4-7. Espectros de impedancia de: (a) Oro limpio; (b) Monocapa; (c) Interacción 5 min con péptido para monocapa binaria

Como se puede ver en la Figura 4-7, la formación de la monocapa, así como la interacción con el péptido producen un incremento de la resistencia al paso de electrones hacia el electrodo. La resistencia del electrodo de oro se ve incrementada por la modificación del mismo al estar en la superficie presentes el aptámero tiolado, que es una especie cargada negativamente y el mercaptohexanol, que es una especie neutra que actúa únicamente como bloqueante. Tras la interacción con el péptido también se produce un aumento de la resistencia debido al enlace del mismo al aptámero presente en la superficie.

La formación de la monocapa a potencial abierto es un proceso largo, por esto, se plantea la posibilidad de reducir este tiempo de modificación empleando una estrategia en la que el aptámero se deposita en la superficie mediante la

aplicación de un potencial al electrodo. Este protocolo experimental ha sido empleado previamente por nuestro grupo de investigación [148] obteniéndose resultados asimilables a los que proporciona la modificación a potencial abierto pero de forma mucho más rápida. Para ello se procedió a la reducción electroquímica de la superficie del oro, aplicando durante 5 minutos un potencial de + 0,3 V en SSPE 2x; posteriormente se formó la monocapa con el ADN tiolado poniendo en contacto el electrodo con una disolución de 200 nM de ADN tiolado en el mismo tampón y aplicando durante 5 minutos un potencial de +0,4 V. Finalmente el electrodo se lavó con agua milli-Q y se bloqueó la superficie incubando con mercaptohexanol en agua a concentración 1 mM durante 50 minutos. Tras este proceso los electrodos modificados con la monocapa binaria se sumergieron en tampón BS y se conservaron en nevera.

Para poder comparar los resultados obtenidos con ambos procedimientos se expresó el cambio de R_{TE} como:

$$\% \Delta R_{TE} = \frac{R_{TE}(m) - R_{TE}(i)}{R_{TE}(i)} \times 100$$

Siendo $R_{TE}(m)$ la resistencia a la transferencia electrónica de la medida y $R_{TE}(i)$ la resistencia a la transferencia electrónica inicial. Esto es necesario debido a que, incluso teniendo las mayores precauciones en la preparación de las monocapas, los valores de R_{TE} iniciales varían mucho. Estas variaciones se corrigen mediante la normalización descrita.

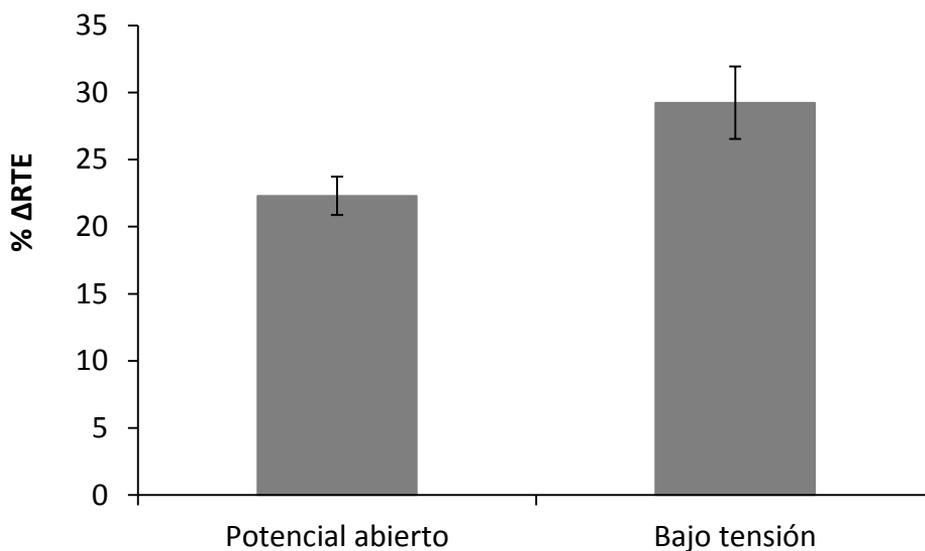


Figura 4-8: % de ΔR_{TE} para los electrodos modificados con monocapa binaria a potencial abierto o bajo tensión, después de la interacción durante 15 minutos con 100 nM de péptido.

En la Figura 4-8 se comprueba que los electrodos modificados con ambos protocolos son equivalentes comparando el % ΔR_{TE} obtenido para cada uno de ellos interaccionando con 100 nM de péptido durante 15 minutos. Por esto se opta por el protocolo de inmovilización de la sonda tiolada bajo tensión dado que aporta la ventaja del ahorro de tiempo.

Dado que la impedancia detecta cambios en la superficie del electrodo, interacciones inespecíficas en la misma proporcionarían señales medibles. Para comprobar que las medidas son específicas se llevaron a cabo una serie de pruebas con diferentes superficies modificadas. Se prepararon las siguientes superficies:

1. Oro limpio.

2. Monocapa de mercaptohexanol.
3. Monocapa de una hebra de ADN tiolado no aptamérica. La secuencia es AGT CAA CCA GTA TTA TCT GAC CGT CCC A y se inmovilizó en la misma concentración siguiendo el mismo procedimiento.

Todas ellas se hicieron reaccionar con el péptido 100 nM durante 15 min.

Adicionalmente se preparó una monocapa de aptámero y mercaptohexanol y se incubó con un péptido diferente al péptido diana, concretamente el péptido control.

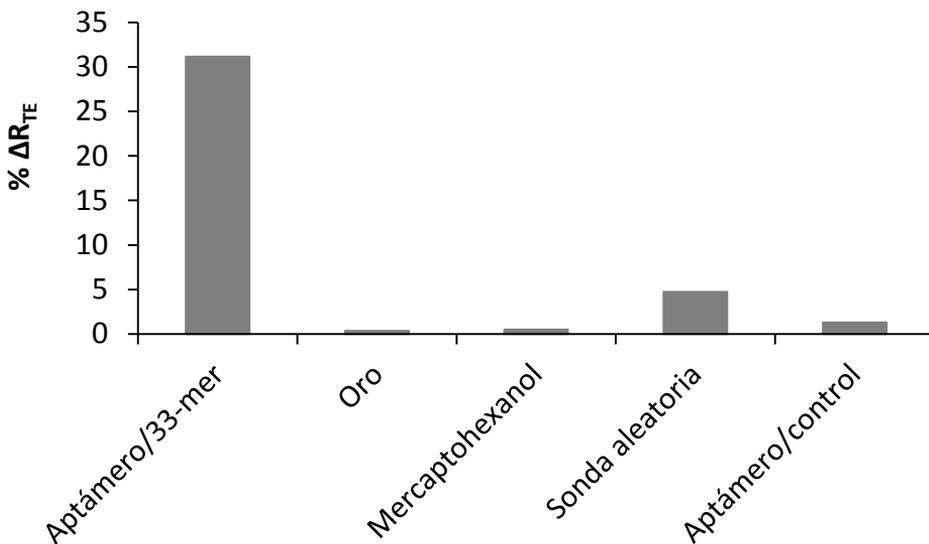


Figura 4-9: % ΔR_{TE} de las diferentes monocapas blanco a la interacción con péptido 100 nM durante 15 minutos

En la Figura 4-9 se pueden observar los incrementos de R_{TE} en % obtenidos en todos los casos. La variación de R_{TE} es prácticamente nula en todos los casos y siempre muy inferior a la obtenida con la monocapa de

aptámero+mercaptohexanol. Además el aptámero no reconoce al péptido control. A la vista de estos datos se puede concluir que la monocapa construida empleando el aptámero Gli 1 y bloqueada con mercaptohexanol proporciona unas medidas específicas que responden a la interacción aptámero-péptido y que permiten monitorizar el seguimiento de la reacción de interacción. De esta forma la señal es una medida de la extensión de la formación del complejo aptámero-péptido en la superficie del electrodo.

Las medidas de FIS a diferentes tiempos de incubación permiten obtener la curva cinética de asociación, Los valores de equilibrio obtenidos son una medida de la cantidad de complejo aptámero-péptido formado en superficie. Si se representa R_{TE} en el equilibrio en % se obtiene una medida de la fracción de péptido enlazado. La ecuación de Langmuir (Ecuación 4-6) relaciona la fracción de ligando enlazada, en este caso péptido, con la fracción libre. Esta expresión permite obtener el valor de la K_D . Se decidió calcular de esta forma la K_D . Para ello se preparó un electrodo con la SAM binaria y se introdujo en una disolución de 33-mer en BS de concentración 500 nM y se realizó un espectro de impedancia a diferentes tiempos de incubación. En la Figura 4-10 se representan las curvas de Nyquist en las que se aprecia el aumento de la impedancia en función del tiempo de interacción con el péptido.

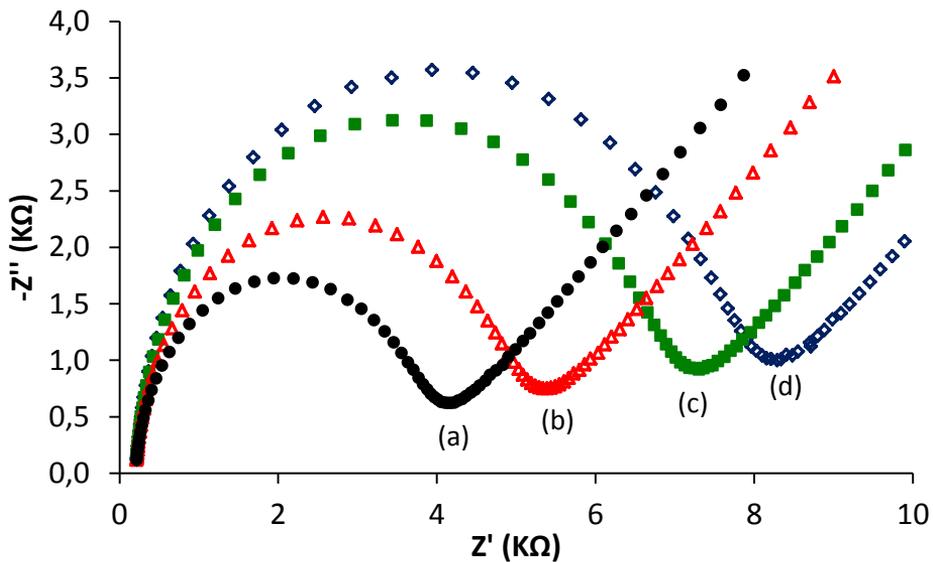


Figura 4-10. Espectros de impedancia de la interacción del péptido a concentración 500 nM con el electrodo modificado con una monocapa binaria a distintos tiempos: (a) inicial; (b) 1 minuto; (c) 10 minutos; (d) 20 minutos

Para medir el cambio de impedancia a otra concentración se procedió incubando en HCl 50 mM en intervalos de tiempo de 2 minutos y se registró la impedancia tras cada incubación hasta que la resistencia se estabilizó y recuperó su valor inicial. Sin embargo la regeneración de la superficie no se produjo de forma completa como se puede observar en la Figura 4-11. El incremento de R_{TE} de un electrodo al interactuar con 500 nM de péptido durante 20 minutos es del 40% y la señal tras la regeneración es de aproximadamente la mitad.

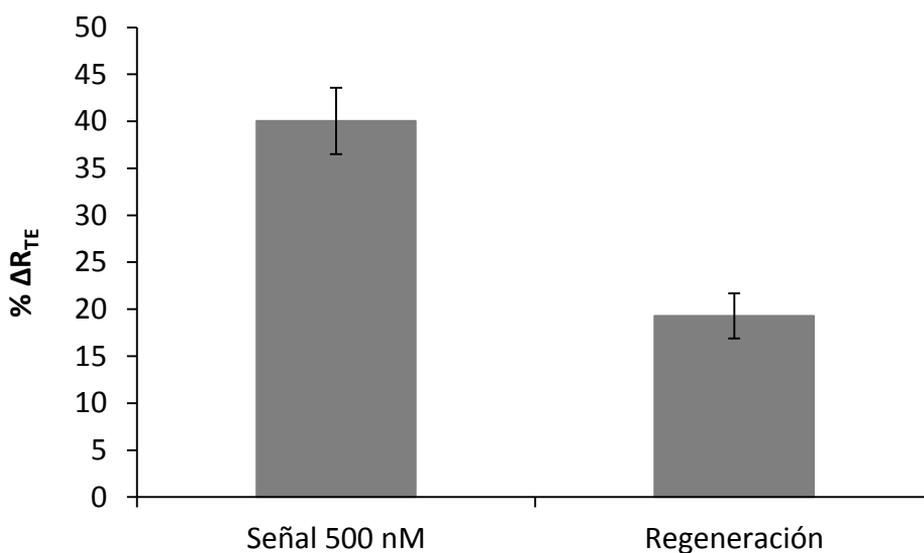


Figura 4-11: % ΔR_{TE} correspondiente a la interacción con 500 nM de péptido y posterior regeneración de un electrodo.

La imposibilidad de regenerar completamente la superficie del electrodo indica que no se disocian completamente todos los enlaces de afinidad aptámero-péptido formados. De esta forma, en una segunda incubación con otra concentración no se obtiene la misma resistencia de partida teniendo entonces que no se dispone de la misma cantidad de sitios de unión del aptámero libres en la superficie por lo que no es posible obtener la isoterma de Langmuir de esta forma. Se ha descrito en la bibliografía la realización de etapas de incubación con concentraciones crecientes de la especie en disolución sin etapas de regeneración intermedias [149]. De este modo se obtiene una valoración del aptámero con el péptido. En la Figura 4-12 se muestra un ejemplo de este tipo de experimentos. Para cada concentración se obtiene un valor de equilibrio tras 15-20 min que se emplea para llevar a cabo el cálculo de la constante de afinidad.

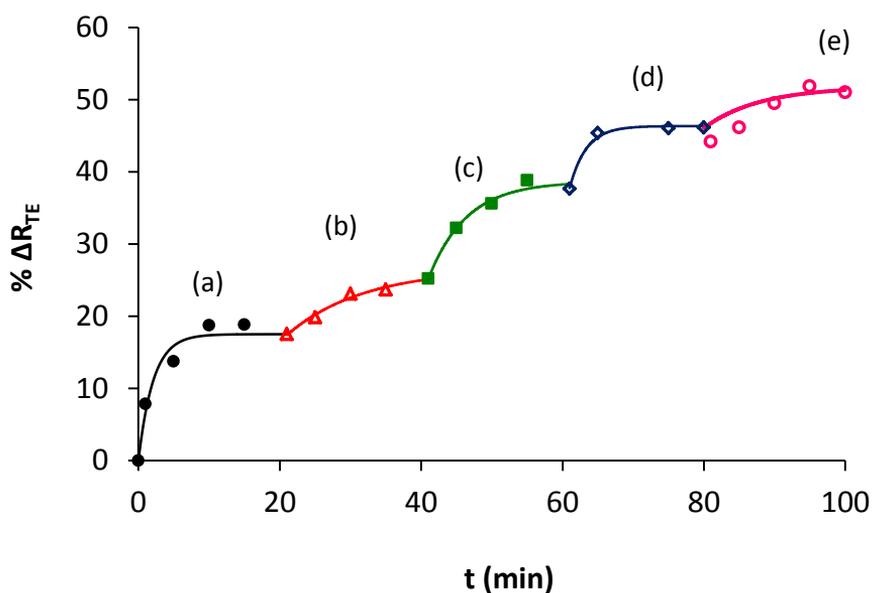


Figura 4-12: Representación del incremento de ΔR_{TE} frente al tiempo. Interacciones con (a) 50 nM; (b) 100 nM; (c) 200 nM; (d) 300 nM; (e) 400 nM de péptido 33-mer en disolución.

Los datos de cada concentración se ajustaron a una función exponencial obteniéndose de esta forma el incremento de R_{TE} de equilibrio para cada concentración, que se representó frente a la concentración de péptido en cada caso trazándose así la isoterma de Langmuir para cada experimento. Los valores representados son la media de cuatro réplicas. La representación de Langmuir requiere conocer la fracción libre de péptido. Una monocapa de ADN típica contiene aproximadamente 10^{12} moléculas/cm², lo que supone unos 30 fmol de aptámero. Para una concentración de péptido de 100 nM y un volumen de 1 mL, la cantidad de péptido, 100 pmol, es muy superior a la de aptámero por lo que $[Péptido]_{inicial} = [Péptido]_{libre}$.

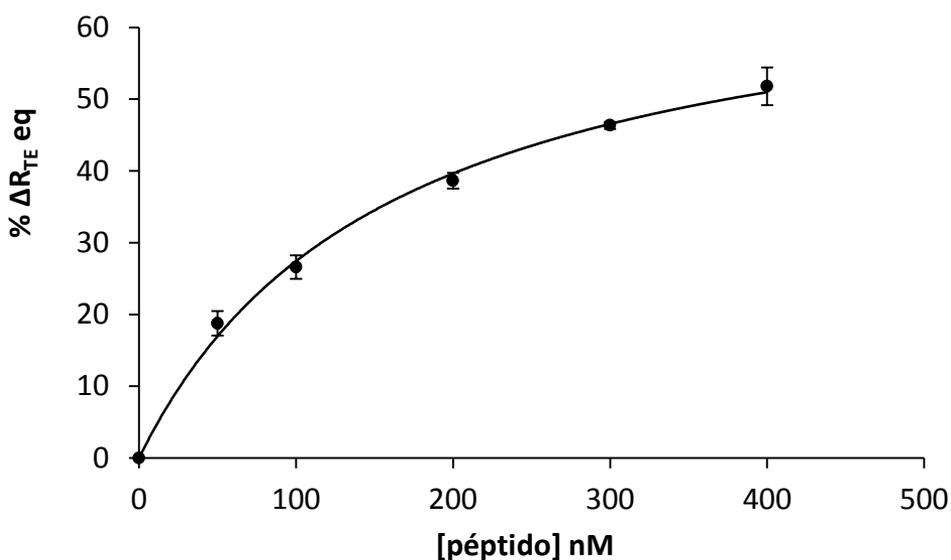


Figura 4-13. Representación de la Isoterma de Langmuir para la valoración de la afinidad.

En la Figura 4-13 se puede ver la isoterma de Langmuir para uno de los experimentos de valoración de la afinidad. Estos datos se ajustan a la isoterma de Langmuir, de donde se obtiene la constante de afinidad. Los parámetros de ajuste a las isotermas de Langmuir de los diferentes experimentos se muestran en la Tabla 4-3. El valor promedio de la constante de afinidad es 98 ± 48 nM, valor superior al calculado por ITC a 25°C (~ 29 nM). Esto indica que la inmovilización del aptámero por su extremo 5' disminuye la afinidad por el péptido probablemente debido a impedimentos estéricos por la proximidad de la superficie.

Tabla 4-3: Parámetros de ajuste a la isoterma de Langmuir para los experimentos de EIS

K_D (nM)	$\% \Delta R_{TEmax}$	r^2
160 ± 18	71 ± 3	0,997
41 ± 11	72 ± 5	0,987
100 ± 6	14 ± 1	0,999
90 ± 18	64 ± 4	0,992

4.3.2 Espectroscopía de resonancia de plasmón superficial

Un plasmón superficial es la partícula asociada a una onda de densidad de carga superficial en la superficie de un metal que se describe como una onda polarizada cuyo vector de campo magnético es perpendicular a la dirección de propagación. Esta onda se genera cuando un haz de luz polarizada incide sobre una capa fina de metal (generalmente oro o plata) que se encuentra en la interfase entre dos medios: uno, del que procede la luz con un índice de refracción n_1 y otro al que se desplaza la luz con un índice de refracción n_2 , siendo $n_1 > n_2$ con un ángulo superior al crítico. La luz incidente se refleja por completo (reflexión interna total) salvo a un determinado ángulo de incidencia para el que se observa una pérdida de reflectividad. Esto es debido a que los fotones reflejados generan una onda evanescente paralela a la superficie cuya amplitud decae exponencialmente en la dirección perpendicular a la superficie. A un determinado ángulo de incidencia y para longitudes de onda que difieren según el metal, la energía de los fotones coincide con la de los electrones libres del metal produciéndose una transferencia de energía entre ambos (resonancia) y esa radiación no se refleja.

La constante de propagación de la onda evanescente desde un metal hasta un dieléctrico viene dada por la Ecuación 4-9. Donde ω es la frecuencia angular de

la onda, c es la velocidad de la luz en el vacío, ϵ_m y ϵ_d son la permitividad del metal y del dieléctrico al que se desplaza la onda, respectivamente

$$\beta = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}}$$

Ecuación 4-9

La parte real de la ecuación anterior determina la longitud de onda de la onda evanescente, mientras que la parte imaginaria determina la penetración de la misma en el dieléctrico de estudio. Como la penetración es muy pequeña, este fenómeno sólo se observa en capas muy finas (nm).

La resonancia de plasmón superficial es experimentalmente observable como un mínimo en la reflectancia de la luz incidente al variar el ángulo de incidencia. El ángulo de resonancia es muy sensible a las variaciones del índice de refracción del medio en contacto con el metal. Debido a esto, cualquier cambio en la superficie metálica o sus proximidades producirá un cambio en el ángulo de resonancia observable lo que permite monitorizar eventos de reconocimiento entre una molécula unida a la superficie y otra en disolución.

La aplicación de la espectrometría de plasmón superficial se empezó a desarrollar a finales de la década de 1970 siendo empleada para la caracterización de películas delgadas [150] o para la monitorización de procesos que ocurren en la interfase del metal [151]. La potencia de la técnica para su aplicación en biosensores fue demostrada por Liedberg y Nylander en la década de 1980 [152, 153] en primer término para la detección de gases.

En el presente trabajo se emplea un dispositivo comercial cuyo esquema se puede ver en la Figura 4-14. El dispositivo consta de un prisma de cuarzo sobre el que se coloca un sensor con una película de oro. Para que la luz no se desvíe antes de incidir sobre el metal, el contacto entre el prisma y el sensor se realiza con un aceite de n coincidente con ambos.

Sobre el sensor recubierto con el oro se forma la cubeta de medida, donde se llevan a cabo las interacciones con diferentes disoluciones tanto para la modificación de la superficie como para llevar a cabo los ensayos que conduzcan a las medidas para la monitorización de la reacción de reconocimiento péptido-ADN. El equipo empleado posee dos celdas de medida simultánea, es programable y cuenta con un auto-inyector que permite la realización de los experimentos, incluyendo las etapas de lavado de forma automática.

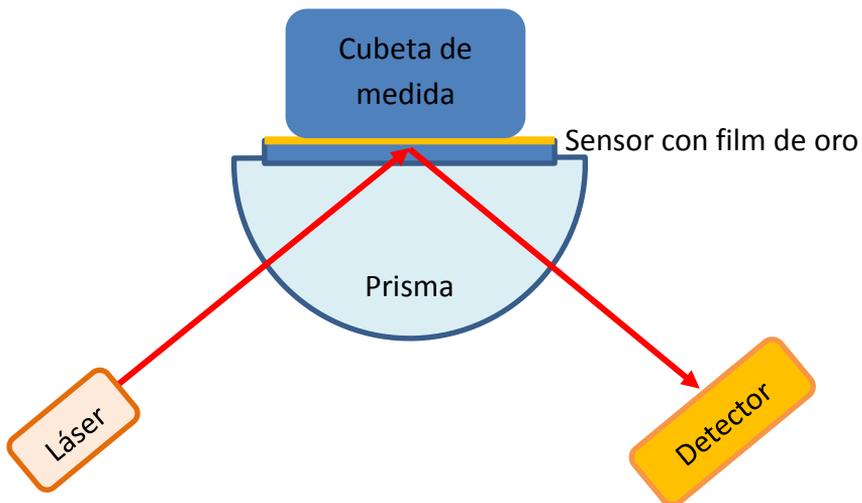


Figura 4-14: Esquema del dispositivo de medida SPR basado en el modelo de Kerstchmann.

Existen varias formas experimentales para medir las variaciones del índice de refracción del medio en contacto con el metal que producen cambio en la condición de resonancia que se debe cumplir para observar el fenómeno de resonancia del plasmón superficial. Si se fija el ángulo de incidencia, se utiliza un haz de luz policromática. Solamente a una longitud de onda determinada, se producirá la resonancia y ésta variará con el índice de refracción de la interfase metal-disolución. Si se fija la longitud de onda, se utiliza un haz de luz monocromática; en este caso la condición de resonancia se producirá a un ángulo de incidencia determinado, que dependerá del índice de refracción del medio en contacto con el metal. En el presente trabajo se emplea un equipamiento que mide el ángulo al que se produce la reflectividad mínima con respecto al tiempo, el equipo fabricado por Autolab que se puede ver en la Figura 4-15.

Se trata de un equipo en el que los diferentes reactivos y tampones que se emplean son suministrados a la cubeta bien por medio de un sistema de bombas peristálticas o bien son inyectados por medio de unas agujas acopladas a unas bombas de jeringa. Estas agujas permiten tanto la inyección de las disoluciones en la cubeta como la agitación durante el proceso de medida.

El equipo se encuentra conectado y controlado por un ordenador equipado con el software que suministra el fabricante para llevar a cabo la automatización, la medida y tratamiento de las señales obtenidas. Una vez colocado el cristal sobre el prisma y cerrado el equipo, las celdas de medida quedan delimitadas sobre el cristal y se procede a llevar a cabo las modificaciones e interacciones para la caracterización de la reacción de afinidad que se quiere estudiar. De

esta forma se monitoriza el paso de la especie en disolución a estar unida a la superficie mediante el enlace de afinidad que se quiere analizar. Este paso produce un cambio medible en la señal de SPR.

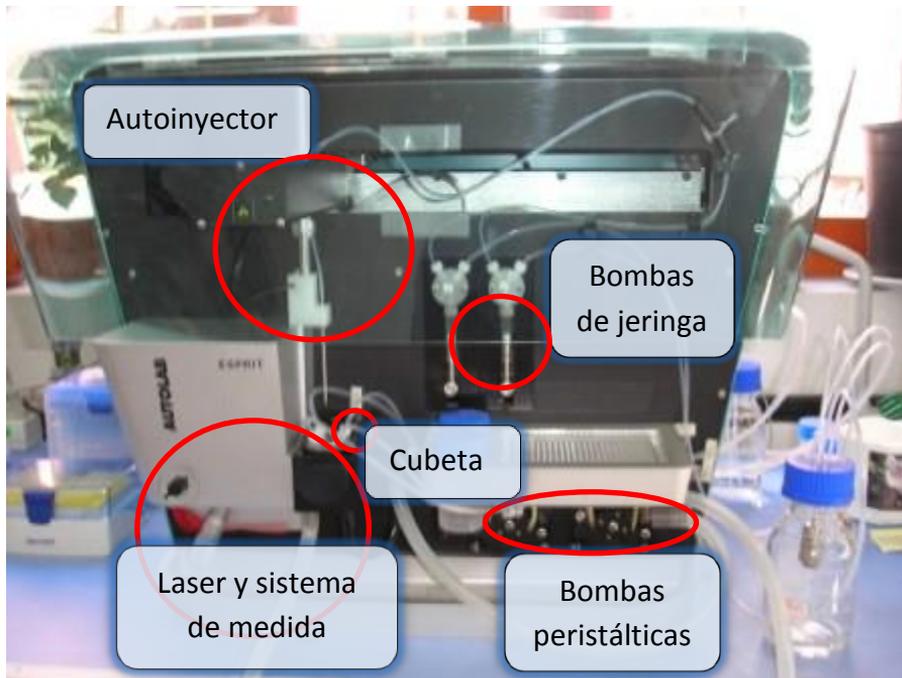


Figura 4-15: Equipo de medida SPR empleado

Habitualmente se inmoviliza sobre la superficie la molécula más pesada para evitar efectos de transporte de materia de la misma desde la disolución hacia la superficie que distorsionarían las medidas. En estos casos la cinética dominante sería la de transporte de masa que enmascararía la cinética de enlace. El hecho de inmovilizar la molécula mayor puede tener un efecto negativo si la especie en disolución es demasiado pequeña, puesto que el cambio de la señal de SPR es directamente proporcional a la masa de la molécula que se va desplazando de la disolución a la superficie, uniéndose a la especie inmovilizada. Si esta

masa es baja se producen señales demasiado pequeñas, lo que imposibilita la medida.

Los sensores con el film de oro se encuentran disponibles en el mercado tanto con el oro desnudo como modificado. Estas modificaciones suelen constar de un polímero de diferentes espesores y funcionalizaciones depositado sobre la superficie de la película de oro. El SPR se emplea muy frecuentemente en la monitorización del enlace de afinidad, siendo utilizados para la obtención de las constantes de afinidad aptámero-diana [154]. Por ello se empleó esta técnica para evaluar la unión aptámero-péptido.

Inicialmente se decidió emplear superficies de oro modificadas con polímero entrecruzados que contienen grupos carboxílicos. Se proponen dos estrategias alternativas (Figura 4-16):

- a) Inmovilización de gliadina covalentemente.
- b) Unión covalente de estreptavidina y posterior enlace de aptámero o péptido biotinilado.

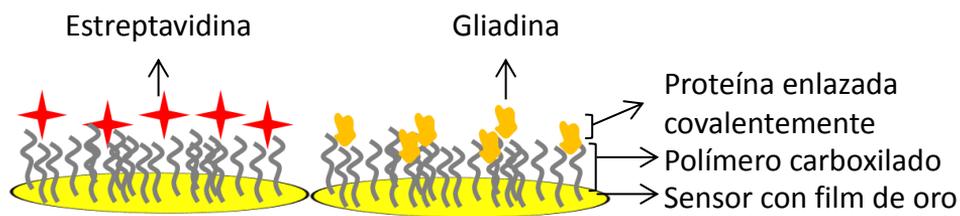


Figura 4-16: Esquema de la modificación de los sensores de SPR que tiene un polímero carboxilado en su superficie con gliadina y estreptavidina enlazada covalentemente.

En cualquier caso, es necesario realizar un acondicionamiento de la superficie. Para ello se alternó un tampón de acondicionamiento: HEPES 10 mM, AEDT 3 mM, NaCl 150 mM y Tween-20 0,005 %, durante 5 min con HCl 50 mM durante 60 segundos hasta obtener una línea de base estable en el tampón de acondicionamiento. El objetivo de este procedimiento es hidratar la superficie y eliminar los conservantes que están presentes en la matriz del polímero.

En su superficie se enlazó proteína covalentemente (gliadina o estreptavidina) empleando para ello la reacción de la carbodiimida que permite que los grupos amino de la proteína se enlacen a los grupos carboxilo disponibles en el polímero que recubre el sensor. Para ello se completó el siguiente protocolo:

- 1) Inyecciones sucesivas de una mezcla de N-hidroxisuccinimida (NHS) 200 nM y de etil-(dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) 50 nM en agua durante 5 min. Estos reactivos activan los grupos carboxilo que se han introducido en la superficie del cristal. (Figura 4-17, etapa 1)
- 2) Lavado de la cubeta para eliminar los reactivos de activación, inyecciones sucesivas de agua durante 5 min. Es necesario eliminar los reactivos de activación de los grupos carboxílicos debido a que la molécula que se quiere fijar a la superficie es una proteína, que presenta tanto grupos amino como grupos carboxílicos que en presencia de NHS y EDC pueden dar lugar a entrecruzamientos indeseados. (Figura 4-17, etapa 2)
- 3) Interacción con proteína, tres inyecciones de 50 µg/mL de la proteína seleccionada en el tampón adecuado durante 20 min. Para la modificación con estreptavidina, esta se prepara en tampón de acetato de sodio 10 mM de pH 4,5 y en el caso de la gliadina se introduce en tampón de HEPES 10 mM de pH

7,6. El pH del tampón de interacción es crucial, para eliminar repulsiones entre la superficie y la proteína. De esta forma se favorece el acercamiento de la proteína a la superficie y la formación del enlace amida entre los grupos amino de la misma y los grupos carboxilo activados de la superficie. (Figura 4-17, etapa 3)

4) Lavado de la cubeta para eliminar la proteína no enlazada, inyecciones sucesivas de agua durante 10 min. (Figura 4-17, etapa 4)

5) Bloqueo con etanolamina 1 M de los grupos carboxilo que no han reaccionado durante 30 min. La etanolamina forma un enlace amida con los grupos carboxilo que han sido activados en la superficie pero que, sin embargo, no han reaccionado con grupos amina de la proteína. (Figura 4-17, etapa 5)

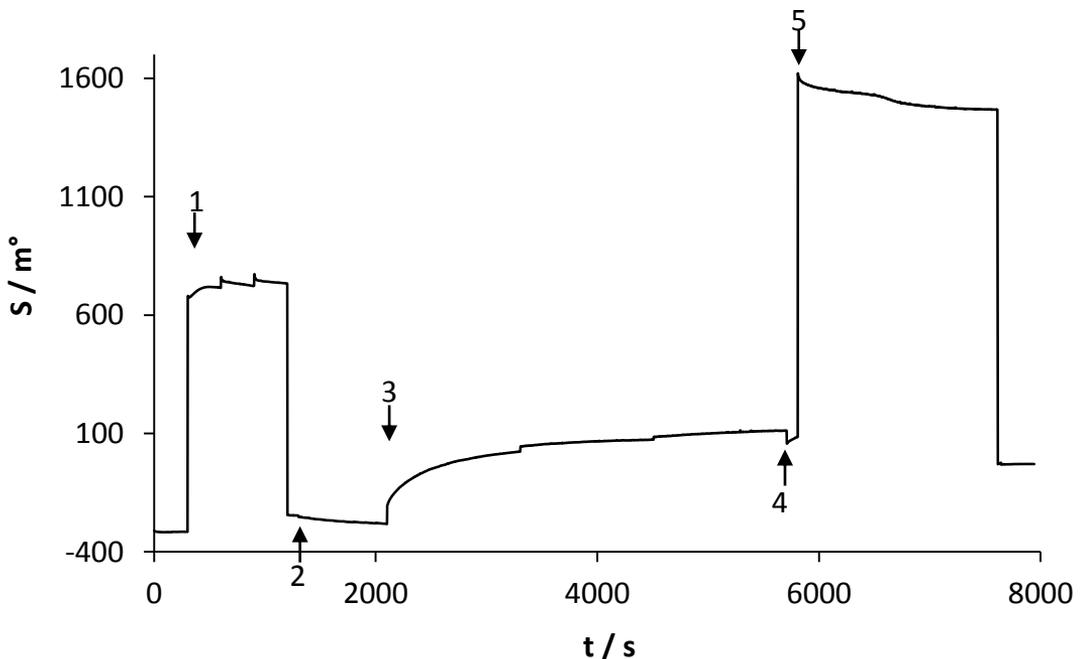


Figura 4-17: Sensograma del enlace covalente de la proteína al cristal de SPR: 1) Activación con EDC/NHS; 2) Línea de base en agua; 3) Enlace de estreptavidina; 4) Lavado; 5) bloqueo con etanolamina.

Tras esta modificación la superficie del sensor se encuentra modificada con proteína enlazada covalentemente. De forma general, se puede estimar la cantidad de ligando fijado en la superficie a través del cambio del ángulo que provoca el enlace de la molécula sabiendo que un cambio de 120 m° se corresponde al enlace de 1 ng/mm² de proteína [155]. De igual forma es posible calcular el cambio máximo esperable para el enlace de otra molécula sobre la que se encuentra previamente fijada en la superficie aplicando la Ecuación 4-10.

$$S_{\text{esperada}}(\text{m}^\circ) = S_M(\text{m}^\circ) \frac{M_{WL}}{M_{WM}} \left(\left(\frac{\partial n}{\partial C} \right)_L / \left(\frac{\partial n}{\partial C} \right)_M \right) \quad \text{Ecuación 4-10}$$

Siendo en este caso $S_M(\text{m}^\circ)$ el cambio en el ángulo de resonancia, en miligrados, producido por la molécula enlazada en la superficie, M_{WM} el peso molecular de la molécula enlazada sobre la superficie, M_{WL} el peso molecular del ligando con el que se hace interaccionar y $\left(\left(\frac{\partial n}{\partial C} \right)_L / \left(\frac{\partial n}{\partial C} \right)_M \right)$ la contribución del cambio del índice de refracción del medio en contacto con el metal al cambio del ángulo de resonancia. Éste último tiene valor 1 si ambas especies son ADN o ambas especies son proteínas; 1/0,8 si la especie enlazada sobre la superficie es una secuencia de ADN y la especie con la que interacciona es una proteína; 0,8 si la especie en la superficie es una proteína y se la hace interaccionar con un ADN.

En la Ecuación 4-10 no se tiene en cuenta la influencia de la distancia de la superficie del oro a la que tiene lugar la interacción que genera el cambio en la señal. Sin embargo, debido a la naturaleza de la técnica y al decaimiento

exponencial de la onda evanescente cuanto mayor es la distancia a la que se produce el evento menor es la señal esperable.

Siguiendo el protocolo anteriormente descrito se enlazó gliadina a la superficie del oro modificado con carboximetildextrano. De esta forma se dispone de un cristal modificado con la proteína para monitorizar el enlace del aptámero. Sin embargo, no se apreció cambio significativo en el ángulo de resonancia al poner en contacto el aptámero con la superficie modificada. Como control se repitió el ensayo usando el anticuerpo G12, que tiene un tamaño más de 10 veces superior al aptámero, $P_M(\text{aptámero}) = 12 \text{ kDa}$ y $P_M(\text{anticuerpo}) = 160 \text{ kDa}$, por lo que se esperan cambios en el ángulo de resonancia mucho mayores. Tampoco en este caso se pudo apreciar enlace. Por ello se preparó una superficie mediante la segunda estrategia, esto es modificando la superficie con estreptavidina y enlazando a ésta aptámero modificado con biotina para proceder al reconocimiento de la proteína o del péptido. Sin embargo los cambios en el ángulo de resonancia para el enlace de la gliadina o del péptido son demasiado pequeños incluso a concentraciones de $10 \mu\text{M}$ de péptido o de $5 \mu\text{M}$ de gliadina. El cambio máximo logrado para el enlace de la estreptavidina es de 95 m° , equivalente a $0,8 \text{ ng/mm}^2$. Por tanto, el cambio máximo calculado para la unión del aptámero a la superficie será de aproximadamente 14 m° , habiéndose obtenido un cambio de 16 m° . El cambio obtenido es mayor al cambio máximo teóricamente esperable debido a que para ese cálculo no se tiene en cuenta la capacidad de enlace de la estreptavidina, que puede enlazar a más de una molécula biotinilada. Para la etapa de enlace, el reconocimiento del péptido el cambio máximo esperado sería de 7 m° y para la gliadina sería de 70 m° . Como ya se ha indicado anteriormente estos cálculos no tienen en

cuenta la distancia a la que se produce el reconocimiento y este sería el máximo valor que cabría esperar. Sin embargo y haciendo experimentos con concentraciones de proteína de hasta 5 μM y de péptido de hasta 10 μM no se han obtenido señales medibles.

El polímero de carboximetildextrano está fuertemente entrecruzado, con lo que es esperable que el enlace de las proteínas ocurra solo en la superficie más externa del polímero. Esto ocasionaría que la distancia mínima a la que tendría lugar el reconocimiento sería equivalente al grosor del polímero que modifica el cristal. Por ello, el grosor de la capa polimérica empleada se redujo de 50 nm a 20 nm con el fin de intentar evitar los inconvenientes de que la reacción de reconocimiento se produjese demasiado lejos de la superficie. Sin embargo, se obtuvieron resultados similares a los anteriores, no pudiendo realizar la caracterización de la unión empleando estos sensores.

Se decidió emplear superficies de oro modificadas con hidrogeles de policarboxilato lineal. Con estos cristales se trata de obtener una modificación más próxima a la superficie del cristal debido a que es posible la penetración de las especies en el entramado lineal del polímero que modifica la superficie. De esta forma se persigue que la modificación no ocurra en la superficie del polímero, lejos de la superficie del cristal de oro, si no que ocurra en más posiciones y éstas sean más cercanas a la misma.

Se enlazó gliadina covalentemente al polímero empleando el protocolo ya descrito. Se comenzó estudiando la interacción con el anticuerpo G12. Tras el enlace covalente se realizaron inyecciones de anticuerpo a concentraciones 3,1

nM, 6,25 nM, 12,5 nM y 31,3 nM en tampón BS. Se midió la interacción entre el anticuerpo y la gliadina durante 10 min tras lo cual se vacía la celda y se procede a la medida de la disociación en BS durante 5 min. Tras la disociación se regenera la superficie liberando el anticuerpo unido mediante inyecciones de HCl 50 nM durante 60 segundos y posteriormente obteniendo una línea de base en BS hasta la recuperación de la señal previa a la unión del anticuerpo.

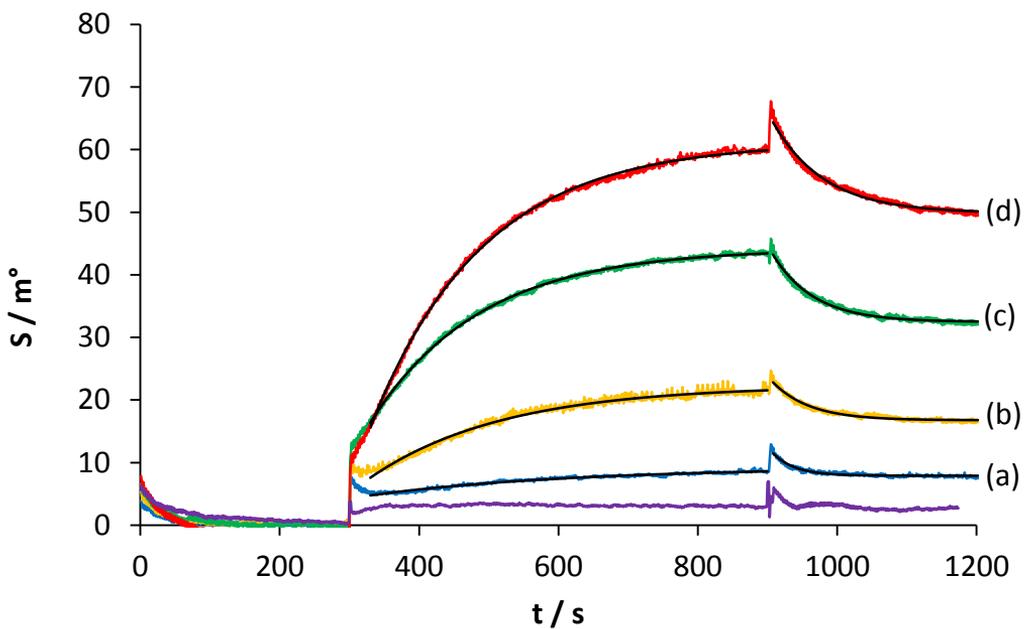


Figura 4-18: Sensorgramas obtenidos con sensores de policarboxilato lineal modificados covalentemente con gliadina concentraciones de anticuerpo G12 (a) 3,1 nM; (b) 6,25 nM; (c) 12,5 nM; (d) 25 nM y blanco correspondiente a la inyección de 3,125 nM de anticuerpo en el canal de referencia.

En la Figura 4-18 se muestran los sensorgramas obtenidos en el experimento de enlace de la gliadina inmovilizada covalentemente sobre la superficie del cristal modificado con carboximetildextrano y el anticuerpo G12. Con los datos

extraídos de las medidas de SPR es posible calcular la constante de disociación por los métodos de equilibrio y cinético.

Para calcular la constante por el método de equilibrio se obtiene la señal de equilibrio por extrapolación del ajuste no lineal de la parte de asociación a la Ecuación 4-11.

$$S_t = S_0 + E (1 - e^{-k_s t}) \quad \text{Ecuación 4-11}$$

donde $S_0 + E = S_{eq}$, es la señal máxima que se alcanza cuando se llega al equilibrio para la concentración inyectada, $k_s = k_a[\text{anticuerpo}]_{\text{libre}} + k_d$ siendo k_a y k_d las constantes cinéticas de asociación y disociación respectivamente. Se representa S_{eq} con respecto a la concentración de anticuerpo libre calculada empleando y se ajusta a la ecuación de Langmuir Ecuación 4-4. Para el cálculo de la concentración de anticuerpo libre se emplea la Ecuación 4-12:

$$[\text{anticuerpo}]_{\text{libre}} = [\text{anticuerpo}]_{\text{inicial}} \frac{S_{eq} A 10^{-3}}{f P_M V} \quad \text{Ecuación 4-12}$$

donde $A=2,8 \text{ mm}^2$ es el área del sensor en contacto con la disolución, f es el factor de conversión entre el cambio del ángulo de resonancia en miligrados y la cantidad de molécula unida a la superficie, para una interacción proteína inmovilizada-proteína en disolución es $120 \text{ (m}^\circ / \text{ng mm}^{-2}\text{)}$, P_M es el peso molecular del anticuerpo y $V = 35 \text{ }\mu\text{L}$ es el volumen de la cubeta de medida. En la Figura 4-19 se representa la isoterma de Langmuir, de la que se obtiene una $K_D=31\pm 12 \text{ nM}$ por el método de equilibrio.

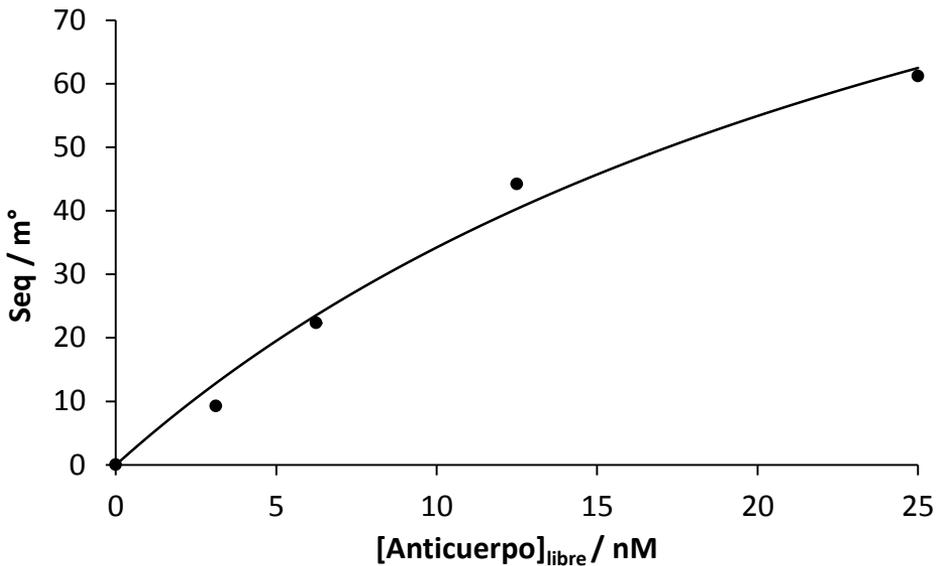


Figura 4-19: Representación de la isoterma de Langmuir para los datos obtenidos mediante SPR para el reconocimiento de la gliadina por el anticuerpo G12

El SPR nos ofrece información cinética que se puede emplear para calcular la constante de disociación. Esto requiere la obtención de las constantes cinéticas mediante el ajuste no lineal tanto de los datos de la etapa asociación como de la de disociación. La curva obtenida en la etapa de disociación se ajusta a la Ecuación 4-13

$$S_t = S_0 e^{-k_d t} + S_\infty \quad \text{Ecuación 4-13}$$

donde S_0 es la señal inicial al comienzo de la disociación y S_∞ es el valor de la señal tras la disociación que, al ser distinto de cero, hace referencia a la disociación incompleta del complejo ligando-diana. Obteniéndose así del ajuste no lineal a la parte de disociación el valor de k_d . Del ajuste de la etapa de asociación según la Ecuación 4-11 se obtiene el valor de k_s . Representando el valor de k_s para cada concentración frente a la concentración de anticuerpo

libre obtenido en cada caso se obtiene una representación lineal en la que la pendiente se corresponde a k_a y la ordenada a k_d . Teniendo los valores para ambas constantes cinéticas se calcula la constante de disociación como $K_D = \frac{k_d}{k_a}$. Los valores calculados para las constantes cinéticas y para la constante de disociación mediante el método cinético se muestran en la Tabla 4-4.

Tabla 4-4: Constantes cinéticas y de disociación del anticuerpo G12 a la gliadina calculada por el método cinético

k_a (s^{-1})	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
$(3,0 \pm 1,0) \times 10^{-4}$	$(2,8 \pm 0,8) \times 10^{-3}$	9 ± 4

Comparando las constantes de disociación calculadas para el enlace gliadina-anticuerpo G12 y teniendo en cuenta los errores asociados se puede ver que ambas difieren. La constante de disociación calculada por el método cinético es menor que la que se calcula por el método de equilibrio. Sin embargo los datos que permiten la obtención de la constante por el método de equilibrio presentan un buen ajuste a la isoterma de Langmuir, $r^2=0,988$. Mientras que los datos para el cálculo de la constante por el método cinético presentan una menor correlación $r^2=0,902$.

Se puede ver en la Figura 4-18 que las señales que proporciona el reconocimiento de la gliadina inmovilizada por parte del anticuerpo oscilan entre los 7 y los 60 m°, pese a que la señal máxima calculada según los datos obtenidos está por encima de los 100 m° no se ha llegado a obtener una señal de esa magnitud experimentalmente. Conociendo la diferencia de masa entre el aptámero y el anticuerpo y a la vista de estas señales no será posible la monitorización del enlace del aptámero a la superficie modificada con gliadina

de esta forma debido a problemas de sensibilidad. Se intenta sin embargo ver la interacción gliadina-aptámero Gli 1 haciendo interaccionar la superficie modificada con gliadina con 1 μM de aptámero sin éxito.

A la vista de los resultados obtenidos con los cristales modificados con matrices poliméricas, se descartan para la determinación de la constante de afinidad del enlace péptido 33-mer-aptámero debido a la insuficiente sensibilidad del equipo. Como alternativa se propone el uso de la superficie de oro sin modificar para formar monocapas autoensambladas que contengan grupos funcionales adecuados para la posterior inmovilización del péptido. Para llevar a cabo los ensayos sobre estas superficies es necesaria la realización de una etapa de limpieza previa que consiste en el lavado del oro con disolución piraña, mezcla 3:1 de $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$, durante 10 minutos. Esta mezcla es altamente corrosiva y elimina toda la posible materia orgánica de la superficie del cristal. Tras esto se lava el cristal con agua y etanol y una vez seco se coloca en la superficie del prisma sobre una gota de aceite de índice de refracción conocido.

Con el fin de obtener una superficie lo más bloqueada posible para evitar adsorciones inespecíficas se propone la preparación de una monocapa autoensamblada mixta de mercaptoácidos de distinta longitud según el procedimiento descrito [156] y una posterior unión covalente de estreptavidina. Esto se hace para disponer de un cristal modificado con estreptavidina y de esta forma poder fijar en la superficie péptido modificado con biotina por medio del enlace de alta afinidad biotina-estreptavidina. Mediante una monocapa formada por dos especies de diferente longitud se consigue que se enlace preferentemente la estreptavidina a los grupos carboxilo activados de la

especie más larga, mientras que la especie más corta ayuda al bloqueo de la superficie de oro y al mismo tiempo le confiere a la misma carácter hidrofílico. Al enlazarse la proteína preferentemente a la especie de más longitud, siendo esta la que está en menor proporción se consigue el enlace de una menor cantidad de estreptavidina. Para obtener valores de la constante de afinidad es imprescindible disponer de una superficie con un recubrimiento bajo de molécula inmovilizada que permita acceso no restringido a la molécula en disolución.

Para formar la monocapa autoensamblada se puso en contacto con el cristal una mezcla de ácidos mercaptopropanoico y mercaptoundecanoico 10 mM en proporción 10:1 en etanol. Se dejaron en la cubeta durante 16 horas a 30 °C tapando la cubeta con parafilm. Tras ello se lavó la cubeta con agua y se procedió a comenzar la funcionalización de la monocapa.

Como se ha indicado previamente, se enlaza estreptavidina covalentemente a la monocapa, lo que permite la fijación posterior del péptido modificado con biotina en su extremo C-terminal. Esta inmovilización se realizó de igual forma que el enlace covalente de proteínas a la superficie de oro modificada con polímero. Se activaron los grupos carboxilo en la superficie con una mezcla de NHS y EDC en agua, tras lo que se lavó la superficie con agua para eliminar residuos de los reactivos de activación y se inyectó la estreptavidina en tampón de acetato 50 mM de pH 4,5.

Se midió un cambio de señal tras el enlace covalente de la estreptavidina de 200 m° para el canal de medida y de 195 m° para el canal de referencia y

posteriormente se bloquearon los sitios libres con etanolamina. Este cambio en el ángulo de resonancia equivale a $1,6 \text{ ng/mm}^2$ de proteína fijados sobre la superficie.

Finalizado este procedimiento, la superficie del cristal se encuentra modificada con estreptavidina y es posible llevar a cabo la modificación del mismo con reactivos biotinilados. Para el enlace a la superficie del péptido biotinilado se llevó a cabo una inyección de $50 \mu\text{L}$ del mismo de una concentración de 25 nM en el canal de medida y como referencia el mismo volumen de biotina a concentración 500 nM para bloquear los sitios de unión de la estreptavidina.

Antes de inmovilizar los reactivos biotinilados se realizó un acondicionamiento de la superficie, efectuando una serie de inyecciones de $\text{HCl } 50 \text{ mM}$ seguidas de líneas de base en tampón de enlace BS, hasta la estabilización de la señal de la superficie modificada. Esto elimina la estreptavidina fijada débilmente que ocasiona una disminución del ángulo de resonancia.

En la Figura 4-20 se muestra el sensograma de la unión del péptido a la estreptavidina fijada en la superficie. El cambio máximo esperado es de 16 m° y se obtienen 37 m° . Esto se interpreta como que se ocupa más de uno de los sitios de unión de cada estreptavidina fijada en la superficie.

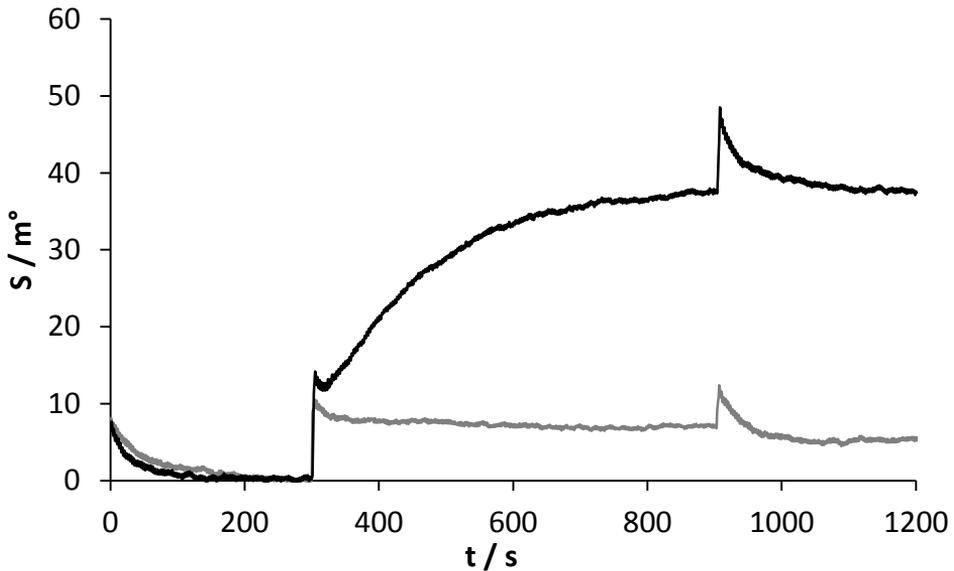


Figura 4-20: Sensorgramanlace del péptido biotinilado (negro) y de la biotina (gris) a la estreptavidina fijada en la superficie de ácido mercaptopropanoico y mercaptoundecanoico.

En este punto la superficie del cristal de oro se encuentra modificada con el péptido diana inmovilizado en el canal de medida y una superficie modificada con estreptavidina bloqueada con biotina como referencia en el segundo canal. Como validación se caracterizó la unión del anticuerpo G12 a dicha superficie. Para ello se hicieron inyecciones de anticuerpo de concentraciones de anticuerpo 3,13 nM, 6,25 nM, 12,5 nM y 31,25 nM. Se midió la formación del complejo anticuerpo-péptido durante 10 min, tras lo que se vació la celda y se inyectó tampón BS midiéndose la disociación del complejo formado durante 5 min. Para recuperar la superficie y eliminar el anticuerpo enlazado al péptido se hicieron inyecciones de HCl 50 mM durante 60 segundos y se estabilizó la superficie en BS obteniendo una línea de base nueva durante 5 min.

Las medidas obtenidas permiten el cálculo de la constante de disociación empleando el método de equilibrio. El ajuste de los datos a la isoterma de Langmuir, con $r^2=0,993$, se presentan en la Figura 4-21. Obteniéndose una constante de disociación de $K_D=17\pm 3$ nM.

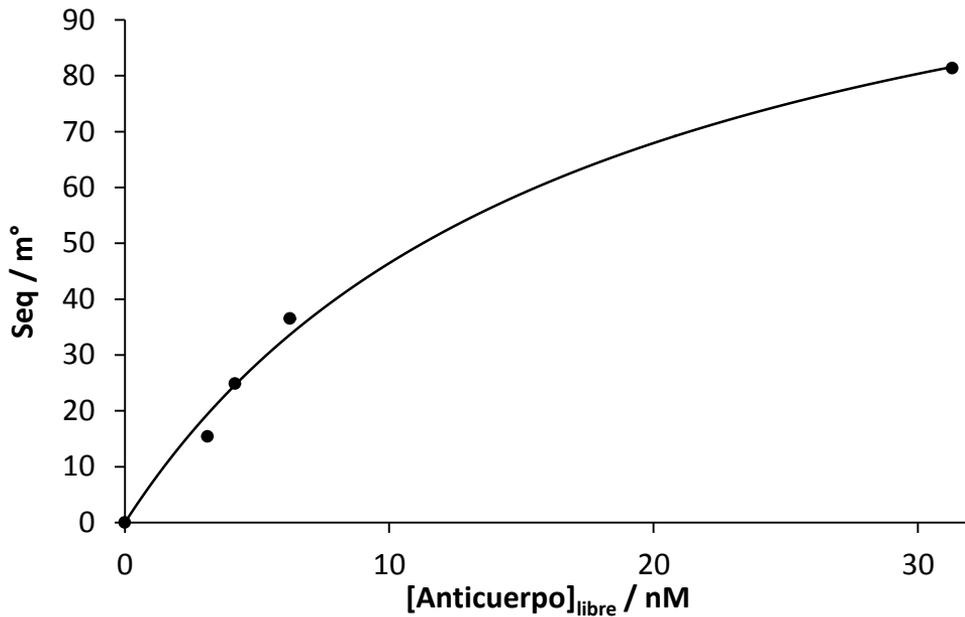


Figura 4-21: Representación de la isoterma de Langmuir para los datos obtenidos mediante SPR para el reconocimiento del péptido 33-mer por el anticuerpo G12 usando un sensor de oro modificado con una SAM de mercaptoácidos, estreptavidina y péptido biotilado.

Las medidas obtenidas para el enlace del anticuerpo G12 con el péptido 33-mer enlazado a la superficie permiten calcular las constantes cinéticas y de disociación por el método cinético. Los valores de estas constantes calculadas por el método cinético se muestran en la Tabla 4-5.

Tabla 4-5: Constantes cinéticas y de disociación del anticuerpo G12 al péptido 33-mer calculada por el método cinético

k_a (s^{-1})	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
$(2,2 \pm 1,8) \times 10^{-4}$	$(4,7 \pm 0,8) \times 10^{-3}$	21 ± 17

Las constantes de disociación obtenidas mediante el cálculo por el método cinético y mediante el cálculo por el método de equilibrio para el enlace del anticuerpo G12 y el péptido 33-mer, teniendo en cuenta el error, no son significativamente diferentes. Comparando las constantes de disociación, calculadas por el método de equilibrio, obtenidas para el reconocimiento por parte del anticuerpo G12 del péptido 33-mer y de la gliadina, ambos enlazados a la superficie, se observa que no difieren significativamente.

De forma totalmente análoga se procede a la monitorización de la formación del complejo péptido-ADN. Para ello se hacen inyecciones de ADN de concentraciones 50 nM, 100 nM, 500 nM y 5 μ M y se dejan interactuar agitando la celda durante 10 min. Tras eso se inyecta tampón BS y se registra la señal de la disociación durante 5 min. Entre cada inyección de aptámero se procede a la regeneración de la superficie eliminando el ADN enlazado inyectando HCl 50 mM y dejándolo interactuar durante 60 segundos para posteriormente adquirir una línea de base en tampón BS durante 5 min.

La constante de disociación se calculó mediante el método de equilibrio representando esta señal con respecto a la concentración de aptámero libre. En el canal empleado como referencia no se observa cambio en la señal al interactuar con el aptámero mientras que se ve interacción del aptámero con el péptido fijado en la superficie en el canal de medida.

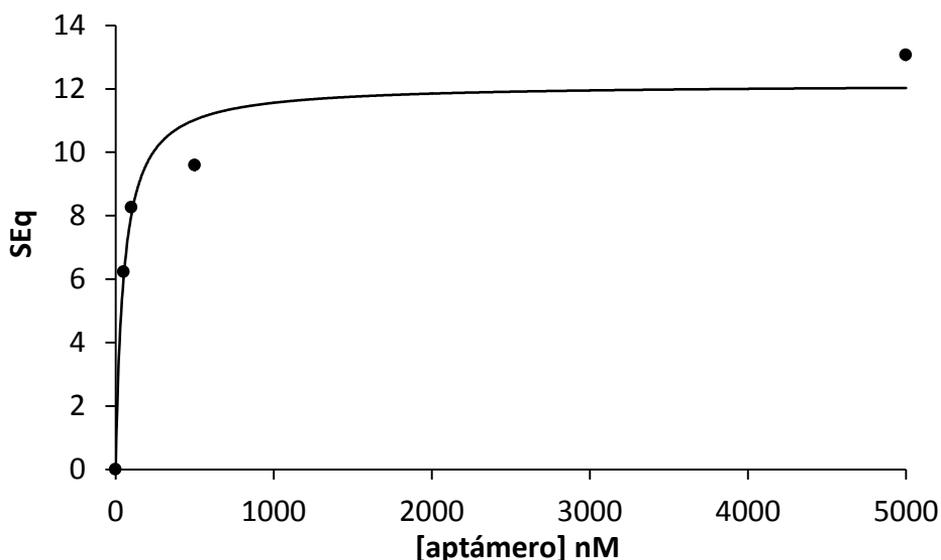


Figura 4-22: Representación de la isoterma de Langmuir para los datos obtenidos por SPR para el enlace entre el aptámero y el péptido.

En la Figura 4-22 se puede ver el ajuste de los datos obtenidos a la isoterma de Langmuir. Con estos datos se obtienen los parámetros de ajuste y el valor para la constante de disociación derivado del mismo que se muestran en la Tabla 4-6.

Tabla 4-6: Valores de los parámetros de ajuste y de la constante de disociación para el complejo aptámero gli 1-péptido obtenidos ajustando al modelo de Langmuir los datos medidos mediante SPR

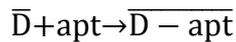
K_D (nM)	S_{max} (m°)	r^2
51±21	12±1	0.965

Estos datos para la constante de disociación son los correspondientes a la formación del complejo péptido-ADN estando el péptido inmovilizado sobre una superficie y el ADN sin ninguna marca en disolución. Pese a las diferencias de operación con respecto al ensayo de impedancia comentado en el apartado 4.3 las constantes de afinidad no difieren en gran medida.

4.4 Efecto del marcaje sobre la afinidad del aptámero

Los datos obtenidos en la construcción de la curva de enlace de los diferentes aptámeros al péptido 33-mer inmovilizado sobre partículas magnéticas permiten obtener valores de la constante de afinidad de los aptámero marcados con biotina. Para ello se asume un modelo de un solo sitio de enlace, lo que se comprobó mediante ITC.

Siendo \bar{D} el péptido diana inmovilizado sobre las partículas magnéticas se tiene que la reacción que ocurre sobre las partículas se puede expresar como



por lo que la constante que define a reacción de asociación en superficie es

$$K_A = \frac{[\overline{\bar{D} - \text{apt}}]}{[\bar{D}] [\text{apt}]}$$

La concentración total de péptido en la superficie es \bar{D}_{tot}

$$[\bar{D}]_{\text{tot}} = [\bar{D}] + [\overline{\bar{D} - \text{apt}}]$$

$$[\bar{D}] = [\bar{D}]_{\text{tot}} - [\overline{\bar{D} - \text{apt}}]$$

Suponiendo estequiometría 1:1, siendo $[\bar{D}]$ la concentración de péptido inmovilizado libre.

$$K_A = \frac{[\overline{\bar{D} - \text{apt}}]}{([\bar{D}]_{\text{tot}} - [\overline{\bar{D} - \text{apt}}])[\text{apt}]_{\text{Eq}}}$$

$$K_A[\bar{D}]_{\text{tot}}[\text{apt}] - K_A[\overline{\bar{D} - \text{apt}}][\text{apt}] = [\overline{\bar{D} - \text{apt}}]$$

$$K_A \bar{D}_{\text{tot}}[\text{apt}] = (K_A[\text{apt}] + 1) [\overline{D - \text{apt}}]$$

$$\frac{[\overline{D - \text{apt}}]}{[\bar{D}]_{\text{tot}}} = \frac{K_A[\text{apt}]}{K_A[\text{apt}] + 1}$$

En las curvas de enlace la señal medida, intensidad de corriente en μA , es proporcional a la concentración de aptámero en superficie enlazada al péptido $[\overline{D - \text{apt}}] \rightarrow I$. De esta forma, cuando las partículas se saturan totalmente se tendrá una medida de la concentración total de péptido en la superficie $[\bar{D}]_{\text{tot}} \rightarrow I_{\text{max}}$

$$\frac{I}{I_{\text{max}}} = \frac{K_A[\text{apt}]}{K_A[\text{apt}] + 1}$$

$$I = \frac{I_{\text{max}} K_A[\text{apt}]}{K_A[\text{apt}] + 1}$$

Ecuación 4-14

Con lo que finalmente, haciendo los inversos en la Ecuación 4-15 se tiene:

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{I_{\text{max}}} + \frac{1}{I_{\text{max}} K_A} \frac{1}{[\text{apt}]}$$

Ecuación 4-15

Considerando la Ecuación 4-15, si se asume que la cantidad de aptámero que se enlaza es despreciable, entonces se tiene que $[\text{apt}]_0 = [\text{apt}]_{\text{eq}}$ Por lo que representando $\frac{1}{I}$ frente a $\frac{1}{[\text{apt}]}$ se obtiene una línea recta, cuya pendiente es $\frac{1}{I_{\text{max}} K_A}$ y la ordenada es $\frac{1}{I_{\text{max}}}$ por lo que de los parámetros de la regresión se puede obtener K_A expresado en M^{-1} .

Aplicando este modelo a los datos experimentales obtenidos para el ensayo descrito en la sección 3.4 empleando partículas magnéticas modificadas con el péptido 33-mer, en todos los casos se obtiene una buena correlación lineal. Los datos de los parámetros de ajuste a la recta de todos los aptámeros se pueden ver en la Tabla 4-7 y las representaciones gráficas se pueden ver en la Figura 4-23.

Tabla 4-7. Parámetros de ajuste de $1/I$ (μA) frente a $1/[\text{aptámero}]$ (nM) para los ensayos de equilibrio sobre partículas magnéticas modificadas con péptido 33-mer.

	Gli 1	Gli 12	Gli 3	Gli 4	Gli sq04
Pendiente	99,0 \pm 1,6	168,5 \pm 4,2	76,3 \pm 3,5	36,0 \pm 1,2	117,7 \pm 1,8
Ordenada	0,97 \pm 0,11	0,57 \pm 0,13	0,81 \pm 0,02	0,59 \pm 0,04	0,82 \pm 0,05
r	0,999	0,999	0,997	0,998	0,999

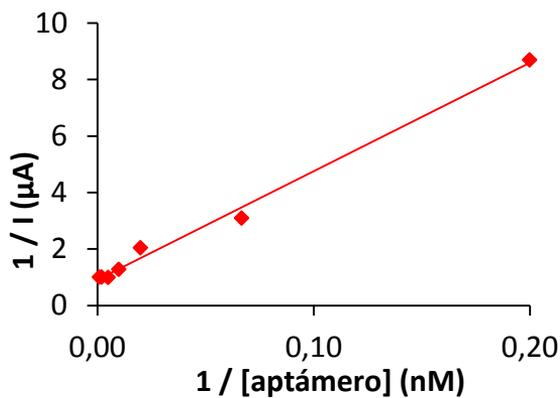
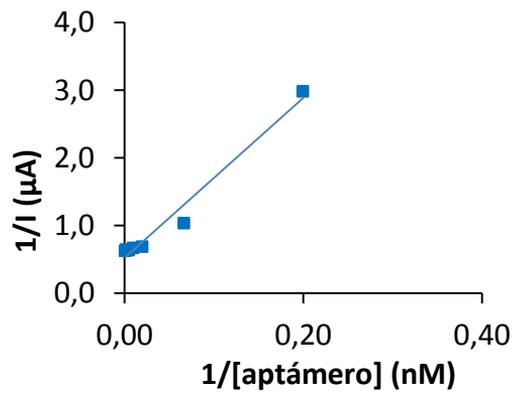
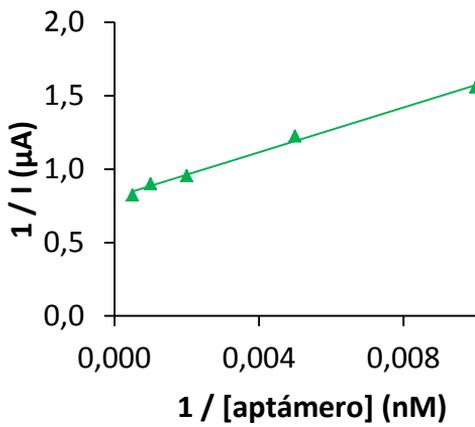
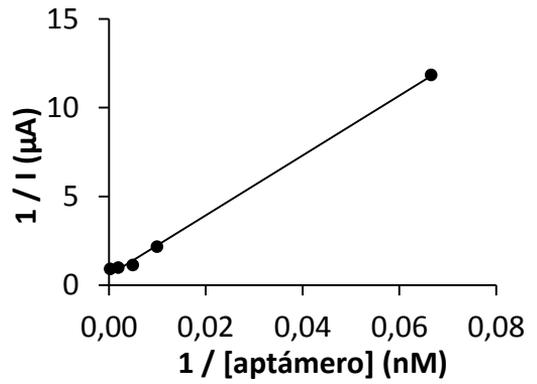
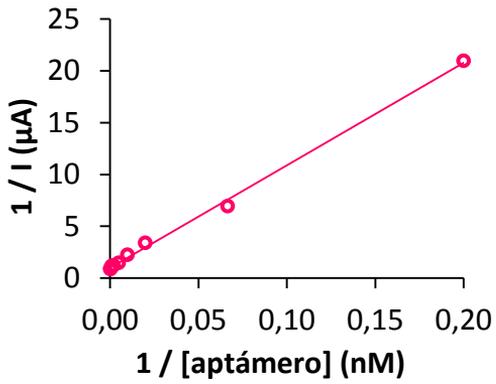


Figura 4-23: Ajuste al modelo de los datos experimentales correspondientes a la obtención de la curva de enlace de Gli 1 (rosa), Gli 12 (negro), Gli 3 (verde), Gli sq4 (azul) y Gli 4 (rojo) a partículas magnéticas modificadas con péptido 33-mer.

Los datos obtenidos son consistentes con el modelo y los valores correspondientes a las constantes aparentes de disociación K_D se muestran en la Tabla 4-8.

Tabla 4-8: Constantes de disociación aptámero-péptido para las diferentes secuencias

	Gli 1	Gli 12	Gli 3	Gli 4	Gli sq04
K_D (nM)	102±11	296±38	94±4	61±4	144±7

Se puede observar que el aptámero Gli 4 presenta una mayor afinidad por el péptido, con la menor constante de disociación encontrada. Los aptámeros Gli 1 y Gli 3 tienen una constante de disociación muy parecida mientras que el aptámero Gli 12 presenta la mayor de todas las calculadas.

El hecho de que la constante de disociación y, por tanto la afinidad, del aptámero representante de la familia más numerosa no sea la más favorable de las encontradas se puede deber a que en el caso del Gli 1 el enlace se produzca a una mayor velocidad y eso favoreciese la presencia en número de esta secuencia. Sin embargo, no es la secuencia más afín a la diana.

De la misma manera se puede llevar a cabo esta aproximación para el caso de las partículas modificadas con gliadina-PW. Así se obtiene la constante de afinidad para el complejo aptámero-PWG, los parámetros de ajuste se presentan en la Tabla 4-9 y las representaciones gráficas de muestran en la Figura 4-24.

Tabla 4-9: Parámetros de ajuste de $1/I$ frente a $1/[\text{aptámero}]$ para los ensayos de equilibrio sobre partículas magnéticas modificadas con PWG.

	Gli 1	Gli 12	Gli 3	Gli 4	Gli sq04
Pendiente	310±70	266±13	98±2	57±1	368±19
Ordenada	1,16±0,16	0,16±0,36	0,84±0,07	0,65±0,04	3,55±0,65
r	0,910	0,997	0,998	0,999	0,997

Se obtiene en la mayor parte de los casos una peor correlación lineal que la obtenida para el ajuste al modelo con las partículas modificadas con el péptido, pero es posible calcular los valores para la constante de disociación que se resumen en la Tabla 4-10.

Tabla 4-10: Constantes de disociación ADN-proteína para los distintos aptámeros.

	Gli 1	Gli 12	Gli 3	Gli 4	Gli sq04
K_D (nM)	267 ± 82	1600 ± 600	117 ± 8	89 ± 4	103 ± 70

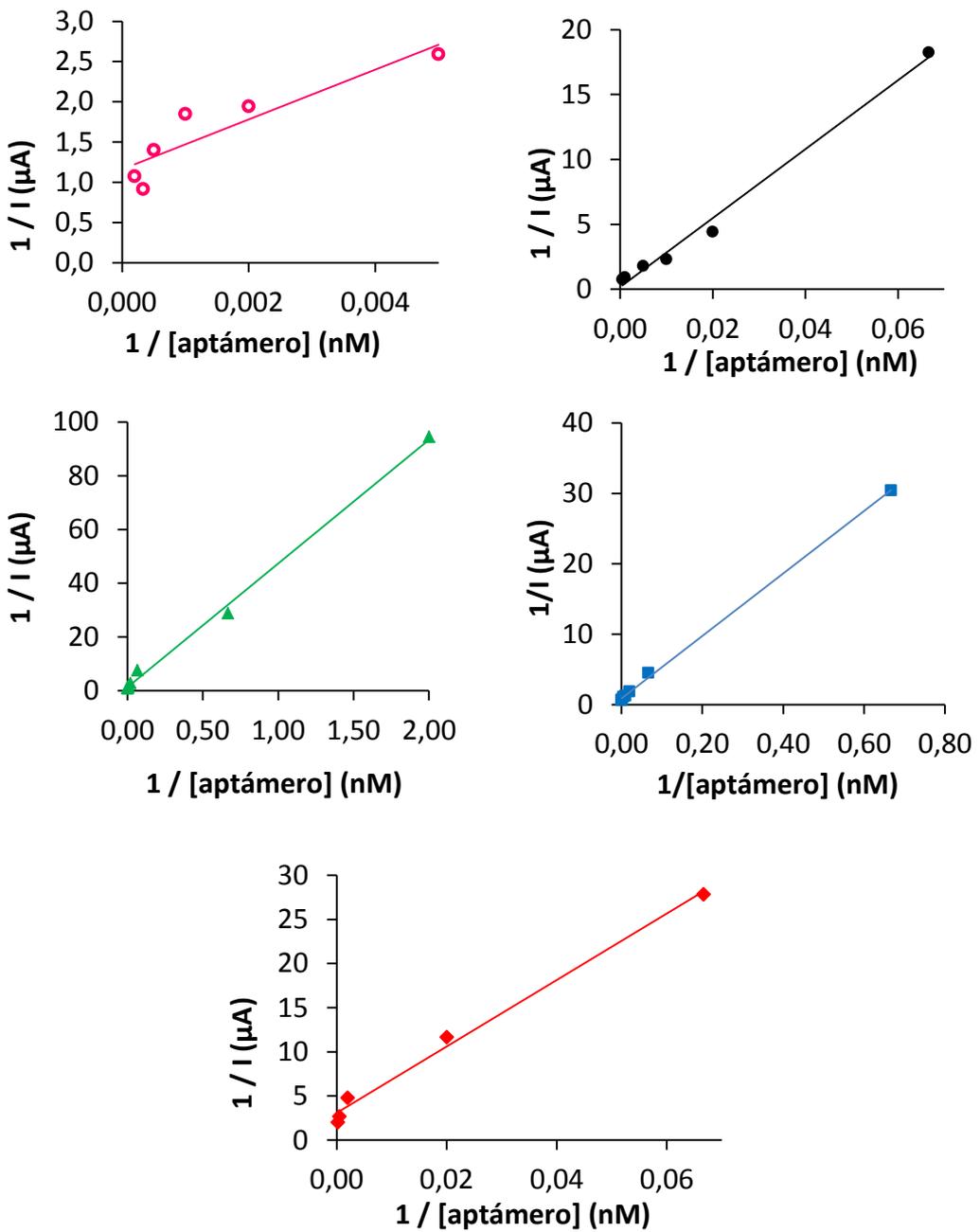


Figura 4-24: Ajuste al modelo de los datos experimentales correspondientes a la obtención de la curva de enlace de Gli 1 (rosa), Gli 12 (negro), Gli 3 (verde), Gli sq04 (azul) y Gli 4 (rojo) a partículas magnéticas modificadas con PWG.

Así se comprueba que el aptámero Gli 4, también en este caso es el que presenta un valor para la K_D menor y, por lo tanto es el que tiene una mayor afinidad por la proteína completa. Sin embargo la diferencia entre la constante de disociación del aptámero Gli 4 con la correspondiente a los aptámeros Gli 3 y Gli sq04 no es demasiado grande, llegando a coincidir teniendo en cuenta el valor de la desviación de la constante de Gli sq04. Del mismo modo, se puede ver que la constante de disociación para la secuencia Gli 12 es marcadamente diferente a las demás. Esta observación está en consonancia con lo que se puede deducir a la vista de las curvas de enlace analizadas en la sección 3.4 y avala la decisión de no continuar con el análisis y el empleo de esta secuencia en los posteriores procedimientos.

4.5 Caracterización estructural

Para conocer en profundidad la naturaleza de la interacción así como los residuos tanto de ADN como del péptido implicados en la reacción de reconocimiento se llevaron a cabo una serie de mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). Esta técnica es habitualmente empleada en la elucidación estructural de compuestos. El empleo de la espectroscopía de RMN permite visualizar núcleos que tengan un momento magnético diferente de cero. Los núcleos giran alrededor de su eje en un movimiento definido por su momento angular, que es, en todos los casos un valor entero o semi-entero de la constante de Planck modificada ($\hbar = h/2\pi$). El momento angular total se describe $p = I\hbar = Ih/2\pi$ donde I es el número cuántico de espín que puede adoptar un valor entero o semi-entero característico de cada núcleo. En el caso de que $I = 0$ el núcleo no gira y no es detectable mediante RMN.

Los núcleos útiles para la espectroscopía de RMN son aquellos que tienen un $I = 1/2$. Esto se debe a que al tener $I \neq 0$ los núcleos giran dando lugar a un campo magnético. El núcleo que gira se comporta como un dipolo magnético con un momento magnético $\mu = \gamma p$ donde γ es la relación magnetogirica. Si se aplica un campo externo B_0 el dipolo correspondiente al núcleo puede adoptar un número finito de estados energéticos cuantizados $2I + 1$. Esto es que para los núcleos de interés solo es posible adoptar dos estados energéticos. En el caso de núcleos con $I > 1/2$ esto se complica apareciendo un mayor número para los posibles estados energéticos. Teniendo estos dos estados posibles solo puede haber una transición energética permitida, la que lleve al núcleo de uno de ellos al otro.

Para la obtención de un espectro de RMN se coloca al compuesto a analizar en un campo magnético que se mantiene constante mientras se aplica a la muestra un pulso de radiofrecuencia. El pulso de radiofrecuencia cubre un amplio intervalo de frecuencias con el fin de que todos los núcleos absorban radiación de frecuencia necesaria para cambiar de estado energético. Se registra la intensidad de radiación, emitida por los núcleos para volver a su estado inicial, con respecto al tiempo. La emisión de cada núcleo dependerá de su entorno electrónico, lo que proporciona información de los enlaces que lo rodean pudiendo elucidar la estructura del compuesto analizando el espectro de RMN.

En nuestro caso se lleva a cabo un RMN multidimensional aplicando a la muestra diferentes pulsos de radiofrecuencia de frecuencia, forma y fases

diferentes en momentos del tiempo que permiten extraer información adicional. Concretamente se realizan los experimentos:

- TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) que permite identificar espines que están acoplados entre sí, sean o no vecinos. En este experimento se obtienen las frecuencias de resonancia a lo largo de dos ejes, los picos diagonales son aquellos que tienen la misma frecuencia y son los equivalentes a los que se obtendrían en un experimento 1D-RMN y los picos en cruz indican los acoplamientos. La correlación entre núcleos distantes es útil para identificar núcleos en anillos de azúcares o en aminoácidos.

- NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY). Se emplea la relajación cruzada del efecto nuclear Overhauser entre espines nucleares durante el periodo de mezcla. El espectro es similar al anterior obteniéndose también picos diagonales y en cruz. Sin embargo estos últimos muestran las resonancias de núcleos que están espacialmente próximos y contienen picos axiales adicionales que no dan información extra.

- ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence). Esta técnica es un tipo de espectroscopía RMN 2D muy sensible que indica la transferencia de la magnetización del protón a un segundo núcleo. En este caso el experimento proporciona una correlación entre un carbono alifático y los protones que éste tiene enlazados.

Los núcleos empleados para la detección son protones ^1H o carbono ^{13}C . Estos núcleos son ampliamente usados en elucidación estructural de compuestos. En cada caso se indica el núcleo empleado para la obtención del espectro y las técnicas empleadas.

Estos experimentos se realizaron con secuencias de ADN correspondientes a los aptámeros Gli 1 y Gli 4. Para el caso del aptámero Gli 1 los espectros de mezcla aptámero-péptido se realizaron empleando el péptido 33-mer con el separador de histidinas que se ha utilizado previamente, LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPFHHHHHH. En el caso del aptámero Gli 4, además, se llevaron a cabo diferentes experimentos empleando péptidos truncados de 7, QLPYPQP, y 14 aminoácidos, QLPYPQPQLPYPQP, que contiene la secuencia del péptido 7-mer dos veces. Como se puede observar en la secuencia del 33-mer estos siete aminoácidos se repiten tres veces.

En primer lugar se llevó a cabo la medida de espectros de RMN tanto del péptido como del ADN por separado, se procedió a la identificación de las señales presentadas y posteriormente se hizo el mismo procedimiento con la mezcla de ambos para estudiar los cambios producidos. Para la realización de los experimentos por separado se empleó una muestra de cada especie a una concentración de 500 μ M en un tampón de 25 mM de KPi pH 7,0 con 25 mM de NaCl y se registraron los espectros 1D y 2D-TOCSY y en el caso del péptido también el espectro 2D-NOESY.

En la Figura 4-25 se puede ver el espectro de 2D-TOCSY y en la Figura 4-26 se muestra el espectro 2D-NOESY del péptido. La falta de dispersión en el espectro 2D-TOCSY apunta a la ausencia de estructuras secundarias o terciarias. Esto se confirma en el espectro 2D-NOESY debido a la ausencia de estructuras plegadas que se situarían en las zonas recuadradas en el espectro correspondiente.

A la vista de estos espectros no es posible la asignación de las señales debido al alto grado de solapamiento, la ausencia de estructura secundaria y la degeneración de la propia secuencia. Esto es, que el péptido se puede observar como una serie de tres repeticiones consecutivas de la secuencia QLPYPQ.

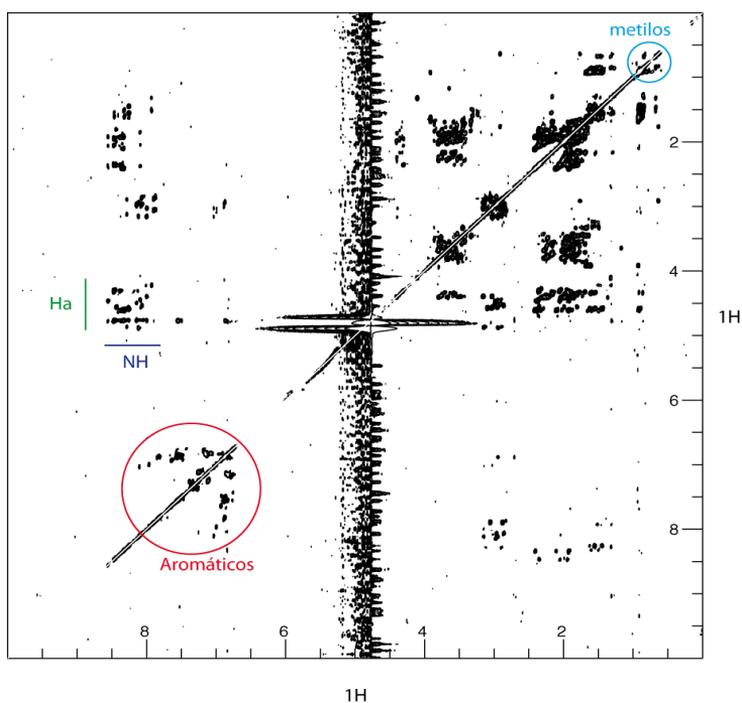


Figura 4-25: Espectro 2D TOCSY del péptido 33-mer

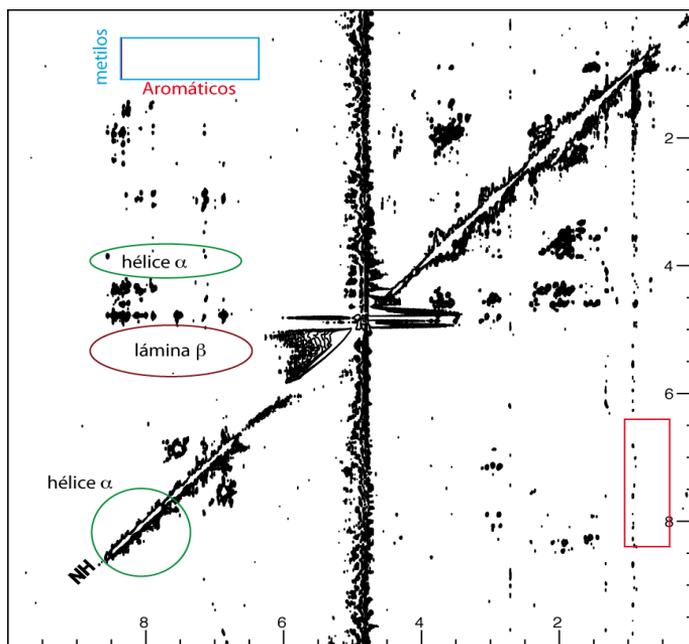


Figura 4-26: Espectro 2D NOESY del péptido 33-mer

En el caso de la secuencia de ADN se puede observar en la Figura 4-27 el espectro de RMN 2D-TOCSY correspondiente a 8 correlaciones de las citidinas, que corresponden a sendas bases espectroscópicamente diferentes. Hay una ausencia total de protones imino a 25°C lo que indica la falta de regiones con conformación helicoidal o estructuras en horquilla, lo cual concuerda con las estimaciones realizadas con los programas de cálculo Mfold ya comentados [103], en los que se destaca la escasa estructura secundaria de los aptámeros obtenidas.

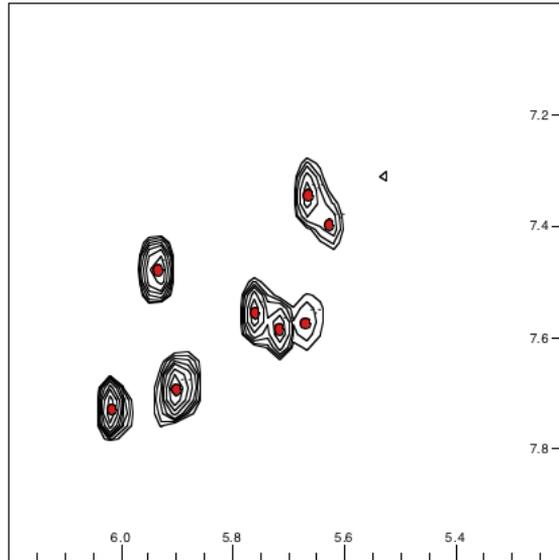


Figura 4-27: Espectro de RMN 2D-TOCSY del oligonucleótido correspondiente al aptámero Gli 1.

Para obtener el espectro de la interacción péptido-ADN se preparó una mezcla equimolecular de proteína y ADN a una concentración final de 250 μM en un tampón igual al que se empleó en las demás medidas. Se comparan los resultados obtenidos con los correspondientes a las especies en su forma libre. La comparación se realiza por zonas sabiendo que en determinadas áreas se pueden encontrar las alteraciones del enlace sobre las diferentes estructuras del ADN o del péptido.

Comparando la zona correspondiente a las correlaciones se puede monitorizar el papel que juega el esqueleto azúcar-fosfato del ADN en el reconocimiento molecular del péptido. Sin embargo se observa que las variaciones son mínimas lo que indica que la interacción, en el caso de producirse en estas condiciones, es de carácter débil.

Comparando la zona correspondiente a la región de las correlaciones entre protones aromáticos de citidinas se puede observar si hay participación de las bases correspondientes a estos residuos. Como en el caso anterior, estos cambios son mínimos y no son concluyentes dado que es posible que puedan deberse a efectos de concentración o ligeras diferencias en la composición de los tampones.

Monitorizando los cambios en las señales del péptido en la región de las correlaciones de tirosina y fenilalanina se pueden observar ligeras variaciones para dos tirosinas y una variación algo mayor para la fenilalanina. Además hay un cambio en un grupo de señales a la derecha de las anteriores que pueden corresponder a correlaciones de cadenas de tipo amida primaria de residuos aspargina o glutamina. Sin embargo estos cambios son pequeños y no son atribuibles a una interacción fuerte. Además no se pueden encontrar evidencias más sólidas como NOEs intermoleculares.

Los resultados obtenidos mediante esta técnica no permiten caracterizar la unión péptido-ADN. Esto puede ser debido a que para llevar a cabo las medidas de RMN es necesaria la variación de las condiciones de la interacción con respecto a lo que se venía haciendo. Esto es, no se puede llevar a cabo la interacción en un tampón acuoso, debido a la naturaleza de la técnica y tampoco se lleva a cabo en las condiciones de pH y fuerza iónica que se han venido empleando en todos los ensayos anteriores.

Para el aptámero Gli 4, los experimentos que se realizaron fueron similares a los que se han descrito para el caso anterior. Esto es, primero se realizaron los

espectros del ADN y del péptido por separado para posteriormente preparar una mezcla equimolecular y realizar el espectro correspondiente a la interacción. El tampón empleado y las concentraciones de las especies por separado y mezcladas es la misma que en el experimento descrito anteriormente.

En este caso, aunque no se muestran los espectros se observa que el ADN está estructurado por evidencias encontradas en espectros de 1D de ^1H y 2D de ^1H - ^{13}C HSQC. Esto podría explicarse por hibridación de dos secuencias de Gli 4. Los péptidos 14 y 7 mer no están estructurados y presentan espectros prácticamente superponibles, como era de esperar al ser repeticiones.

Al llevar a cabo el espectro de la mezcla del ADN y del péptido 14-mer las señales del péptido desaparecen mientras que las del ADN permanecen inalteradas. Como la concentración del péptido al adquirir el espectro es diferente si está solo que si está en la mezcla y para descartar que la desaparición de las señales sea fruto de la concentración se adquiere un espectro de péptido solo a la misma concentración de la mezcla. Haciendo esto se puede comprobar que la desaparición de las señales del péptido no ocurre si no está presente el ADN.

La no observación de las señales del péptido en el espectro de la mezcla sugiere que aumenta su difusión rotacional. Esto es posible que sea debido a que cambia su estado de asociación. Este proceso no altera las señales del ADN, por lo tanto no afecta a su estructura a no ser que la parte involucrada en el proceso no sea visible.

Si se calienta la mezcla ADN-péptido a 80°C y se baja la temperatura lentamente hasta temperatura ambiente las señales del péptido vuelven a aparecer. Además estas señales aparecen en la misma posición que en el espectro del péptido solo.

A la vista de los resultados es posible que el aptámero Gli 4 induzca de alguna forma la agregación del péptido en las condiciones en las que se ha llevado a cabo la medida. Esto no es un impedimento para algunas de las aproximaciones experimentales llevadas a cabo en la presente tesis.

4.6 Discusión

A lo largo del presente capítulo se han obtenido diferentes valores para la constante de disociación del evento de reconocimiento que ocurre entre el aptámero Gli 1 y el péptido. Las distintas técnicas empleadas han proporcionado diferentes constantes en diferentes condiciones. La constante de disociación medida por ITC. Correspondiente a la interacción en medio homogéneo donde ninguna de las especies tiene modificaciones ni está enlazada a una superficie. Para la obtención de la constante de disociación por medio de FIS el aptámero incorpora una marca, un separador de 6 átomos de carbono con un tiol que hace posible la unión del aptámero a la superficie de oro. Por otro lado en el caso de la constante cuantificada en el experimento de espectroscopía de SPR el péptido se encuentra inmovilizado, para lo cual se introdujo una biotina para hacer posible el enlace a la superficie. Finalmente la constante estimada tratando los datos de las curvas de enlace frente a las partículas magnéticas modificadas con péptido 33-mer o con gliadina la especie inmovilizada es bin el péptido o la proteína mientras que el aptámero se

encuentra modificado con C6-biotina como en el caso de SPR, para su posterior marcaje enzimático con un conjugado estreptavidina HRP. En la Tabla 4-11 se puede ver resumidos los valores y las condiciones de las constantes encontradas.

Tabla 4-11: Comparativa de las constantes de disociación para el aptámero Gli 1 obtenidas mediante las diferentes técnicas.

Especie inmovilizada	Técnica	Marca Péptido	Marca Aptámero	K_D (nM)
Ninguna	ITC	Ninguna	Ninguna	45±10
Aptámero	FIS	Ninguna	Tiol-C6	98±48
Péptido	SPR	Biotina	Ninguna	51±16
Péptido	Partículas	Biotina	Biotina-C6	102±11

En todos los casos las marcas del aptámero se introducen en el extremo 5' mientras que las marcas en el péptido se introducen en el extremo C-terminal de la secuencia. La introducción de marca en el aptámero tiene un efecto negativo sobre la afinidad. La inmovilización del péptido mediante la introducción de una biotina tiene un efecto menor sobre la afinidad que la inmovilización del aptámero mediante la introducción de un grupo tiol. La biotilación del aptámero tiene una influencia menor en la afinidad dado que la constante de afinidad medida empleando el péptido también biotilado es comparable a la obtenida para el aptámero tiolado y el péptido sin marcar. La mayor influencia sobre la afinidad de los grupos tioles en comparación con la biotina ha sido previamente observada para el aptámero de la trombina [157].

En la Tabla 4-12 se compara la constante obtenida para el enlace del aptámero Gli 1 y el anticuerpo G12 al péptido 33-mer. Esta constante está obtenida mediante medidas de SPR en las mismas condiciones para ambos casos.

Tabla 4-12: Comparativa de las constantes obtenidas en el ensayo de SPR para el aptámero Gli 1 y para el anticuerpo G12.

	<u>K_D (nM)</u>
<u>Aptámero Gli 1</u>	51±16
<u>Anticuerpo G12</u>	17±3

La constante obtenida para el anticuerpo G 12 en las mismas condiciones que para el aptámero Gli 1 es menor, lo que indica que la afinidad de anticuerpo por el péptido 33-mer inmovilizado sobre la superficie del cristal del SPR es ligeramente mayor que la que presenta el aptámero Gli 1.

La constante de afinidad para la interacción entre los aptámeros y la proteína completa no se pudo obtener en disolución debido a problemas de solubilidad de la proteína. Únicamente fue posible medirla empleando aptámeros marcados con biotina. Comparando los datos obtenidos para la constante de disociación de los aptámeros biotinilados frente a la gliadina y frente al péptido, datos que se muestran en la Figura 4-13, se observa que la constante de disociación de casi todos los aptámeros frente al péptido es menor que la que se obtiene frente a la gliadina, excepto para el aptámero Gli sq04. Esto indica que la afinidad por la proteína completa es menor que la afinidad que presenta el aptámero por el péptido 33-mer. Como se ha comentado en la sección 3.4 no es infrecuente la menor afinidad por el péptido formando parte de la proteína completa que por el péptido aislado [127].

Tabla 4-13: Comparativa para las constantes de afinidad obtenidas a partir de las curvas de enlace de los aptámeros sobre las partículas modificadas con Gliadina o con péptido biotinilado.

K_D (nM)	Gli 1	Gli 12	Gli 3	Gli 4	Gli sq04
Péptido	102±11	296±38	94±4	61±4	144±7
Gliadina	267 ± 82	1600 ± 600	117 ±8	89 ± 4	103 ± 70

Realizando la misma comparación para los datos obtenidos con el anticuerpo para el reconocimiento de la proteína y del péptido (Tabla 4-14) se observa que, al igual que en el caso de los aptámeros, la constante de afinidad medida para el enlace del anticuerpo G12 al péptido es menor que la obtenida para el enlace del anticuerpo G 12 a la proteína completa. Por lo tanto, la afinidad por el péptido dentro de la proteína es inferior tanto para el anticuerpo como para los aptámeros.

Tabla 4-14: Comparativa para las constantes de afinidad obtenidas mediante SPR para el anticuerpo G12 frente a la gliadina o el péptido 33-mer inmovilizado.

	K_D (nM)
Péptido	17±3
Gliadina	31±12

5 Ensayos electroquímicos de cuantificación de gluten

5.1 Introducción

Como se ha puesto de manifiesto en el primer capítulo de esta tesis, la disponibilidad de métodos rápidos y sensibles para el análisis de gluten en alimentos es crucial para poder certificar que un alimento es seguro para el consumo de personas celiacas o con algún desorden relacionado con el gluten.

Teniendo en cuenta la complejidad del problema que se plantea, solo mediante el empleo de ensayos de alta sensibilidad y selectividad será posible proporcionar a los pacientes celiacos o sensibles al gluten una dieta segura. Para desarrollar estos métodos se requiere disponer de receptores de elevada afinidad y selectividad. De hecho, los métodos estándar más empleados en la actualidad para resolver el problema son inmunoensayos que utilizan anticuerpos que reconocen a alguna de las fracciones alergénicas. Los aptámeros desarrollados a lo largo de este trabajo constituyen una excelente alternativa a los anticuerpos para desarrollar dispositivos analíticos con las características analíticas que se exigen para garantizar la ausencia del alérgeno en alimentos. Su naturaleza no proteica les hace más resistentes químicamente, así como la posibilidad de síntesis química de manera reproducible, son algunas de las ventajas de estos nuevos receptores cuando se les compara con los anticuerpos.

En este capítulo se describe el desarrollo, caracterización y validación de diferentes métodos para la cuantificación de gluten que emplean alguno de los aptámeros seleccionados como elementos de reconocimiento. Inicialmente se consideró que un sensor químico, en el que el receptor molecular se integre sobre la superficie de un transductor, sería una excelente alternativa a los

métodos actualmente disponibles. Considerando que la mayor parte de estos métodos utilizan un sistema de transducción óptico, se exploró en primer lugar la compatibilidad de la detección de esta proteína. Para ello, se acopló un enzimoimmunoensayo ELISA sándwich comercial a un transductor electroquímico. Posteriormente, se exploraron diferentes esquemas para el acoplamiento de los aptámeros con transductores electroquímicos. Los métodos que mejores características analíticas presentaron fueron utilizados para la cuantificación de gluten en una amplia variedad de matrices alimentarias.

5.2 Adaptación de un método óptico a detección electroquímica

Uno de los objetivos de este trabajo es el desarrollo de un método electroquímico para la detección de gluten en alimentos. Para ello, en primer lugar se planteó la adaptación de un inmunoensayo comercial de tipo ELISA, diseñado para la detección óptica, a un sistema de detección electroquímica. En la obtención de los aptámeros se empleó como diana el péptido 33-mer, por esto, se seleccionó un inmunoensayo comercializado por la empresa Biomedal que utiliza el anticuerpo G12. Este anticuerpo ha sido seleccionado y reconoce este mismo fragmento peptídico inmunotóxico para los enfermos celíacos. El kit del inmunoensayo ELISA seleccionado consta de una placa de pocillos de microtitulación recubierta con gliadina, el anticuerpo G12 marcado con enzima HRP y estándares de diferentes concentraciones de gliadina, y utiliza un formato de ensayo competitivo, por lo que permite la detección de gluten en alimentos hidrolizados. El ensayo comercial emplea el sustrato enzimático tetrametilbencidina (TMB) para la detección óptica, este sustrato es fácilmente

detectable mediante técnicas electroquímicas y ha sido utilizado previamente en los ensayos sobre partículas magnéticas descritos en la sección 3.4.

El ensayo, esquematizado en la Figura 5-1, se realizó en las condiciones que indica el fabricante, que implica las siguientes etapas:

- 1) 300 μL de muestra o de estándar se pre-incubaron con 300 μL de disolución del anticuerpo G12 conjugado con HRP durante 45 minutos.
- 2) Se introdujeron 200 μL de esta mezcla en los pocillos tapizados con gliadina y se dejó interaccionar durante 30 min. Muestras y patrones se procesaron por duplicado.
- 3) Pasado el tiempo de reacción se retiró la disolución de los pocillos y se lavaron 5 veces con la solución de lavado del kit.
- 4) Tras los lavados se retiró toda la disolución de los pocillos y se introdujo en los mismos 100 μL de la mezcla de disolución sustrato $\text{TMB}_{(\text{Red})} + \text{H}_2\text{O}_2$ y se incubó en la oscuridad 15 min. mientras transcurre la reacción enzimática.
- 5) Finalmente se para la reacción enzimática con 100 μL de disolución 1 M de H_2SO_4 .

La etapa final del ensayo implica la medida de la actividad de HRP inmovilizada sobre los pocillos de la placa, que se correlaciona con la cantidad de gliadina inicialmente presente. Para ello se utiliza un método de tiempo fijo, midiendo la cantidad de producto generado después de que la reacción enzimática ha transcurrido durante un tiempo controlado

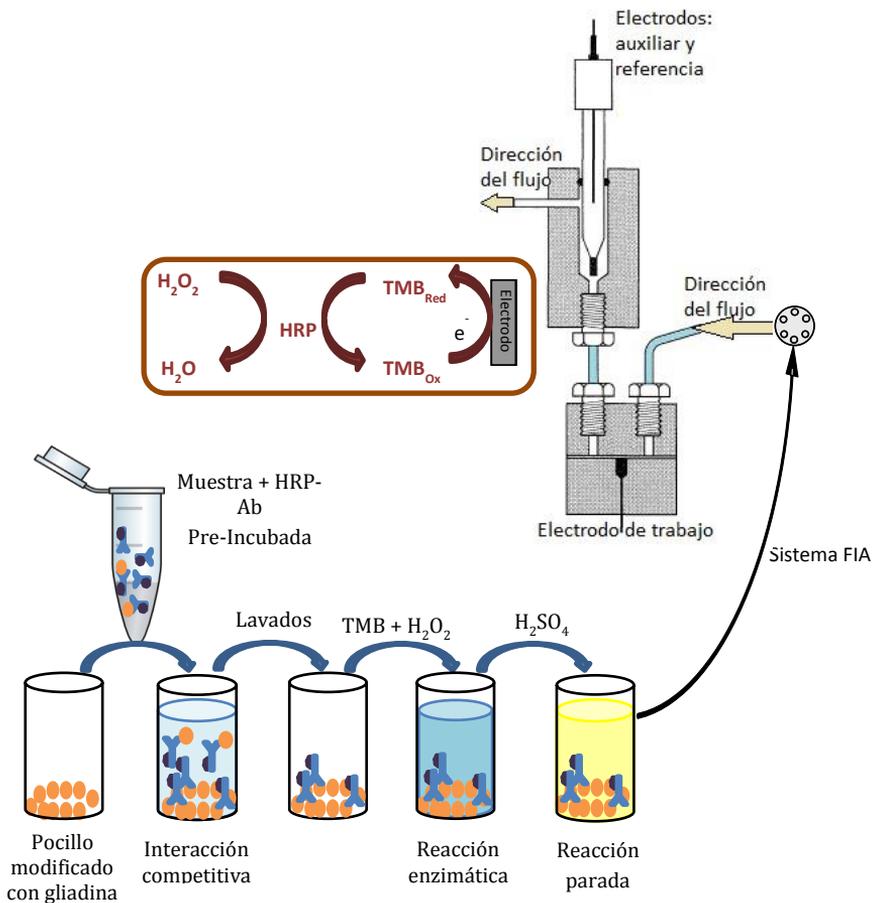


Figura 5-1: Esquema del ensayo ELISA + FIA electroquímico.

El sustrato, TMB, es oxidado por el H_2O_2 en presencia de la enzima HRP que actúa como catalizador, el producto de oxidación es azul y tras la adición de ácido adopta color amarillo, presentando un máximo de absorbancia a 450 nm. Como TMB es una molécula electroactiva, la reacción se puede seguir tanto espectrofotométrica como electroquímicamente, en este último caso se puede medir la reducción de $TMB_{(Ox)}$. Debido al medio ácido que se obtiene finalizando el ensayo no es posible llevar a cabo las medidas, tal y como se ha hecho

anteriormente, sobre electrodos de carbono serigrafiado dado que el electrodo de pseudo-referencia es una tinta de Ag que se disuelve parcialmente en dicho medio. El volumen final, tras parar la reacción enzimática, en los pocillos de la placa de microtitulación es de 200 μL , por lo que no es posible llevar a cabo la medida en una celda electroquímica convencional, que requiere un volumen de trabajo mayor al disponible.

Por todo lo anterior, se optó por llevar a cabo una medida amperométrica en un sistema de inyección en flujo (FIA) con un electrodo de carbono vitrificado que es compatible con el medio de medida. El sistema FIA empleado consta de: una bomba peristáltica IsmaTec; válvula de inyección de seis vías; celda de flujo de metacrilato con un electrodo de carbono vitrificado; jeringa de plástico, acoplada a la salida del flujo de la celda, en la que se alojan los electros de referencia $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}$ (3M) y el electrodo auxiliar: tubo de acero a través del cual la disolución portadora se dirige hacia el desecho. De esta forma, una vez que se ha completado la reacción inmunológica en la placa, se realizó la inyección de un volumen de disolución pequeño, 50 μL , en el sistema de flujo, superando el inconveniente de la limitación de volumen. La disolución portadora utilizada fue H_2SO_4 0,5 M al igual que el medio en el que se encuentra el producto de la reacción enzimática.

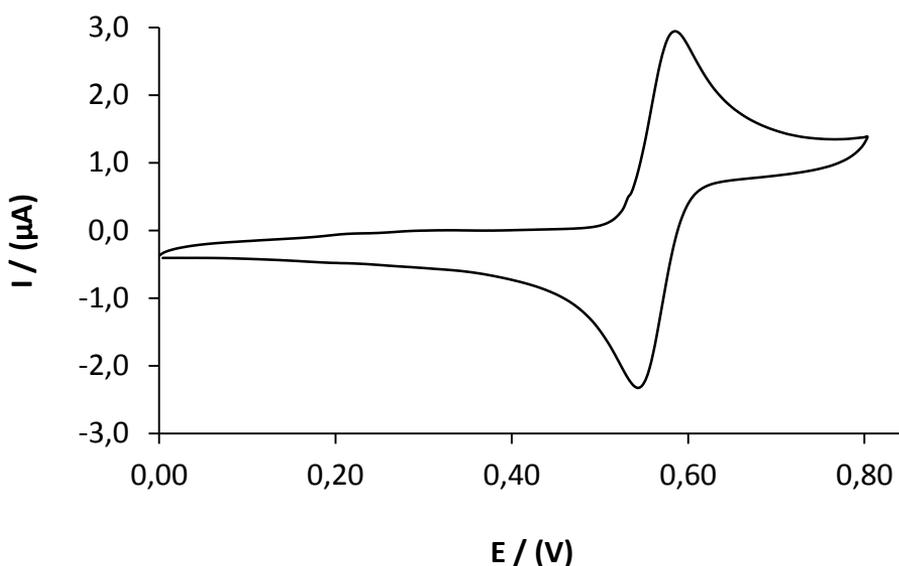


Figura 5-2: Voltametría cíclica del TMB oxidado en medio ácido en un electrodo de carbono vitrificado.

Teniendo en cuenta que el proceso redox del TMB en electrodo de carbono vitrificado y en medio de H_2SO_4 0,5 M aparece a $E^{\circ'} = 0,56$ V (Figura 5-2), para la detección amperométrica se seleccionó un potencial al que el producto de oxidación generado enzimáticamente se reduzca sobre el electrodo. Se escogió para la medida un potencial 100 mV menos positivo que el potencial de pico catódico para asegurar la completa reducción del $\text{TMB}_{(\text{ox})}$, por ello el potencial de medida fue de 0,44 V. a este potencial se obtiene un pico (figrama) cuando la muestra pasa por el electrodo de medida en el sistema de flujo.

En primer lugar se evaluó la detectabilidad de la $\text{TMB}_{(\text{ox})}$ midiendo la corriente de reducción de este compuesto tras su inyección en el sistema FIA a concentraciones desde 0,1 hasta 0,8 μM . $\text{TMB}_{(\text{ox})}$ no es un producto comercial, por lo que fue necesario generarlo para su medida añadiendo a 500 μL de TMB de concentraciones crecientes, en presencia de 0,1 mM de H_2O_2 y 40 μL de HRP

10 µg/mL. Se aseguró que la oxidación había sido cuantitativa mediante medidas amperométricas a +0,68 V antes y después de la oxidación enzimática. En ambos casos las medidas se realizaron en ácido sulfúrico para simular las condiciones experimentales empleadas en el inmunoensayo. Se obtuvo que, para la concentración de TMB más alta ensayada, la intensidad de corriente medida después de la oxidación enzimática (30 min) fue solo un 3 % de la intensidad de corriente inicial. Debido a esto se considera que se consigue la oxidación cuantitativa del sustrato en las condiciones experimentales. La introducción del TMB_(Ox) a diferentes concentraciones en el sistema FIA, dio lugar a corrientes de reducción que se relacionan con la concentración de producto mediante la recta de regresión siguiente: $I(\text{nA}) = -0,20 + 10,8 [\text{TMB}_{(\text{Ox})}]$ (µM); $r=0,993$, con un límite de detección estimado de 67 nM. A la vista de estos resultados el sistema FIA con detección amperométrica diseñado es una excelente alternativa a la detección óptica para la medida de la actividad enzimática HRP.

Inicialmente, se estudió la influencia del tiempo de reacción enzimático sobre la intensidad de corriente medida para una concentración de gliadina de 30 ppb. El tiempo de reacción enzimática recomendado por los fabricantes del kit es de 30 min, sin embargo, a partir de 5 minutos de incubación se midieron intensidades de corriente de 200 nA. A tiempos más largos la señal se incrementó, llegando a doblarse a los 15 minutos y alcanzando los 480 nA a los 30 minutos. Por esto se seleccionó un tiempo de incubación de 15 minutos para los experimentos siguientes.

Como se mencionó anteriormente, el formato de ensayo competitivo permite la detección de gliadina nativa e hidrolizada. Aunque el kit comercial recomienda

el uso de la prolamina completa como estándar de calibración la respuesta del ensayo a hidrolizados puede ser diferente. Por esta razón se examinó la posibilidad de emplear el péptido 33-mer como estándar. Con este propósito se evaluó la respuesta del ensayo frente a tres estándares diferentes, el péptido 33-mer, las disoluciones de gliadina suministradas con el kit y disoluciones de gliadina de Sigma preparadas en tampón proporcionado con el kit. Las concentraciones de los estándares empleadas fueron 7,5; 15; 30; 60 y 120 ppb preparadas en el tampón de trabajo aportado por el fabricante. En todos los casos, tras parar la reacción enzimática se midió la señal óptica y posteriormente se inyectó en el sistema FIA una fracción de la disolución de cada pocillo. La Figura 5-3 muestra el fiagrama característico, obtenido para concentraciones crecientes de gliadina del kit. Para poder establecer la comparación entre medidas fue necesaria la normalización de las mismas, mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Señal} = \frac{S_i - S_{\min}}{S_{\max} - S_{\min}} \times 100$$

Donde S_i es la señal para cada concentración, S_{\min} es la señal para la concentración más alta y S_{\max} es la señal para la concentración menor. En la medida óptica la señal es la densidad óptica, mientras que para la medida electroquímica es la intensidad de corriente medida al final del ensayo.

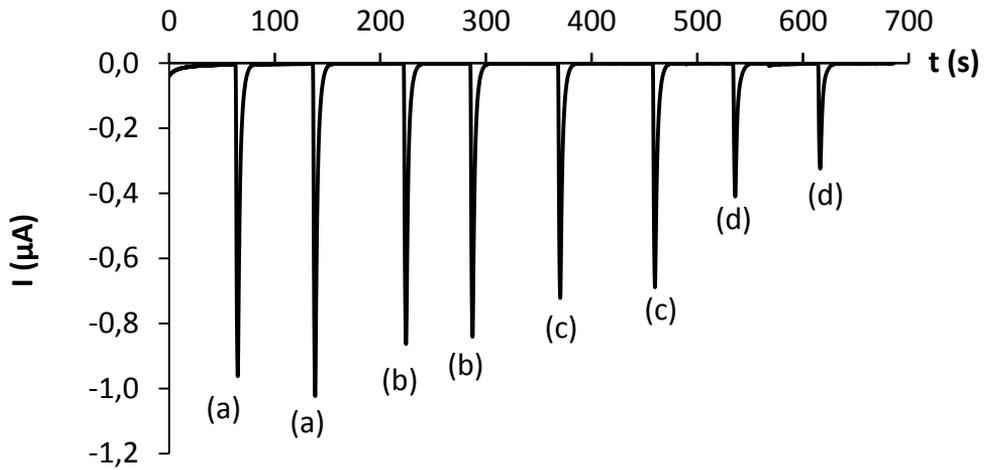


Figura 5-3: Señales de amperometría en flujo obtenidas para concentraciones de gliadina del kit: (a) 7,5 ppb; (b) 15 ppb; (c) 60 ppb; (d) 120 ppb.

De esta forma se obtienen las curvas dosis-respuesta que se muestran en la Figura 5-4 para los estándares propuestos.

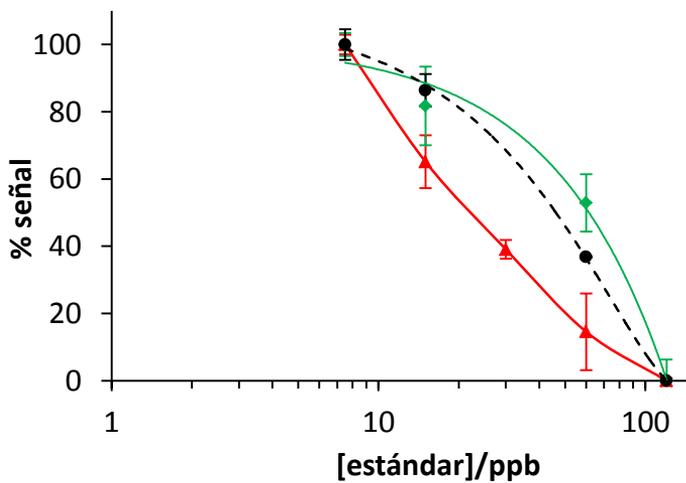


Figura 5-4: Curva dosis-respuesta normalizada obtenida empleando gliadina del kit (verde), gliadina de Sigma (negro) y 33-mer (rojo) como estándar para la calibración.

Como puede observarse, las curvas de respuesta obtenidas para los patrones de gliadina de Sigma y gliadina del kit son similares, lo que sugiere que el patrón de calibración propuesto en el kit es gliadina, con una ligera influencia de la composición desconocida del tampón. Sin embargo la curva dosis respuesta obtenida empleando el de péptido 33-mer presenta un comportamiento diferente, obteniéndose señales menores (una mayor respuesta) a la misma concentración, en ppb, para el péptido. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que la concentración de ambas especies no puede ser directamente comparada en estas unidades. Puesto que la forma habitual que presenta una curva dosis respuesta en los ensayos ELISA es sigmoidea, podría considerarse que la respuesta al estándar de gliadina corresponde a la parte superior de esta curva mientras que la respuesta del péptido se correspondería con la parte inferior de la misma, si ambos se expresan en unidades de concentración equivalentes.

Por lo tanto, si se desea utilizar el péptido 33-mer como patrón es imprescindible establecer una equivalencia entre proteína y péptido que permita expresar los resultados obtenidos de unidades de péptido a gluten en muestra. Para esto es necesario conocer la estequiometría de la interacción de afinidad entre el anticuerpo G12 y la gliadina. Aunque el epítipo de unión del anticuerpo al péptido se encuentra repetido 3 veces en el 33-mer, solo es posible la unión de un anticuerpo al péptido por razones estéricas. Si se establece el número de moléculas de anticuerpo que se enlazan a la gliadina se podría obtener un factor de conversión de ppm de péptido a ppm de gluten.

Con este fin se representaron los resultados para los dos estándares, expresando su concentración en nanoequivalentes/L. En el caso del 33-mer se

asumió que, el número de equivalentes/mol es de 1 por la razón expuesta, mientras que en el caso de la gliadina podría ser superior a 1, por lo que se realizó el cálculo suponiendo valores de entre 1 y 3 equivalentes/mol. Se obtuvo una única curva sigmoidea tanto en el caso en la que se supuso estequiometría gliadina-anticuerpo 1:1, representada en la Figura 5-5, como en el caso de estequiometría 1:2, representada en la Figura 5-6. En ambos casos, la parte superior de la curva sigmoidea se corresponde con las señales obtenidas para la gliadina mientras que la parte inferior se corresponde a las señales obtenidas para el péptido. Estequiometrías superiores no presentan una única curva sigmoidea.

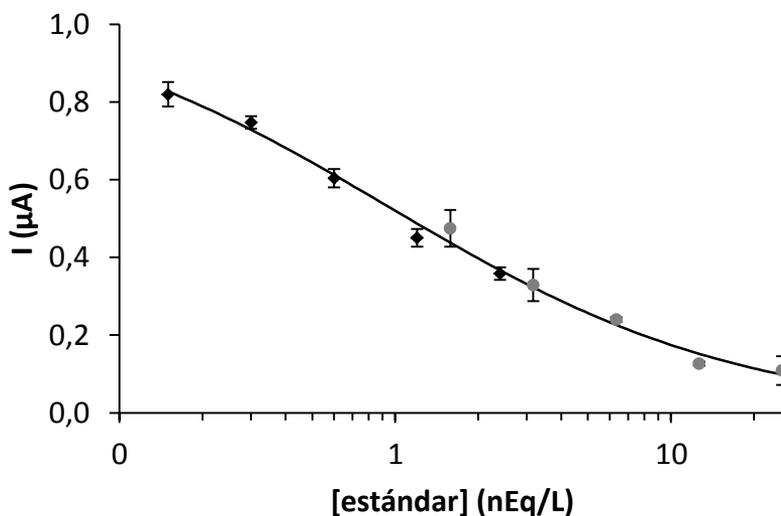


Figura 5-5: Representación de la relación entre la intensidad de corriente medida, en μA , y la concentración de gliadina (negro) y péptido 33-mer (gris) en nEq/L suponiendo en el caso de la gliadina una estequiometría de unión con el anticuerpo 1:1

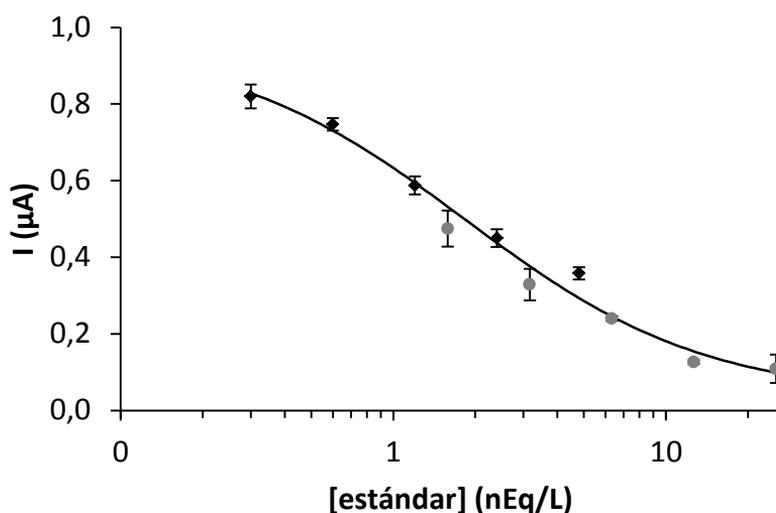


Figura 5-6: Representación de la relación entre la intensidad de corriente medida, en μA , y la concentración de gliadina (negro) y péptido 33-mer (gris) en nEq/L suponiendo en el caso de la gliadina una estequiometría de unión con el anticuerpo 1:2

El ajuste sigmoideo en ambos casos, tanto en estequiometría 1:1 como en estequiometría 1:2 da lugar a representaciones muy similares. Sin embargo, solo la estequiometría 1:2 es compatible con el hecho que el anticuerpo G12 se ha utilizado en un ensayo ELISA de tipo sándwich, donde este anticuerpo se utiliza tanto como anticuerpo de captura como de detección. Por eso se ha utilizado en posteriores cálculos que cada mol de gliadina contiene 2 equivalentes. De esta forma es posible realizar una conversión de unidades de péptido a unidades de gluten permitiendo la comparación con la legislación vigente y con otros ensayos ELISA.

Se obtuvieron pues las características analíticas del método usando el péptido 33-mer como estándar para la calibración. Para ello se evaluó la respuesta a concentraciones crecientes del mismo, desde 0,4 hasta 400 ppb. La curva

sigmoidea decreciente obtenida se muestra en la Figura 5-7. El intervalo analíticamente útil se establece como las concentraciones de péptido que proporcionen una señal comprendida entre el 80 y el 20 % de la señal máxima y se muestra en la gráfica como líneas horizontales discontinuas. El límite de detección se estima como la concentración de péptido que proporciona una señal correspondiente al 95 % de la señal máxima y se muestra en la gráfica como una línea horizontal continua.

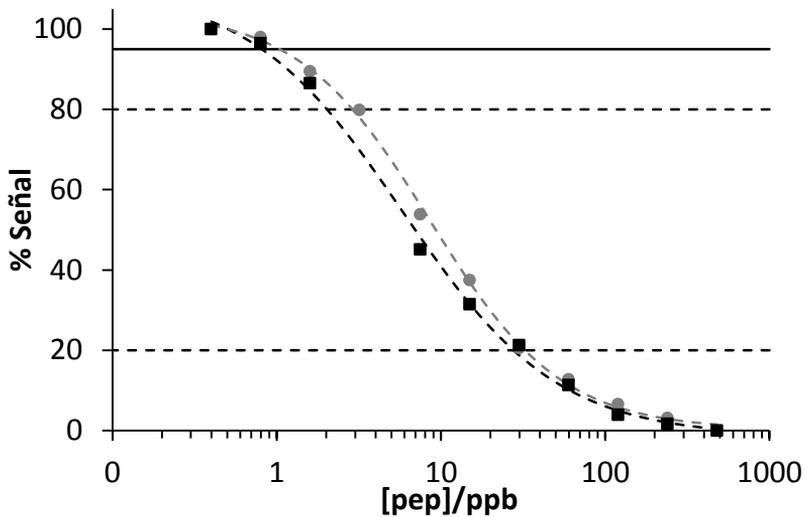


Figura 5-7: Curva dosis respuesta normalizada empleando como estándar para la calibración el péptido 33-mer medida óptica (gris) medida electroquímica (negro).

En la Tabla 5-1 se muestran las características analíticas comparadas para los ensayos electroquímico y óptico. El límite de detección se expresa en concentración de gluten empleando la conversión encontrada previamente y es muy similar al encontrado por los fabricantes del kit (1,26 ppm) lo que sugiere

que la detectabilidad del ensayo está limitada por la afinidad del anticuerpo y no por la técnica de detección empleada.

Tabla 5-1. Características analíticas del ensayo ELISA de detección de gluten en alimentos con detección óptica y con detección electroquímica.

	Detección óptica	Detección electroquímica
Intervalo lineal	2,8-29,4 ppb gliadina	1,8-27,4 ppb gliadina
L. D.	1,0 ppm gluten	0,75 ppm gluten

En la Figura 5-8 se presenta la comparación de las señales electroquímica y óptica para el ensayo anterior. La recta de regresión $\%S_{\text{electroquímica}} = 0.99 \%S_{\text{óptica}} - 2$; $r=0.998$, indica que existe una buena correlación entre las dos técnicas de detección empleadas.

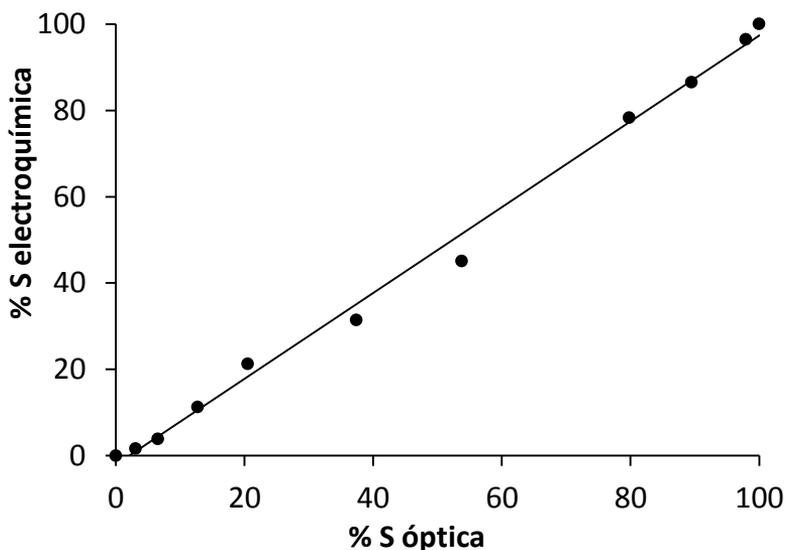


Figura 5-8: Correlación entre las señales electroquímica y óptica para el calibrado con gliadina.

Se emplearon los ensayos electroquímico y óptico para la determinación del contenido en gluten de muestras de alimentos libres de gluten, utilizando el

péptido 33-mer como estándar de calibración y la equivalencia encontrada anteriormente para la conversión de unidades de péptido a gluten. Para esto se extrajo la prolamina presente en las muestras empleando una disolución de etanol al 60 %, para lo cual se añadió 10 mL de esta disolución a 1 g de muestra alimentaria, incubando la mezcla durante 30 minutos con agitación. Tras la extracción se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 2500 g y temperatura ambiente, y el sobrenadante convenientemente diluido con la disolución proporcionada junto con el kit, se sometió al inmunoensayo. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5-2. Las mismas muestras fueron analizadas por un laboratorio independiente empleando el método de referencia, inmunoensayo de tipo sándwich con el anticuerpo R5, así como el mismo kit basado en el anticuerpo G12 siguiendo las instrucciones del fabricante y empleando como estándar las disoluciones de gliadina proporcionadas en el mismo. La comparación de los resultados también se muestra en la tabla siguiente.

Tabla 5-2: Comparación de los contenidos de gluten (ppm) en distintos alimentos, medidas empleando distintos anticuerpos, estándar y sistema de detección.

	G12 competitivo			R5 Sándwich
	Estándar 33-mer		Estándar Gliadina Kit	
	Electroquímico	Óptico	Óptico	
Galletas	<0,75	<1,5	<1,26	<5
Magdalenas	1,2	<1,5	<1,26	<5
Bizcocho	<0,75	<1,5	<1,26	--
Gazpacho	<0,75	<1,5	<1,26	<5
Espárragos	<0,75	<1,5	<1,26	<5

A la vista de los resultados se concluye que todas las muestras analizadas, excepto las magdalenas, tienen contenidos de gluten por debajo del límite de

detección de todos los métodos. Las magdalenas contienen 1,2 ppm de gluten, valor que se encuentra por encima del límite de detección del método empleando detección electroquímica, pero por debajo del límite de detección de los demás ensayos. Todas las muestras se encuentran correctamente etiquetadas y cumplen los requisitos de la etiqueta “Controlado por FACE” que garantiza un contenido en gluten de menos de 10 ppm.

Para validar el ensayo con detección electroquímica se realizó un ensayo de la recuperación empleando una galleta etiquetada como “sin gluten” enriquecida con 75 ppm de gliadina comercial. La muestra, enriquecida adicionando gliadina de Sigma, fue homogeneizada y posteriormente extraída siguiendo el procedimiento indicado anteriormente. La muestra sin enriquecer proporcionó una señal inferior al límite de detección de la técnica confirmando que es un producto etiquetado correctamente “sin gluten” el análisis de las muestras enriquecidas permitió obtener una recuperación de $(82,4 \pm 5,0) \%$.

5.3 Desarrollo de un apta-sensor electroquímico sobre electrodos nanoestructurados de oro

Una vez comprobadas las excelentes características analíticas que se obtienen al emplear detección electroquímica en inmunoensayos comerciales, se plantea el desarrollo de un sensor con los nuevos receptores seleccionados en este trabajo.

Con el objeto de desarrollar un sensor de bajo coste se decidió elegir una plataforma sensora desechable y para favorecer la sensibilidad se pensó en

aprovechar los beneficios de los electrodos nanoestructurados, concretamente nanoelectrodos de oro.

Este tipo de electrodos fue introducido por Martin en los años 90 como un tipo de ultramicroelectrodos generados por deposición no electroquímica de oro en los poros de membranas de policarbonato [158]. Sus ventajas consistían en disminuir fuertemente la corriente capacitiva mientras que se mantenía la corriente faradaica. Posteriormente, a principios de este siglo, se propuso la eliminación parcial del policarbonato que rodea al oro para dejar al descubierto partes de los laterales de oro depositado [159, 160]. De esta forma los electrodos pasan de dos a tres dimensiones y se dispone de mayor superficie para la inmovilización de reactivos de reconocimiento.

Inicialmente la eliminación del policarbonato se realizaba con plasma de oxígeno seguido de un sellado térmico [159, 160]. Más recientemente se han propuesto otras alternativas más económicas como mezclas de disolventes (disolución o eliminación química) [161]. Esta plataforma se va a usar para la construcción de un aptaensayo competitivo donde el péptido 33-mer estará inmovilizado sobre los nanoelectrodos de oro y se producirá una competición de este péptido y la proteína PWG en disolución por una cantidad limitada de aptámero.

El protocolo de obtención de los nanoelectrodos en tres dimensiones (NEE) fue el siguiente. Se utilizaron membranas de filtración de policarbonato de tamaño de poro 50 nm como molde [161], que se sensibilizaron con estaño sumergiéndolas en SnCl_2 25 mM en una mezcla metanol/agua 50:50.

Posteriormente se sustituyó el estaño depositado sobre la membrana por plata mediante inmersión en una disolución amoniacal de AgNO_3 durante 10 minutos. De esta forma la membrana queda recubierta con plata elemental. Posteriormente se introdujo la membrana en el seno de una disolución de 10 mg/mL de $\text{Na}_3\text{Au}(\text{SO}_3)_2$ en tampón de 125 mM de Na_2SO_3 , 25 mM de NaHCO_3 y 625 mM de CH_2O de pH 10 y se dejó a 4°C durante 24 horas. Finalmente, la membrana recubierta con oro depositado se limpia con HNO_3 al 25 % durante 12 horas, metanol durante 10 minutos y agua durante 10 minutos.

En este punto los poros de la membrana contienen de oro formando nanotubos de 50 nm de grosor y las dos caras de la misma se encuentran recubiertas de láminas de oro. Para continuar con el proceso de construcción de la nanoestructura es necesario retirar una de las láminas de oro, de forma que se descubra la parte superior de los nanotubos de oro formados en los poros de la membrana. Esto se llevó a cabo mediante una exfoliación mecánica. La última etapa consistió en la exposición de los nanotubos de oro, disolviendo parcialmente la membrana con una mezcla de disolventes $\text{EtOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ al 50%. De esta forma se obtiene un conjunto de nanoelectrodos de oro con una disposición en forma de cepillo. En la Figura 5-9 se esquematiza la modificación de la membrana y la exposición de la nano-estructura formada en la superficie de la misma, teniendo así un NEE en 2D.

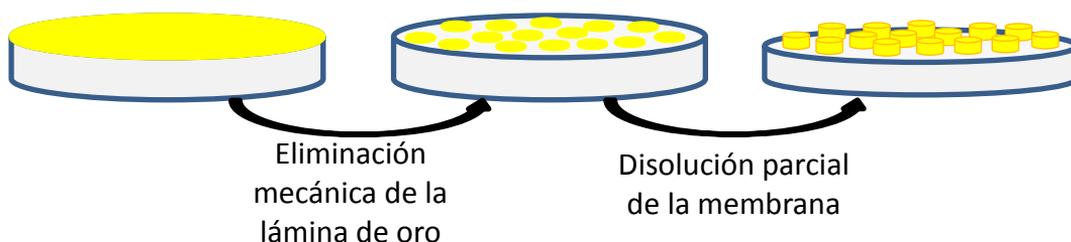


Figura 5-9: Esquema de las etapas finales de la construcción de los NEE de oro.

Estas membranas no pueden utilizarse directamente como electrodos (Figura 5-10 A). Para ello es necesario ponerles un contacto de cobre que permita su conexión al potencióstato. Además es necesario delimitar el área de trabajo, por lo que cada membrana se dividió en 20 porciones de $4 \times 4 \text{ mm}^2$ (Figura 5-10 B) y sobre cada una de ellas se colocó una máscara de teflón adhesiva con un agujero de 2 mm de diámetro. Esta área será el electrodo de trabajo. El contacto se realiza por la parte de atrás de la membrana, que aún está recubierta de oro, con una cinta de cobre (Figura 5-10 C). el resultado final es el que se muestra en la Figura 5-10 D.

Los electrodos construidos se sometieron a un proceso de limpieza electroquímica que permitió también observar su comportamiento electroquímico y detectar fallos en la construcción (recubrimientos heterogéneos, incompletos, falta de contacto eléctrico, etc.) El tratamiento electroquímico consistió en 10 ciclos de $-0,2 \text{ V}$ a $-1,6 \text{ V}$ a 100 mV/s en KOH $0,5 \text{ M}$ para eliminar de la superficie posibles restos de materia orgánica y otros 15 ciclos en H_2SO_4 $0,5 \text{ M}$ de 0 V a $1,6 \text{ V}$ a 100 mV/s hasta obtener el voltagrama cíclico típico del oro policristalino, como el que se muestra en la Figura 5-11.

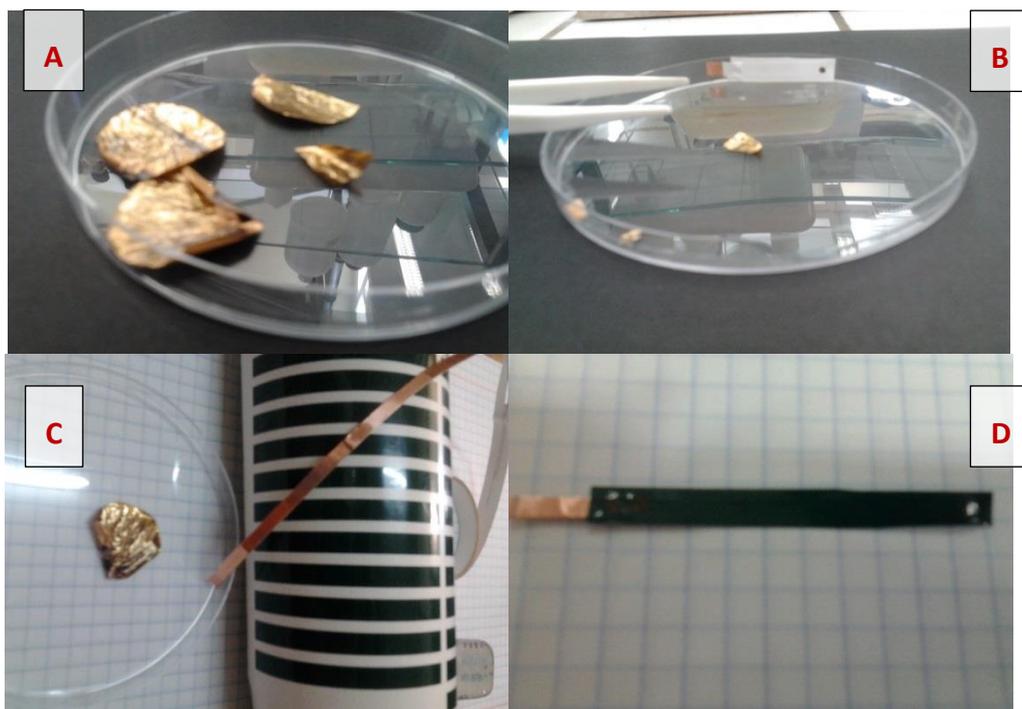


Figura 5-10: Construcción de los electrodos a partir de las membranas. (A) Membranas modificadas con oro; (B) Corte de la membrana; (C) Máscara, membrana y cinta adhesiva de cobre; (D) Electrodo construido

Mediante la integración del proceso de reducción de los óxidos de oro, es posible estimar el área activa del electrodo, considerando que una monocapa de óxidos de oro corresponde a $390 \mu\text{C}/\text{cm}^2$.

Para cada electrodo construido se calculó el área electroquímicamente activa obteniéndose un promedio de 21 mm^2 con una RSD del 45 %. Teniendo esto en cuenta, en el ensayo se trabajó con los valores de densidad de corriente para corregir las posibles diferencias de señal atribuibles a la variabilidad del área electroactiva.

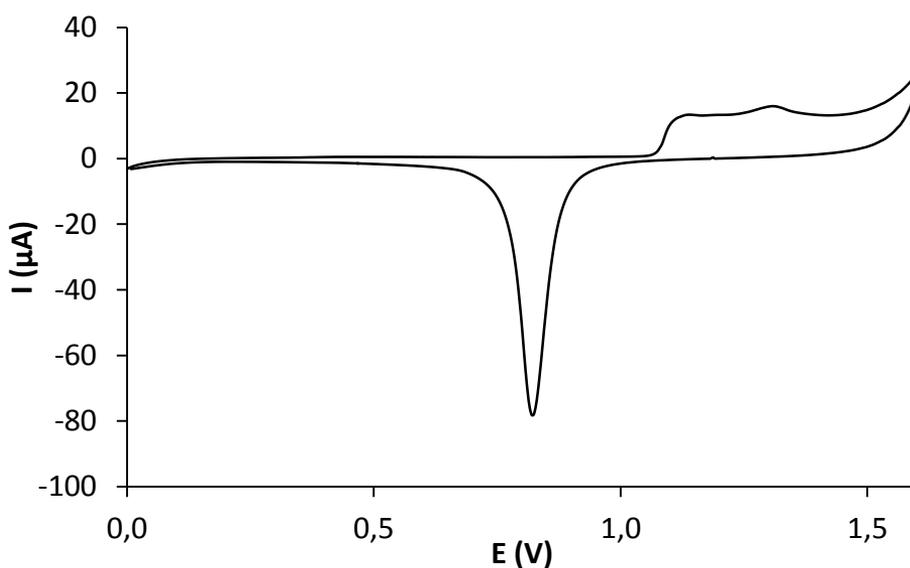


Figura 5-11: Voltametría cíclica de un electrodo construido con una membrana de oro nanoestructurada en H_2SO_4 0,5 M.

La preparación de la fase sensora requiere la inmovilización del péptido 33-mer. Se dispone del péptido biotinilado por lo que la estrategia se basó en la obtención de una superficie modificada con estreptavidina. Para ello se formó una monocapa autoensamblada con un reactivo heterofuncional que contiene un grupo tiol en un extremo y una biotina por el otro. Este reactivo es el HDPD-biotin (piridilditio-biotina), conocido comercialmente como EZ-Biotin y viene como disulfuro, por lo que, en realidad, se forma una monocapa tiólica mixta en la que la mitad está formada por el piridilo tiolado y la otra mitad por la biotina modificada con un espaciador de seis carbonos terminando en un grupo tiol. El procedimiento empleado fue el siguiente:

1. Sobre un electrodo nanoestructurado, se colocó una gota de 10 μL de EZ-Biotin en etanol 50 μM y dejándolos en un ambiente saturado de etanol a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche.
2. Tras un lavado del electrodo con PBS, se depositó una gota de 10 μL de estreptavidina 0,5 mg/mL en PBS y se dejó interaccionar a temperatura ambiente durante 30 min.
3. Tras un nuevo lavado con PBS, se colocó electrodo una gota de 10 μL de péptido 33-mer biotinilado 2 μM en PBS durante 30 minutos.
4. Después de eliminar esta disolución y lavar con PBS, se colocó sobre el electrodo una gota de 10 μL de biotina 500 μM en PBS y se dejó interaccionar durante 30 min para bloquear los sitios de unión libres de la estreptavidina.

Los ensayos competitivos se caracterizan por emplear cantidades limitantes de uno de los reactivos, en nuestro caso, el aptámero. Es, por tanto, imprescindible seleccionar la concentración de aptámero que permita una competición efectiva entre el péptido inmovilizado y la proteína en disolución. Haciendo interaccionar concentraciones crecientes de aptámero con la superficie modificada con péptido 33-mer. El aptámero empleado en la obtención de la curva de enlace fue el Gli 4 biotinilado, ya que mejores características de afinidad presenta. Se hicieron interaccionar con la superficie concentraciones de aptámero de 10 nM, 100 nM, 1 μM y 10 μM . La detección se realizó mediante cronoamperometría tras el marcaje del aptámero en superficie con Str-HRP y posterior reacción enzimática con TMB + H_2O_2 . El protocolo empleado fue el siguiente:

1. Se colocó sobre el electrodo una gota de 10 μL de la concentración de Gli 4 biotinilado correspondiente en BS y se dejó interaccionar 30 min.

2. Tras lavar el electrodo con BSL, se depositó una gota de 10 μL de conjugado enzimático estreptavidina-HRP 2,5 mg/mL en BSL y se dejó interaccionar a temperatura ambiente durante 30 min sobre el electrodo.

3. a continuación se lavó el electrodo con BS, y se introdujo en una microcelda con 200 μL de sustrato TMB comercial y se dejó transcurrir la reacción enzimática durante 1 min, tras lo cual, se llevó a cabo la medida cronoamperométrica.

En estas condiciones la densidad de corriente para la mayor concentración de aptámero (10 μM) fue de 1 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$ mientras que la del blanco fue de 0,9 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$. Estos resultados impiden la detección específica de la interacción entre el péptido y el aptámero. Se probó a inhibir esta interacción inespecífica con distintos bloqueantes incluyendo en los tampones empleados en las etapas de marcaje enzimático, de lavado o en ambas, 1 % de caseína, 1% de BSA o empleando un tampón comercial de bloqueo sin proteínas. Las medidas obtenidas para el blanco y para una concentración de Gli 4 biotinilado de 10 μM en los ensayos anteriormente descritos se encuentran recogidas en la Tabla 5-3.

Tabla 5-3: Señales en densidad de corriente ($\mu\text{A}/\text{mm}^2$) para el blanco y una concentración de Gli 4 de 1 μM para el ensayo sobre electrodos de oro empleando una monocapa de EZ-Biotin y diferentes bloqueantes.

	Sin bloqueante	Caseína	BSA	Tampón bloqueo sin proteínas
Blanco	0,90 \pm 0,07	1,36 \pm 0,10	0,08 \pm 0,01	0,47 \pm 0,16
Gli 4 10 μM	1,02 \pm 0,26	1,08 \pm 0,18	0,06 \pm 0,01	0,64 \pm 0,10

En ninguno de los casos anteriores se consiguió diferenciar la señal del blanco de la concentración más alta del aptámero por lo que se optó por un diseño alternativo de fase sensora, concretamente el descrito en la sección 4.3.1 en los

ensayos de SPR, basado en la formación de una SAM con una mezcla de ácido mercaptopropánico (MPA) y ácido mercaptoundecanoico (MUA) 10:1 y posterior enlace covalente de la estreptavidina. Para la formación de la monocapa se colocó en el electrodo una gota de 10 μL de 10 mM de ácidos mercaptopropánico y mercaptoundecanoico en proporción 10:1 en etanol y se dejaron a 4 °C durante toda la noche en un ambiente saturado de etanol para evitar la evaporación. Una vez formada la monocapa de MPA:MUA, se procedió a la inmovilización covalente de la estreptavidina siguiendo el protocolo detallado a continuación:

1. Se depositó sobre el electrodo una gota de 10 μL de N-hidroxisuccinimida (NHS) 200 nM y de etil-(dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) 50 nM en agua y se dejó interaccionar durante 15 minutos.
2. Se lavó el electrodo con tampón de acetato de sodio 10 mM de pH 4,5, y se depositó sobre el electrodo una gota de 10 μL de estreptavidina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón de acetato de pH 4,5 y se deja interaccionar durante 60 min.
3. Se lavó el electrodo con HEPES de pH 8 y se depositó una gota de 10 μL de etanolamina 1 M en tampón de HEPES de pH 8 y se dejó interaccionar durante 30 min, para inactivar los grupos carboxílicos que no hubiesen reaccionado con la estreptavidina.
4. A continuación, se colocó sobre el electrodo una gota de 10 μL de péptido 33-mer biotinilado 2 μM en PBS durante 30 minutos.
5. Tras un lavado del electrodo con PBS, se colocó sobre el electrodo una gota de 10 μL de biotina 500 μM en PBS y se deja interaccionar durante 30 min para bloquear los sitios de unión libres de la estreptavidina.

Con esta superficie se intentó construir la curva de enlace pero tanto la señal del blanco como la correspondiente a 10 μM de aptámero resultaron muy bajas e idénticas (Tabla 5-4).

Tabla 5-4: Densidad de corriente ($\mu\text{A}/\text{mm}^2$) para el blanco y una concentración de Gli 4 de 10 μM para el ensayo sobre electrodos de oro empleando una monocapa de ácidos mercaptopropanoico y mercaptoundecanoico con y sin bloqueante.

	Sin bloqueante	Caseína
Blanco	0,19 \pm 0,01	0,50 \pm 0,11
Gli 4 10 μM	0,20 \pm 0,04	0,51 \pm 0,03

La adición de caseína como bloqueante aumenta ambas señales en idéntica proporción (Tabla 5-4), por lo que se descartó el uso de NEE 3D para la obtención de un aptasensor

5.4 Desarrollo de un apta-ensayo competitivo sobre partículas magnéticas

Para el diseño de un ensayo que permita la de gluten en alimentos, se escogió el formato de ensayo competitivo que permite la determinación tanto de la proteína intacta como de pequeños fragmentos peptídicos generados por hidrólisis de ésta. Como soporte para la fase sensora se han seleccionado micropartículas magnéticas para aprovechar las ventajas que ofrecen en la separación eficiente y rápida que facilita las etapas de lavado, que contribuyen a minimizar los problemas asociados a interacciones inespecíficas. La preparación de la fase sensora se realizó tal y como se ha descrito en la sección 3.4 inmovilizando el péptido 33-mer biotinilado sobre micropartículas magnéticas recubiertas con estreptavidina. El ensayo analítico consta de las siguientes etapas (Figura 5-12):

1. Se hicieron interaccionar muestra y aptámero biotinilado con una cantidad fija de partículas. En esta etapa el analito en disolución compite con el péptido inmovilizado por una cantidad limitada de aptámero. Como resultado parte del aptámero biotinilado es capturado específicamente.
2. Se lavaron las partículas dos veces durante dos minutos con BS para separar el aptámero fijado en las partículas del resto de la disolución.
3. Las partículas se reconstituyeron en BSL con 2,5 µg/mL de conjugado enzimático estreptavidina-peroxidasa de rábano silvestre que contiene dos enzimas por cada estreptavidina (Str-HRP₂) y se hicieron interaccionar durante 30 min. De esta forma se consigue el marcaje del aptámero con el conjugado enzimático para detectar la cantidad del mismo enlazado a las partículas.
4. Se lavaron las partículas dos veces durante dos minutos con BSL y una vez con BS.

Finalmente se cuantificó la actividad enzimática en la superficie de estas atrapando magnéticamente las partículas modificadas en un electrodo serigrafiado de carbono. Tras la adición del sustrato enzimático, TMB y peróxido de hidrógeno, se mide por cronoamperometría la cantidad del producto generado enzimáticamente. Cuanto mayor sea la concentración de gliadina en la muestra menor será la corriente medida.

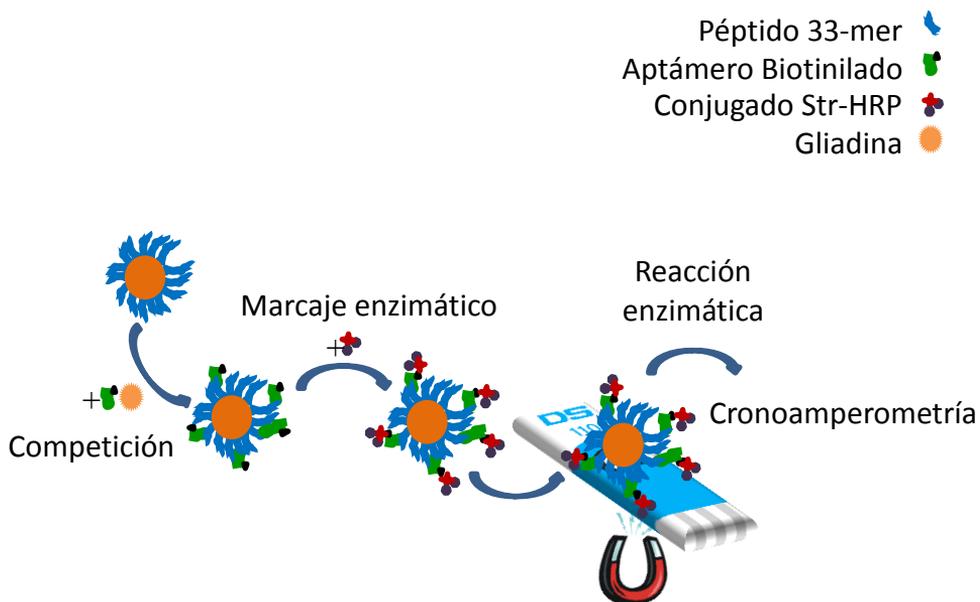


Figura 5-12: Esquema del ensayo competitivo.

Para obtener las condiciones óptimas para el ensayo competitivo se seleccionó la concentración de aptámero marcado con biotina que es necesario emplear en la etapa de competición, fijando la cantidad de partículas modificadas con péptido empleadas en 0,06 mg/mL. En este estudio se ensayaron diferentes concentraciones de los aptámeros en el intervalo de 0,5 nM a 5 μ M, sin proteína ni péptido en disolución. Este análisis proporciona las curvas de enlace, mostradas en la Figura 5-13, para los dos aptámeros. Para efectuar el ensayo competitivo se seleccionó una concentración de cada aptámero de 250 nM, que corresponde a la concentración que proporciona aproximadamente el 50 % de señal máxima. En ausencia de aptámeros (ensayo blanco) se obtiene una pequeña corriente de reducción ($0,4 \pm 0,1$) μ A, lo que confirma que la contribución de la interacción inespecífica del conjugado enzimático no es significativa. La señal máxima obtenida para la concentración de aptámero

seleccionada es de $4,7 \pm 0,1 \mu\text{A}$ para el aptámero Gli 4 y de $3,6 \pm 0,1 \mu\text{A}$ para el aptámero Gli 1. Estos resultados son consistentes con la interacción específica de los aptámeros con el péptido inmovilizado y la mayor afinidad del aptámero Gli 4.

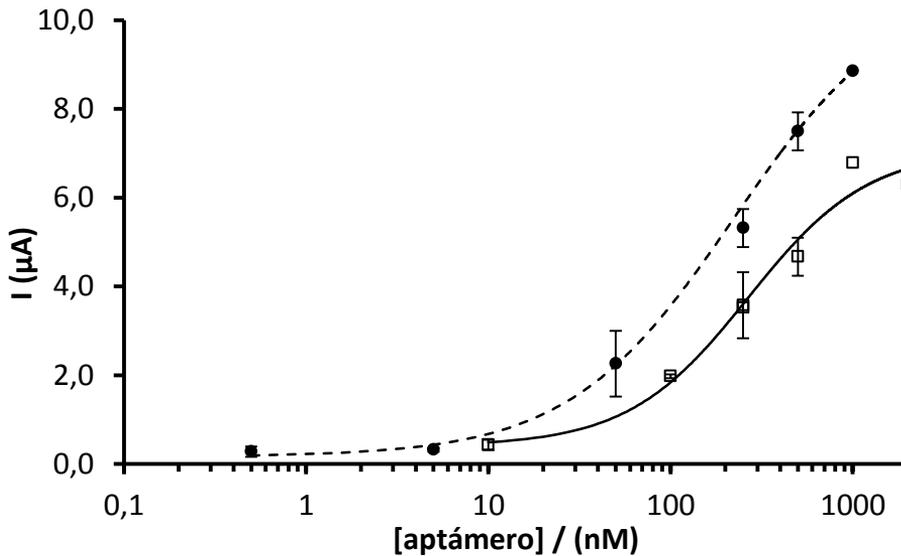


Figura 5-13: Curvas de enlace de las aptámeros Gli 1 (□, línea continua) y Gli 4 (●, línea discontinua) a partículas magnéticas modificadas con péptido 33-mer.

La segunda variable que se ha tenido en consideración es la composición del tampón para la competición. Durante el proceso de extracción de las muestras previo a la medida se necesita utilizar una disolución de etanol al 60 %. Por esta razón es imprescindible evaluar el efecto del etanol en la interacción péptido aptámero. Para ello se realiza el ensayo de unión péptido-aptámero en un tampón que contiene diferentes concentraciones de este alcohol. La presencia de 1,2 % de etanol, que se corresponde con una dilución 1:50 de las muestras extraídas empleando 60 % de etanol, incrementa la señal máxima mientras que

no afecta al blanco. Este aumento de señal obtenido con 1,2 % de etanol puede explicarse por la naturaleza apolar del péptido presente en la superficie de las partículas, que puede inducir una ligera agregación de las mismas. Una pequeña cantidad de etanol puede actuar como agente disgregante y favorecer la interacción péptido-aptámero. En concordancia con este resultado, se obtuvo que el ensayo competitivo proporciona un descenso mayor de la señal con esta cantidad de etanol en el tampón de competición. Incrementando la cantidad de etanol a una concentración del 3 %, el enlace del aptámero Gli 1 decrece aproximadamente un 35 % con respecto al obtenido con el 1,2 % mientras que la interacción del aptámero Gli 4 apenas se ve afectada. Esto concuerda con la menor constante de afinidad para la reacción de reconocimiento del péptido por parte del Gli 1. Por lo tanto, el mejor resultado en términos de sensibilidad se obtiene empleando 0,06 mg/mL de partículas modificadas y 250 nM de aptámero en presencia de 1,2 % de etanol.

En estas condiciones se compararon las señales obtenidas en presencia de 10 ppb de PWG. En el caso del aptámero Gli 1 se observa un descenso del 87 % con un coeficiente de variación del 6 %, mientras que con Gli 4 el descenso de la señal es del 80 %, lo que indica una mayor sensibilidad como cabe esperar en un aptámero de mayor afinidad. Sin embargo el ensayo utilizando el aptámero Gli 4 conduce a una peor reproducibilidad con una RSD del 15 % para tres medidas de 10 ppb de PWG. Esta mayor desviación se debe, probablemente, a la mayor tendencia a la agregación que presentan las partículas magnéticas modificadas con el péptido 33-mer en presencia de este aptámero. Para superar esta dificultad se llevó a cabo el ensayo con el aptámero Gli 4 empleando una mayor dilución de las partículas magnéticas durante la etapa de

competición, de forma que la concentración final fue de 0,01 mg/mL, mientras que se mantuvo la cantidad de partículas finalmente colocadas en la superficie del electrodo para la medida. Con esta modificación se mejora la precisión del ensayo, obteniendo una RSD del 6% para 10 ppb de PWG.

El conjugado enzimático, Str-HRP₂, utilizado en la etapa de marcaje se encuentra en exceso. Concretamente, se emplea una concentración tres veces superior a la estequiométricamente necesaria en el caso de que todo el aptámero se enlazase sobre las partículas. Se emplea esta cantidad para asegurar el marcaje de todo el aptámero inmovilizado sobre las partículas y posibilitar su detección.

En las condiciones establecidas se llevó a cabo el ensayo para concentraciones crecientes de PWG con el objetivo de obtener sus características analíticas. En la Figura 5-14 se representan algunos cronoamperogramas representativos.

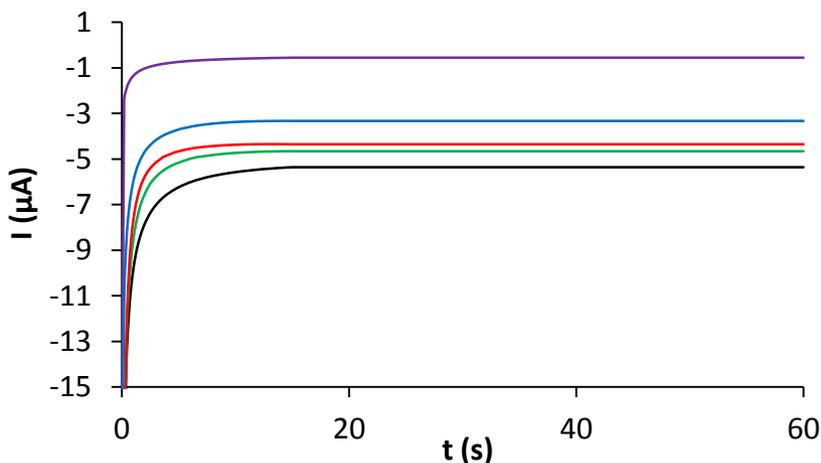


Figura 5-14: Cronoamperogramas correspondientes al ensayo competitivo con el aptámero Gli 4. Blanco (morado); concentraciones de PWG, 100 ppb (azul), 10 ppb (rojo), 1 ppb (verde) y Señal máxima sin PWG.

Como se ha comentado en la sección 1.2.2 el estándar más empleado para la calibración y la validación es la gliadina PWG [26], que es el que se seleccionó en este caso. Debido a la baja solubilidad de la gliadina en medio acuoso no se ensayaron concentraciones superiores a 1 $\mu\text{g/L}$, lo que ha impedido la obtención de la curva sigmoidea completa, como se observa en la Figura 5-15.

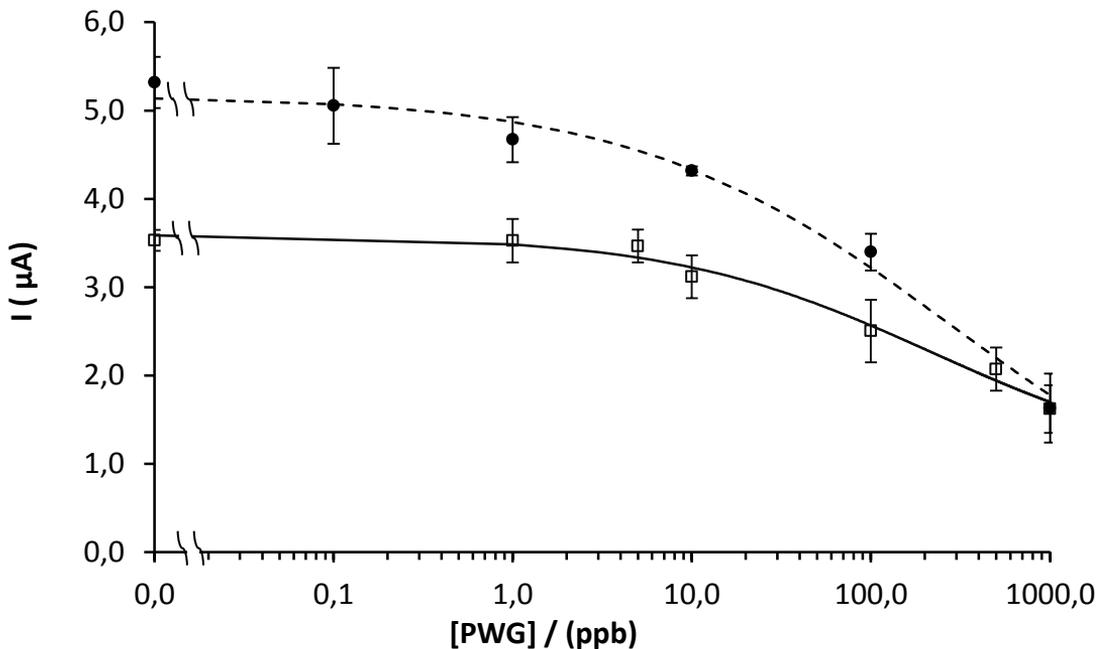


Figura 5-15: Curvas de calibración para el ensayo competitivo empleando los aptámeros Gli 1 (\bullet , línea discontinua) y Gli 4 (\square , línea continua) con gliadina PWG como estándar de calibración.

En la Figura 5-15 se muestran las intensidades de corriente obtenidas en la calibración del ensayo competitivo con los aptámeros Gli 1 y Gli 4 empleando PWG como estándar. Estos datos se han ajustado a la función logística de cuatro parámetros:

$$y = A + \frac{(B - A)}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p}$$

Donde A es la respuesta a una concentración infinita de analito, B es la respuesta a una concentración cero de analito, x_0 es la concentración de analito que proporciona un 50 % de la señal máxima y p es la pendiente de Hill que representa la pendiente en el punto de inflexión de la sigmoide, el mejor ajuste se ha obtenido fijando el parámetro A=0 y las ecuaciones son las siguientes:

$$I(\mu A) = \frac{3,60}{1 + \left(\frac{[PWG](ppb)}{721}\right)^{0,5}}; r = 0.980 \text{ para Gli 1 y}$$

$$I(\mu A) = \frac{5,17}{1 + \left(\frac{[PWG](ppb)}{273}\right)^{0,6}}; r = 0.997 \text{ para Gli 4.}$$

El límite de detección de cada ensayo se calculó como la concentración que proporciona el 95 % de la señal máxima y se correspondió con 4,9 ppb de gliadina empleando el aptámero Gli 1 como elemento de reconocimiento y de 0,5 ppb de gliadina empleando el aptámero Gli 4. Asumiendo que en muestras reales hay que hacer una extracción dilución del extracto, el límite de detección sería de 4,9 ppm y de 0,5 ppm de gluten empleando Gli 1 y Gli 4 respectivamente, si la dilución es 1:500 y considerando que el contenido de gliadina en el gluten es el 50 %.

El límite de detección obtenido para el ensayo empleando el aptámero Gli 4 es el menor obtenido para un ensayo de detección de gluten hasta el momento. El

método considerado oficial, ELISA de tipo sándwich basado en el anticuerpo R5 tiene un límite de detección de 5 ppm de gluten [49], mientras que el ensayo competitivo basado en el mismo anticuerpo presenta un límite de detección de 0,75 ppm de gluten [39]. De los inmunoensayos comerciales el que tiene mejor sensibilidad es el ELISA competitivo, comercializado por Biomedal basado en el anticuerpo G12 [55], que tiene un límite de detección de 0,6 ppm de gluten.

Así mismo, el límite de detección para el ensayo empleando el aptámero Gli 1 permite la verificación del cumplimiento de la legislación vigente para el etiquetado de alimentos “sin gluten”.

Como se ha comentado en la sección 3.3, finalizando el presente trabajo se publicó la obtención del aptámero G33 del que no se comprobó su reactividad contra otras proteínas distintas a la gliadina de Sigma como las del centeno, cebada o la avena [122]. El método de detección desarrollado se basa en un ensayo competitivo en el que la gliadina presente en la muestra compite con la gliadina enlazada a un pocillo de una placa ELISA por el aptámero presente en el medio. Se cuantificó la cantidad de ADN fijada en el pocillo eluyendo el mismo y llevando a cabo una PCR cuantitativa. El límite de detección de este ensayo es de 100 ppb de gliadina, dado no se ha comprobado su aplicación a muestras reales y no se propone una extracción o dilución no se puede calcular el límite de detección de gluten en muestra.

La repetibilidad del ensayo se calculó como el coeficiente de variación para 1 y para 10 ppb de gliadina, siendo 7 y 8 % respectivamente para el aptámero Gli 1 y 9 y 6 % para el aptámero Gli 4. La reproducibilidad interensayo se calculó para

la señal obtenida para 10 ppb de gliadina en tres días diferentes y es 9,5 % para el ensayo con el aptámero Gli 1 y 6% para el ensayo con el aptámero Gli 4.

El ensayo competitivo está diseñado específicamente para la determinación de fragmentos de proteínas hidrolizadas. Por esto, se evaluó la viabilidad de emplear el péptido 33-mer como estándar para el ensayo competitivo. Utilizando el aptámero Gli 4 no ha sido posible la calibración con el péptido en disolución. Este hecho se atribuye a la agregación microscópica, anteriormente comentada, de las partículas modificadas con péptido en presencia del aptámero. Por tanto, este aptámero es específico para gluten no hidrolizado. Por el contrario, cuando se utiliza el aptámero Gli 1 como receptor específico fue posible obtener una respuesta decreciente a concentraciones crecientes de péptido 33-mer.

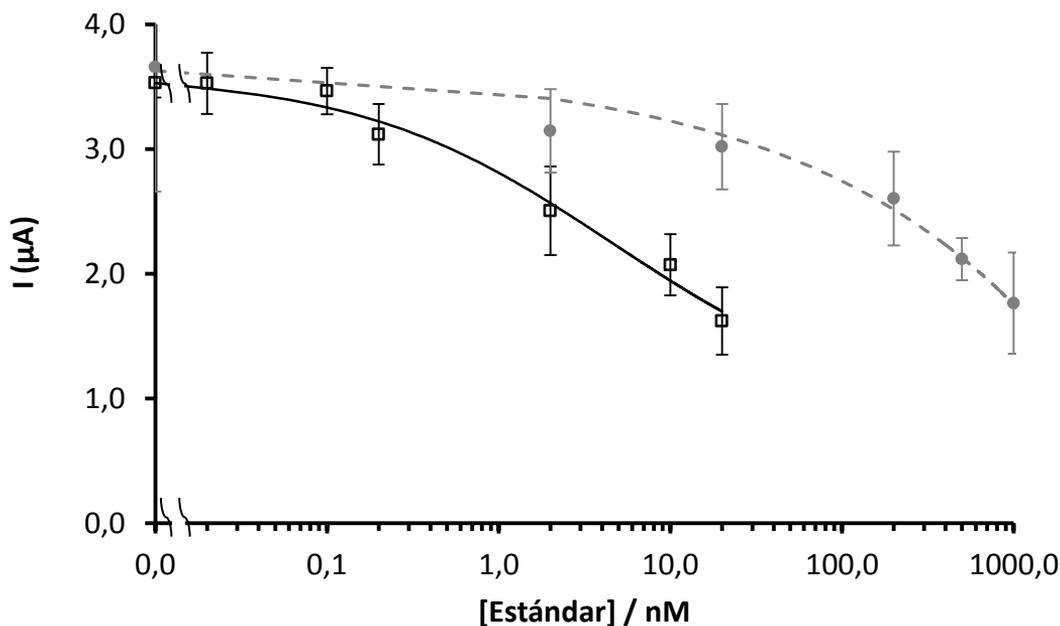


Figura 5-16: Curvas de calibrado para el ensayo competitivo basado en el aptámero Gli 1 y empleando gliadina PWG (□, línea continua) y péptido 33-mer (*, línea discontinua) como patrón.

En la Figura 5-16 se muestra la respuesta del método basado en el aptámero Gli 1 a concentraciones crecientes de péptido 33-mer, comparado con la calibración obtenida empleando PWG, expresando las concentraciones de ambos patrones en nM. Aunque el aptámero reconoce el péptido, para que se produzca una competencia efectiva se requieren concentraciones mayores de esta diana que de la proteína intacta. Esto puede explicarse si se considera que el PWG contiene varios sitios de unión al aptámero en su estructura. Sin embargo, si a partir de la comparación de las dos curvas de enlace mostradas en la Figura 5-16 se trata de obtener el número de sitios de unión, se encuentra que este número sería muy elevado, aproximadamente 200, lo que no parece razonable. Previamente en este trabajo se encontró que la gliadina presentaba dos sitios de unión para el anticuerpo G12.

También se ha evaluado el reconocimiento por parte del aptámero Gli 1 del epítipo de reconocimiento del método oficial basado en el anticuerpo R5, el pentapéptido QQFPF. Esta secuencia no se encuentra en el péptido inmunodominante 33-mer que fue empleada en la selección, pero está presente en las prolaminas del trigo, centeno y cebada. El aptámero reconoce este péptido pero a concentraciones mucho más altas que el péptido 33-mer, por encima de 1 μM , lo que sugiere una afinidad muy inferior. Esta menor afinidad concuerda con la ausencia de la secuencia en la diana empleada para la selección.

Una vez comprobado el reconocimiento de las proteínas provenientes del trigo es necesario evaluar la respuesta del ensayo frente a otras proteínas tóxicas para los enfermos celíacos como el centeno y la cebada que presentan una toxicidad similar al trigo. Además se evaluó la respuesta a la avena, cuya toxicidad está en entredicho, así como a las prolaminas procedentes de otros cereales tóxicos y su selectividad contra proteínas de fuentes no tóxicas para los enfermos celíacos frecuentemente presentes en los alimentos etiquetados “sin gluten” como arroz, maíz y soja. Debido a la no disponibilidad de estándares comerciales para estas prolaminas se llevó a cabo su extracción de la harina de cada fuente siguiendo el protocolo indicado en secciones previas. Para la realización del ensayo los extractos se diluyeron a los niveles de concentración deseados en el tampón de competición.

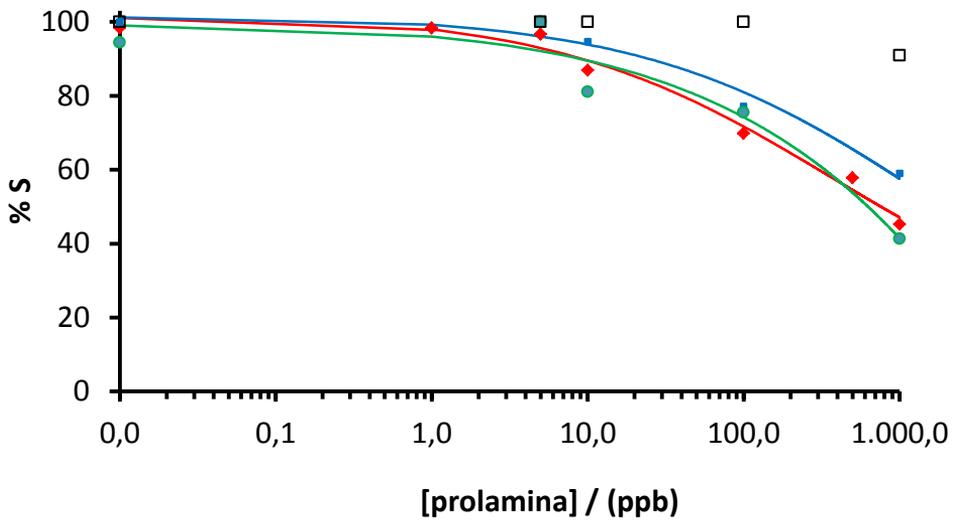


Figura 5-17: Respuesta del ensayo competitivo empleando el aptámero Gli 1 frente a las prolaminas tóxicas de trigo (rojo), centeno (azul), cebada (verde) y avena (negro).

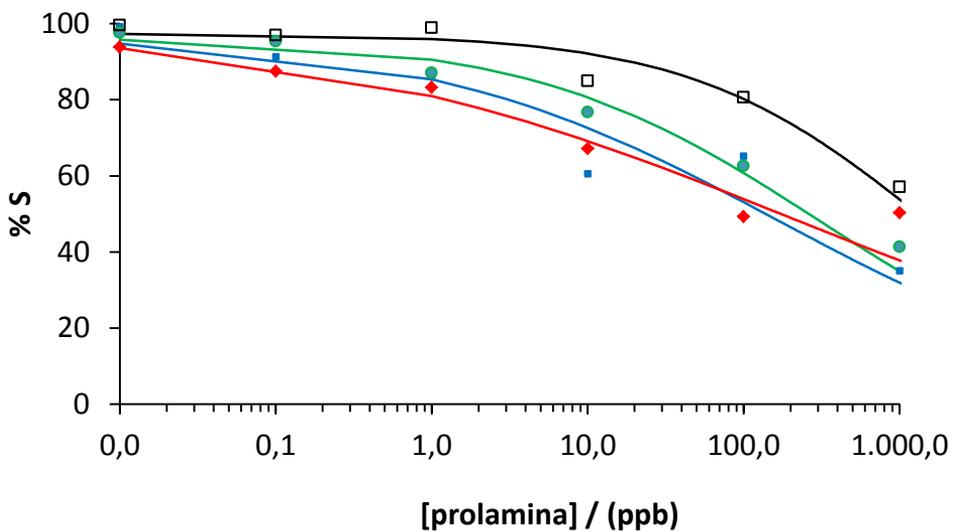


Figura 5-18: Respuesta del ensayo competitivo empleando el aptámero Gli 4 frente a las prolaminas tóxicas de trigo (rojo), centeno (azul), cebada (verde) y avena (negro).

En la Figura 5-17 se muestra la respuesta del ensayo a las diferentes prolaminas empleando el aptámero Gli 1 y en la Figura 5-18 los resultados del ensayo utilizando el aptámero Gli 4. Ambos aptámeros reconocen la gliadina del trigo, la hordeína de la cebada y la secalina del centeno de forma similar dentro del error experimental. Sin embargo, la respuesta frente a las aveninas de la avena es diferente, el aptámero Gli 1 no es capaz de enlazar a las proteínas de la avena mientras que el aptámero Gli 4 sí que las reconoce pero con menor afinidad que al resto de prolaminas de los cereales tóxicos para los enfermos celíacos, tal y como se había observado en los ensayos de caracterización (sección 3.5). Este resultado es interesante dado que los anticuerpos G12 y A1 desarrollados contra el péptido 33-mer también son capaces de enlazarse débilmente a las aveninas, pese a que el 33-mer no está presente en su secuencia. La sensibilidad de los ensayos que utilizan distintos receptores es, sin embargo diferente, siendo el orden de sensibilidad encontrado: hordeína \approx gliadina > secalina >> avenina para el G12 y hordeína \approx secalina > gliadina >> avenina para los aptámeros. En el caso de los aptámeros las diferencias entre hordeínas, secalinas y gliadinas son menos pronunciadas. El método oficial basado en el anticuerpo R5 no responde a las prolaminas de la avena. Por tanto, aunque ambos aptámeros han sido seleccionados contra la misma diana presentan afinidad distinta por las proteínas de la avena. De esta forma podemos disponer de dos receptores que nos permitirían diferenciar de forma sencilla el origen del gluten (tóxico vs. Controvertido).

También es importante asegurar la respuesta del método desarrollado a proteínas de harinas no tóxicas para los enfermos celíacos como las provenientes de arroz, maíz y soja, que son habitualmente sustitutas de las

harinas de los cereales tóxicos en los productos sin gluten. Para evaluar la reactividad cruzada se midió la respuesta de los ensayos con ambos aptámeros a concentraciones crecientes de las proteínas extraídas de la harina de soja, maíz y arroz. Las respuestas analíticas, expresadas en porcentaje de corriente con respecto a la intensidad de corriente máxima en ausencia de proteína, están en torno al 100 % y se pueden observar en la Tabla 5-5. De acuerdo con estos resultados, los ensayos desarrollados no presentan reactividad cruzada con las proteínas no tóxicas para los enfermos celíacos.

Tabla 5-5: Porcentaje de corriente con respecto a la corriente obtenida en ausencia de proteína medido para las proteínas provenientes de harinas no tóxicas para los enfermos celíacos.

Proteína	Gli 1	Gli 4
Soja	112±11 %	125±37 %,
Maíz	135±26 %	121±36 %
Arroz	112±9 %	113±25 %.

En definitiva, se puede concluir que los métodos competitivos desarrollados son suficientemente sensibles y selectivos para ser aplicados a la determinación de gluten en alimentos etiquetados “sin gluten” para evaluar el cumplimiento de la ley y proporcionar mayor información al consumidor. La legislación permite el etiquetado “sin gluten” a aquellos productos con un contenido en gluten inferior a 20 ppm. El método basado en el aptámero Gli 4 permitiría rebajar este límite sensible, protegiendo de forma más efectiva a la población celiaca más vulnerable. Para comprobar la aplicabilidad de estos métodos, se analizaron muestras proporcionadas por dos laboratorios externos, todas ellas con un contenido en gluten desconocido y muestras de contenido en gluten certificado por un ensayo interlaboratorio empleando el método oficial basado en el anticuerpo R5.

El protocolo general de extracción fue el mismo indicado anteriormente para la extracción de las proteínas de las diferentes harinas. La muestra se kava con NaCl 2M y se somete a dos extracciones sucesivas con etanol 60 %.

En algunos casos y con el fin de comprobar la compatibilidad del método de extracción basado en la disolución cóctel que se emplea en muestras sometidas a calor, se empleó el siguiente protocolo. Se mezcló 0,25 g de muestra con 2 mL de disolución coctel (250 mercaptoetanol, 2 mM de guanidina en tampón 0,1× de PBS). La suspensión se incubó durante 40 minutos a 50 °C. Una vez a temperatura ambiente se añadieron 3 mL de etanol y se incubó durante 1 hora con agitación. Finalmente las muestras fueron centrifugadas durante 30 minutos a 2500 g y el sobrenadante fue utilizado en el análisis. La muestra que contenía chocolate fue extraída en presencia de 0,25 g de gelatina y de 0,1 g de polivinilpirrolidona (PVP) a la que se le añadió 0,25 g de muestra, para mejorar el rendimiento de la extracción.

En primer lugar se analizaron las muestras con contenido en gluten certificado con el método basado en el aptámero Gli 4: una masa preparada para pastel certificada como sin gluten en un ensayo interlaboratorio y un preparado infantil de soja con un valor certificado de 21 ppm de gluten obtenido igualmente en un ensayo interlaboratorio. Adicionalmente se llevó a cabo un ensayo de recuperación enriqueciendo el extracto de la masa para pastel con dos niveles de gliadina, 25 y 100 ppm, adicionando al extracto el volumen adecuado de una disolución de PWG de concentración 1000 ppm 60 %. Los valores encontrados para todas las muestras se resumen en la Tabla 5-6.

Tabla 5-6: Resultados obtenidos en el análisis del contenido de gluten en muestras certificadas empleando el método basado en el aptámero Gli 4.

Muestra	Valor medido Gli 4 ppm gluten	Valor asignado ppm gluten
Preparado infantil de soja	16±5	21,0
Preparado para pastel	<L.D.	Negativo
Pastel enriquecido 1	27,5±0,3	25
Pastel enriquecido 2	98±9	100

Los resultados obtenidos concuerdan con los resultados esperados. Teniendo en cuenta que el intervalo de valores asignado en el ensayo interlaboratorio comprende desde 10,5 hasta 31,4 ppm de gluten, el valor obtenido por el aptaensayo competitivo se encuentra dentro de dicho intervalo. De igual forma la muestra certificada como negativa no proporcionó una señal diferente del blanco, mientras que los ensayos con la muestra enriquecida proporcionaron una recuperación próxima al 100 % (110 % para el nivel de 25 ppm y 98 % para el de 100 ppm).

Las muestras proporcionadas por el Laboratorio I se dividieron en dos grupos de acuerdo a la información obtenida a través de la compañía: muestras no hidrolizadas (Tabla 5-8), que se cuantificaron con el ensayo empleando el aptámero Gli 4, más sensible, y muestras hidrolizadas (Tabla 5-7), que se cuantificaron con el ensayo que utiliza el aptámero Gli 1, el aptámero que responde a fragmentos hidrolizados. Las muestras líquidas se diluyeron con etanol al 60 %, que es el método recomendado por los fabricantes del kit comercial basado en el anticuerpo G12. Este kit fue el empleado por el Laboratorio I para proporcionarnos a posteriori los datos necesarios para comparar nuestros resultados con métodos ya establecidos.

Tabla 5-7: Resultados proporcionados por el ensayo empleando el aptámero Gli 4 para muestras extraídas con etanol 60 % en comparación con los obtenidos por el laboratorio externo utilizando el método G12.

Muestra	Método Gli 4 (ppm gluten)	Laboratorio Externo I (ppm gluten)
Harina de Mijo	16 ± 2	15
Quinoa	76 ± 24	40
Harina de Maíz	35 ± 20	Negativa
Harina de Arroz	< L. D.	Negativa
Muestra Chamtor	36 ± 25	Negativa
Harina de almendra	116 ± 65	Negativa
Muestra líquida A	12 ± 1	Negativa
Muestra líquida B	30 ± 13	Positiva
Muestra líquida C	1 ± 0.6	Positiva
Muestra líquida G	35 ± 7	Positiva
Muestra líquida H	16 ± 5	Positiva

Como se puede observar en la Tabla 5-7, todas las muestras identificadas como positivas por la compañía fueron también positivas por el método aquí descrito, por lo que se concluye que el método competitivo con Gli 4 no da lugar a falsos negativos. Es interesante destacar que todas las muestras dadas como negativas por el Laboratorio I, es decir, por debajo de su límite de detección, excepto una son positivas con el ensayo competitivo. Aunque esta circunstancia haría pensar que este método es proclive a dar falsos positivos, esta discrepancia puede atribuirse a la mayor sensibilidad del aptaensayo. En el caso de la muestra líquida A se ha obtenido un contenido en gluten inferior a 20 ppm, por lo que en cualquier caso la muestra puede ser etiquetada como “sin gluten”. En el caso de las muestras sólidas las discrepancias son más acusadas pero hay que tener en cuenta que los compuestos o fragmentos diana son diferentes en cada ensayo. No se puede, por tanto, afirmar que el aptaensayo

conduzca a falsos positivos sino a resultados, en general, mayores a los obtenidos con el método del anticuerpo G12.

En el análisis de muestras hidrolizadas empleando el aptámero Gli 1 se observa una tendencia análoga. De nuevo no se observan falsos negativos que pondrían en duda la utilidad de este método para asegurar la seguridad de los enfermos celíacos. La única muestra negativa por el método del G12 es positiva por el aptaensayo por idénticas razones a las expuestas. En el caso de muestras hidrolizadas es donde cabe esperar mayores discrepancias puesto que el valor obtenido depende fuertemente de la secuencia diana detectada y ésta puede ser diferente a la que origina la respuesta inmunotóxica [162].

Tabla 5-8: Resultados obtenidos en el análisis de muestras líquidas empleando el método competitivo basado en el aptámero Gli 1 comparados con los valores proporcionados por el laboratorio externo.

Muestra	Método Gli 1 (ppm gluten)	Laboratorio Externo I (ppm gluten)
Cerveza de trigo (Paulaner)	224 ± 5	Positiva
Muestra líquida D	46 ± 6	Dudosa
Muestra líquida E	92 ± 29	Positiva
Cerveza española (Cruzcampo)	130 ± 27	Positiva
Muestra líquida F	130 ± 28	Positiva
Cerveza Daura (sin gluten)	113 ± 36	Negativa

Utilizando las muestras sólidas proporcionadas por el Laboratorio II, se evaluó la influencia de los agentes reductores y desnaturalizantes, presentes en el cóctel de extracción, sobre la respuesta del apta-ensayo. Los resultados, mostrados en la Tabla 5-9, se han comparado con los valores obtenidos por el método oficial basado en el anticuerpo R5, proporcionados por la compañía proveedora de las muestras a posteriori y con los análisis llevados a cabo por

una compañía española (Laboratorio III) acreditada oficialmente para el análisis de gluten.

Tabla 5-9: Resultados obtenidos en muestras analizadas empleando el aptámero Gli 4 y dos protocolos diferentes de extracción en comparación con los resultados obtenidos por el método R5 llevado a cabo por dos laboratorios independientes.

Muestra	Extrac. etanol (ppm gluten)	Extrac. coctel (ppm gluten)	Lab II (ppm gluten)	Lab III (ppm gluten)
Pastel	>100	>100	78	>80
Fixamyl	8 ± 3	30	7	13.3 ± 1.1
Capuccino	23 ± 3	50	<5	<5
Rollito de avena	63 ± 9	97 ± 9	77	>80
Corn flakes 2	34	58 ± 4	38	18.1 ± 1.3
Postre de chocolate	11	<LD	13	<5
Fit snack	81 ± 8	90	77	>80
Crema de vainilla	<6	<LD	<5	<5
Corn flakes 1	13	34 ± 7	17	30.8 ± 1.9
Panna Cotta	6 ± 1	< LD	<5	<5

La mayoría de los valores obtenidos por el método que emplea el anticuerpo R5 son comparables con los resultados obtenidos con el apta-ensayo que emplea Gli 4, excepto el capuccino, donde se encuentra un falso positivo. De nuevo, este desacuerdo en los resultados puede ser atribuible a la mayor sensibilidad del método empleando al aptámero frente al inmunoensayo.

Cuando se evalúa la influencia de la disolución cóctel en el ensayo competitivo basado en el aptámero, se obtienen, en general, valores de concentración de gluten más elevados, probablemente debido a un mayor rendimiento de la extracción. La excepción fue la muestra que contiene chocolate. Incluso

empleando gelatina de pescado y PVP para mejorar el rendimiento de la extracción, se obtuvieron valores inferiores a los de la extracción con etanol. En cualquier caso observando los valores proporcionados independientemente por dos laboratorios se pone de manifiesto la dificultad de esta muestra. De acuerdo con el Laboratorio III esta muestra no contiene gluten (por debajo del límite de detección) mientras que según el Laboratorio II que utiliza exactamente el mismo método si tiene gluten aunque podría ser etiquetada como sin gluten.

Adicionalmente, se han encontrado discrepancias en las muestras de corn flakes. Dependiendo del laboratorio podrían ser etiquetadas como sin gluten o no. Los valores obtenidos tras la extracción con etanol empleando el aptaensayo concuerdan mejor con los valores obtenidos por el Laboratorio II. Sin embargo, al realizar la extracción con el cóctel nuestros resultados se acercan a los obtenidos por el Laboratorio II en el caso de la muestra 1 pero difieren en el de la muestra 2.

A la vista de estos resultados se puede concluir que la alteración de la conformación de la proteína durante el procedimiento de extracción no afecta significativamente a su reconocimiento por el aptámero, no se han detectado falsos negativos, y la solución cóctel es compatible con el método competitivo basado en el aptámero a diferencia de los inmunoensayos competitivos comerciales, que, hasta el momento, requieren extracción en etanol.

6 Conclusiones/Conclusions

Las principales conclusiones extraídas en la presente tesis se presentan a continuación.

1. Se ha diseñado un proceso SELEX para la obtención de un aptámero contra con la diana, el péptido 33-mer, una de las fracciones más inmunotóxicas del gluten, utilizando partículas magnéticas modificadas con la diana. Pese a la naturaleza hidrofóbica del péptido, la biblioteca aleatoria inicial de secuencias de ADN se ha podido enriquecer en secuencias afines con un alto grado de homología. Se han identificado cinco aptámeros diferentes denominados Gli 1, Gli 3, Gli 4, Gli 12 y Gli sq04.

2. Todos los aptámeros obtenidos son capaces de detectar tanto el péptido 33-mer aislado como formando parte de la proteína en la que se encuentra, gliadina, aunque con menor afinidad. Se evaluó la interacción entre el aptámero Gli 1 (secuencia más abundante) y el péptido 33-mer en disolución mediante ITC obteniéndose una $K_d = 45 \pm 10$ nM a 17 °C. El enlace está dominado por la variación de entropía.

3. Se evaluó la afinidad de los cuatro aptámeros restantes frente a otras proteínas tóxicas para los celíacos. Todos detectaron hordeínas y secalinas excepto Gli 12, que fue por tanto excluido. Únicamente el aptámero Gli 4 se une específicamente a las aveninas. No se detectaron reacciones cruzadas de ningún aptámero hacia proteínas de soja, maíz o arroz, por lo que el reconocimiento es específico del gluten.

4. Se estudió la posibilidad de inmovilizar el péptido o el aptámero sobre un soporte adecuado para el diseño de un ensayo competitivo. El valor de la constante de afinidad medido por FIS (98 ± 48 nM) usando un aptámero tiolado fue ligeramente superior al obtenido mediante SPR (51 ± 16 nM) inmovilizando

el péptido mediante interacción biotina-estreptavidina. Por ello, se prefiere la inmovilización del péptido.

5. El marcaje de los aptámeros con una biotina también afectó a su afinidad. Para el aptámero Gli 1 se obtuvo una K_d de 102 ± 11 nM, el doble de lo obtenido con el aptámero sin marcar. Para el aptámero Gli 4 se obtuvo un valor de 61 ± 3 nM, el más bajo de todos los aptámeros ensayados, lo que indica que es el de mayor afinidad.

6. Se han desarrollado dos métodos competitivos de detección de gluten en alimentos con detección electroquímica, en los que se inmoviliza el péptido 33-mer biotinilado sobre la superficie de partículas magnéticas. Mientras que el aptámero Gli 1 responde a concentraciones crecientes de gliadina patrón, PWG, o de péptido 33-mer, el aptámero Gli 4 responde únicamente al PWG. Por tanto, el aptámero Gli 1 es el seleccionado para detectar gluten en muestras hidrolizadas.

7. Los límites de detección de los métodos que emplean Gli 4 y Gli 1 fueron de 0.5 ppm y 4.9 ppm de gluten, respectivamente. El método competitivo desarrollado con Gli 4 es el más sensible hasta el momento, muy por debajo de los límites legales de etiquetado sin gluten (20 ppm). Su reproducibilidad en el mismo día es del 6% y en varios días del 12.5 % para una concentración de 10 ppb de gliadina. Además, al contrario que los actuales inmunoensayos competitivos comerciales, es compatible con el método de extracción recomendado por el método oficial en muestras que han sufrido tratamientos térmicos.

8. Ambos métodos han sido validados mediante el análisis de muestras sólidas y líquidas, hidrolizadas o no, con contenido en gluten certificado o desconocido. En este último caso las muestras fueron analizadas

independientemente por otros laboratorios usando dos inmunoensayos comerciales distintos. En general, los resultados correlacionan bien. No se han obtenido falsos negativos y los pocos falsos positivos son debidos a la mayor detectabilidad de los métodos propuestos, por lo que pueden usarse para la verificación del cumplimiento de la normativa legal europea vigente.

Herein are the main conclusions extracted from the present thesis.

1. A SELEX procedure has been designed for the evolution of an aptamer against the 33-mer peptide, one of the most immunotoxic fractions of gluten, using magnetic particles modified with the target. In spite of the hydrophobic nature of the peptide, the initial random library of DNA sequences was successfully enriched in sequences of higher affinity with a high degree of homology. Five different aptamers have been identified, which were called Gli 1, Gli 3, Gli 4, Gli 12 and Gli sq04.
2. Every aptamer obtained is able to detect the 33-mer peptide both, isolated and within the protein where it is found, gliadin, although with less affinity. The interaction between Gli 1 aptamer (the most abundant sequence) and 33-mer peptide was evaluated in solution using ITC, and a $K_d = 45 \pm 10$ nM at 17 °C was obtained. The binding is dominated by the entropy variation.
3. The affinity of the aptamers towards other proteins toxic for coeliac disease patients has been evaluated. Gli 1, Gli 3 and Gli 4 were able to detect hordeins and secalins, but not Gli 12 that was, therefore, excluded. Only Gli 4 aptamer bound specifically avenins. Cross reactions of any aptamers towards proteins from soya, maize or rice were not detected, so the recognition is specific to gluten.
4. The possibility of immobilizing the aptamer or the peptide on an adequate support for the design of a competitive assay was assessed. The value of the affinity constant measured by FIS (98 ± 48 nM) using a thiolated aptamer was slightly higher than the one obtained by SPR (51 ± 16 nM) immobilizing the peptide through biotin-streptavidin interaction. For this reason the peptide immobilization is preferred.

5. The labeling of the aptamers also affects their affinity. For Gli 1 aptamer, a $K_d = 102 \pm 11$ nM was obtained, twice the value obtained with the unlabeled aptamer. For the Gli 4 aptamer a value of 61 ± 3 nM was obtained, the lowest of all tested aptamers, which indicates that this is the aptamer with the highest affinity.

6. Two competitive methods for detecting gluten in food with electrochemical detection were developed. In those methods the 33-mer peptide is immobilized on the surface of magnetic particles. While Gli 1 aptamer responds to increasing concentrations of gliadin standard, PWG, or 33-mer peptide, the Gli 4 aptamer responds only to PWG. Therefore, the Gli 1 aptamer was selected to detect gluten in hydrolyzed samples.

7. The limit of detection of the developed methods using Gli 1 and Gli 4 were 0.5 ppm of gluten and 4.9 ppm of gluten respectively. The competitive method with Gli 4 aptamer is the most sensitive gluten detection method so far, well below the legal limit established for the "gluten free" labeling (20 ppm). The intraday reproducibility is 6 % and interday is 12.5 % for a concentration of 10 ppb of gliadin. Furthermore, unlike the existing competitive commercial methods, the method proposed is compatible with the officially recommended extraction method for heat treated samples.

8. Both methods have been validated through analysis of solid and liquid samples, hydrolyzed or not, with gluten content certified or unknown. In the latter case, the samples were independently analyzed by other laboratories using two different commercial immunoassays. In general, the results correlated well. False negatives were not obtained and the scarce false positive results were due to the better detectability of the proposed methods. The

developed methods can be used to verify the accomplishment of the European legislation in force.

Bibliografía

- [1] S.H. Sicherer, Determinants of systemic manifestations of food allergy, *Journal of Allergy of Clinical Immunology*, 106 (Suppl 5) (2000) S251-S257.
- [2] A. Rostom, J.A. Murray, and M.F. Kagnoff, American Gastroenterological Association (AGA) institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease, *Gastroenterology*, 131 (6) (2006) 1981-2002.
- [3] K.E.A. Lundin, E.M. Nilsen, H.G. Scott, E.M. Loberg, A. Gjoen, J. Bratlie, V. Skar, E. Mendez, A. Lovik, and K. Kett, Oats induced villous atrophy in coeliac disease, *Gut*, 52 (11) (2003) 1649-1652.
- [4] C.Y. Kim, H. Quarsten, E. Bergseng, C. Khosla, and L.M. Sollid, Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (12) (2004) 4175-4179.
- [5] M.F. Kagnoff, Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease, *Journal of Clinical Investigation*, 117 (1) (2007) 41-49.
- [6] E.M. Nilsen, F.L. Jahnsen, K.E.A. Lundin, F.E. Johansen, O. Fausa, L.M. Sollid, J. Jahnsen, H. Scott, and P. Brandtzaeg, Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease, *Gastroenterology*, 115 (3) (1998) 551-563.
- [7] G.J. Tack, W.H.M. Verbeek, M.W.J. Schreurs, and C.J.J. Mulder, The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 7 (4) (2010) 204-213.
- [8] N. Gujral, H.J. Freeman, and A.B.R. Thomson, Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment, *World Journal of Gastroenterology*, 18 (42) (2012) 6036-6059.
- [9] P.H.R. Green, The many faces of celiac disease: Clinical presentation of celiac disease in the adult population, *Gastroenterology*, 128 (4) (2005) S74-S78.
- [10] C. Dube, A. Rostom, R. Sy, A. Cranney, N. Saloojee, C. Garritty, M. Sampson, L. Zhang, F. Yazdi, V. Mamaladze, I. Pan, J. Macneil, D. Mack, D. Patel, and D. Moher, The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: A systematic review, *Gastroenterology*, 128 (4) (2005) S57-S67.
- [11] A. Sapone, J.C. Bai, C. Ciacci, J. Dolinsek, P.H. Green, M. Hadjivassiliou, K. Kaukinen, K. Rostami, D.S. Sanders, M. Schumann, R. Ullrich, D. Villalta, U. Volta,

C. Catassi, and A. Fasano, Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification, *BMC Medicine*, 10 (13) (2012)

[12] A.S. Abdulkarim, L.J. Burgart, J. See, and J.A. Murray, Etiology of nonresponsive celiac disease: Results of a systematic approach, *American Journal of Gastroenterology*, 97 (8) (2002) 2016-2021.

[13] Reglamento Comisión Europea (UE) No 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, L304 (2011) 18-63.

[14] C. Hitchenhuber, R. Crevel, B. Jarry, M. Maki, D.A. Moneret-Vautrin, A. Romano, R. Troncone, and R. Ward, Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 23 (5) (2006) 559-575.

[15] Reglamento de ejecución Comisión Europea (UE) No 828/2014 de la Comisión de 30 de julio de 2014 relativo a los requisitos para la transmisión de información a los consumidores sobre la ausencia o la presencia reducida de gluten en los alimentos, L228 (2014) 5-8.

[16] T.B. Osborne, The vegetable proteins. Monographs on Biochemistry. 1916, London [etc.]: Longmans, Green and Co. XIII, 125 p.

[17] P.R. Shewry and A.S. Tatham, The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution, *Biochemical Journal*, 267 (1990) 1-12.

[18] P.R. Shewry, B.J. Mifflin, and D.D. Kasarda, The structural and evolutionary relationships of the prolamin storage proteins of barley, rye and wheat, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 304 (1984) 297-308.

[19] P.R. Shewry and N.G. Halford, Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization, *Journal of Experimental Botany*, 53 (370) (2002) 947-958.

[20] L. Spaenij-Dekking, Y. Kooy-Winkelaar, P. Van Veelen, J.W. Drijfhout, H. Jonker, L. Van Soest, M.J.M. Smulders, D. Bosch, L. Gilissen, and F. Koning, Natural variation in toxicity of wheat: Potential for selection of nontoxic varieties for celiac disease patients, *Gastroenterology*, 129 (3) (2005) 797-806.

[21] I. Comino, A. Real, J. Gil-Humanes, F. Piston, L. de Lorenzo, M. de Lourdes Moreno, M. Angel Lopez-Casado, P. Lorite, A. Cebolla, M. Isabel Torres, F. Barro, and C. Sousa, Significant differences in coeliac immunotoxicity of barley varieties, *Molecular Nutrition & Food Research*, 56 (11) (2012) 1697-1707.

- [22] R.P. Anderson, P. Degano, A.J. Godkin, D.P. Jewell, and A.V.S. Hill, In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope, *Nature Medicine*, 6 (3) (2000) 337-342.
- [23] L. Shan, Ø. Molberg, I. Parrot, F. Hausch, F. Filiz, G.M. Gray, L.M. Sollid, and C. Khosla, Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue., *Science*, 297 (5590) (2002) 2275-2279.
- [24] J.A. Tye-Din, J.A. Stewart, J.A. Dromei, T. Beissbarth, D.A. van Heel, A. Tatham, K. Henderson, S.I. Mannering, C. Gianfrani, D.P. Jewell, A.V.S. Hill, J. McCluskey, J. Rossjohn, and R.P. Anderson, Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease, *Science Translational Medicine*, 2 (41) (2010) 41-51.
- [25] O.M. Lukow and P.B.E. McVetty, Effect of Cultivar and Environment on Quality Characteristics of Spring Wheat, *Cereal Chemistry*, 68 (6) (1991) 597-601.
- [26] R. van Eckert, E. Berghofer, P. Ciclitira, F. Chirido, S. Denery-Papini, H. Ellis, P. Ferranti, P. Goodwin, U. Immer, G. Mamone, E. Mendez, T. Mothes, S. Novalin, A. Osman, M. Rumbo, M. Stern, L. Thorell, A. Whim, and H. Wieser, Towards a new gliadin reference material-isolation and characterisation, *Journal of Cereal Science*, 43 (3) (2006) 331-341.
- [27] Z. Bugyi, K. Toeroek, L. Hajas, Z. Adonyi, R.E. Poms, B. Popping, C. Diaz-Amigo, S. Kerbach, and S. Toemoeskoezi, Development of incurred reference material for improving conditions of gluten quantification, *Journal of AOAC International*, 95 (2) (2012) 382-387.
- [28] D. Gabrovská, J. Rýsova, V. Filová, J. Plicka, P. Cuhra, M. Kubík, and S. Barsova, Gluten determination by gliadin enzyme-linked immunosorbent assay kit: Interlaboratory study, *Journal of AOAC International*, 89 (1) (2006) 154-160.
- [29] E. Mendez, C. Vela, U. Immer, and F.W. Janssen, Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food, *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17 (10) (2005) 1053-1063.
- [30] R. van Eckert, J. Bond, P. Rawson, C.L. Klein, M. Stern, and T.W. Jordan, Reactivity of gluten detecting monoclonal antibodies to a gliadin reference material, *Journal of Cereal Science*, 51 (2) (2010) 198-204.

- [31] G.J. Tanner, M.J. Blundell, M.L. Colgrave, and C.A. Howitt, Quantification of hordeins by ELISA: The correct standard makes a magnitude of difference, *PLoS One*, 8 (2) (2013) e56456.
- [32] H. Wieser and P. Koehler, Is the calculation of the gluten content by multiplying the prolamin content by a factor of 2 valid?, *European Food Research and Technology*, 229 (1) (2009) 9-13.
- [33] J.D. Schofield, R.C. Bottomley, M.F. Timms, and M.R. Booth, The effect of heat on wheat gluten and the involvement of sulfhydryl-disulfide interchange reactions, *Journal of Cereal Science*, 1 (4) (1983) 241-253.
- [34] A.S. Tatham and P.R. Shewry, The conformation of wheat gluten proteins - the secondary structures and thermal stabilities of alpha-gliadins, beta-gliadins, gamma-gliadins and omega-gliadins, *Journal of Cereal Science*, 3 (2) (1985) 103-113.
- [35] M. Rumbo, F.G. Chirido, C.A. Fossati, and M.C. Anon, Analysis of the effects of heat treatment on gliadin immunochemical quantification using a panel of anti-prolamin antibodies, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (12) (2001) 5719-5726.
- [36] E. Garcia, M. Llorente, A. Hernando, R. Kieffer, H. Wieser, and E. Mendez, Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods, *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17 (5) (2005) 529-539.
- [37] B. Gessendorfer, H. Wieser, and P. Koehler, Optimisation of a solvent for the complete extraction of prolamins from heated foods, *Journal of Cereal Science*, 52 (2) (2010) 331-332.
- [38] P. Kanerva, T. Sontag-Strohm, O. Brinck, and H. Salovaara, Improved extraction of prolamins for gluten detection in processed foods, *Agricultural and Food Science*, 20 (3) (2011) 206-216.
- [39] M. Mena, M. Lombardia, A. Hernando, E. Mendez, and J. Albar, Comprehensive analysis of gluten in processed foods using a new extraction method and a competitive ELISA based on the R5 antibody, *Talanta*, 91 (2012) 33-40.
- [40] V.V. Dona, C.A. Fossati, and F.G. Chirido, Interference of denaturing and reducing agents on the antigen/antibody interaction. Impact on the

performance of quantitative immunoassays in gliadin analysis, *European Food Research and Technology*, 226 (3) (2008) 591-602.

[41] S. Denery-Papini, Y. Nicolas, and Y. Popineau, Efficiency and limitations of immunochemical assays for the testing of gluten-free foods, *Journal of Cereal Science*, 30 (2) (1999) 121-131.

[42] L. Sorell, J.A. Lopez, I. Valdes, P. Alfonso, E. Camafeita, B. Acevedo, F. Chirido, J. Gavilondo, and E. Mendez, An innovative sandwich ELISA system based on an antibody cocktail for gluten analysis, *FEBS Letters*, 439 (1-2) (1998) 46-50.

[43] J.H. Skeritt and A.S. Hill, Monoclonal-antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38 (8) (1990) 1771-1778.

[44] J.H. Skeritt, A.S. Hill, and J.L. Andrews, Antigenicity of wheat prolamins: Detailed epitope analysis using a panel of monoclonal antibodies, *Journal of Cereal Science*, 32 (3) (2000) 259-279.

[45] T. Thompson and E. Mendez, Commercial assays to assess gluten content of gluten-free foods: why they are not created equal, *Journal of the American Dietetic Association*, 108 (10) (2008) 1682-1687.

[46] L.K. Allred and E.S. Park, EZ Gluten (R) for the qualitative detection of gluten in foods, beverages, and environmental surfaces, *Journal of AOAC International*, 95 (4) (2012) 1106-1117.

[47] Secretariat of the Codex Alimentarius Commission. Codex Alimentarius Commission: Procedural Manual, (2014)

[48] A.A. Osman, H.H. Uhlig, I. Valdes, M. Amin, E. Mendez, and T. Mothes, A monoclonal antibody that recognizes a potential toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins, *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 13 (10) (2001) 1189-1193.

[49] I. Valdes, E. Garcia, M. Llorente, and E. Mendez, Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol, *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15 (5) (2003) 465-474.

[50] S. Haas-Lauterbach, U. Immer, M. Richter, and P. Koehler, Gluten fragment detection with a competitive ELISA, *Journal of AOAC International*, 95 (2) (2012) 377-381.

- [51] B. Gessendorfer, P. Koehler, and H. Wieser, Preparation and characterization of enzymatically hydrolyzed prolamins from wheat, rye, and barley as references for the immunochemical quantitation of partially hydrolyzed gluten, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395 (6) (2009) 1721-1728.
- [52] J.R. Mujico, L. Dekking, Y. Kooy-Winkelaar, R. Verheijen, P. van Wichen, L. Streppel, N. Sajic, J.W. Drijfhout, and F. Koning, Validation of a new enzyme-linked immunosorbent assay to detect the triggering proteins and peptides for celiac disease: interlaboratory study, *Journal of AOAC International*, 95 (1) (2012) 206-215.
- [53] H.M. Nassef, M.C.B. Redondo, P.J. Ciclitira, H.J. Ellis, A. Fragoso, and C.K. O'Sullivan, Electrochemical immunosensor for detection of celiac disease toxic gliadin in foodstuff., *Analytical Chemistry*, 80 (23) (2008) 9265-9271.
- [54] H.M. Nassef, L. Civit, A. Fragoso, and C.K. O'Sullivan, Amperometric immunosensor for detection of celiac disease toxic gliadin based on Fab fragments, *Analytical Chemistry*, 81 (13) (2009) 5299-5307.
- [55] B. Moron, A. Cebolla, H. Manyani, M. Alvarez-Maqueda, M. Megias, M.d.C. Thomas, M.C. Lopez, and C. Sousa, Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide, *American Journal of Clinical Nutrition*, 87 (2) (2008) 405-414.
- [56] B. Moron, M.T. Bethune, I. Comino, H. Manyani, M. Ferragud, M.C. Lopez, A. Cebolla, C. Khosla, and C. Sousa, Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide, *PLoS One*, 3 (5) (2008) e2294.
- [57] E. Halbmayr-Jech, E. Hammer, R. Fielder, J. Coutts, A. Rogers, and M. Cornish, Characterization of G12 sandwich ELISA, a next-generation immunoassay for gluten toxicity, *Journal of AOAC International*, 95 (2) (2012) 372-376.
- [58] S. Radcliffe, M. Sutzko, Z. Jiang, D. Freitag, C. Swoboda, L. Frank, and A. Rogers, Validation of the AgraStrip (R) gluten G12 test kit, *Journal of AOAC International*, 97 (6) (2014) 1638-1650.
- [59] E.H.A. Spaenij-Dekking, E.M.C. Kooy-Winkelaar, W.F. Nieuwenhuizen, J.W. Drijfhout, and F. Koning, A novel and sensitive method for the detection of T

cell stimulatory epitopes of alpha/beta- and gamma-gliadin, *Gut*, 53 (9) (2004) 1267-1273.

[60] H.J. Ellis, S. Rosen-Bronson, N. O'Reilly, and P.J. Ciclitira, Measurement of gluten using a monoclonal antibody to a coeliac toxic peptide of A gliadin, *Gut*, 43 (2) (1998) 190-195.

[61] M.C.B. Redondo, P.B. Griffin, M.G. Ransanz, H.J. Ellis, P.J. Ciclitira, and C.K. O'Sullivan, Monoclonal antibody-based competitive assay for the sensitive detection of coeliac disease toxic prolamins, *Analytica Chimica Acta*, 551 (1-2) (2005) 105-114.

[62] W. Vader, Y. Kooy, P. Van Veelen, A. De Ru, D. Harris, W. Benckhuijsen, S. Pena, L. Mearin, J.W. Drijfhout, and F. Koning, The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides, *Gastroenterology*, 122 (7) (2002) 1729-1737.

[63] T. Laube, S.V. Kergaravat, S.N. Fabiano, S.R. Hernandez, S. Alegret, and M.I. Pividori, Magneto immunosensor for gliadin detection in gluten-free foodstuff: Towards food safety for celiac patients, *Biosensors and Bioelectronics*, 27 (1) (2011) 46-52.

[64] N. Gujral, M.R. Suresh, and H.H. Sunwoo, Quantitative double antibody sandwich ELISA for the determination of gliadin, *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 33 (4) (2012) 339-351.

[65] M. Ribeiro, J.D. Nunes-Miranda, G. Branlard, J.M. Carrillo, M. Rodriguez-Quijano, and G. Igrejas, One hundred years of grain omics: identifying the glutes that feed the world, *Journal of Proteome Research*, 12 (11) (2013) 4702-4716.

[66] F.M. DuPont, R. Chan, R. Lopez, and W.H. Vensel, Sequential extraction and quantitative recovery of gliadins, glutenins, and other proteins from small samples of wheat flour, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (5) (2005) 1575-1584.

[67] H. Wieser, S. Antes, and W. Seilmeier, Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Cereal Chemistry*, 75 (5) (1998) 644-650.

[68] P. Ferranti, G.R. Marnone, G. Picariello, and F. Addeo, Mass spectrometry analysis of gliadins in celiac disease, *Journal of Mass Spectrometry*, 42 (12) (2007) 1531-1548.

- [69] J.A. Sealey-Voyksner, C. Khosla, R.D. Voyksner, and J.W. Jorgenson, Novel aspects of quantitation of immunogenic wheat gluten peptides by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217 (25) (2010) 4167-4183.
- [70] E. Camafeita, P. Alfonso, T. Mothes, and E. Mendez, Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric micro-analysis: The first non-immunological alternative attempt to quantify gluten gliadins in food samples, *Journal of Mass Spectrometry*, 32 (9) (1997) 940-947.
- [71] E. Camafeita, P. Alfonso, B. Acevedo, and E. Mendez, Sample preparation optimization for the analysis of gliadins in food by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 32 (4) (1997) 444-449.
- [72] I. Dahinden, M. von Buren, and J. Luthy, A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients, *European Food Research and Technology*, 212 (2) (2001) 228-233.
- [73] L. Olexova, L. Dovicovicova, M. Svec, P. Siekel, and T. Kuchta, Detection of gluten-containing cereals in flours and "gluten-free" bakery products by polymerase chain reaction, *Food Control*, 17 (3) (2006) 234-237.
- [74] M. Sandberg, L. Lundberg, M. Ferm, and I.M. Yman, Real Time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods, *European Food Research and Technology*, 217 (4) (2003) 344-349.
- [75] B. Martin-Fernandez, A.J. Miranda-Ordieres, M.J. Lobo-Castanon, G. Frutos-Cabanillas, N. de-Los-Santos-Alvarez, and B. Lopez-Ruiz, Strongly structured DNA sequences as targets for genosensing: Sensing phase design and coupling to PCR amplification for a highly specific 33-mer gliadin DNA fragment, *Biosensors and Bioelectronics*, 60 (2014) 244-251.
- [76] B. Martín-Fernández, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, and B. López-Ruiz, Hairpin-based DNA electrochemical sensor for selective detection of a repetitive and structured target codifying a gliadin fragment, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, DOI: 10.1007/s00216-015-8560-2 (2015) 1-12.
- [77] C. Diaz-Amigo and B. Popping, Gluten and gluten-free: issues and considerations of labeling regulations, detection methods, and assay validation, *Journal of AOAC International*, 95 (2) (2012) 337-348.

- [78] C. Tuerk and L. Gold, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science*, 249 (4968) (1990) 505-510.
- [79] A.D. Ellington and J.W. Szostak, Invitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, 346 (6287) (1990) 818-822.
- [80] Q. Yang, I.J. Goldstein, H.Y. Mei, and D.R. Engelke, DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (10) (1998) 5462-5467.
- [81] L.A. Jones, L.E. Clancy, W.D. Rawlinson, and P.A. White, High-affinity aptamers to subtype 3a hepatitis C virus polymerase display genotypic specificity, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (9) (2006) 3019-3027.
- [82] R. Stoltenburg, C. Reinemann, and B. Strehlitz, FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383 (1) (2005) 83-91.
- [83] J.D. Vaught, C. Bock, J. Carter, T. Fitzwater, M. Otis, D. Schneider, J. Rolando, S. Waugh, S.K. Wilcox, and B.E. Eaton, Expanding the Chemistry of DNA for in Vitro Selection, *Journal of the American Chemical Society*, 132 (12) (2010) 4141-4151.
- [84] S.W. Santoro, G.F. Joyce, K. Sakthivel, S. Gramatikova, and C.F. Barbas, RNA cleavage by a DNA enzyme with extended chemical functionality, *Journal of the American Chemical Society*, 122 (11) (2000) 2433-2439.
- [85] S.M. Knudsen, M.P. Robertson, and A.D. Ellington, In vitro selection using modified or unnatural nucleotides, *Current protocols in nucleic acid chemistry / edited by Serge L. Beaucage ... [et al.]*, Chapter 9 (2002) Unit 9.6.
- [86] M. Kimoto, R. Yamashige, K.-i. Matsunaga, S. Yokoyama, and I. Hirao, Generation of high-affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet, *Nature Biotechnology*, 31 (5) (2013) 453-+.
- [87] P.E. Burmeister, S.D. Lewis, R.F. Silva, J.R. Preiss, L.R. Horwitz, P.S. Pendergrast, T.G. McCauley, J.C. Kurz, D.M. Epstein, C. Wilson, and A.D. Keefe, Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF, *Chemistry & Biology*, 12 (1) (2005) 25-33.
- [88] S.C.B. Gopinath, Methods developed for SELEX, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387 (1) (2007) 171-182.

- [89] M. Blank, T. Weinschenk, M. Priemer, and H. Schluesener, Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels - Selective targeting of endothelial regulatory protein p19^{ink4d}, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (19) (2001) 16464-16468.
- [90] X.B. Yang, X. Li, T.W. Prow, L.M. Reece, S.E. Bassett, B.A. Luxon, N.K. Herzog, J. Aronson, R.E. Shope, J.F. Leary, and D.G. Gorenstein, Immunofluorescence assay and flow-cytometry selection of bead-bound aptamers, *Nucleic Acids Research*, 31 (10) (2003)
- [91] P. Ruff, R.B. Pai, and F. Storici, Real-Time PCR-Coupled CE-SELEX for DNA Aptamer Selection, *ISRN Molecular Biology*, (2012) Article ID 939083.
- [92] S.D. Mendonsa and M.T. Bowser, In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis, *Analytical Chemistry*, 76 (18) (2004) 5387-5392.
- [93] M. Berezovski, A. Drabovich, S.M. Krylova, M. Musheev, V. Okhonin, A. Petrov, and S.N. Krylov, Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures: A universal tool for development of aptamers, *Journal of the American Chemical Society*, 127 (9) (2005) 3165-3171.
- [94] J.-W. Park, R. Tatavarty, D.W. Kim, H.-T. Jung, and M.B. Gu, Immobilization-free screening of aptamers assisted by graphene oxide, *Chemical Communications*, 48 (15) (2012) 2071-2073.
- [95] M.G. Wallis, U. Vonahsen, R. Schroeder, and M. Famulok, A novel RNA motif for neomycin recognition, *Chemistry & Biology*, 2 (8) (1995) 543-552.
- [96] Y. Wang and R.R. Rando, Specific binding of aminoglycoside antibiotics to RNA, *Chemistry & Biology*, 2 (5) (1995) 281-290.
- [97] T.S. Misono and P.K.R. Kumar, Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance, *Analytical Biochemistry*, 342 (2) (2005) 312-317.
- [98] A. Grozio, V.M. Gonzalez, E. Millo, L. Sturla, T. Vigliarolo, L. Bagnasco, L. Guida, C. D'Arrigo, A. De Flora, A. Salis, E.M. Martin, M. Bellotti, and E. Zocchi, Selection and characterization of single stranded DNA aptamers for the hormone abscisic acid, *Nucleic Acid Therapeutics*, 23 (5) (2013) 322-331.
- [99] M.B. Murphy, S.T. Fuller, P.M. Richardson, and S.A. Doyle, An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification, *Nucleic Acids Research*, 31 (18) (2003)

- [100] J.B.H. Tok and N.O. Fischer, Single microbead SELEX for efficient ssDNA aptamer generation against botulinum neurotoxin, *Chemical Communications*, (16) (2008) 1883-1885.
- [101] R.D. Jenison, S.C. Gill, A. Pardi, and B. Polisky, High-resolution molecular discrimination by RNA, *Science*, 263 (5152) (1994) 1425-1429.
- [102] A. Geiger, P. Burgstaller, H. vonderEltz, A. Roeder, and M. Famulok, RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity, *Nucleic Acids Research*, 24 (6) (1996) 1029-1036.
- [103] M. Zuker, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Research*, 31 (13) (2003) 3406-3415.
- [104] F. Nishikawa, K. Funaji, K. Fukuda, and S. Nishikawa, In vitro selection of RNA aptamers against the HCVNS3 helicase domain, *Oligonucleotides*, 14 (2) (2004) 114-129.
- [105] J.C. Cox and A.D. Ellington, Automated selection of anti-protein aptamers, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9 (10) (2001) 2525-2531.
- [106] R. Stoltenburg, C. Reinemann, and B. Strehlitz, SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands, *Biomolecular Engineering*, 24 (4) (2007) 381-403.
- [107] G. Mayer, The chemical biology of aptamers, *Angewandte Chemie-International Edition*, 48 (15) (2009) 2672-2689.
- [108] I. Majerfeld and M. Yarus, An RNA pocket for an aliphatic hydrophobe, *Nature Structural Biology*, 1 (5) (1994) 287-292.
- [109] M.N. Stojanovic, P. de Prada, and D.W. Landry, Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine, *Journal of the American Chemical Society*, 123 (21) (2001) 4928-4931.
- [110] J. Mehta, E. Rouah-Martin, B. Van Dorst, B. Maes, W. Herrebout, M.-L. Scippo, F. Dardenne, R. Blust, and J. Robbens, Selection and Characterization of PCB-Binding DNA Aptamers, *Analytical Chemistry*, 84 (3) (2012) 1669-1676.
- [111] S. Eissa, A. Ng, M. Siaj, A.C. Tavares, and M. Zourob, Selection and identification of DNA aptamers against okadaic acid for biosensing application, *Analytical Chemistry*, 85 (24) (2013) 11794-11801.

- [112] H. Betat, S. Vogel, M. Struhalla, H.H. Forster, M. Famulok, P. Welzel, and U. Hahn, Aptamers that recognize the lipid moiety of the antibiotic moenomycin A, *Biological Chemistry*, 384 (10-11) (2003) 1497-1500.
- [113] B.A. Gilbert, M. Sha, S.T. Wathen, and R.R. Rando, RNA aptamers that specifically bind to a K ras-derived farnesylated peptide, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 5 (6) (1997) 1115-1122.
- [114] P. Nadal, A. Pinto, M. Svobodova, N. Canela, and C.K. O'Sullivan, DNA Aptamers against the Lup an 1 Food Allergen, *PLoS One*, 7 (4) (2012)
- [115] D.T. Tran, K. Knez, K.P. Janssen, J. Pollet, D. Spasic, and J. Lammertyn, Selection of aptamers against Ara h 1 protein for FO-SPR biosensing of peanut allergens in food matrices, *Biosensors and Bioelectronics*, 43 (2013) 245-251.
- [116] J. Pollet, F. Delport, K.P.F. Janssen, D.T. Tran, J. Wouters, T. Verbiest, and J. Lammertyn, Fast and accurate peanut allergen detection with nanobead enhanced optical fiber SPR biosensor, *Talanta*, 83 (5) (2011) 1436-1441.
- [117] E.J. Cho, J.-W. Lee, and A.D. Ellington, Applications of Aptamers as Sensors, in *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2009. p. 241-264.
- [118] A.S.R. Potty, K. Kourentzi, H. Fang, P. Schuck, and R.C. Willson, Biophysical characterization of DNA and RNA aptamer interactions with hen egg lysozyme, *International Journal of Biological Macromolecules*, 48 (3) (2011) 392-397.
- [119] D.T. Tran, K.P.F. Janssen, J. Pollet, E. Lammertyn, J. Anne, A. Van Schepdael, and J. Lammertyn, Selection and characterization of DNA aptamers for egg white lysozyme, *Molecules*, 15 (3) (2010) 1127-1140.
- [120] G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*. 2nd ed. 2008, Amsterdam: Elsevier.
- [121] M.U. Musheev and S.N. Krylov, Selection of aptamers by systematic evolution of ligands by exponential enrichment: Addressing the polymerase chain reaction issue, *Analytica Chimica Acta*, 564 (1) (2006) 91-96.
- [122] A. Pinto, P.N. Polo, O. Henry, M.C.B. Redondo, M. Svobodova, and C.K. O'Sullivan, Label-free detection of gliadin food allergen mediated by real-time apta-PCR, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (2) (2014) 515-524.
- [123] A. Crew, C. Alford, D. Cowell, and J. Hart, Development of a novel electrochemical immuno-assay using a screen printed electrode for the determination of secretory immunoglobulin A in human sweat, *Electrochimica Acta*, 52 (16) (2007) 5232--5237.

- [124] M.A. Williams, Protein–ligand interactions: fundamentals, in *Protein-Ligand Interactions: Methods and applications*, M.A. Williams and T. Daviter, Editors. 2013, Springer.
- [125] V.J.B. Ruigrok, E. van Duijn, A. Barendregt, K. Dyer, J.A. Tainer, R. Stoltenburg, B. Strehlitz, M. Levisson, H. Smidt, and J. van der Oost, Kinetic and stoichiometric characterisation of streptavidin-binding aptamers, *ChemBioChem*, 13 (6) (2012) 829-836.
- [126] M.N. Win, J.S. Klein, and C.D. Smolke, Codeine-binding RNA aptamers and rapid determination of their binding constants using a direct coupling surface plasmon resonance assay, *Nucleic Acids Research*, 34 (19) (2006) 5670-5682.
- [127] W. Xu and A.D. Ellington, Anti-peptide aptamers recognize amino acid sequence and bind a protein epitope, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (15) (1996) 7475-7480.
- [128] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2) (1976) 248-254.
- [129] E. Freire, O.L. Mayorga, and M. Straume, Isothermal titration calorimetry, *Analytical Chemistry*, 62 (18) (1990) A950-A959.
- [130] M.A.D. Neves, O. Reinstein, M. Saad, and P.E. Johnson, Defining the secondary structural requirements of a cocaine-binding aptamer by a thermodynamic and mutation study, *Biophysical Chemistry*, 153 (1) (2010) 9-16.
- [131] S.W. Homans, Probing the binding entropy of ligand-protein interactions by NMR, *ChemBioChem*, 6 (9) (2005) 1585-1591.
- [132] S.W. Homans, Water, water everywhere - except where it matters?, *Drug Discovery Today*, 12 (13-14) (2007) 534-539.
- [133] S.W. Homans, Dynamics and thermodynamics of ligand-protein interactions, in *Bioactive Conformation I*, T. Peters, Editor. 2007. p. 51-82.
- [134] I. Jelesarov and H.R. Bosshard, Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition, *Journal of Molecular Recognition*, 12 (1) (1999) 3-18.
- [135] I. Haq, P. Lincoln, D.C. Suh, B. Norden, B.Z. Chowdhry, and J.B. Chaires, Interaction of Δ - and Λ -[Ru(phen)2DPPZ]2+with DNA: A calorimetric and

equilibrium binding Study, *Journal of the American Chemical Society*, 117 (17) (1995) 4788-4796.

[136] J.A. Cowan, T. Ohyama, D.Q. Wang, and K. Natarajan, Recognition of a cognate RNA aptamer by neomycin B: quantitative evaluation of hydrogen bonding and electrostatic interactions, *Nucleic Acids Research*, 28 (15) (2000) 2935-2942.

[137] M. Ilgu, D.B. Fulton, R.M. Yennamalli, M.H. Lamm, T.Z. Sen, and M. Nilsen-Hamilton, An adaptable pentaloop defines a robust neomycin-B RNA aptamer with conditional ligand-bound structures, *Rna-a Publication of the Rna Society*, 20 (6) (2014) 815-824.

[138] Y. Pang, Z. Xu, Y. Sato, S. Nishizawa, and N. Teramae, Base pairing at the abasic site in DNA duplexes and its application in adenosine aptasensors, *ChemBioChem*, 13 (3) (2012) 436-442.

[139] P.-H. Lin, S.-L. Yen, M.-S. Lin, Y. Chang, S.R. Louis, A. Higuchi, and W.-Y. Chen, Microcalorimetric studies of the thermodynamics and binding mechanism between L-tyrosinamide and aptamer, *Journal of Physical Chemistry B*, 112 (21) (2008) 6665-6673.

[140] N.A. Treuheit, M.A. Beach, and E.A. Komives, Thermodynamic compensation upon binding to exosite 1 and the active site of thrombin, *Biochemistry*, 50 (21) (2011) 4590-4596.

[141] T. Hayashi, H. Oshima, T. Mashima, T. Nagata, M. Katahira, and M. Kinoshita, Binding of an RNA aptamer and a partial peptide of a prion protein: crucial importance of water entropy in molecular recognition, *Nucleic Acids Research*, 42 (11) (2014) 6861-6875.

[142] A. Lasia, Electrochemical impedance spectroscopy and its applications, in *Modern Aspects of Electrochemistry*, B.E. Conway, J. Bockris, and R.E. White, Editors. 1999, Kluwer Academic Plenum: New York.

[143] A.J. Bard and L.R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. 2nd ed. 2001, New York: Wiley.

[144] Innovagen AB Peptide Property Calculator. www.pepcalc.com [Último acceso 16-03-2015].

[145] N. Bhatt, P.-J.J. Huang, N. Dave, and J. Liu, Dissociation and degradation of thiol-modified DNA on gold nanoparticles in aqueous and organic solvents, *Langmuir*, 27 (10) (2011) 6132-6137.

- [146] T.M. Herne and M.J. Tarlov, Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces, *Journal of the American Chemical Society*, 119 (38) (1997) 8916-8920.
- [147] S. Campuzano, F. Kuralay, M.J. Lobo-Castanon, M. Bartosik, K. Vyavahare, E. Palecek, D.A. Haake, and J. Wang, Ternary monolayers as DNA recognition interfaces for direct and sensitive electrochemical detection in untreated clinical samples, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (8) (2011) 3577-3583.
- [148] R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Alvarez, M. Jesus Lobo-Castanon, A.J. Miranda-Ordieres, and P. Tunon-Blanco, PCR-coupled electrochemical sensing of *Legionella pneumophila*, *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (8) (2009) 2390-2396.
- [149] J.Y. Liu, S.J. Tian, P.E. Nielsen, and W. Knoll, In situ hybridization of PNA/DNA studied label-free by electrochemical impedance spectroscopy, *Chemical Communications*, (23) (2005) 2969-2971.
- [150] I. Pockrand, J.D. Swalen, J.G. Gordon, and M.R. Philpott, Surface plasmon spectroscopy of organic monolayer assemblies, *Surface Science*, 74 (1) (1978) 237-244.
- [151] J.G. Gordon and S. Ernst, Surface plasmons as a probe of the electrochemical interface, *Surface Science*, 101 (1-3) (1980) 499-506.
- [152] C. Nylander, B. Liedberg, and T. Lind, Gas detection by means of surface plasmons resonance, *Sensors and Actuators*, 3 (1983)
- [153] B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lundstrom, Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sensors and Actuators*, 4 (2) (1983) 299-304.
- [154] E. Gonzalez-Fernandez, N. de-los-Santos-Alvarez, A. Jose Miranda-Ordieres, and M. Jesus Lobo-Castanon, SPR evaluation of binding kinetics and affinity study of modified RNA aptamers towards small molecules, *Talanta*, 99 (2012) 767-773.
- [155] T.M. Davis and W.D. Wilson, Determination of the refractive index increments of small molecules for correction of surface plasmon resonance data, *Analytical Biochemistry*, 284 (2) (2000) 348-353.
- [156] J.W. Lee, S.J. Sim, S.M. Cho, and J. Lee, Characterization of a self-assembled monolayer of thiol on a gold surface and the fabrication of a biosensor chip based on surface plasmon resonance for detecting anti-GAD antibody, *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (7) (2005) 1422-1427.

- [157] V. Ostatna, H. Vaisocherova, J. Homola, and T. Hianik, Effect of the immobilisation of DNA aptamers on the detection of thrombin by means of surface plasmon resonance, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391 (5) (2008) 1861-1869.
- [158] V.P. Menon and C.R. Martin, Fabrication and evaluation of nanoelectrode ensembles, *Analytical Chemistry*, 67 (13) (1995) 1920-1928.
- [159] S.F. Yu, N.C. Li, J. Wharton, and C.R. Martin, Nano wheat fields prepared by plasma-etching gold nanowire-containing membranes, *Nano Letters*, 3 (6) (2003) 815-818.
- [160] R. Gasparac, B.J. Taft, M.A. Lapierre-Devlin, A.D. Lazareck, J.M. Xu, and S.O. Kelley, Ultrasensitive electrocatalytic DNA detection at two- and three-dimensional nanoelectrodes, *Journal of the American Chemical Society*, 126 (39) (2004) 12270-12271.
- [161] K. Krishnamoorthy and C.G. Zoski, Fabrication of 3D gold nanoelectrode ensembles by chemical etching, *Analytical Chemistry*, 77 (15) (2005) 5068-5071.
- [162] A. Real, I. Comino, M. de Lourdes Moreno, M. Angel Lopez-Casado, P. Lorite, M. Isabel Torres, A. Cebolla, and C. Sousa, Identification and in vitro reactivity of celiac immunoactive peptides in an apparent gluten-free beer, *PLoS One*, 9 (6) (2014) e100917.

ANEXO I: Tablas de datos

Tabla 1: Datos correspondientes a las curvas de enlace de los distintas aptámeros con el péptido 33-mer representadas en la Figura 3-17. Intensidad neta de corriente medida por cronoamperometría para cada concentración de aptámero. Señales netas en μA .

[aptámero] / nM	Gli 1	Gli 12	Gli 3	Gli 4	Gli sq04
0,5	0,063	0,040	0,038	0,001	0,000
1,5	0,153	0,000	0,081	0,038	0,000
5	0,048	0,209	0,142	0,036	0,027
15	0,144	0,084	0,257	0,335	0,115
50	0,295	0,382	0,525	0,529	0,324
100	0,450	0,463	0,642	0,969	0,489
200	0,696	0,886	0,817	1,462	0,781
500	0,838	1,017	1,048	1,506	1,002
1000	0,868	0,956	1,111	1,582	0,995
2000	1,112	1,298	1,215	1,774	0,990
3000	1,104	1,114	1,306	1,558	0,890
5000	1,143	1,155	0,997	1,613	0,823

Tabla 2: Datos correspondientes a las curvas de enlace de los distintas aptámeros con la gliadina representadas en la Figura 3-18. Intensidad neta de corriente medida por cronoamperometría para cada concentración de aptámero. Señales netas en μA .

[aptámero] / nM	Gli 1	Gli 12	Gli 3	Gli 4	Gli sq04
0,5	0,000	0,000	0,011	0,003	0,015
1,5	0,000	0,005	0,035	0,035	0,065
5	0,044	0,014	0,172	0,244	0,023
15	0,000	0,060	0,135	0,224	0,050
50	0,121	0,226	0,374	0,547	0,086
100	0,116	0,437	0,340	0,835	0,209
200	0,386	0,564	0,644	0,963	0,040
500	0,515		0,852	1,480	0,208
1000	0,541	1,096	1,152	1,444	0,410
2000	0,715	1,343	1,211	1,319	0,371
3000	1,095	1,189	1,329	1,741	0,318
5000	0,931			1,664	0,490

Tabla 3: Datos correspondientes a los calibrados del método de Bradford empleando como estándares BSA y PWG en la Figura 3-20. Señales netas de absorbancia.

[Proteína] ppm	BSA	PWG
0,5	0,049	0,016
1,5	0,066	0,044
3,0	0,105	0,041
6,0	0,183	0,091
12,0	0,327	0,156
25,0	0,573	0,279
35,0		0,367

Tabla 4: Datos correspondientes a las curvas de enlace de los distintos aptámeros con la proteína del centeno, secalina, representadas en la Figura 3-21. Intensidad neta de corriente medida por cronoamperometría para cada concentración de aptámero. Señales netas en μA .

[aptámero] / nM	Gli 1	Gli 12	Gli 3	Gli 4
0,5	0,004	0,000		0,061
1,5	0,013	0,038		0,000
5	0,075	0,005	0,036	0,042
15	0,005	0,069	0,206	0,127
50	0,027	0,052	0,416	0,189
100	0,064	0,014	0,537	0,319
200	0,039	0,000	0,579	0,264
500	0,224	0,023	0,996	0,587
1000	0,219	0,073	0,982	0,641
2000	0,420	0,071	1,021	0,710
3000	0,454	0,063	0,982	0,735
5000	0,528	0,064		0,877

Tabla 5: Datos correspondientes a las curvas de enlace del aptámero Gli 4 con la proteína de la avena, avenina, representadas en la Figura 3-22. Intensidad neta de corriente medida por cronoamperometría para cada concentración de aptámero. Señales netas en μA .

[aptámero] / nM	Gli 4
5	0
100	0,12802
500	0,19954
1000	0,33895
2000	0,25651
3000	0,36864
5000	0,53686

Tabla 6: Datos correspondientes a ΔH_{Tot} para el experimento de ITC realizado a 17°C mostrados en la Figura 4-2.

[Péptido] / [Gli 1]	ΔH_{Tot} (kcal/mol) 17°C
0,135	-0.45
0,243	-0.19
0,352	-0.20
0,462	-0.20
0,573	-0.21
0,685	-0.20
0,799	-0.22
0,913	-0.22
1,029	-0.24
1,146	-0.27
1,264	-0.37
1,382	-0.77
1,503	-0.90
1,624	-0.90
1,746	-0.91
1,870	-0.90
1,995	-0.92
2,120	-0.90

Tabla 7: Datos correspondientes a los experimentos de ITC realizados empleando el aptámero Gli 1 y el péptido 33-mer representados en la Figura 4-1.

[Péptido] / [Gli 1]	ΔH (kcal/mol)	
	17°C	37°C
0,135	0,681	0,565
0,243	0,709	0,556
0,352	0,711	0,569
0,462	0,703	0,545
0,573	0,706	0,564
0,685	0,694	0,569
0,799	0,690	0,572
0,913	0,676	0,553
1,029	0,659	0,426
1,146	0,491	0,087
1,264	0,141	0,015
1,382	0,038	-0,010
1,503	0,009	-0,009
1,624	-0,004	-0,004
1,746	0,007	-0,007
1,870	-0,012	-0,012
1,995	0,009	0,009
2,120	-0,004	-0,004

Tabla 8: Datos correspondientes a los $\% \Delta R_{TEmax}$ para los electrodos modificados con los dos diferentes protocolos para la construcción de una monocapa binaria representados en la Figura 4-8.

	$\% \Delta R_{TEmax}$
Potencial abierto	21,3
Bajo tensión	31,1

Tabla 9: Datos correspondientes a la respuesta de las diferentes monocapas blanco representados en la Figura 4-9.

	$\% \Delta R_{TE_{max}}$ I
Aptámero/33-mer	31,1
Oro	0,4
Mercaptohexanol	0,5
Sonda aleatoria	4,7
Aptámero/control	1,3

Tabla 10: Datos correspondientes a la regeneración de un electrodo modificado con monocapa binaria construida bajo tensión tras la interacción con 100 nM de péptido representada en la Figura 4-11.

	$\% \Delta R_{TE_{max}}$
Señal 100 nM	37,5
Regeneración	21,0

Tabla 11: Datos correspondientes a la valoración del equilibrio de afinidad del aptámero Gli 1 inmovilizado en la superficie del electrodo con el péptido 33-mer en disolución

[pep] (nM)	t (min)	%ΔR_{TEmax}
50	0	0,0
	1	7,8
	5	13,7
	10	18,7
	15	18,8
100	21	17,5
	25	19,8
	30	23,1
	35	23,7
200	41	25,2
	45	32,2
	50	35,6
	55	38,8
300	61	37,6
	65	45,4
	75	46,1
	80	46,1
400	81	44,1
	85	46,1
	90	49,5
	95	51,9
	100	51,0

Tabla 12: Datos correspondientes a la isoterma de Langmuir del ensayo de FIS representados en la Figura 4-13

[pep] nM	%$\Delta R_{TE_{max}}$
0	0
50	18,8
100	26,6
200	38,6
300	46,3
400	51,8

Tabla 13: Datos correspondientes al ensayo de enlace medido por SPR para el anticuerpo G12 en un cristal de policarboxilato modificado con PWG representados en la Figura 4-19.

[Ac]libre / nM	S eq / m²
0,00	0
3,12	9,26
6,25	22,31
12,50	44,17
25,00	61,19

Tabla 14: Datos correspondientes al experimento de enlace medido por SPR del anticuerpo G12 al péptido 33-mer biotinilado inmovilizado sobre un cristal representados en la Figura 4-21.

[Ac] libre / nM	S eq / m²
0,00	0
3,12	15,40
4,17	24,83
6,25	36,49
31,30	81,31

Tabla 15: Datos correspondientes al experimento de enlace medido por SPR del aptámero Gli 1 al péptido 33-mer biotinilado inmovilizado sobre un cristal representados en la Figura 4-22.

[Apt]libre / nM	S eq / m°
0	0
50	6,231
100	8,264
500	9,593
5000	13,07

Tabla 16: Datos correspondientes al ajuste al modelo para la obtención de la constante de afinidad de los resultados experimentales obtenidos en la obtención de las curvas de enlace para todos los aptámeros al péptido 33-mer. Mostrados en la Figura 4-23.

1 / [aptámero] (nM)	1 / I (μA)				
	Gli 1	Gli 12	Gli 3	Gli 4	Gli sq04
0,2	20,9				
0,06	6,9	11,8		3,0	8,7
0,02	3,4				3,1
0,01	2,2	2,2	1,6	1,0	2,0
0,005	1,4	1,1	1,2	0,7	1,3
0,002	1,2	1,0	1,0	0,7	1,0
0,001	1,2		0,9	0,6	1,0
0,0005	0,9		0,8		1,0
0,0003	0,9	0,9		0,6	
0,0002	0,9			0,6	

Tabla 17: Datos correspondientes al ajuste al modelo para la obtención de la constante de afinidad de los resultados experimentales obtenidos en la obtención de las curvas de enlace para todos los aptámeros al PWG. Mostrados en la Figura 4-24.

1 / [aptámero] (nM)	1 / I (μA)				
	Gli 1	Gli 12	Gli 3	Gli 4	Gli sq04
2,0000			94,4		
0,6667			28,7	30,4	
0,2000					
0,0667		18,2	7,4	4,5	27,8
0,0200		4,4	2,7	1,8	11,7
0,0100		2,3		1,2	
0,0050	2,6	1,8	1,6	1,0	
0,0020	1,9		1,2		4,8
0,0010	1,8	0,9	0,9	0,7	
0,0005	1,4	0,7	0,8		2,7
0,0003	0,9		0,8	0,6	
0,0002	1,1				2,0

Tabla 18: Datos correspondientes a la curva dosis respuesta normalizada para los distintos estándares empleados en el ensayo ELISA electroquímico. Mostrados en la Figura 5-4.

[estándar] ppb	% señal		
	33-mer	Gliadina Kit	Gliadina Sigma
7,5	100,0	100,0	100,0
15	65,1	81,8	86,4
30	39,1		
60	14,6	52,9	36,8
120	0,0	0,0	0,0

Tabla 19: Datos correspondientes a los calibrados del ensayo ELISA electroquímico con el anticuerpo G12 empleando gliadina y péptido como estándares. Mostrados en la Figura 5-5 y la Figura 5-6.

[gli] nEq/L	I (μA)	[pep] nEq/L	I (μA)
0,15	0,820	1,58	0,475
0,30	0,747	3,17	0,329
0,60	0,604	6,34	0,240
1,20	0,450	12,67	0,126
2,40	0,358	25,35	0,109

Tabla 20: Datos correspondientes a los calibrados del ensayo ELISA electroquímico y óptico con el anticuerpo G12 empleando péptido 33-mer como estándar. Mostrados en la Figura 5-7 y la Figura 5-8.

[pep]/ppb	% señal electroquímica	% señal óptica
1000		
480	0,0	0,0
240	1,6	3,1
120	3,9	6,6
60	11,3	12,8
30	21,2	20,5
15	31,5	37,4
7,5	45,1	53,8
3,2		79,8
1,6	86,5	89,5
0,8	96,4	97,9
0,4	100,0	100,0

Tabla 21: Datos correspondientes a las curvas de enlace de los aptámeros Gli 1 y Gli 4 a partículas modificadas con péptido 33-mer. Representados en la Figura 5-13.

[aptámero] (nM)	I (μ A)	
	Gli 4	Gli 1
0,5	0,280	
5	0,323	
10		0,432
50	2,262	
100		1,980
250	5,318	3,579
500	7,494	4,672
1000	8,858	6,788
2000		6,296

Tabla 22: Datos correspondientes a los calibrados del ensayo competitivo empleando los aptámeros Gli 1 y Gli 4 con PWG mostrados en la Figura 5-15.

[PWG] (ppb)	I (μ A)	
	Gli 4	Gli 1
0,0	5,318	3,530
0,1	5,054	
1	4,672	3,527
5		3,465
10	4,316	3,118
100	3,398	2,504
500		2,072
1000	1,630	1,622

Tabla 23: Datos correspondientes a los calibrados con el ensayo competitivo empleando Gli 1 con 33-mer y PWG como estándares. Representados en la Figura 5-16.

[Estándar] (nM)	I (μ A)	
	33-mer	PWG
0,0	3,656	3,530
0,02		3,527
0,1		3,465
0,2		3,118
2	3,146	2,504
10		2,072
20	3,020	1,622
200	2,603	
500	2,117	
1000	1,765	
2000	1,265	

Tabla 24: Datos correspondientes al ensayo competitivo con Gli 1 empleando diferentes proteínas, señales en %. Representados en la Figura 5-17 .

[proteína] ppb	Centeno	Cebada	Avena
5	100,0	100,0	100,0
10	94,6	81,1	100,0
100	77,2	75,5	100,0
1000	59,0	41,3	90,9

Tabla 25: Datos correspondientes al ensayo competitivo con Gli 4 empleando diferentes proteínas, señales en %. Representados en la Figura 5-18.

[proteína] (ppb)	PWG	Trigo	Centeno	Cebada	Avena
0,1	92,4	87,4	91,3	95,3	96,9
1	86,6	83,2	86,0	87,0	98,9
10	84,0	67,1	60,5	76,7	84,9
100	67,0	49,3	65,2	62,5	80,6
1000	45,3	50,3	35,1	41,3	57,1
10000	21,2	15,5	5,6	6,6	21,0

ANEXO II: Publicaciones relacionadas

**Aptamer binding to celiac disease-
triggering hydrophobic proteins: a
sensitive gluten detection approach**

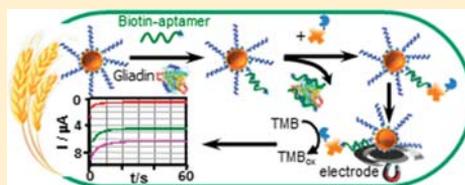
Aptamer Binding to Celiac Disease-Triggering Hydrophobic Proteins: A Sensitive Gluten Detection Approach

Sonia Amaya-González, Noemí de-los-Santos-Álvarez, Arturo J. Miranda-Ordieres, and M. Jesús Lobo-Castañón*

Dpto. Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Av. Julián Clavería 8, 33006, Oviedo, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Celiac disease represents a significant public health problem in large parts of the world. A major hurdle in the effective management of the disease by celiac sufferers is the sensitivity of the current available methods for assessing gluten contents in food. In response, we report a highly sensitive approach for gluten analysis using aptamers as specific receptors. Gliadins, a fraction of gluten proteins, are the main constituent responsible for triggering the disease. However, they are highly hydrophobic and large molecules, regarded as difficult targets for *in vitro* evolution of aptamers without nucleobase modification. We describe the successful selection of aptamers for these water insoluble prolamins that was achieved choosing the immunodominant apolar peptide from $\alpha 2$ -gliadin as a target for selection. All aptamers evolved are able to bind the target in its native environment within the natural protein. The best nonprotein receptor is the basis for an electrochemical competitive enzyme-linked assay on magnetic particles, which allows the measurement of as low as 0.5 ppb of gliadin standard (0.5 ppm of gluten). Reference immunoassay for detecting the same target has a limit of detection of 3 ppm, 6 times less sensitive than this method. Importantly, it also displays high specificity, detecting the other three prolamins toxic for celiac patients and not showing cross-reactivity to nontoxic proteins such as maize, soya, and rice. These features make the proposed method a valuable tool for gluten detection in foods.



Since more than 2 decades, the systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX)^{1,2} has opened the door to the identification of nucleic acids with defined affinity for theoretically any kind of target. In practice, the rate of successful/failed selections is unknown. From the large collection of targeted compounds available in the literature it is apparent that not all targets are equally accessible. Although the “aptamerogenicity” of a target is, so far, unpredictable,³ some indications exist. Ligands containing positively charged groups under the selection conditions, plane aromatic rings, and hydrogen-bond forming groups are regarded as the best targets to find an aptamer of high affinity and specificity. On the contrary, negatively charged and especially large hydrophobic molecules are less prone to succeed.⁴ Anionic groups are not usually involved in recognition. The polyanionic character of some proteins precludes the isolation of aptamers unless a small charge-balanced peptide from the protein is used for selection.⁵ In such a case, the affinity of the aptamer to the complete molecule must be probed. On the other hand, the folding of RNA and DNA to form hydrophobic binding pockets is known since the mid 1990s,⁶ which indicates favorable but constrained interactions with hydrocarbon chains. So, purely hydrophobic binding sites are rare though not unexpected using unmodified nucleic acid libraries.^{7,8} A taken to the extreme example corresponds to a RNA aptamer evolved against moenomycin A, with much higher affinity to the unsaturated lipid chain of the molecule than to the polysaccharide moiety.⁹ An aptamer

against a farnesyl region of a peptide was also described.¹⁰ Both RNA sequences share common short motifs but did not show cross-reactivity, which indicates that the polar moiety of each target also plays a role at least in selectivity.^{9,10}

Herein a successful selection of unmodified DNA aptamers for the hydrophobic immunodominant peptide from $\alpha 2$ -gliadin (33-mer)¹¹ involved in one of the most prevalent autoimmune disorders (1% of the population),¹² celiac disease (CD), is described. Ingestion of prolamins (alcohol soluble fraction of gluten) from wheat, barley, rye, and probably certain oat varieties induces an inflammatory process of the small intestine in sensitized individuals that develop a variety of clinical symptoms, only alleviated by adherence to a long-life gluten free diet. The detection of trace amounts of gluten in foods is, then, of paramount importance for the patients’ safety. Until now, only antibodies have been raised against toxic/immunogenic fragments of these prolamins^{13–21} to be used as receptors in ELISA assays in food. Current EU regulations allows labeling a product as “gluten free” when the gluten content does not exceed 20 ppm based on the most recent recommendations from the Codex Alimentarius Commission.²² Unfortunately, this threshold is not equally safe for all CD patients. In 1999, the Spanish Federation of CD patients’

Received: December 20, 2013

Accepted: February 5, 2014

Published: February 6, 2014

associations (FACE) released a warrant label "Controlled by FACE" for those products containing less than 10 ppm, a value very close to the current limit of detection of the reference method. According to this, the need for analytical methodology with increased sensitivity to protect a wider sector of celiac patients is apparent. The search for nonprotein receptors such as aptamers is a promising alternative. Not only do they exhibit enhanced chemical and thermal stability but also can be easily evolved to increase their affinity, which is not possible when raising antibodies. Herein the first aptamers against the immunodominant peptide, 33-mer, are described. We hypothesize that the anti-peptide aptamer could bind both the immunotoxic peptide and the corresponding native epitope in the protein. The evolution of aptamers against this and other small peptides from gliadin has been recently recognized as repeatedly elusive.²³ After several trials with peptides and complete gliadin from several sources, an aptamer with modest detectability was reported using Sigma gliadin as a target. This aptamer was not tested with barley, rye, and real food samples.²³ In this work, a panel of anti-33-mer aptamers was obtained. All of them also recognized the complete protein. Comparing all oligonucleotide sequences, gli4 aptamer showed the best performance and was selected as a receptor in an electrochemical competitive assay for the detection of gliadin (prolamin from wheat). Cross-reactivity with prolamins from other cereals both CD-triggering and non-CD triggering was evaluated. The low limit of detection, 2 orders of magnitude lower than the aptamer recently reported, allowed us to accurately measure gluten in real food samples.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. All DNA oligo sequences were synthesized from Sigma-Life Science (Spain) as HPLC purified except the initial library (PAGE purified) and the sequence encoding for 33-mer and primers for its amplification (desalted). Gliadin standard from Prolamin Working Group (PWG) was acquired to R-Biopharm AG (Germany). Hot-start immolase DNA polymerase, buffer, and magnesium salt for PCR were obtained from Bioline, U.K. The imidazole, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) liquid substrate system for ELISA, tRNA type X-SA, streptavidin-peroxidase conjugate (strep-HRP), 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), dNTPs, 10× PCR buffer without MgCl₂, MgCl₂, PCR low ladder set, and the Bradford kit were obtained from Sigma-Aldrich (Spain). Salts for buffer solutions used in the SELEX procedure, Tween-20, BSA, and 1 M TRIS/HCl pH 7.4 solution were of molecular biology grade (DNase and RNase free) and also obtained from Sigma-Aldrich. The 5× TBE (0.45 M Tris-Borate and 0.01 M EDTA, pH 8.3) was acquired from 5 Prime (Maryland), and the 6× DNA gel loading buffer was acquired from Novagen (San Diego). DNA Lo-bind Eppendorf tubes and Eppendorf epT.I.P.S PCR Clean (Sigma-Aldrich) were used throughout the SELEX procedure. Protein Lo-bind PCR Clean Eppendorf tubes were used for binding assays to avoid prolamin binding to plastic.

Apparatus. Electrochemical measurements were performed with a computer-controlled μ -AutoLab type II potentiostat with GPES 4.9 software (EcoChemie, The Netherlands). The 12-tube mixing wheel (Dyna MX1) and the magnet (DynaMag-2) for magnetic separation were purchased from Life Technologies (Madrid, Spain). PCR was carried out in a GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Life Technologies).

In Vitro Selection of Aptamers. A degenerated 80-nt DNA oligonucleotide library was synthesized at the 1 μ mol scale. The library was composed of a 40 nt long central randomized sequence flanked by two constant sequences of 20 nt each (Table S-1 in the Supporting Information). In the initial round of selection, the 1 nmol library in binding buffer (BS, 50 mM TRIS-HCl pH 7.4 + 0.25 M NaCl + 5 mM MgCl₂) was heated at 98 °C for 5 min and immediately cooled in ice for 5 min. This material was added to Ni²⁺-nitrilotriacetic magnetic particles (Ni²⁺-NTA MPs) modified with a recombinant peptide (R-33-mer) containing the 33-mer immunotoxic target and a polyhistidine tag, in such a way that the amount of peptide was 10-fold lower than the amount of DNA library to favor the competition. A concentration of 1 μ g/mL BSA was added to the selection mixture to avoid unspecific binding. tRNA was also used as a competitor to make the selection more stringent. The [t-RNA]/[ssDNA] ratio was kept at 0.1. After interaction and magnetic separation, the supernatant was discarded and the modified MPs were washed in BS + 0.01 tween-20. The bound peptide-DNA complex was then eluted by incubation with 50 μ L of BME (100 mM HEPES pH 7.5 + 500 mM imidazole) for 10 min in the mixer wheel. The eluate was transferred to PCR tubes for amplification, using a biotin-reverse primer thus obtaining biotinylated-dsDNA (Supporting Information). After amplification and strand separation (see the Supporting Information), 250 pmol of the amplified and enriched library was used in subsequent rounds. Concentrations of target, competitor, and BSA were accordingly modified. The incubation time was progressively diminished as indicated in Table S-2 in the Supporting Information. The number of washing steps was also increased to further enhance the stringency of the selection. Before rounds 3, 6, and 9, a counterselection was carried out by incubating the DNA obtained from the previous round with control peptide-modified Ni²⁺-NTA MPs. In this case, the supernatant was collected and used in the subsequent round of selection. After 10 rounds of selection the remaining binding pool was cloned and 25 randomly selected clones were sequenced (Supporting Information).

Enrichment Assays. An aliquot of ssDNA from each round was PCR amplified with 5'-biotinylated reverse primer (SelR-Biot) and 5'-6-carboxyfluorescein labeled forward primer (SelF-6-FAM) (Table S-1 in the Supporting Information). The 6-FAM labeled strand was separated from the biotinylated one by entrapment on strep-MPs and further denaturation with NaOH. The final concentration was determined with a fluorescence microplate reader (Biotek Instrument flx800, Biotek, VT) using an excitation wavelength of 480 nm and an emission one of 528 nm. 6-FAM-ssDNA strands of known concentration were used as standards. The binding assay was carried out equilibrating equimolar amounts of 6-FAM-ssDNA from each cycle and R-33-mer-modified Ni²⁺-NTA MPs for 10 min in BS in a mixer wheel at room temperature, followed by magnetic separation of the unbound fraction (supernatant) using a magnet. After two washing steps with BS + 0.01% Tween-20, the bound fraction was eluted with BME for 10 min under rotation in a mixer wheel and collected. Both fractions were measured fluorimetrically. An identical binding assay was performed with control peptide-modified Ni²⁺-NTA MPs.

Binding Curves to 33-mer on MPs. A volume of 30 μ L of the 33-mer modified strep-MPs (see the Supporting Information for detailed preparation) were equilibrated with 470 μ L of increasing concentrations of each biotinylated

aptamer for 30 min under rotation in the mixer wheel and at RT. The amount of bound aptamer was then electrochemically measured, using strep-HRP conjugate as a label. With this aim, the beads were subjected to two washing steps in BS containing 0.01% Tween-20 (BSL), followed by incubation in 500 μL of 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ strep-HRP conjugate for 30 min under shaking at RT. After two washing steps with BSL and one with BS, the beads were resuspended in 30 μL of BS. A volume of 10 μL of beads were put on the working electrode of a disposable screen-printed carbon electrochemical cell (Dropsens, Oviedo, Spain), electrode area 12.6 mm^2 , and collected with a magnet (diameter 4 mm) placed under it. After 1 min, to ensure fully magnetic entrapment, 40 μL of the commercially available ready-to-use TMB solution was added. The current due to the reduction of the product generated during 1 min of enzymatic reaction was chronoamperometrically recorded at 0 V.

Binding Curves to PWG on MPs. To test the ability of the aptamers for recognizing the whole protein, gliadin standard from Prolamin Working Group (PWG) was employed. A volume of 30 μL of the PWG-modified tosylactivated MPs were conditioned in BSL and after discarding the supernatant, they were equilibrated with 500 μL of increasing concentrations of each biotinylated aptamer for 30 min under rotation in the mixer wheel at RT. The following steps (conjugation, enzymatic reaction and measurement) were identical as those described for binding curves to 33-mer.

Competitive Assay. A volume of 10 μL of strep-MPs modified with 33-mer were equilibrated with 1 mL of a mixture of 250 nM of biotinylated gli4 and increasing concentrations of PWG for 30 min under continuous shaking at 30 $^{\circ}\text{C}$. Next, after two washing steps in BSL, 1 mL of 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ strep-HRP conjugate was added and incubated for 30 min under continuous shaking at 30 $^{\circ}\text{C}$. After two washing steps with BSL, the beads were resuspended in 10 μL of BS and put on the working electrode. The measurement is identical to that described for binding curves to the 33-mer. For blank experiments, neither aptamer nor PWG were used in the first step. Selectivity studies were performed with the same protocol but using ethanol extracts of commercially available flour of different grains instead of PWG. The protein concentration in the extracts was measured by the Bradford method using PWG as a standard.

RESULTS AND DISCUSSION

Selection of Aptamers against 33-mer. SELEX was performed using a recombinant peptide containing the proteolytically resistant immunodominant 33-mer peptide with a polyhistidine tag (His_6 -tag) attached to the C terminus and a spacer between them (R-33-mer, Table S-1 in the Supporting Information) to ensure proper exposition of the intended target sequence to the aqueous solution and avoid steric hindrance from the bead surface. This peptide was immobilized onto Ni^{2+} -NTA MPs through the His_6 -tag and exposed to an 80-mer DNA library containing about 6×10^{14} different sequences. The stringency of the selection was controlled by adding tRNA as a competitor and varying the interaction time from 60 to 10 min and the washing steps from 2 to 15 (Table S-2 in the Supporting Information). The unspecific binding of aptamers was minimized using BSA in the selection buffer. Given the high content of apolar amino acids and low net charge of the 33-mer moiety is essential to avoid the evolution of aptamers for the spacer that contains hydrophilic side chains and ionizable groups, which are more

facile targets for hydrophilic DNA.⁴ Therefore, counterselection steps were carried out every three rounds using Ni^{2+} -NTA MPs covered with the spacer His_6 -tag (control peptide). The reversibility of the Ni^{2+} - His_6 tag bond allowed the elution of the DNA-target complex with a high concentration of imidazole, a histidine analogue. The presence of the peptide (confirmed by Western blot assay, Figure S-2 in the Supporting Information) as well as imidazole in the PCR mixture did not inhibit the amplification.

A fluorimetric binding assay confirmed the enrichment in specific aptamers for 33-mer after 10 rounds. The bound fraction of oligos progressively increases from the fifth to tenth round and concomitantly the unbound fraction decreased (Figure 1).

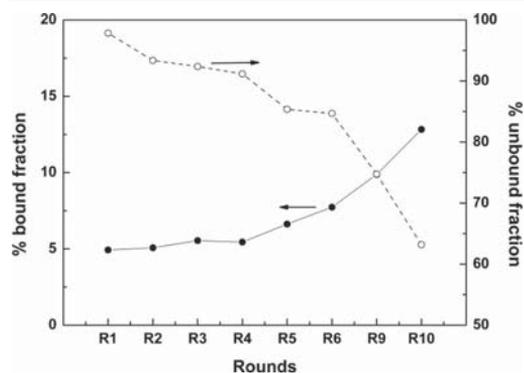


Figure 1. Percentage of 6-FAM-ssDNA, fluorimetrically measured, that binds (filled squares) or do not bind (open squares) to R-33-mer onto Ni^{2+} -NTA MPs after each SELEX round.

Additional rounds did not increase the bound fraction, so sequences from round 10 were cloned and sequenced. Binding to control peptide was undetectable after 10 rounds, which confirms the success of counterselection steps. The effectiveness of counterselection steps is further demonstrated by measuring the amount of DNA recovered in each SELEX round by fluorimetry (PicoGreen assay) after 15 PCR cycles. A clear diminution of the DNA recovered is observed when a counterselection was carried out before the corresponding selection step (steps 3, 6 and 9) (Figure S-3 in the Supporting Information). Inspection of 25 cloned sequences revealed important homologies showing the successful selection of anti-33-mer aptamers.

Five different families were identified according to their sequence. In Table 1, the alignment of a representative member of each family carried out using Bioedit software is shown. For clarity, matched nucleotides to gli1 sequence are shown as dots. Family I is the most populated one accounting for half of all clones, being 11 out of 12 fully identical. Interestingly, clone gli8 showed a common 12 nt identical motif (ACT GTC TGA AGG) with family I but displaced toward the very 5' end and it was included within this family. Family II contains 5 members with a 65% homology among them. Families III and IV have 3 and 2 identical members, respectively, and family V has two sequences with a 60% homology. Variations of this 12 nt motif were also found in families II, III, and IV at different positions, and the core motif GTCT is also present in family V, which is a very unusual result that indicates the convergent selection

Table 1. 5' → 3' Alignment of a Representative Sequence of Each Homologue Family^a

Family	Clon		ΔG (kcal mol ⁻¹)	ΔG (kcal mol ⁻¹)
		10 20 30 40 50 60		
I (13)	Gli1	CTAGGCGAAATATAGCTACAACCTGTCTGAAGGCACCCAAT	-9.8	-1.24
II (5)	Gli12	C.C.....G.AATTAGG.ATCGTCCATTAACCTGCTTCT	-8.14	-3.21
III (3)	Gli3	.GT.AG.G.TCTA..GC.....GC.AT.GT.TCGGCC	-10.56	-3.06
IV (2)	Gli4	CCAGTCTCCC.TTT.CCGCGC.....CA.....T..C	-7.75	-1.72
V (2)	GliSq04	AAT...TCTCGGT...ATTGTAACATGGTGTCAACC	-11.35	-2.95
I	Gli8T.ATGCTGGCATTGACTCTGCAACAATC	-9.13	-3.02

^aThe number of family members is in brackets in column 1. The Gibbs energy values for the full-length (80-mer) clones and for the truncated ones (randomized region, 40-mer) are indicated in the fourth and fifth columns.

toward a highly conserved sequence. Under the selection conditions, the Gibbs energy for the most stable secondary structure of each aptamer is also tabled in columns 4 (full-length clone) and 5 (random region). Structural predictions of representative sequences were made by using Mfold.²⁴

Evaluation of the Specific Reactivity of Candidate Aptamers against 33-mer and Gliadin. Aptamers representing each family were tested for their individual abilities to bind both the immobilized peptide and gliadin. For that, a fixed amount of biotinylated 33-mer (chemically synthesized without spacer and His₆-tag) was immobilized on strep-MPs. Upon blocking with biotin, beads were exposed to increasing concentrations of aptamers tagged with a biotin in its 5' end. After labeling with streptavidin-HRP conjugate, the aptamer fraction bound to the MP surface was detected by chronoamperometry. A similar approach using tosylactivated MPs was selected to test the affinity of aptamers for the whole protein. The only well characterized reference material (PWG gliadin),²⁵ widely accepted for gluten calibration in commercial kits, was immobilized on MPs. It is important to note that PWG is no longer available as a certified material from European Union Institute of Reference Materials and Methods because of several concerns. The lack of a common certified reference material is still an important issue to solve.²⁶

All aptamers recognized both the 33-mer (Figure 2A) and the native protein (Figure 2B) but with different affinity. A close inspection of both panels reveals that binding curves for aptamer gli4 perfectly matches each other indicating an equivalent affinity for the whole protein and 33-mer (Figure S-4 in the Supporting Information). A slight displacement of the binding curves toward higher aptamer concentrations when testing PWG with other aptamers is observed, especially for the case of gliSq04, which also exhibits the lowest intensity currents.

This behavior indicates a lower affinity for PWG. The ability of recognizing the peptide target within the natural protein but with lower affinity is not uncommon.²⁷ Aptamers might bind an unstructured conformation of the peptide or peptide fragment that it is not present in the natural protein and cannot be easily fit-induced. Accordingly, it can be speculated that the closer the native and recognized conformations, the smaller the loss in affinity.

From the results shown in Figure 2 it is apparent that the lower the affinity for 33-mer the worse recognition ability for the peptide sequence within the wheat prolamins molecule. It is worth noting that the most abundant sequence (family I, gli1) is not the best binder. This, at first sight, self-contradictory result was previously reported in other selections and attributed

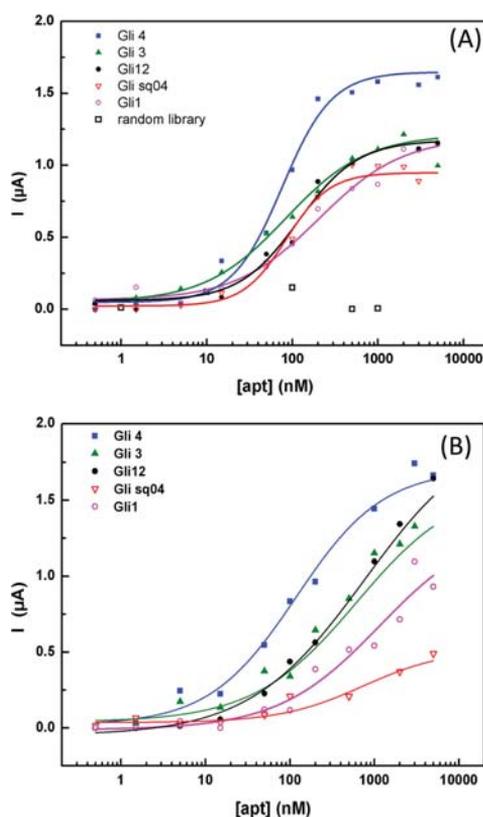


Figure 2. Binding curves of biotinylated aptamers to (A) biotinylated 33-mer bound to strep-MPs and (B) PWG covalently bound to tosylactivated MPs. The detection was carried out chronoamperometrically at 0 V after labeling with strep-HRP and adding TMB for 1 min.

to a certain selection bias toward fast binders rather than high-affinity ones.^{28,29}

As a control experiment, MPs modified with 33-mer were assayed with a randomized 40 nt-long biotinylated oligonucleotide library within an identical concentration range (Figure 2A, open squares). Low intensity currents were found independ-

ently of the oligonucleotide concentration tested. This confirms the specific affinity of the aptamers selected by SELEX to the immunodominant peptide.

The analysis of the experimental equilibrium binding data displayed in Figure 2A also provides an estimation of the dissociation constants (K_d) of the individual aptamers to the immobilized peptide. Assuming a Langmuir-type adsorption and considering that the current obtained as signal is a measurement of bound aptamer, the reciprocal of the signal is plotted against the reciprocal of aptamer concentration.³⁰ A good linear relationship was obtained in all cases, consistent with the hypothesized model. The values of the apparent K_d estimated from the slope of the straight lines are summarized in Table 2. Aptamer gli4 showed the highest affinity for the

Table 2. Dissociation Constants of the Aptamer-33-mer Complex Estimated Form the Saturation Binding Assays Displayed in Figure 2A

aptamer	Gli4	Gli3	Gli1	Glisq04	Gli12
K_d /nM	61 ± 3	94 ± 4	102 ± 11	144 ± 7	296 ± 38

peptide, with a dissociation constant about 61 nM. A wide range of K_d values for protein-aptamer interaction have been reported.⁴ For an amyloid peptide, a molecule similar in size to 33-mer, K_d values between 29 and 48 nM were reported³¹ in good agreement with the present estimation. Moreover, this value lies in the typical range for antibodies, supporting that the new aptamer can favorably compete with antibodies in analytical applications.

Competitive Electrochemical Aptamer-Based Assay.

The performance of aptamer with the highest affinity, gli4, was assessed for quantitative detection of gliadin in a competitive aptaassay using strep-MPs modified with 33-mer. The competition is established between the immobilized peptide and PWG in solution in the presence of a fixed amount of biotinylated gli4 aptamer. In the presence of increasing concentrations of PWG, the amount of free aptamer available to bind 33-mer on the MPs surface diminishes resulting in a decreasing analytical signal with analyte concentration.

In Figure 3, the decreasing response curve expressed as a percentage of the maximum signal obtained when no PWG was added is shown between 0.1 ppb and 10 ppm of PWG. The calibration curve was fitted to a four-parameter logistic equation as follows:

$$y = A + \frac{(B - A)}{1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)^p}$$

where A is the response at ∞ analyte concentration, B is the response at zero analyte concentration, $EC50$ is the concentration leading to 50% of the maximum signal, and p is the Hill slope that represents the slope at the inflection point of the sigmoid curve. The values of the four parameters that best fit the experimental data are the following: $y = 0.81 + (98.16 - 0.81)/(1 + (x/284.65)^{0.52})$.

All PWG standards were prepared to contain 1.2% ethanol in BS to mimic the final ethanol concentration after gluten extraction from real samples and dilution. All signals are blank subtracted. The blank signal corresponds to the nonspecific adsorption of the enzyme conjugate on modified MPs because neither aptamer nor PWG were added. A limit of detection of 0.5 ppb is calculated as the concentration that leads to 95% of

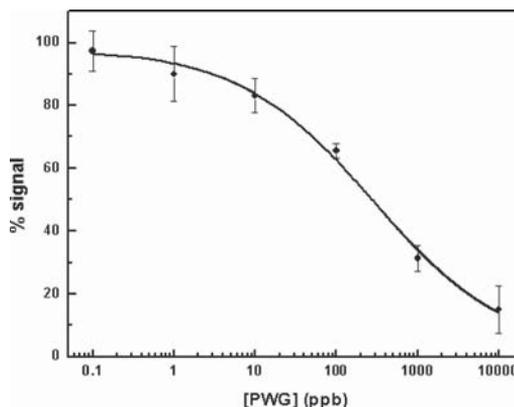


Figure 3. Competitive assay curve. Analytical signals expressed as percentage of the maximum intensity current as a function of the PWG concentration in the presence of [gli4] = 250 nM. Detection as in Figure 2

the maximum signal. The repeatability of the assay expressed as variation coefficient was 6% for 10 ppb. Using calibration curves obtained in three different days, the interassay reproducibility at the same concentration was 12.5%.

Although in the past decade significant advances have been produced in the development of sensitive and reliable methods for gluten analysis in gluten-free food, the issue is still unresolved due to the lack of a well-established threshold value that ensures the safety of all sensitized individuals. Consequently, the search for novel receptors that pushes down the limits of detection is an active area of research.

A variety of methods using antibodies and enzymes with both spectrophotometric or electrochemical detection appears in the literature but their comparison is not straightforward because of the different ways of reporting the analytical features, especially the limits of detection. To clarify this, Table 3 compiles approaches that appeared in the past decade differentiating the LD obtained from the working curves using conveniently diluted standards expressed in ppb of gliadin standard (PWG or Sigma gliadin) and their equivalence in ppm of gluten taking into consideration the dilution factor and assuming that gliadin constitutes 50% of gluten. In that table the apta-PCR assay recently developed is also included for comparison. From this table, it is apparent that most antibody-based assays present a LD between 1 and 5 ppm of gluten, similar to the reference method (R5). Only the competitive methods using G12 and R5 achieved a detectability below 1 ppm. The first one is commercial and the second one is currently marketed using a different extraction method. The aptamer-based assay herein described is slightly more sensitive than them.

Aptamer Reactivity with CD-Triggering and Non-CD-Triggering Proteins. The ability to recognize other prolamins that triggers CD while discriminating nonrelated proteins is essential to evaluate the potential of any receptor for gluten analysis. Diluted ethanolic extracts of wheat, rye, barley, oat, maize, rice, and soya flours were tested on strep-MPs modified with 33-mer in the presence of a fixed amount of gli4. The amount of biotinylated aptamer bound was measured by chronoamperometry. In the cases of the four cereals containing

Table 3. Comparison of the Analytical Performance of the Binding Assays Reported for Gliadin Detection

receptor	assay type	LD (ppb gliadin) ^a	dilution factor	LD (ppm gluten) ^b	ref
R5	competitive	1.56	1:1000	3.2	18
R5	competitive	0.36	1:1000	0.720	32
PN3	competitive	128	1:100	25	21
CDC5	sandwich	3.29	no samples		33
CDC5	sandwich	5.5	1:250	2.75	17
G12	sandwich	0.6	1:1000	1.2	15
G12	competitive	0.44	1:1000	0.88	15
G12	competitive	1.26	1:500	1.26	34
Antigliadin	competitive	5.7	1:400	4.56	35
IgY/HYB314	sandwich	4	1:200	1.6	20
Aptamer G33	competitive	100	not mentioned		23
Aptamer Gli4	competitive	0.5	1:500	0.5	this work

^aCalculated from the working curve. ^bCalculated taking into account the dilution factor and the gliadin content in gluten as 50%.

prolamins immunotoxic for celiac individuals, an inverse dependence between the current and the prolamin concentration was found. This indicates that the selected aptamer is able to recognize all offending proteins even the controversial avenins. The magnitude of the cross-reactivity was evaluated for 10 ppb (that corresponds to the European legislated threshold 20 ppm in the sample) as the ratio between the percentage of signal for wheat extract to percentage of signal for barley/rye/oat extract $\times 100$. The values calculated were 94.5, 86.1, and 76.6%, respectively. This indicates that the gli4 aptamer responds to barley and rye similarly to wheat, within the experimental error. The affinity for oat is significantly different. This result can be expected from the similar homology between analogous sequences to 33-mer in barley and rye.¹¹ Interestingly, an antibody raised against 33-mer showed identical behavior, that is, it recognizes barley over rye and oat with less affinity.¹⁴ The aptamer developed against the Sigma gliadin was not challenged to barley and rye.²³ It is well-known that the response of some receptors to this type of gliadin is sometimes smaller than the one with PWG.²¹ The content of gliadin in gluten varies depending on the source. For these reasons we have selected the European standard (PWG) that is made from a mixed of wheat cultivars around the world.

The recognition of avenins is important because their role in CD is still controversial.^{26,36–38} Antibody used in the official method of analysis in food does not recognize avenins^{18,39} and neither does the aptamer recently developed.²³ The antibodies raised against a peptide of $\alpha 2$ -gliadin, G12 and PN3 were able to detect oat prolamins.^{18,21} The availability of receptors capable of recognizing prolamins from oat is essential to definitively elucidate their role and to increase the safety of CD patients.

The competitive aptaassay was also tested with extracts from non CD-triggering grains such as rice, soya, and maize in the range between 0.1 ppb and 10 ppm of alcohol soluble protein, as determined by the Bradford test, except for maize flour for which a maximum concentration of 1 ppm was assayed. This was due to the low protein content of this cereal. Currents equivalent to the blank within the experimental error were obtained at all protein concentration levels. In Table 4, mean values and standard deviation for each cereal compared with the blank signal are shown.

Analysis of Real Samples and Recovery. In order to demonstrate the feasibility of detecting gluten in food matrices, two samples certified by an interlaboratory assay were tested. A cake mix certified as gluten-free using the R5 method and an

Table 4. Averaged Current Obtained with Nontoxic Grains from 0.1 ppb to 10 ppm (for Maize Values Were Averaged up to 1 ppm) and Values for the Respective Blanks

grain	mean current \pm Std (μ A)	mean blank current \pm Std (μ A)
rice	5.0 \pm 1.1	4.4 \pm 0.9
soya	4.4 \pm 1.3	3.5 \pm 0.8
maize	4.0 \pm 1.0	3.3 \pm 0.4

infant soya formula with a certified assigned value of 21 ppm of gluten were assayed. In addition to this, the extracted cake mix was enriched with 25 and 100 ppm of gliadin to evaluate the recovery.

Good agreement with the values expected was obtained as shown in Table 5. The response obtained for the infant soya

Table 5. Comparison of Gliadin Analysis in Real Samples with Certified or Fortified Values

sample	certified value	concentration found
infant soya formula	21.0 ppm of gluten	16 \pm 5 ppm of gluten
cake	negative	LD
cake spiked	25 ppm of gliadin	27.5 \pm 0.3 ppm of gliadin
cake spiked	100 ppm of gliadin	98 \pm 9 ppm of gliadin

formula agrees well with the assigned value. The range of concentration reported in the interlaboratory test varies from 10.5 to 31.4 ppm using the R5 sandwich method. As expected the negative sample did not give an analytical signal different from the blank.

CONCLUSIONS

Oligonucleotides with affinity for the most immunotoxic fraction of gluten (peptide 33-mer) were developed by SELEX using magnetic beads and His tags for analyte immobilization. In spite of the hydrophobic nature of the target, the initial large pool of different DNA sequences could be enriched in affinity sequences with a high degree of homology. All the evolved receptors are able of detecting 33-mer alone and within the native protein (gliadin). The best of them also detect hordeins and secalins as well as avenins with lower affinity and discriminates them from rice, soya, and maize proteins. This selectivity for the CD-triggering cereals is the foundation for the development of aptaassays for gluten detection in food. As a proof of that, a competitive assay on MPs was developed with a limit of detection of 0.5 ppb of

PWG, which corresponds to 0.5 ppm of gluten, well below the value of the reference method. The enhanced detectability along with the improved chemical and thermal stability of the nonprotein receptor evolved makes this approach a candidate to rival the established methods of analysis for more reliable quantitation of gluten content in food and ensure the safety of a wider sector of the CD sensitized population.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

Additional information as indicated in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: mjlc@uniiovi.es.

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

S.A.G. and N.S.A. thank the Spanish Government for a predoctoral FPI grant and a Ramón y Cajal contract, respectively. The authors also thank Dr. Marcos García Ocaña for obtaining the recombinant peptide and cloning, Dr. José Luis Martínez Fernández for his advice in molecular biology techniques and aptamer sequencing, and Prof. Carmen Rodríguez for the use of microplate readers. This work has been financed by Project CTQ2008-02429 granted to “Grupos Consolidados” and the European Regional Development Fund.

■ REFERENCES

- (1) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, *346* (6287), 818–822.
- (2) Tuerk, C.; Gold, L. *Science* **1990**, *249* (4968), 505–510.
- (3) Mayer, G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48* (15), 2672–2689.
- (4) Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. *Biomol. Eng.* **2007**, *24* (4), 381–403.
- (5) Kim, M. Y.; Jeong, S. *Nucleic Acid Ther.* **2011**, *21* (3), 173–178.
- (6) Majerfeld, I.; Yarus, M. *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1* (5), 287–292.
- (7) Mehta, J.; Rouah-Martin, E.; Van Dorst, B.; Maes, B.; Herrebout, W.; Scippo, M. L.; Dardenne, F.; Blust, R.; Robbins, J. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (3), 1669–1676.
- (8) Eissa, S.; Andy, N.; Sijaj, M.; Tavares, A. C.; Zourob, M. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 11794–11801.
- (9) Betat, H.; Vogel, S.; Struhalla, M.; Forster, H. H.; Famulok, M.; Welzel, P.; Hahn, U. *Biol. Chem.* **2003**, *384* (10–11), 1497–1500.
- (10) Gilbert, B. A.; Sha, M.; Wathen, S. T.; Rando, R. R. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5* (6), 1115–1122.
- (11) Shan, L.; Molberg, O.; Parrot, I.; Hausch, F.; Filiz, F.; Gray, G. M.; Sollid, L. M.; Khosla, C. *Science* **2002**, *297* (5590), 2275–2279.
- (12) Lee, S. K.; Green, P. H. R. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2006**, *18* (1), 101–107.
- (13) Skerritt, J. H.; Hill, A. S. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38* (8), 1771–1778.
- (14) Moron, B.; Bethune, M. T.; Comino, I.; Manyani, H.; Ferragud, M.; Lopez, M. C.; Cebolla, A.; Khosla, C.; Sousa, C. *PLoS One* **2008**, *3* (5), e2294.
- (15) Moron, B.; Cebolla, A.; Manyani, H.; Alvarez-Maqueda, M.; Megias, M.; Thomas, M. D. C.; Lopez, M. C.; Sousa, C. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *87* (2), 405–414.
- (16) Ellis, H. J.; Rosen-Bronson, S.; O'Reilly, N.; Ciclitira, P. J. *Gut* **1998**, *43* (2), 190–195.
- (17) Nassef, H. M.; Redondo, M. C. B.; Ciclitira, P. J.; Ellis, H. J.; Frago, A.; O'Sullivan, C. K. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (23), 9265–9271.
- (18) Valdes, I.; Garcia, E.; Llorente, M.; Mendez, E. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2003**, *15* (5), 465–474.
- (19) Mujico, J. R.; Dekking, L.; Kooy-Winkelaar, Y.; Verheijen, R.; van Wichem, P.; Streppel, L.; Sajic, N.; Drijfhout, J. W.; Koning, F. J. *AOAC Int.* **2012**, *95* (1), 206–215.
- (20) Gujral, N.; Suresh, M. R.; Sunwoo, H. H. *J. Immunoassay Immunochem.* **2012**, *33* (4), 339–351.
- (21) Redondo, M. C. B.; Griffin, P. B.; Ransanz, M. G.; Ellis, H. J.; Ciclitira, P. J.; O'Sullivan, C. K. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *551* (1–2), 105–114.
- (22) Codex Alimentarius Commission. *Codex Alimentarius Alinorm 08/31/REP*; Codex Alimentarius: Geneva, Switzerland, 2008.
- (23) Pinto, A.; Nadal-Polo, P.; Henry, O.; Bermudo-Redondo, M. C.; Svobodova, M.; O'Sullivan, C. K. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 515–524.
- (24) Zuker, M. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (13), 3406–3415.
- (25) van Eckert, R.; Berghofer, E.; Ciclitira, P. J.; Chirido, F.; Denery-Papini, S.; Ellis, H. J.; Ferranti, P.; Goodwin, P.; Immer, U.; Mamone, G.; Mendez, E.; Mothes, T.; Novalin, S.; Osman, A.; Rumbo, M.; Stern, M.; Thorell, L.; Whim, A.; Wieser, H. *J. Cereal Sci.* **2006**, *43* (3), 331–341.
- (26) Diaz-Amigo, C.; Popping, B. *J. AOAC Int.* **2012**, *95* (2), 337–348.
- (27) Xu, W.; Ellington, A. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93* (15), 7475–7480.
- (28) Ruigrok, V. J. B.; van Duijn, E.; Barendregt, A.; Dyer, K.; Tainer, J. A.; Stoltenburg, R.; Strehlitz, B.; Levisson, M.; Smidt, H.; van der Oost, J. *ChemBioChem* **2012**, *13* (6), 829–836.
- (29) Win, M. N.; Klein, J. S.; Smolke, C. D. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (19), S670–S682.
- (30) Winzor, D. J.; Sawyer, W. H., *Quantitative Characterization of Ligand Binding*, 1st ed.; Wiley-Liss: New York, 1995.
- (31) Ylera, F.; Lurz, R.; Erdmann, V. A.; Furste, J. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *290* (5), 1583–1588.
- (32) Mena, M. C.; Lombardia, M.; Hernando, A.; Mendez, E.; Albar, J. P. *Talanta* **2012**, *91*, 33–40.
- (33) Nassef, H. M.; Civit, L.; Frago, A.; O'Sullivan, C. K. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (13), 5299–5307.
- (34) Amaya-González, S.; de-los-Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tuñón-Blanco, P. *Electroanalysis* **2011**, *23* (1), 108–114.
- (35) Laube, T.; Kergaravat, S. V.; Fabiano, S. N.; Hernandez, S. R.; Alegret, S.; Pividori, M. I. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *27* (1), 46–52.
- (36) Real, A.; Comino, I.; de Lorenzo, L.; Merchan, F.; Gil-Humanes, J.; Gimenez, M. J.; Lopez-Casado, M. A.; Torres, M. L.; Cebolla, A.; Sousa, C.; Barro, F.; Piston, F. *PLoS One* **2012**, *7* (12), e48365.
- (37) Comino, I.; Real, A.; de Lorenzo, L.; Cornell, H.; Lopez-Casado, M. A.; Barro, F.; Lorite, P.; Torres, M. L.; Cebolla, A.; Sousa, C. *Gut* **2011**, *60* (7), 915–922.
- (38) Arentz-Hansen, H.; Fleckenstein, B.; Molberg, O.; Scott, H.; Koning, F.; Jung, G.; Roepstorff, P.; Lundin, K. E. A.; Sollid, L. M. *PLoS Med.* **2004**, *1* (1), 84–92.
- (39) Kahlenberg, F.; Sanchez, D.; Lachmann, I.; Tuckova, L.; Tlaskalova, H.; Mendez, E.; Mothes, T. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *222* (1–2), 78–82.

Supporting information for

Aptamer binding to celiac disease-triggering hydrophobic proteins: a sensitive gluten detection approach

Sonia Amaya-González, Noemí de-los-Santos-Álvarez, Arturo J. Miranda-Ordieres, M.

*Jesús Lobo-Castañón**

Dpto. Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Av. Julián Clavería 8. 33006,

Oviedo, Spain

Protocols for molecular biology experiments

Protocols for magnetic beads modification

Protocol for flour extraction

Figure S-1: SDS-PAGE and Western Blot to assess the purity of the R-33mer and control peptides

Figure S-2: Western Blot to assess the immobilization of the R-33mer onto Ni²⁺-MPs

Figure S-3: Amount of amplified dsDNA obtained after each SELEX round measured fluorimetrically

S-4: Comparison of binding curves by aptamer to 33-mer and PWG.

Table S-1: Nucleic acid and amino acid sequences used.

Table S-2: SELEX conditions

PROTOCOLS

Cloning, peptide expression and purification of SELEX target (R-33-mer)

The DNA sequence encoding for 33-mer peptide from α 2-gliadin from *Triticum aestivum* (accession number AJ 133612.1 position 168-267) was amplified by PCR using the primers ExpF and ExpR. The PCR vial contained 1 μ M of each primer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 \times buffer PCR, 2.5 U Taq polymerase (Biotools, Madrid, Spain), and 4 μ g of template. Amplification conditions: 10 min at 97 °C to activate the enzyme and 35 cycles of 60 s at 95 °C, 60 s at 60 °C and 60 s at 72 °C and a final extension at this temperature. These amplicons were cloned and expressed using the pETBlue-2 system (Novagen, Millipore Ibérica, Spain) following the manufacturer instructions. The purification was carried out using a 1-mL HisTrap FF column in an AKTA FPLC instrument (GE Healthcare, Spain). The control peptide was similarly obtained but without inserting the amplicon into the vector. The purity of the target and control, key for the success of the SELEX procedure, is shown by Western-Blot assay (Figure S-1). All DNA and peptide sequences are shown in Table S-1.

PCR amplification and conditioning steps in each round of SELEX

After elution of the R33-mer-bound oligonucleotide complexes, amplification of the DNA sequences was carried out by PCR. Each 100 μ L PCR vial contained: 2 μ L of template (eluate), 1 μ M each primer (Self and SelR-Biot), 0.2 mM dNTP, 3 mM Mg²⁺, 1 \times buffer PCR and 2.8 U hot-start immolase™ DNA polymerase. Amplification conditions were: initial step 10 min at 37 °C, 20 min at 95 °C to activate the enzyme and 15 cycles of 45 s at 94 °C, 45 s at 57 °C and 45 s at 72 °C. A final extension was carried out at 72 °C for 10 min. This protocol generated the correct size product as determined by 2% agarose gel using a low size DNA ladder (not shown). 10 μ L each vial and standards as well as a low size DNA ladder were loaded on the agarose gel with 1 \times TBE as a running buffer. Electrophoresis was carried out at 80 V for about 30 min and amplicons visualized with ethidium bromide in a transilluminator (Vilber Lourmat, France). At this point all the PCR products were pooled and quantified fluorimetrically using Quant-iT™

PicoGreen kit (Life Technologies, Spain) in a Minifluorometer TBS-380 (Turner Biosystems, CA). When less than 250 pmol were obtained, several aliquots were subsequently amplified by PCR until this quantity was reached. 250 pmol of dsDNA from each round were incubated with Dynabeads® MyOne™ streptavidin C1 magnetic particles (strep-MPs, Life Technologies, Spain). The amount of beads necessary to bind all biotinylated ssDNA and the remaining biotinylated primers (SelR-Biot) was calculated according to manufacturer specifications for each round. The strand separation was carried out as follows. An excess of strept-MPs to ensure complete entrapment were washed three times with BLstrep (5 mM TRIS-HCl pH 7.4 + 1 M NaCl + 0.01 Tween-20) and then resuspended in a volume of 10 mM TRIS-HCl pH 7.4 + 2 M NaCl equals to the volume that contains 250 pmol of DNA from each round. The 250 pmol were immediately added and left to bind for 15 min in the mixer wheel. After magnetic separation, the beads were washed three times with BLstrep. The dsDNA was denatured with 50 µL of 100 mM NaOH for 10 min under stirring. The supernatant containing the non-biotinylated strands was collected, neutralized with 6 µL of HCl 1 M and diluted with BS for a new round of selection.

Cloning and sequencing of sequenced selected during SELEX

After 10 rounds of selection, DNA was amplified by PCR with SelF and SelR (Table S-1) using the PCR parameters used during SELEX rounds. The products were cloned using pETBlue-1 Acceptor Vector Kit (Novagen) and transformed into Nova Competent cells (Novagen). After plating, twenty-five colonies were picked and the plasmids purified using Wizard Plus minipreps DNA purification system (Promega, USA) according to manufacturer specifications. Finally, they were sequenced using BigDye Terminator kit and run on Abi PRISM 3130xl Genetic Analyzer instrument (Applied Biosystems, Life Technologies). The sequences were analyzed using the Chromas Lite 2.01. After identification, the sequences were trimmed to remove the primer fragments and aligned using the free BioEdit software (Ibis Biosciences, CA).

Ni²⁺-NTA MPs modification

6 μL of Ni²⁺-NTA MPs (MagneHis™ Ni, Promega, USA) were equilibrated in 500 μL of modification buffer (BM, 100 mM HEPES pH 7.5 + 10 mM imidazole + 0.5 M NaCl). After discarding the supernatant, they were incubated with 10 μL of R-33-mer (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) or control (0.75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) peptides in BM for 15 min in the mixer wheel at RT. After magnetic separation, they were washed twice with 500 μL BM + 0.01% Tween-20 and once with 500 μL binding buffer (BS, 50 mM TRIS pH 7.4+0.25 M NaCl+5 mM MgCl₂). Finally, the modified Ni²⁺-NTA MPs were diluted at 5 pmol peptide/ μL with BS and stored at 4 °C when not in use.

Modification of strep-MPs with 33-mer

50 μL strep-MPs were washed twice with 1 mL PBS + 0.01 % Tween-20 and resuspended in PBS + 0.01 % Tween-20 containing 2 μM of biotinylated 33-mer (Biomedal, Spain). The interaction proceeded for 30 min under continuous shaking in a Thermomixer (Eppendorf Ibérica, Spain) at 30 °C. After that, the beads were washed twice in PBS + 0.01 % Tween-20 and blocked with 500 μM biotin in PBS + 0.01 % Tween-20 for 30 min. After two new washing steps, they were reconstituted in BS and used within the same day.

Modification of tosylactivated-MPs with PWG

50 μL of Dynabeads® MyOne™ tosylactivated magnetic beads (Life Technologies) were washed twice with 1.25 mL 0.1 M borate pH 9.5 and then coated with the 0.32 mg/mL PWG in 0.058 M borate pH 9.5 + 1 M (NH₄)₂SO₄ under continuous shaking at 37 °C for 24 h. After two washing steps with 1.25 mL PBS + 0.01 % Tween-20, they were left in the same solution overnight under shaking at 37 °C in a Thermomixer. After two additional washing steps with the same solution, the beads were resuspended in PBS + 0.01 % Tween-20 and used within the same day.

Prolamin extraction from flour and food

A simplified version of a previously reported protocol was used¹. Briefly: 4 mL of NaCl 0.4 M was added to 1 g of the corresponding sample (flour or food). After 20 min of shaking at RT, the suspension was centrifuged in a Heraeus Multifuge 1L-R (ThermoScientific) for 15 min at 7500 g. The supernatant was removed and the whole washing step was repeated twice. To extract the prolamins, 4 mL of 60% ethanol was added to the washed pellet, incubated for 20 min under shaking at RT and centrifuged for 15 min at 7500 g. After collecting the supernatant, a second extraction step was performed and both supernatants were combined. Flours of gluten-containing cereals were extracted in different days to avoid cross-contamination. Extractions and measurements were carried out in separate rooms for the same reason.

Final prolamin concentration in flour extracts was determined using a Genesys 10S UV-VIS Spectrophotometer from ThermoScientific, Spain, and the Bradford assay. PWG was used as standard instead of BSA for calibration due to discrepancies found in absorbance intensities at equal concentrations. This behavior is attributed to the difference in the content of the dye target amino acids (mainly arginine, lysine and histidine)². Flour extracts were diluted with BS to obtained concentrations ranging from 0.1 ppb to 10 ppm to carry out selectivity studies in the competitive assay format.

Food extracts were diluted 1:50 with BS before used in the competitive assay.

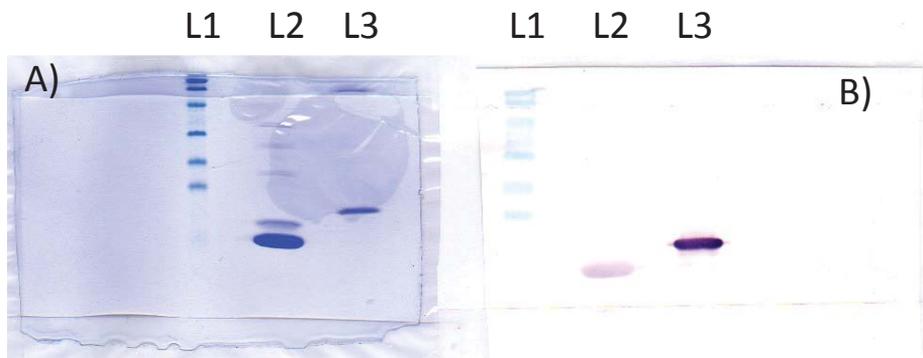


Figure S-1: Expressed R-33-mer and control peptide visualized by 15% SDS-PAGE with Coomassie stain (A) and western blot (B). Purified peptides in HisTrap FF column by FPLC were loaded on the SDS-PAGE. After electrophoretic separation the proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane at 400 mA for 1 h at room temperature. The membrane was further blocked with 3% BSA-TBS with sodium azide for preservation at 4 °C for 1 h and reacted with an antiHis₆- tag antibody (Biomedal, Spain) in TBS with 1% BSA and sodium azide for 1 h at room temperature under gently shaking. After two washing steps with TBS containing 0.05 % tween-20, the membrane was incubated with anti-mouse-alkaline phosphatase conjugate in TBS with 1% BSA and sodium azide for 1 h under gently shaking and room temperature. Then, it was washed three times with TBS with 0.05% tween-20 and developed with nitro-blue tetrazolium chloride/ 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate toluidine salt (NBT/BCIP from Sigma-Aldrich). L1: protein marker, L2: control peptide, L3: R-33-mer.



Figure S-2. Western Blot of the R-33-mer eluted from Ni²⁺-NTA MPs. 1 nmol of R-33-mer were added to 10 μ L of Ni²⁺-NTA MPs and diluted to 500 μ L in BM for 15 min at RT in the mixer wheel. The supernatant (the unbound R-33-mer) was used in the western blot as a comparison (L1). The MPs were washed three times with BM+0.01% Tween-20. An aliquot of 20 μ L of MPs were separated for western blot analysis. 50 μ L of 100 mM HEPES pH 7.5 + 0.5 M NaCl + 500 mM imidazole were added to elute the peptide for 5 min under vigorous shaking with a vortex. The supernatant was collected and a second elution step was carried out. Both supernatants were mixed and loaded in 15% SDS-PAGE. The PAGE and western blotting were carried out as indicated in supporting Figure S-1. Lane 1: protein marker, Lane 2 (L1): unbound R-33-mer, Lane 3 (L2): eluted R-33-mer

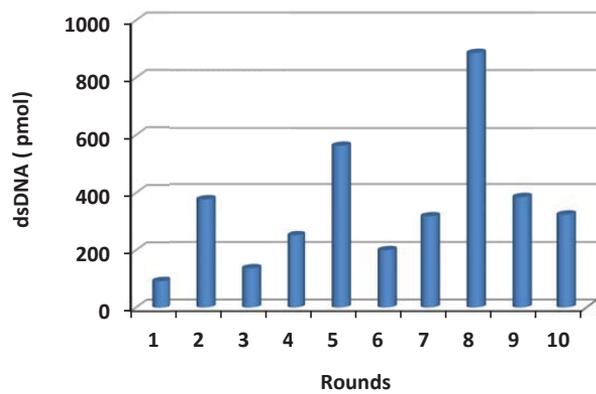


Figure S-3: Amount of amplified dsDNA obtained after each SELEX round measured fluorimetrically

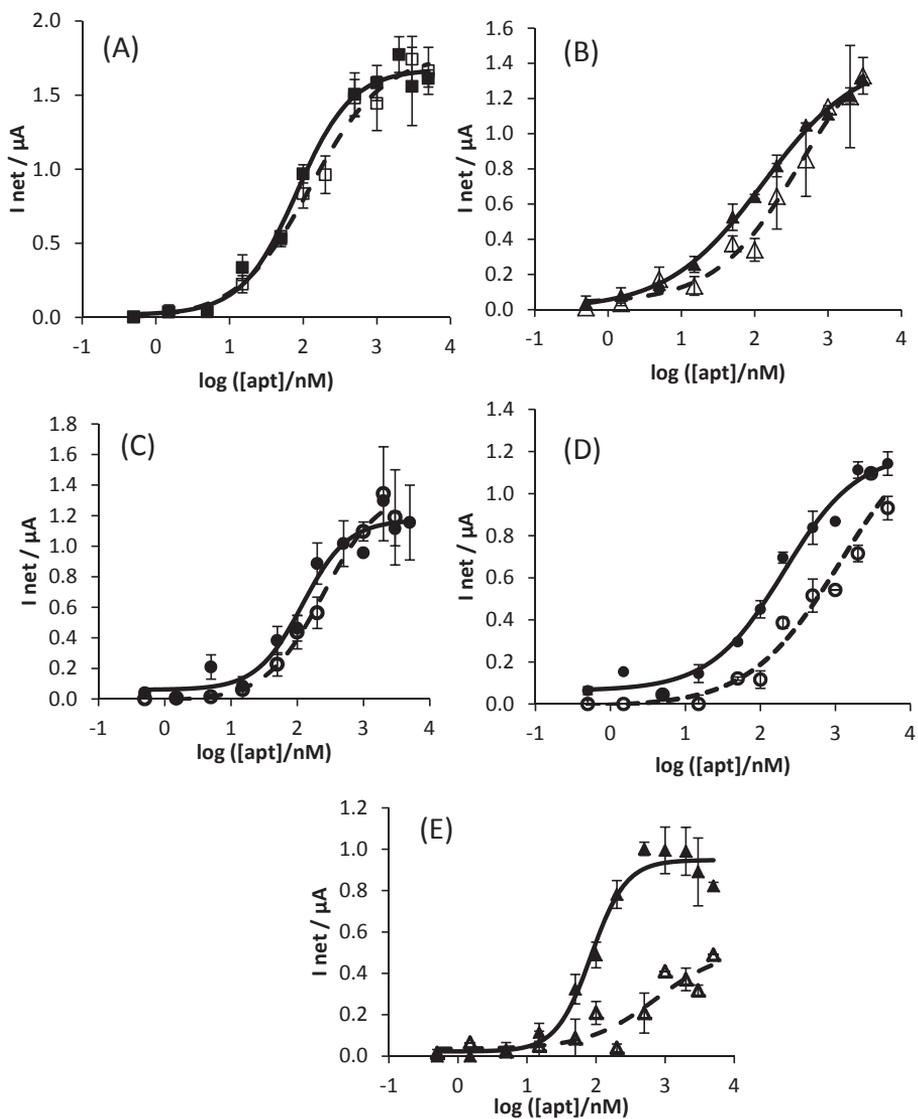


Figure S-4: Binding curves of biotinylated A) gli4, B) gli3, C) gli12, D) gli1 and E) glisq04 aptamers to (filled symbols) biotinylated 33-mer bound to strep-MPs and (open symbols) PWG covalently bound to tosylactivated MPs. The detection was carried out chronoamperometrically at 0 V after labeling with streptavidin-HRP and adding the substrate for 1 min.

Table S-1: Nucleic acid and amino acid sequences used.

Description (abbreviation)	Sequences
33-mer encoding ssDNA	GCT GCA GCT GCA ACC ATT TCC GCA GCC GCA ACT ACC ATA TCC GCA GCC GCA ACT ACC ATA TCC GCA GCC GCA ACT ACC ATA TCC GCA GCC GCA ACC ATT T
Forward primer for R-33-mer expression (ExpF)	GCT GCA GCT GCA ACC ATT TC
Reverse primer for R-33-mer expression (ExpR)	ATA AAT GGT TGC GGC TGC GGA T
Recombinant 33-mer (R-33-mer)	MLQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPFISRELVDPNVQARLQD VDGTIDTRSKLAAAQLYTRASQPELAPEDPEDLEHHHHHH
Control peptide	MISRELVDPNVQARLQDVDGTIDTRSKLAAAQLYTRASQPELAPEDPEDLE HHHHHH
Initial ssDNA library	AGG GTT GAT AGG TTA AGA GC-40N-CGA TGT CAA CTA GCT GTT GG
Reverse biotinylated primer (SelR-Biot)	biotin-(CH ₂) ₆ -CCA ACA GCT AGT TGA CAT CG
6-FAM Forward primer (Self-6-FAM)	6-FAM-AGG GTT GAT AGG TTA AGA GC
Reverse primer (SelR)	CCA ACA GCT AGT TGA CAT CG
Forward primer (Self)	AGG GTT GAT AGG TTA AGA GC

Table S-2: SELEX conditions.

Round	Counterselection	Incubation time (min)	Number of washing steps
1		60	2
2		60	2
3	yes	60	2
4		30	2
5		30	5
6	yes	30	5
7		15	5
8		15	10
9	yes	15	10
10		15	15

REFERENCES

- [1]. van Eckert, R.; Berghofer, E.; Ciclitira, P. J.; Chirido, F.; Denery-Papini, S.; Ellis, H. J.; Ferranti, P.; Goodwin, P.; Immer, U.; Mamone, G.; Mendez, E.; Mothes, T.; Novalin, S.; Osman, A.; Rumbo, M.; Stern, M.; Thorell, L.; Whim, A.; Wieser, H., *J. Cereal Sci.* **2006**, *43* (3), 331-341.
- [2]. Gessendorfer, B.; Koehler, P.; Wieser, H., *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395* (6), 1721-1728.

**Affinity of aptamers binding 33-mer gliadin
peptide and gluten proteins: Influence of
immobilization and labeling tags**



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca



Affinity of aptamers binding 33-mer gliadin peptide and gluten proteins: Influence of immobilization and labeling tags

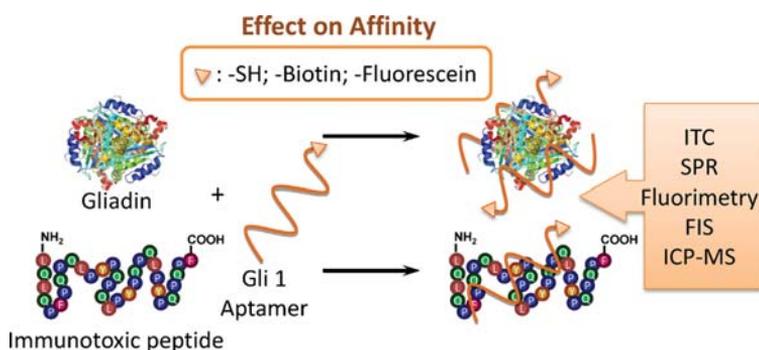
Sonia Amaya-González, Laura López-López, Rebeca Miranda-Castro, Noemí de-los-Santos-Álvarez, Arturo José Miranda-Ordieres, María Jesús Lobo-Castañón*

Dpto. Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Av. Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

HIGHLIGHTS

- Affinity of anti 33-mer peptide aptamer was evaluated by various techniques.
- Unlike other antipeptide aptamers, it recognizes the whole protein with minimal loss in affinity.
- Any modification at 5' end led to a decrease in affinity but at different extent.
- 6-FAM was the most deleterious marker molecule.
- Biotin modification seems to be less harmful than thiol modification, so recommended for analytical purposes.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 December 2014
Received in revised form 17 February 2015
Accepted 19 February 2015
Available online xxx

Keywords:
Aptamer
Gliadin
Gluten
33-mer Peptide
Binding constant

ABSTRACT

Aptamers are starting to increase the reagents tool box to develop more sensitive and reliable methods for food allergens. In most of these assays, aptamers have to be modified for detection and/or immobilization purposes. To take full advantage of their affinity, which decisively influence the detectability, these modifications must be faced rationally. In this work, a recently developed aptamer for an immunotoxic peptide of gliadin associated to celiac disease is used in different configurations and modified with various markers and anchored groups to evaluate the influence of such modifications on the real affinity. The interaction in solution with the peptide is strong for a relatively small molecule ($K_d = 45 \pm 10$ nM, 17 °C) and slightly stronger than that for the immobilized intact protein due to a cooperative binding effect. Comparatively, while only minor differences were found when the peptide or the aptamer were immobilized, labeling with a biotin resulted preferable over fluorescein ($K_d = 102 \pm 11$ vs 208 ± 54 nM, 25 °C). These findings are of prime importance for the design of an aptamer-based analytical method for gluten quantification.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The high affinity of aptamers for their cognate ligand is frequently invoked as one of the most prominent features that support their use in theranostic [1,2] or sensing applications [3,4]. Measurement of the

* Corresponding author. Tel.: +34 985106235; fax: +34 985103125.
E-mail addresses: s.amaya_g@yahoo.es (S. Amaya-González), UO194986@uniovi.es (L. López-López), mirandarebeca@uniovi.es (R. Miranda-Castro), santosnoemi@uniovi.es (N. de-los-Santos-Álvarez), amir@uniovi.es (A.J. Miranda-Ordieres), mjlc@uniovi.es (M.J. Lobo-Castañón).

affinity between aptamers and their ligands is usually carried out after SELEX evolution, to select the best binder among the enriched DNA pool obtained, and to characterize the winning sequence.

In order to select an aptamer among several described for a given target, K_d values are usually the primary criteria for comparison. Tables of K_d values, though useful, are reported irrespective of the method employed for their estimation [5,6]. True dissociation constants in solution are not always measured for several reasons. On one hand, some techniques such as isothermal titration calorimetry (ITC) [7] or NMR [8] need partner concentrations in the μM range, which is expensive and not always achievable because of the low solubility of some ligands in aqueous media. On the other hand, among the variety of techniques available to measure the constant binding [8–10], some of the most powerful ones (surface plasmon resonance (SPR), fluorescence intensity) require partner immobilization.

Interactions between the immobilized partner and the surface or steric hindrance, related to the proximity of the surface, are plausible and well-known explanations for the decrease in affinity commonly observed in heterogeneous binding events. Striking and not well-explained loss in affinity as large as three orders of magnitude have been found with aptamers directed against small molecules immobilized on SPR sensors [11,12]. Nonetheless, negligible [13] or even the opposite effects have been also reported and tentatively attributed to a more active presentation of the immobilized aptamer [14], cooperativity at the matrix or loss of anionic nature of the immobilized ligand [15].

From a practical point of view, not only the true affinity of an aptamer in solution but also the actual affinity after post-SELEX modifications is interesting. For sensing applications, labeling the aptamer with small molecules is the most wide-spread strategy that allows easy and inexpensive immobilization and/or detection. All these modifications, however, can exert a non-trivial impact on the affinity of the synthetic receptor towards the ligand. In general, this aspect is set aside assuming that modification of oligonucleotides at their ends keeps enough affinity for most analytical applications. However, selection of the proper end for labeling as well as the length and nature of spacers has been proved to improve the affinity [16,17]. Rational selection would be straightforward if the aptamer–ligand complex structure is fully solved. Unfortunately, this is unknown for most aptamers, so they are modified at any end irrespective of the effect.

To take advantage of the full binding potential of the winning aptamer evolved by SELEX, detailed comparative studies on binding ability of aptamers modified for immobilization or detection purposes are desirable but scarce. We have recently developed by SELEX a pool of aptamers against the immunodominant peptide of gliadin, known as 33-mer, that triggers the celiac disease [18]. Taking as a model the most abundant in the final pool, we present here a systematic study of the extent to which different tags to facilitate the immobilization and detection of aptamer alters its affinity towards both the peptide and the whole protein. This is crucial in order not to impact further the solution-phase affinity and selectivity in the development of analytical approaches aimed at detecting gluten in food. Availability of more sensitive methods of gluten detection are essential to protect patients from inadvertent content of gluten in food below the current threshold (20 ppm) [19] that it is still high for a relevant proportion of the sensitized population.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Native (unmodified) and 5'-tagged (biotin and 6-FAM) gli1 aptamers were obtained from Integrated DNA Technologies (IDT,

Leuven, Belgium). 5'-thiolated gli1-aptamer and 5'-thiolated control DNA were obtained from Sigma-Life Science. Gli1 aptamer and control DNA sequences are the following:

Gli 1: 5' CTA GGC GAA ATA TAG CTA CAA CTG TCT GAA GGC ACC CAA T 3'

Control DNA: 5' AGT CAA CCA GTA TTA TCT GAC CGT CCC A 3'

Peptide 33-mer was obtained from Biomedal (Sevilla, Spain). The sequences of the unmodified and the biotinylated 33-mer are as follows:

33-mer: LQLQPFPPQPLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF

Biotin-33-mer: LQLQPFPPQPLPYQPQLPYQPQLPYQPQPFH-HHHHH-Biotin

Gliadin standard from Prolamin Working Group (PWG) was acquired to R-Biopharm AG (Germany). Phosphorus and beryllium standards were purchased from High Purity Standards (Charleston, USA): 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ P in 0.05% HNO_3 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Be in 2% HCl.

All aptamer interactions with peptide or PWG were carried out in the binding solution (BS) composed of 50 mM Tris-HCl pH 7.4 + 0.25 M NaCl + 5 mM MgCl_2 . This buffer was the one used for aptamer evolution by SELEX, so optimized for the best interaction [18]. All buffer components were obtained from Sigma-Aldrich. Milli-Q purified water was used.

2.2. ITC experiments

The isothermal titration calorimetric (ITC) experiments were performed at two temperatures (17 and 37 °C) in a VP-ITC instrument (MicroCal Inc., USA). The aptamer, loaded into the calorimetric cell (1.4189 mL) at a concentration of 33.4 μM , was titrated by the sequential addition of 15 μL -aliquots of the 33-mer gliadin peptide from the stirring syringe at a concentration of 338 μM (the volume of first injection was 4 μL and was not considered in the fit). The amount of power required to maintain the reaction cell at constant temperature after each injection was monitored as a function of time. The exchanged heat due to the recognition event between 33-mer and gli1 aptamer was obtained as the difference between the heat of reaction and the corresponding heat of dilution.

2.3. Faradaic impedance spectroscopy (FIS) experiments

All electrochemical measurements were performed with a standard three electrode cell controlled by an AutoLab 12 potentiostat equipped with GPES and FRA 4.9 software (EcoChemie, The Netherlands). A platinum wire acted as an auxiliary electrode and a 1.6 mm diameter gold electrode as a working electrode (Bioanalytical Systems, Inc., USA). All potentials are referred to the Ag|AgCl|KCl saturated reference electrode.

The Au electrode was cleaned and conditioned as indicated elsewhere [20,21]. The gli1 aptamer was immobilized onto the freshly cleaned surface under potential control due to accelerated self-assembly [22]. This way, the electrode was immersed in 20 mM sodium phosphate + 0.3 M NaCl + 2 mM EDTA for 5 min at +0.3 V. The reduced gold surface was then immersed in 200 nM thiolated gli1 (or thiolated DNA control for specificity studies) in identical buffer for 5 min at +0.4 V. After washing with water, the electrode was incubated with 1 mM mercaptohexanol for 50 min to fill the bare regions and minimize unspecific adsorption. The modified electrodes were stored in BS at 4 °C until their use.

The interaction was carried out by incubating the modified electrodes with increasing concentrations of 33-mer peptide in BS (or the control peptide for unspecific assessment). Each 5 min the electrode was transferred to the impedance measurement solution (10 mM Tris-HCl pH 7.4 + 100 mM KCl + 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) where the corresponding spectra were recorded at a bias potential

of +0.223 V using a frequency range from 10 kHz to 100 MHz and an alternating current amplitude of 5 mV.

2.4. SPR measurements

A double-channel cuvette ESPRIT instrument (EcoChemie) was operated in automatic mode using the autosampler for dispensing the solutions and mixing. All SPR experiments were carried out using commercial BK7 disks coated with a 50 nm gold film supplied by Autolab (Metrohm, The Netherlands) under controlled temperature conditions of $25 \pm 1^\circ\text{C}$ obtained with a thermostat HaakeD1 (Germany).

The Au sensor was cleaned as indicated elsewhere [23]. Then, a mixed SAM monolayer of mercaptoundecanoic and mercaptopropionic acids was prepared overnight from a 10 mM ethanolic mixture of each acid in a 1:10 ratio [24]. After washing with water, streptavidin was covalently attached to the carboxylic acids by activating these groups with 4 injections of 50 μL of 200 mM EDC and 50 mM NHS in water for 5 min and subsequent reaction with the 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ protein in 50 mM acetate buffer pH 4.5 for 30 min. The unreacted carboxylic groups were blocked with 1 M ethanolamine for 30 min. The streptavidin-modified sensor was primed with 50 mM HCl. Finally, one channel was modified with 25 nM biotinylated-33-mer and the reference channel with 500 nM biotin in BS buffer.

Each independent interaction cycle carried out in BS includes baseline, association, dissociation, regeneration and back to baseline steps as follows: after obtaining a stable signal by acquiring several baselines, varying concentrations of aptamer prepared in BS (35 μL) were simultaneously injected in both channels and the association phase was recorded for 10 min. After draining the cuvettes, 50 μL of BS were injected and the dissociation phase was monitored for 5 min resulting in a decrease of the resonance angle until a stable value was achieved. Finally regeneration step was accomplished by several injections of 50 μL of 0.05 M HCl (1 min) followed by baseline registration until the initial value was reached. All steps were recorded under needle-based agitation to avoid mass transfer control.

2.5. Aptamer–PWG interaction assays on microtiter plates

Microtiter plates (Corning High Bind, NY) were modified overnight at 25°C with 100 μL of 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PWG in 50 mM sodium carbonate/hydrogen carbonate buffer (pH 9.6). Then, the wells were washed with 10 mM Tris–HCl pH 7.4 three times. For each binding interaction assay, 100 μL of increasing concentrations (60–500 nM) of the corresponding native or 6-FAM-tagged gli1 aptamer was dispensed on the wells. After 30 min at 25°C under mild microtiter plate stirring, the aptamer solutions (free fraction) were transferred to a vial to be measured by ICP-MS (native aptamer) or to a microtiter plate for fluorescence measurements (6-FAM aptamer).

For the ICP-MS measurements, the free aptamer fraction was diluted 1:10 with 1% v/v HNO_3 to reduce the salt concentration. An Element 2 ICP-MS (Thermo Elemental, Bremen, Germany) operated in medium resolution mode ($R=3000$) for detection of $^{31}\text{P}^+$ was used. This kind of double focusing instrument improves the detection of phosphorus, which is obscured by the low ionization efficiency and the spectra interferences [25]. ^9Be was used as an internal standard. The operating conditions were the following: 1280 W RF power, 14.2 L min^{-1} coolant gas, 0.91 L min^{-1} auxiliary gas, 0.965 L min^{-1} nebulizer gas, sample flow 0.4 mL min^{-1} . Inorganic phosphorus in 1% v/v HNO_3 was used as standard for calibration from 5 to 1000 ppb in the presence of 10 ppb of Be.

For the fluorescence measurements, a Flx800 microplate reader (BioTek[®], VT, USA) was used. The excitation and emission

wavelengths were fixed at 480 and 528 nm, respectively. A calibration plot for each labeled aptamer in the range of 50–500 nM was needed. Differences in fluorescent response at identical total ssDNA concentration as estimated by UV-vis measurements at 260 nm were found probably due to discrepancies in the yield of the commercial labeling process.

As in the case of ICP-MS, the excellent correlation between the analytical response and the DNA concentration allowed the calculation of the unbound aptamer concentration after interaction with PWG.

3. Results

3.1. Homogeneous aptamer–peptide interaction

First, the evaluation of the binding affinity between gli1 aptamer to immunodominant peptide 33-mer was addressed. Among the available techniques, ITC provides not only direct measurement of all thermodynamic parameters from a single experiment but also valuable information about binding stoichiometry. It is also the method of choice to thermodynamically characterize binding reactions with affinity range from mM down to high nM as expected for most aptamer–protein interactions. This restriction derives from the need for performing the experiments at μM concentration of both reagents to generate enough binding heat change [7]. ITC measures the heat involved during macromolecular interactions. Usually small aliquots of the ligand are stepwise injected into a solution of the macromolecule (typically a protein) at a constant temperature. In our case the aptamer is larger (12 kDa) than the peptide (5 kDa), so the aptamer was titrated and the heat absorbed/released measured as a function of time. In Fig. 1 representative data of ITC experiments at 17 and 37°C are shown. In Table 1, the thermodynamic parameters obtained by ITC determined by fitting the experimental data to a single-site binding isotherm.

According to the estimated K_d values (45 ± 10 and 17 ± 6 nM at 17 and 37°C , respectively), a strong affinity between gli1 aptamer and peptide exists, especially at high temperatures, where the value approaches the limit of detection of the technique. The binding stoichiometry calculated from the titration equivalence point is 1:1, which is reasonable for a small peptide.

The aptamer binding is entropically driven since a large positive entropy at both temperatures is measured, while the enthalpic contribution is small but positive, that is, unfavorable to the binding. This thermodynamic signature is usually associated to the so called hydrophobic effect mainly arising from solvent reorganization. The entropy variation related to the formation of a ligand–macromolecule complex originates from two contributions: reduction of the conformational degree of freedom of both molecules, which is usually unfavorable ($\Delta S < 0$), and solvation effects [26]. When a hydrophobic molecule is involved, hydration is entropically unfavorable because of disruption of the stable hydrogen-bonding network of the bulk water and the formation of a shell of strongly bound water molecules to compensate [27]. This leads to ordering with a penalty in entropy. Binding regarded as a withdrawal of non-polar groups from water (desolvation process) can account for a favorable entropy change [26,28]. Then, a positive entropy change is a strong evidence of removal of water molecules from the complex interface [29]. The negligible heat capacity minimizes the role of hydrophobic interactions in the DNA–peptide binding.

A binding to DNA entropically driven is not unusual even for intercalating agents where stacking interactions are expected to give negative enthalpy changes as major contribution to the binding free energy [30]. The interaction of aptamers with small molecules such as antibiotics [31,32], adenosine [33] or

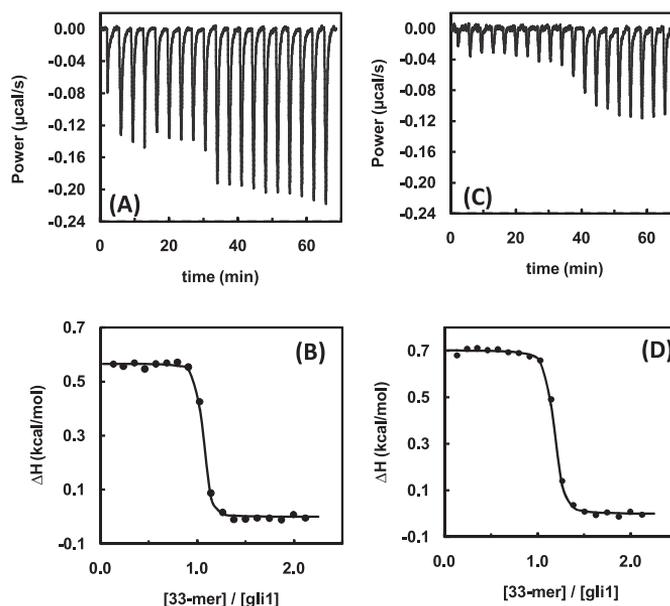


Fig. 1. ITC titration of 33.4 μM gli1 aptamer with 338 μM 33-mer in BS at 37 $^{\circ}\text{C}$ (A and B) and 17 $^{\circ}\text{C}$ (C and D). Top panels: power as a function of time. Bottom panels: integrated heat change per injection with the fitted curve to a single-site binding model.

L-tyrosinamide [34] was found to be controlled by enthalpy negative changes. With proteins, both thermodynamic signatures were found even for a single binding site, the exosite I of thrombin, with two different ligands [35]. The binding of thrombin [35], lysozyme [36] and peptide prion [37] aptamers is also entropically driven. In the lysozyme case, this behavior is accompanied by an increase in K_d with temperature, which was explained by progressive disruption of a weak secondary aptamer structure. In the case of gli1 aptamer, the secondary structure is very weak at room temperature [18] but exactly the contrary trend is observed.

3.2. Heterogeneous aptamer–peptide interaction

In heterogeneous aptassays and aptasensors, the aptamer is usually anchored to a solid surface assuming a minimal influence on affinity, but the ligand can be also immobilized in competitive or displacement assays. Since the immobilization of each partner can induce different loss in affinity both approaches were examined.

Thiolated gli1 aptamer was assembled on Au surfaces at a positive potential to accelerate the monolayer formation [22] and then, the surface was blocked with mercaptohexanol. Successive additions of increasing concentrations of 33-mer peptide were followed by faradaic impedance spectroscopy (FIS). An increase in electron transfer resistance (R_{et}) with time was observed for each addition due to the progressive blocking of the electrode surface

(Fig. 2(A) inset). The equilibrium R_{et} values at each concentration were expressed as percentage of R_{et} increase through the equation

$$\% = (R_{\text{eq}} - R_0) / R_0 \times 100 \quad (1)$$

where R_{eq} denotes the R_{et} at equilibrium and R_0 the initial R_{et} . The plot of % vs the peptide concentration takes the general form of a rectangular hyperbola. By non-linear fitting (Fig. 2(A)), a value of $K_d = 98 \pm 48 \text{ nM}$ was obtained. This calculation implies that the bound peptide concentration is negligible relative to the total peptide concentration in solution. Surface coverages in the range of 10^{12} aptamers cm^{-2} are typically achieved that implies an amount of about 30 fmol of aptamers on the surface. Since the lowest amount of 33-mer tested was 100 pmol it is apparent that this assumption is reasonable.

The sensing phase prepared did not exhibit significant unspecific binding. A set of blank experiments was carried out on bare Au and with sensing phases prepared with mercaptohexanol alone, or a mixture of a scrambled DNA sequence and MCH. These surfaces were incubated with 100 nM of 33-mer. Additionally, a mixed SAM prepared with gli1 was incubated with a 57-mer peptide control previously used for counter selection steps in the SELEX process [18]. In all cases, the increase in R_{et} was negligible with respect to that obtained in the specific interaction between 33-mer and gli1 aptamer (Fig. 2(B)).

SPR is a better suited technique for biomolecular interaction characterization. Like FIS is a label-free technique but kinetics is continuously monitored. Since peptide is a small molecule the direct observation of binding on self-assembled monolayers of aptamers is only detectable at high concentrations. So, this technique was used to evaluate the binding reaction with 33-mer peptide immobilized on the surface. To do this, a mixed monolayer of mercaptoacetic acid and mercaptoundecanoic acid was prepared and streptavidin was covalently linked through carbodiimide chemistry. About 200 m^2 of streptavidin were immobilized that is equivalent to 1.6 ng mm^{-2} assuming 120 m^2 corresponds to 1 ng mm^{-2} according to instrument specifications.

Table 1
Thermodynamic parameters and stoichiometry obtained by ITC for the gli1 aptamer–33-mer binding.

	17 $^{\circ}\text{C}$	37 $^{\circ}\text{C}$
ΔG (kcal mol^{-1})	-9.75 ± 0.14	-11.1 ± 0.3
ΔH (kcal mol^{-1})	0.70 ± 0.01	0.57 ± 0.01
ΔS (cal $\text{K}^{-1} \text{mol}^{-1}$)	36.0 ± 0.5	37.4 ± 0.7
n	1.12 ± 0.01	1.07 ± 0.01

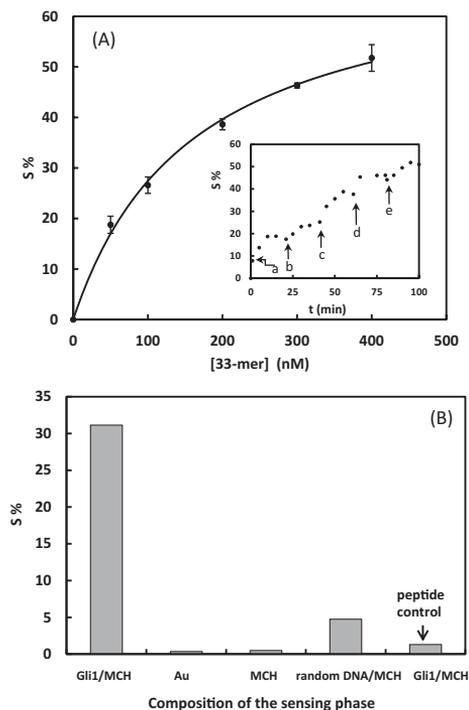


Fig. 2. (A) Binding isotherm obtained from FIS experiments fitted to the single-site binding model. Inset: representative data to estimate the K_d between thiolated gli1 aptamer and 33-mer peptide. Normalized R_{et} (S%) with time after successive incubation of a Au electrode modified with a mixed SAM of gli1 aptamer and mercaptohexanol with (a) 50 nM; (b) 100 nM; (c) 200 nM; (d) 300 nM; (e) 400 nM of 33-mer. (B) Variation of the R_{et} (S%) of different sensing phases to 100 nM of 33-mer and peptide control (last column).

An averaged angle shift of 37 m° was measured when adding 25 nM biotinylated 33-mer peptide, indicating that there was more than one binding site available for peptide binding. In the reference channel 500 nM of biotin was used to fill the streptavidin binding sites. Both channels were then challenged with concentrations of aptamer ranging from 50 nM to $5\text{ }\mu\text{M}$. After each interaction, a regeneration step with 0.05 M HCl was carried out until the initial baseline was recovered. The angle shifts at equilibrium were plotted against the aptamer free concentration calculated as the difference between the total aptamer in solution and the surface concentration of complex estimated from the angle shift. At all concentrations the amount of complex formed was negligible with respect to the total aptamer concentration in solution. After fitting to Langmuir isotherm, K_d was estimated to be $51 \pm 16\text{ nM}$. Although the mean value is slightly lower than the one estimated by FIS suggesting a larger influence on affinity when the aptamer is immobilized, both K_d values are identical within the experimental error. This indicates that there are subtle differences when immobilizing the aptamer through a thiol or the peptide through a biotin–streptavidin affinity interaction. The K_d value in solution at $25\text{ }^\circ\text{C}$ was estimated to be about 29 nM. Considering this value, in both cases the K_d values for the heterogeneous reaction are substantially higher than that of the homogeneous one calculated by ITC. It is worth noting that the peptide has a spacer of six histidine residues adjacent to the biotin and aptamer has a C6 spacer, which can contribute to somehow minimize the steric hindrance of the surface.

We have previously estimated the K_d of gli1 aptamer from a binding curve obtained with the peptide immobilized onto magnetic beads and chronoamperometrically (CRamp) measuring the aptamer bound using an streptavidin–enzyme conjugate [18]. In that experiment, the aptamer was biotinylated, so the influence of the labeling can be determined. A K_d value of $102 \pm 11\text{ nM}$ indicates that the biotin tag also decreases the affinity. However, it is not significantly different from the K_d value obtained by FIS when the aptamer is immobilized. This points out that the influence of aptamer modification is larger than that of the peptide. This is reasonable although the peptide is half the size of aptamer. The binding site is probably constituted by a few amino acids while the entire aptamer might fold upon ligand binding. The separate influence of the tagging and the surface steric hindrance is difficult to interpret. K_d almost doubles from non-labelled (SPR) to biotin-tagged aptamer (CRamp). This suggests that the tagging effect dominates over the steric hindrance effect. However, the thiol group is much smaller than biotin, so its chemical interaction with the aptamer is expected to be minimal. Its strong impact on the affinity might be determined, in this case, by the proximity to the surface.

3.3. Heterogeneous gliadin–aptamer interaction

In real samples, the receptor has to recognize the 33-mer peptide within the native protein. Previous studies suggest that the aptamer developed binds to the complete protein [18] but the extent of the affinity in comparison with the peptide has not been accomplished yet. The K_d for the homogeneous reaction between the gliadin standard, PWG, and gli1 aptamer is difficult to estimate because of the limited solubility of the protein in aqueous solution. So only the constant for the heterogeneous reaction was estimated immobilizing the protein on microtiter plates. After interaction with gli1 aptamer in the concentration range from 60 to 500 nM, the unbound aptamer fraction (F), was determined by ICP-MS after tenfold dilution with 1% v/v HNO_3 to reduce the salt concentration. In spite of its high first ionization potential and the spectral interferences, the use of a double focusing instrument allowed the construction of calibration plots with inorganic P from 5 to 1000 ppb with excellent correlation ($r > 0.9997$). The bound fraction (B) was estimated as the difference between the total and free aptamer. Plot of B vs F did not fit to the one-binding site model indicating that gliadin has several binding sites for the aptamer. This is not unusual because gliadin is a mixture of peptide chains containing a high percentage of prolines and glutamines in repetitive motifs. It is known that the epitope for antigliadin antibodies G12 and A1 raised against 33-mer are hexameric and heptameric regions, respectively [38]. Since aptamer is smaller than antibody a small fraction of the 33-mer is also expected to be the epitope, so the chances for finding homologue sequences throughout the overall sequence of gliadin is high. Therefore, the saturation curve (Fig. 3(A)) was non-linearly fitted to the Hill equation (Eq. (2)), a simplification of the general Adair equation that accounts for macromolecules with interacting binding sites, that is, cooperativity.

$$B = \frac{F^n}{K_d + F^n} \quad (2)$$

where B is the bound aptamer concentration, F is the free aptamer concentration and n is a measure of the cooperativity.

Blank experiments on bare microtiter plates gave rise to undetectable changes in the concentration of the aptamer in solution, ruling out the unspecific binding to microtiter plates.

Using this approach, the K_d value is $58 \pm 2\text{ nM}$, with a cooperativity index of 3.4 ± 0.2 . This represents a value slightly

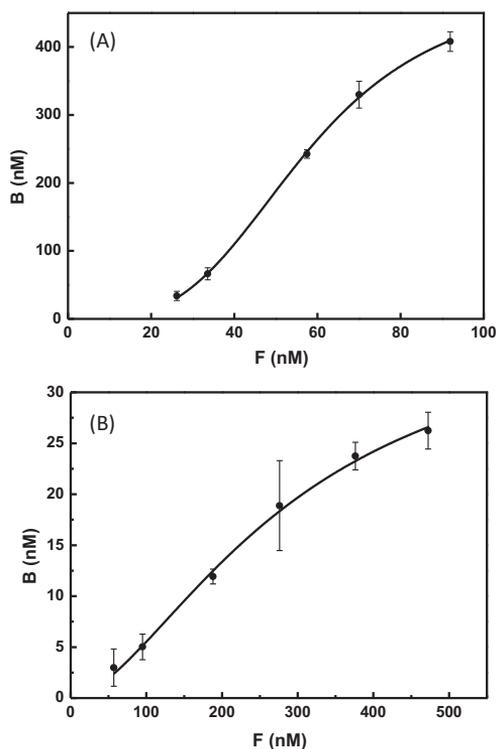


Fig. 3. Binding isotherms obtained from ICP-MS (A) and fluorescence (B) experiments at 25 °C between PWG and gli1 aptamer.

higher than that of the peptide, which correlates with previous studies with magnetic particles and electrochemical detection that suggested a lower affinity for the native protein. However, those experiments were carried out with a labeled aptamer, so the influence of a small tag was further evaluated using 6-carboxy-fluorescein (6-FAM) as fluorophore at 5' end to be able to directly monitor the free aptamer fraction by fluorescence. Performing analogue experiments on microtiter plates and fitting the binding curves to the Hill equation (Fig. 3(B)), the K_d value (208 ± 54 nM) clearly increases relative to the untagged aptamer. It is worth noting that in all cases, n values were always higher than 1 indicating a positive cooperativity.

4. Discussion

The immobilization and labeling tag effects we have observed for gli1 aptamer with regard to 33-mer and gliadin binding are summarized in Table 2. Gli1 was obtained using a short peptide (the 33-mer immunotoxin peptide) as a target, and it binds two

related ligands, 33-mer peptide and PWG-protein, with similar affinities. The possibility of generating aptamers from specific short amino acid sequences to bind that epitope in the protein was previously shown with a peptide from Rev protein but this strategy was never generalized [39] and led to up to 16 times decrease in affinity when challenged against the whole protein [40]. In this work we have shown that it is possible to obtain aptamers with similar affinity for the full-length protein. Although the highest affinity is obtained for the homogeneous interaction between gli1 and 33-mer peptide (ITC measurements), the immobilization of ligand produces only a slight increase in K_d (SPR measurements). Even when the whole protein, PWG, was adsorbed on the surface, only 1.7 fold less affinity than for 33-mer in solution was observed. This is attributed to a positive allosteric effect not previously reported to the best of our knowledge for other aptamers.

Remarkably, the aptamer evolved against the 33-mer presents a binding affinity larger than most of the few aptamers raised against food allergens. Currently aptamers for food allergen sensing are being developed due to steady increase of allergenic individuals to a great variety of food ingredients. The discovery of novel receptors with enhanced sensing properties fuels this trend. Although in all cases allergenic proteins were used as targets, a wide range of K_d values were reported. Lupine and peanut aptamers showed affinity larger than 300 nM when measured by SPR. In the former, the protein was covalently immobilized [41] and in the latter a biotinylated aptamer was bound to streptavidin coated surfaces [42]. The affinity of the peanut aptamer was also estimated by fluorescence anisotropy (FA) and nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures (NECEEM) obtaining higher values than with SPR where immobilization of a biotinylated aptamer is needed. This increase was attributed to the unpurified aptamer used in FA obtained from the SELEX and to the high voltage applied in NECEEM that somehow disrupt the complex.

More interesting is the behavior of lysozyme aptamers. First an RNA aptamer against a biotinylated lysozyme was evolved using automated SELEX that showed slightly increased affinity for the unlabeled protein [43]. Since the aptamer sequence was published as the DNA template used to generate it, other researchers erroneously employed that DNA sequence in various successful analytical approaches [4]. Subsequent investigations revealed that the DNA-lysozyme interaction was governed by electrostatic interactions rather than sequence specificity [36]. In that detailed study, ITC experiments showed a binding driven by entropy, with a small positive enthalpy change and a high positive entropy change, similarly to that found for gli1 aptamer. Authors assigned this energetic pattern to electrostatic interactions by comparison with another adsorption process. However, in the case of gli1-33-mer interaction, the absence of charged amino acids in the sequence along with the much higher ionic strength used during interaction rules out this possibility. K_d values around 30 nM for the best clone against lysozyme were reported by filter binding assays [44], an order of magnitude lower than those for lupine and peanut. Gli1 aptamer raised against a much smaller molecule showed, nonetheless, similar affinity for the peptide and slightly lower

Table 2
Mean values of the binding constants and cooperativity degree (mean values \pm SD) for the interaction between aptamer gli1 and 33-mer peptide or PWG.

Technique	Immobilized species	Species in solution	T (°C)	K_d (nM)	n
ITC	None	33-mer, gli1	17	45 ± 10	1.01 ± 0.01
			37	17 ± 6	1.12 ± 0.01
FIS	SH-gli1	33-mer	RT	98 ± 48	
SPR	Biotin-33-mer	Gli1	25	51 ± 16	
CRamp	Biotin-33-mer	Biotin-gli1	25	102 ± 11 [18]	
ICP-MS	PWG	Gli1	25	58 ± 2	3.4 ± 0.2
Fluorescence	PWG	6-FAM-gli1	25	208 ± 54	1.7 ± 0.5

RT: room temperature.

for the protein, which is remarkable taking into account the apolar nature of the target. Newly developed DNA aptamers against egg white lysozyme shown the lowest K_d values (6 nM by SPR) [45] for food allergens.

The group/molecule attached at 5' end of gli1 aptamer has a negative but diverse influence on the affinity. In our case, immobilizing the peptide resulted somehow less deleterious than immobilizing the aptamer with a thiol group. Biotinylation of aptamer, however, could have a milder influence on the affinity because the average K_d obtained when challenged to biotinylated 33-mer on magnetic beads matches the one measured with the thiolated aptamer and native peptide. A larger adverse effect of thiol groups with respect to biotin was observed for the thrombin aptamer [17].

Labeling aptamer at its 3' or 5' end with small molecules for detection has usually a limited influence on affinity [13,16,46]. As an example, labeling the protein with a fluorophore sometimes resulted more damaging than biotinylating the aptamer and this effect was dependent on the aptamer clone [44]. In our case, when the aptamer was labeled with 6-FAM, a clear decrease in binding ability for PWG was found even when a cooperative mechanism is operating. Although a direct comparison must be taken with care, 6-FAM seems to be more damaging for the affinity than biotin.

5. Conclusions

In this work, evaluation of the affinity of the recently developed aptamer for gliadin was carried out. Modification of the aptamer at 5' with thiol, biotin and 6-FAM allowed us to gain insight into the recognition ability. The solution phase binding constant between gli1 aptamer and 33-mer peptide was significantly low for such a small molecule. Interestingly, the binding to the whole protein was only slightly affected, which is unusual for aptamer developed against a peptide fragment. This encourages the implementation of that strategy for the generation of future aptamers.

Immobilization of peptide through biotin–streptavidin interaction resulted beneficial when compared with the immobilization of aptamer through thiol groups. This finding points to the potential advantages of developing competitive assays, which are desirable in the food allergen field because of hydrolysis of proteins during processing. The modification of gli1 aptamer with a fluorophore showed an unexpectedly substantial negative effect, probably larger than that of biotin. As a consequence, for future applications, the use of biotinylated gli1 aptamer is strongly recommended.

Acknowledgements

SAG thanks the Spanish Government for a predoctoral FPI grant. Authors thank Prof. Javier Gómez and Dr. Cristina Sariego for technical assistance in ITC and ICP-MS experiments, respectively and Prof. Carmen Rodriguez for the use of fluorescence microplate reader. This work was financed by Spanish Government Project CTQ2012-31157, and the European Regional Development Fund.

References

- [1] S. Kruspe, F. Mittelberger, K. Szameit, U. Hahn, Aptamers as drug delivery vehicles, *ChemMedChem* 9 (2014) 1998–2011.
- [2] S. Shigdar, J. Macdonald, M. O'Connor, T. Wang, D.X. Xiang, H. Al Shamaileh, L. Qiao, M. Wei, S.F. Zhou, Y.M. Zhu, L.X. Kong, S. Bhattacharya, C.G. Li, W. Duan, Aptamers as theranostic agents: modifications, serum stability and functionalisation, *Sensors* 13 (2013) 13624–13637.
- [3] N. de-los-Santos-Alvarez, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, Aptamers as recognition elements for label-free analytical devices, *TrAC* 27 (2008) 437–446.
- [4] E.J. Cho, J.W. Lee, A.D. Ellington, Applications of aptamers as sensors, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2 (2009) 241–264.
- [5] A.D. Keefe, S. Pai, A. Ellington, Aptamers as therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 537–550.
- [6] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, SELEX-A (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands, *Biomol. Eng.* 24 (2007) 381–403.
- [7] M.L. Doyle, Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8 (1997) 31–35.
- [8] Y. Lee, H.F. Zeng, S. Ruedisser, A.D. Gosser, C. Hilty, Nuclear magnetic resonance of hyperpolarized fluorine for characterization of protein–ligand interactions, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 17448–17451.
- [9] M. Jing, M.T. Bowser, Methods for measuring aptamer–protein equilibria: a review, *Anal. Chim. Acta* 686 (2011) 9–18.
- [10] D. Rotem, L. Jayasinghe, M. Salichou, H. Bayley, Protein detection by nanoprobes equipped with aptamers, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 2781–2787.
- [11] Y. Wang, R.R. Rando, Specific binding of aminoglycoside antibiotics to RNA, *Chem. Biol.* 2 (1995) 281–290.
- [12] S.H.L. Verhelst, P.J.A. Michiels, G.A. van der Marel, C.A.A. van Boeckel, J.H. van Boom, Surface plasmon resonance evaluation of various aminoglycoside–RNA hairpin interactions reveals low degree of selectivity, *ChemBioChem* 5 (2004) 937–942.
- [13] H.C. Mei, T. Bing, X.J. Yang, C. Qi, T.J. Chang, X.J. Liu, Z.H. Cao, D.H. Shanguan, Functional-group specific aptamers indirectly recognizing compounds with alkyl amino group, *Anal. Chem.* 84 (2012) 7323–7329.
- [14] R.A. Potyrailo, R.C. Conrad, A.D. Ellington, G.M. Hieftje, Adapting selected nucleic acid ligands (aptamers) to biosensors, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3419–3425.
- [15] L.A. Holeman, S.L. Robinson, J.W. Szostak, C. Wilson, Isolation and characterization of fluorophore-binding RNA aptamers, *Fold. Des.* 3 (1998) 423–431.
- [16] N. Tuleuova, C.N. Jones, J. Yan, E. Ramanculov, Y. Yokobayashi, A. Revzin, Development of an aptamer beacon for detection of interferon-gamma, *Anal. Chem.* 82 (2010) 1851–1857.
- [17] V. Ostatna, H. Vaisocherova, J. Homola, T. Hianik, Effect of the immobilisation of DNA aptamers on the detection of thrombin by means of surface plasmon resonance, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 1861–1869.
- [18] S. Amaya-Gonzalez, N. de-los-Santos-Alvarez, A.J. Miranda-Ordieres, M.J. Lobo-Castañón, Aptamer binding to celiac disease-triggering hydrophobic proteins: a sensitive gluten detection approach, *Anal. Chem.* 86 (2014) 2733–2739.
- [19] Commission directive 2007/68/EC, L310 (2007) 11–14.
- [20] N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, Modified-RNA aptamer-based sensor for competitive impedimetric assay of neomycin B, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 3808–3809.
- [21] R.B. Queiros, N. de-los-Santos-Alvarez, J.P. Noronha, M.G.F. Sales, A label-free DNA aptamer-based impedance biosensor for the detection of *E. coli* outer membrane proteins, *Sens. Actuata. B-Chem.* 181 (2013) 766–772.
- [22] R. Miranda-Castro, P. de-los-Santos-Alvarez, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, Hairpin-DNA probe for enzyme-amplified electrochemical detection of *Legionella pneumophila*, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4050–4055.
- [23] E. González-Fernández, N. de-los-Santos-Álvarez, A.J. Miranda-Ordieres, M.J. Lobo-Castañón, SPR evaluation of binding kinetics and affinity study of modified RNA aptamers towards small molecules, *Talanta* 99 (2012) 767–773.
- [24] J.W. Lee, S.J. Sim, S.M. Cho, J. Lee, Characterization of a self-assembled monolayer of thiol on a gold surface and the fabrication of a biosensor chip based on surface plasmon resonance for detecting anti-GAD antibody, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 1422–1427.
- [25] L.L. Fernandez, M. Montes-Bayon, E.B. Gonzalez, L.M. Sierra, A. Sanz-Medel, J. Bettmer, Initial studies on quantitative DNA induced oxidation by gel electrophoresis (GE)-ICP-MS, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 26 (2011) 195–200.
- [26] S.W. Homans, Probing the binding entropy of ligand–protein interactions by NMR, *ChemBioChem* 6 (2005) 1585–1591.
- [27] S.W. Homans, Water, water everywhere – except where it matters? *Drug Discov. Today* 12 (2007) 534–539.
- [28] S.W. Homans, Dynamics and thermodynamics of ligand–protein interactions, *Top. Curr. Chem.* 272 (2007) 51–82.
- [29] I. Jelezarov, H.R. Bosshard, Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition, *J. Mol. Recognit.* 12 (1999) 3–18.
- [30] I. Haq, P. Lincoln, D.C. Suh, B. Norden, B.Z. Chowdhry, J.B. Chaires, Interaction of delta-[Ru(Phen)₂ Dppz]²⁺ and lambda-[Ru(Phen)₂ Dppz]²⁺ with DNA – a calorimetric and equilibrium binding study, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 4788–4796.
- [31] J.A. Cowan, T. Ohyama, D.Q. Wang, K. Natarajan, Recognition of a cognate RNA aptamer by neomycin B: quantitative evaluation of hydrogen bonding and electrostatic interactions, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 2935–2942.
- [32] M. Ilgu, D.B. Fulton, R.M. Yennamalli, M.H. Lamm, T.Z. Sen, M. Nilsen-Hamilton, An adaptable pentaloop defines a robust neomycin-B RNA aptamer with conditional ligand-bound structures, *RNA* 20 (2014) 815–824.
- [33] Y.F. Pang, Z.A. Xu, Y. Sato, S. Nishizawa, N. Teramae, Base pairing at the abasic site in DNA duplexes and its application in adenosine aptasensors, *ChemBioChem* 13 (2012) 436–442.
- [34] P.H. Lin, S.L. Yen, M.S. Lin, Y. Chang, S.R. Louis, A. Higuchi, W.Y. Chen, Microcalorimetric studies of the thermodynamics and binding mechanism between L-tyrosinamide and aptamer, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 6665–6673.

- [35] N.A. Treuheit, M.A. Beach, E.A. Komives, Thermodynamic compensation upon binding to exosite 1 and the active site of thrombin, *Biochem.-US* 50 (2011) 4590–4596.
- [36] A.S.R. Potty, K. Kourentzi, H. Fang, P. Schuck, R.C. Willson, Biophysical characterization of DNA and RNA aptamer interactions with hen egg lysozyme, *Int. J. Biol. Macromol.* 48 (2011) 392–397.
- [37] T. Hayashi, H. Oshima, T. Mashima, T. Nagata, M. Katahira, M. Kinoshita, Binding of an RNA aptamer and a partial peptide of a prion protein: crucial importance of water entropy in molecular recognition, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 6861–6875.
- [38] B. Moron, M.T. Bethune, I. Comino, H. Manyani, M. Ferragud, M.C. Lopez, A. Cebolla, C. Khosla, C. Sousa, Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide, *PLoS One* 3 (2008) e2294.
- [39] W. Xu, A.D. Ellington, Anti-peptide aptamers recognize amino acid sequence and bind a protein epitope, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 7475–7480.
- [40] Z. Liu, J.H. Duan, Y.M. Song, J. Ma, F.D. Wang, X. Lu, X.D. Yang, Novel HER2 aptamer selectively delivers cytotoxic drug to HER2-positive breast cancer cells in vitro, *J. Transl. Med.* 10 (2012) 148.
- [41] P. Nadal, A. Pinto, M. Svobodova, N. Canela, C.K. O'Sullivan, DNA aptamers against the Lup an 1 food allergen, *PLoS One* 7 (2012) e35253.
- [42] D.T. Tran, K. Knez, K.P. Janssen, J. Pollet, D. Spasic, J. Lammertyn, Selection of aptamers against Ara h 1 protein for FO-SPR biosensing of peanut allergens in food matrices, *Biosens. Bioelectron.* 43 (2013) 245–251.
- [43] J.C. Cox, A.D. Ellington, Automated selection of anti-protein aptamers, *Bioorg. Med. Chem.* 9 (2001) 2525–2531.
- [44] R. Kirby, E.J. Cho, B. Gehrke, T. Bayer, Y.S. Park, D.P. Neikirk, J.T. McDevitt, A.D. Ellington, Aptamer-based sensor arrays for the detection and quantitation of proteins, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4066–4075.
- [45] D.T. Tran, K.P.F. Janssen, J. Pollet, E. Lammertyn, J. Anne, A. Van Schepdael, J. Lammertyn, Selection and characterization of DNA aptamers for egg white lysozyme, *Molecules* 15 (2010) 1127–1140.
- [46] N. Tuleuova, J.Y. Lee, J. Lee, E. Ramanculov, M.A. Zern, A. Revzin, Using growth factor arrays and micropatterned co-cultures to induce hepatic differentiation of embryonic stem cells, *Biomaterials* 31 (2010) 9221–9231.

Amperometric quantification of gluten in food samples using an ELISA competitive assay and Flow Injection Analysis

Amperometric Quantification of Gluten in Food Samples Using an ELISA Competitive Assay and Flow Injection Analysis

Sonia Amaya-González, Noemí de-los-Santos-Álvarez, María Jesús Lobo-Castañón, Arturo J. Miranda-Ordieres, Paulino Tuñón-Blanco*

Departamento de Química Física y Analítica. Universidad de Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

fax: 34985103125

*e-mail: ptb@uniovi.es

Received: September 17, 2010

Accepted: October 21, 2010

Abstract

Gluten analysis in food is intricate because of the analyte variability among cereal species and protein states. Herein the immunodominant peptide 33-mer from alpha2-gliadin is proposed as standard for calibration in a competitive ELISA assay with amperometric flow-injection detection. Using the monoclonal antibody G12, a correlation between the content of gluten in peptide and gluten units was obtained for the first time. The analytical features were compared with optical measurements using several standards obtaining a slightly lower detection limit, which suggested the sensitivity is limited by affinity and not by the detection technique. "Gluten-free" samples were satisfactorily analyzed.

Keywords: 33-mer peptide, ELISA competitive assay, Electrochemical detection, Gluten, Gliadin

DOI: 10.1002/elan.201000583

Dedicated to the Memory of Prof. Dr. Lucas Hernández

Presented at the 13th International Conference on Electroanalysis, ESEAC 2010, Gijón, Spain

1 Introduction

The storage proteins from some cereal species such as wheat, barley, rye and oats called gluten, are immunotoxic for a growing number of susceptible individuals who are diagnosed with coeliac disease (CD). Initially considered as a rare disease with an estimated prevalence of 0.03% worldwide, the advent of more sensitive and specific analytical assays that allow the relatively fast screening of the population, has increasing this Figure up to 1% in Europe and the USA [1], converting CD in one of the most prevalent chronic gastrointestinal disorders. CD is considered an autoimmune disorder with genetic, environmental and immunological components that it is believed to predispose patients to other autoimmune diseases. Since the only treatment is a lifelong strict gluten-free diet, the surveillance of the ingested food is of paramount importance for these patients. Unfortunately, gluten is one of the most common ingredients in human diet and may be inadvertently present as a consequence of cross-contamination, which complicates adherence to the prescription. In addition to this, there is no agreement among countries about the term "gluten-free" food. Whereas the proposed FDA definition from 2007 remains in draft form, in the European Community the Commission Regulation (EC) n° 41/2009 established an upper

limit of 20 ppm for gluten-free food and 100 ppm for very-low gluten content. Unfortunately, there is no a defined correlation between the amount of gluten ingested and the seriousness of clinical symptoms, which makes to find a threshold value difficult. The Spanish Federation of Coeliac Associations analyzes food samples to guarantee a gluten content below 10 ppm, which they considered the new critical value.

In the past decade great advancements have been achieved to develop reliable and sensitive methods for the analysis of gluten in food. Most of them are enzyme immunoassays either in competitive or sandwich formats. Commercial kits use exclusively optical detection [2–4] but electrochemical readout has also been reported [5,6]. Although PCR-based methods are increasingly applied to food samples, a positive correlation between the presence of DNA and the allergenic protein has to be shown because food technological processing can degrade DNA or separate the marker DNA from the allergenic protein [7].

Only 10% of gluten, defined as the rubbery mass that remains when wheat dough is washed to remove starch granules and water-soluble constituents [7], is actually immunotoxic for CD patients, so it is desirable to quantify selectively this fraction.

Ascertaining which part of gluten is toxic is a difficult problem. Traditionally, toxic fraction is ascribed to the al-

cohol-water soluble fraction, the prolamins, whereas glutenins are considered to be safe. The high proline and glutamine content of prolamins prevent their complete proteolysis by gastric and pancreatic enzymes leading to relatively long peptides that are responsible for their toxicity [2]. Several antibodies have been raised against different gliadin epitopes. The anti ω -gliadin Ab is used in a sandwich format that was approved as an official method by AOAC [4]. However, the content of ω -fraction in wheat significantly varies from 6 to 20% [8] and this method can not accurately detect and quantify barley prolamins. Other antibodies were raised against different epitopes of α -gliadin such as PN3 for the toxic 19-mer peptide (residues 31–49) [9], CDC5 (residues 56–75) [6] and R5 for a pentapeptide (QQFPF) repeatedly present in wheat, barley and rye grains [3]. The latter detects all wheat fractions and is used in the sandwich ELISA method endorsed as a type I method by the Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling [10]. A competitive assay using R5 is also commercial but the gluten content is expressed in ppm of peptide and no conversion to gluten units is given, which precludes the direct relation to maximum limits allowable by laws currently in force [11].

Recently, two monoclonal antibodies were raised against the immunodominant peptide 33-mer (residues 57–89) from α -gliadin [2]. mAb G12 and mAb A1 were able to detect oat avenins (whose role in celiac disease is controversial), though with lower sensitivity than the other three prolamins.

An additional problem regarding the detection of gluten is the reference material. It has been shown that the origin and type of gliadin used for calibration has a huge impact on the results of the analysis. The Prolamin Working Group has prepared and characterized a material that was submitted to Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) of the European Commission-Joint Research Centre as a candidate material for the preparation of a Certified Reference Material (CRM) for gliadin [12]. However, after several years it has not been accepted so far.

Herein, we propose the use of peptide 33-mer (LQLQFPFQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF) as a calibration standard in a competitive assay that employs the antibody mAb G12, coupled to a flow injection electrochemical detection for gluten analysis in foodstuff. For the first time a relationship between the content in ppm of peptide and the content in ppm of gluten was described. The analytical characteristics of the electrochemical method were compared with those obtained by optical measurements using both the 33-mer and gliadin as standards. The method was applied to the determination of gluten in different food samples.

2 Experimental

2.1 Apparatus

Cyclic voltammetric measurements were carried out using a computer-controlled AutoLab Pgstat-10 potentiostat with GPES 4.9005 (EcoChemie, The Netherlands).

For flow injection experiments, an eight cylinder peristaltic pump (IsmaTec, Germany) was used for carrier solution delivery. Samples were injected through a six-port rotary valve (Rheodyne 5020) with a loop of 50 μ L. Amperometric detection was performed at an applied potential of +440 mV in a home made thin-layer flow cell equipped with a glassy carbon electrode of 3 mm in diameter, well fitted in a methacrylate holder. A downstream compartment coupled to the cell outlet was placed containing the reference electrode (Ag|AgCl|KCl 3 M) and a stainless steel waste tube, acting as a counterelectrode. The potential was controlled with the potentiostat mentioned above. Unless otherwise stated, the carrier solution was 0.5 M H₂SO₄.

Prior to each experiment, GCE was polished with slurries of successively smaller sizes of alumina (1, 0.3 and 0.05 μ m) on a cloth followed by sonication in purified water for 5 min.

In order to select the applied potential for amperometric measurements, a conventional three-electrode electrochemical cell consisting of a 2 mm diameter glassy carbon electrode (Methrom) as a working electrode and a Pt wire as a counter electrode and a Ag|AgCl|KCl 3 M reference electrode was used.

Spectrophotometric measurements were carried out with a μ Quant absorbance microplate spectrophotometer (Biotek, VT).

Sample pretreatment was performed with a centrifuge Hereaus Multifuge 1L-R, (Thermo Fisher Scientific, Spain) and a rocking stirring bed Movil tub (Selecta, Spain).

2.2 Chemicals

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), horseradish peroxidase (HRP) type VI-A (1100 U/mg) and gliadin were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Other chemicals were of analytical grade. All aqueous solutions were prepared in purified water using a Direct-Q system (Millipore).

Glutentox competitive ELISA was acquired from Biomedal (Sevilla, Spain).

The 33-mer peptide from α -gliadin was chemically synthesized by Biomedal (Sevilla, Spain) with a certified minimum purity of 98%. Standard solutions were prepared daily in water from a 1 mg/mL stock aqueous solution.

A 2 mg/mL stock solution of gliadin was prepared to obtain the calibration standards by dilution. Although gliadin is soluble in alcohol-water mixtures ranging from 40 to 70%, at this high concentrations a complete dissolu-

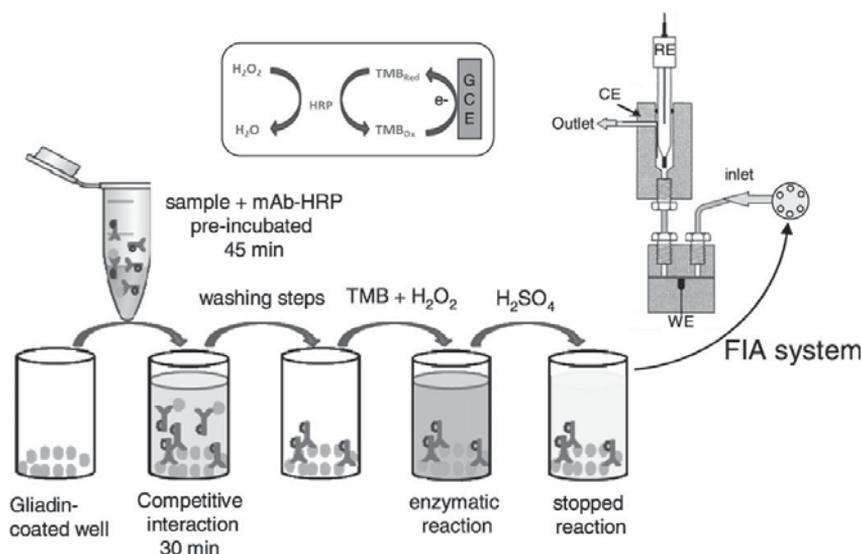


Fig. 1. Schematic representation of the competitive ELISA assay protocol. Inset: Enzymatic and electrode reactions.

tion was never achieved. Therefore, a stock solution in DMSO [13] was prepared by adding 20 mg of gliadin to 10 mL of DMSO and subsequent vigorous sonication in an ultrasonic bath.

TMB is sparingly soluble in aqueous solutions, so, the stock solution was prepared in DMSO (solubility about 1.7 mg/mL) to a final concentration of 0.8 mg/mL.

HRP stock solutions were prepared in water at a 1 mg/mL concentration.

2.3 Sample Extraction Procedure

Food samples were extracted in 60% ethanol-water solutions. 10 mL of this solution was added to 1 g of food sample and agitated in a rocking stirring bed. After 30 min, the tubes were centrifuged at 2500 g for 15 min at room temperature. The pellet was discarded and the supernatant was diluted with the dilution solution provided with the kit according to manufacturer recommendations that depend on the content of gluten expected.

2.4 Competitive ELISA Assay

The Glutentox competitive ELISA test kit was used to carry out the assay mainly following the manufacturer instructions. The procedure is illustrated in Figure 1. 300 μ L of the diluted food extract (or standard solution) were incubated with 300 μ L of mAb G12-HRP conjugated solution for 45 min at room temperature. 200 μ L of the incubated solution were placed in each gliadin-containing microtiter well for 30 min. After the competitive interaction takes place, wells were washed 5 times with the washing solution and then, the substrate solution (TMB + H₂O₂) was added (100 μ L). The enzymatic reaction was carried

out for 15 min in the dark (unless otherwise stated). Finally, the reaction was stopped by adding 100 μ L of 1 M H₂SO₄. Immediately after, the absorbance of each well was measured, and a volume of each well was introduced in the FIA system to perform the amperometric measurements.

3 Results and Discussion

3.1 Description/Optimization of the Assay

HRP oxidizes TMB in the presence of H₂O₂ (Figure 1, Inset). The product (TMB_{ox}) presents a blue color that turns into yellow-orange color after acid addition. As TMB is a redox active molecule the reaction can be followed both spectrophotometrically and electrochemically. In this case, the reduction of the enzymatically generated product TMB_{ox} will be measured.

The electrochemical oxidation of TMB has been previously studied [14]. In neutral solutions two redox processes are observed because of the formation of radical cation intermediates whereas in acidic solutions only a single redox process appears because the oxidation takes place through a 2e⁻, 2H⁺ reaction [14]. This behavior was verified under conditions used in this assay by CV (data not shown). Since both the enzymatic and electrochemical oxidation leads to the same product, it is not possible to detect the enzymatically generated product by voltammetric measurements. Amperometric measurement at a potential at which the reduction of the TMB_{ox} takes place is the alternative option. For analytical purposes a stable species is required, so it was decided to stop the enzymatic reaction with sulfuric acid and carry out the amperometric FIA detection under these condi-

tions. Taking into account that the redox process of TMB on GCE in 0.5 M H₂SO₄ appeared at $E^{o'} = 0.56$ V ($E_{an} = 0.58$ V and $E_{cat} = 0.54$) (data not shown) and to ensure a complete reduction of the enzymatically generated product (TMB_{ox}), an applied potential of 0.44 V, 100 mV beyond the cathodic peak potential, was selected for amperometric FIA measurements.

The detectability of the technique for the detection of TMB_{ox} was estimated by measuring the reduction current of this compound in solutions of TMB_{ox} concentration varying from 0.1 to 0.8 μM. TMB_{ox} is not a commercial product, so it was enzymatically generated by adding 40 μL of a 1:100 dilution of the stock HRP solution to 500 μL of TMB of increasing concentrations in the presence of 0.1 mM H₂O₂. At this point, it is of paramount importance to ensure the quantitative oxidation of TMB. Therefore, the oxidation current of TMB before and after the enzymatic oxidation was amperometrically measured at +0.68 V. In both cases, sulfuric acid was added to simulate the assay experimental conditions. After 30 min of enzymatic reaction, the current intensity was about 3% of the initial one for the highest concentration of TMB tested, thus, a quantitative oxidation was achieved under these experimental conditions. Then, the reduction current of TMB_{ox} at different concentrations was measured, resulting proportional to its concentration. The regression plot obtained was as follows: I (nA) = $-0.20 + 10.8 [TMB_{(ox)}]$ (μM); $r = 0.993$, and the limit of detection was estimated to be 67 nM. This value ensured the feasibility of using this technique for the detection of gliadin.

Analysis of gluten traces requires an exquisite care of the cleanliness of the laboratory and instrumentation used because of its ubiquitous presence and dusty nature of standards and food samples. In order to ensure a clean environment, negative controls were performed with each experiment. It consisted of the analysis of a maize sample provided with the kit. In all cases an amperometric signal higher than the most diluted gliadin standard provided with the kit was obtained (signal off assay) indicating that there is no cross-contamination. In addition to this, a positive control (also provided with the kit) was assayed to ensure the proper conditions of the kit reagents (mAb G12-HRP conjugate and substrate).

Preliminary experiments using calibration standards provided by the kit's manufacturer showed amperometric signals much higher than those obtained in the experiment described above, indicating that the analytical signal can be sacrificed in order to shorten the analysis time. Therefore, the influence of the extent of the enzymatic reaction on the current intensity was studied. Even after only 5 min of incubation, about 200 nA are measured. At longer times the magnitude of the current intensity increased (twofold at 15 min), although less pronouncedly beyond this incubation time (I at 30 min is 480 nA). Therefore, a 15 min incubation time was selected for further experiments.

As mentioned above, competitive assays allow the detection of gliadin in hydrolyzed samples that contains

only one epitope. The mAb G12 permits the detection of gliadin based on the measurement of the immunodominant toxic peptide but the commercial ELISA kit uses the whole prolamin as standard. The possibility of using the peptide 33-mer itself was investigated. With this aim, standard solutions of 33-mer (7.5, 15, 30, 60 and 120 ng/mL) were prepared from the stock solution. Since the precise composition of the standard solutions provided with the kit is unknown, standard solutions of commercial gliadin were also prepared at the same concentrations. The ELISA protocol was carried out using the three sets of standards (33-mer, gliadin from the kit and gliadin from Sigma). The current intensities measured amperometrically using the FIA system are shown in Figure 2A for 33-mer. In order to compare the electrochemical signals, they were normalized by applying the following expression:

$$S\% = (S_i - S_{min}) (S_{max} - S_{min})^{-1} \times 100$$

where S_i was the current intensity at each standard concentration, S_{min} was the I for the higher concentration and S_{max} was the I for the lower concentration.

As can be seen in Figure 2B, dose-response curves for commercial gliadin and kit standards had a similar shape suggesting that gliadin was the standard used in the solutions provided with the kit with little influence of the unknown buffer composition. However, the dose-response curve obtained with 33-mer standards showed a different behavior and lower signal (higher response) at a fixed concentration in ppb. It is worth noting that the concentration can not be directly compared in these units. Since, a sigmoidal dose-response curve is usually obtained in ELISA assays, it seems that gliadin standards corresponds to the upper part of the sigmoidal curve and the peptide ones corresponds to the lower part of it. From these experiments it was apparent that the analytical signals obtained with both standards were not equal and a relationship between them was needed in order to be able to use the peptide 33-mer as standard for calibration purposes. To do this, it was necessary to establish the stoichiometry of the affinity interaction between gliadin and mAb-G12. Although the epitope that binds to the mAb in 33-mer is a hexapeptide repeated 3 times in the peptide sequence, only one mAb is able to bind the 33-mer due to steric hindrance. If the number of mAb bound to gliadin is estimated, a straightforward way of conversion ppm of peptide into ppm of gluten will be obtained.

For this purpose, the I measured using both kit and 33-mer standards was plotted against the concentration expressed in nano equivalent/L. In the case of 33-mer the equivalence was clear: 1 eq/mol is used because the small size of the peptide prevents the binding of more than one Ab. In the case of gliadin, 1 to 3 eq/mol were used. In Figure 3 the dose-response curves for 1:1 and 2:1 models (gliadin: mAb) are depicted. A unique sigmoidal curve was obtained in both cases. The upper part is formed by the signals obtained with gliadin standards and the lower

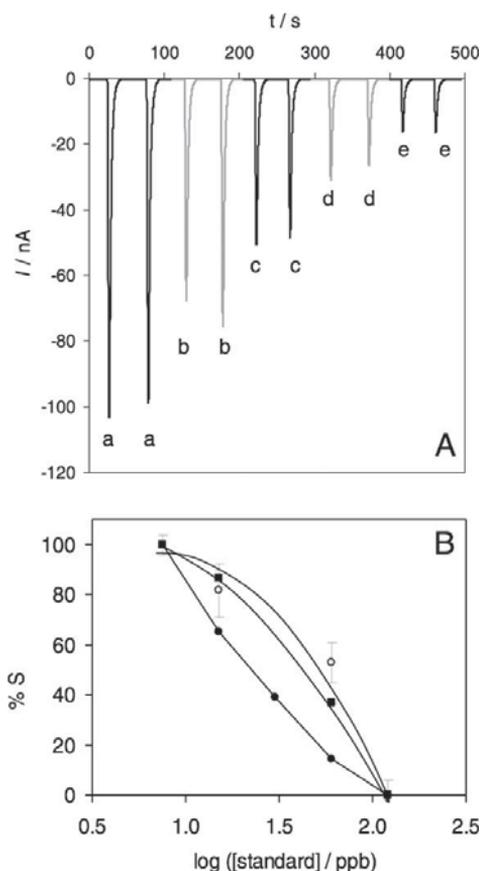


Fig. 2. A) FIAGram corresponding to TMB_{ox} enzymatically generated after carrying out the ELISA assay protocol with a) 7.5; b) 15; c) 30; d) 60 and e) 120 ppm of 33-mer standard solution. $E_{\text{applied}} = +0.44$ V. Carrier solution: 0.5 M H_2SO_4 . B) Normalized dose-response curves obtained using (○) kit standards (■) Sigma Gliadin and (●) 33-mer as standards for calibration.

part by the signals obtained with 33-mer. Higher stoichiometries showed no a single curve (data not shown). A sigmoidal fitting of the data led to very similar fitting parameters. Taking into account that a sandwich ELISA assay using mAb G12 as both capture and reporting antibodies, is currently being commercialized, only the 2:1 model can support this, thus, two equivalents/mol were assumed for further calculations. This way, a direct conversion between peptide units and gluten units that allow their comparison with law regulations and other ELISA assays was found.

3.2 Analytical Features

In order to obtain the dynamic range and the limit of detection using 33-mer as standard for calibration, a dose-response curve was constructed using a wide concentration range (0.4–480 ppb). From the decreasing sigmoidal

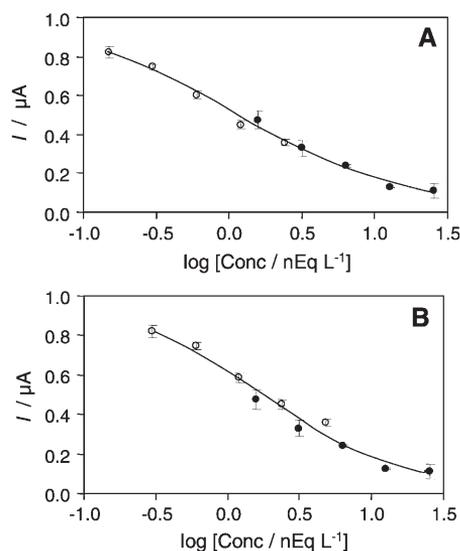


Fig. 3. Current intensity measured at +0.44 V vs. nequivalent/L of (○) kit standards or (●) 33-mer using a A) 1:1 B) 2:1 stoichiometry for gliadin-mAb reaction.

curve obtained (Figure 4), the analytically useful range was established as the 33-mer concentrations that gave a signal comprising between 80 and 20% of the maximum signal (horizontal dashed lines). The limit of detection was estimated as the 33-mer concentration corresponding to a 90% of the maximum signal (horizontal solid line).

In Table 1, analytical features for both electrochemical and optical assays are shown.

The limit of detection calculated in terms of gluten content, using the conversion herein found, was virtually identical for both methods of detection and very similar to the reported by kit manufacturers (1.26 ppm), which suggested that the detectability of the assay was limited by the affinity of the antibody rather than by the detection technique.

The electrochemical signals were compared with those obtained using the same competitive ELISA assay with optical detection at 450 nm. In Figure 5, the relationship between results obtained with both techniques is depicted. The regression plot, $\%S_{\text{electrochem}} = 0.99\%S_{\text{optical}} - 2$; $r = 0.998$, indicates a good correlation between both detection techniques.

3.3 Analysis of Gluten in Real Samples

As mentioned before, the quantitative extraction of gluten from food samples depends on the state of the protein after food treatment and the method used. Ethanol extraction is recommended to analyze food containing native unheated proteins. Thermally treated food has to be extracted using a special cocktail solution. However, hydrolyzed proteins only can be detected by competitive

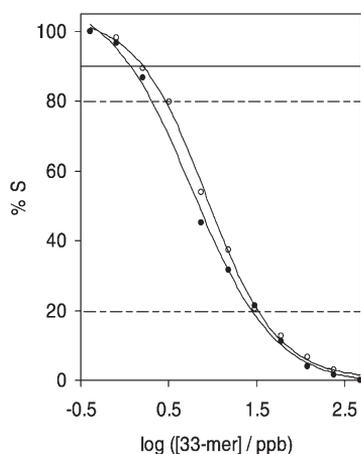


Fig. 4. Normalized dose response-curve obtained using 33-mer standards after (○) electrochemical and (●) optical measurements. Horizontal dashed line indicates analytically useful range and horizontal solid line indicates the limit of detection.

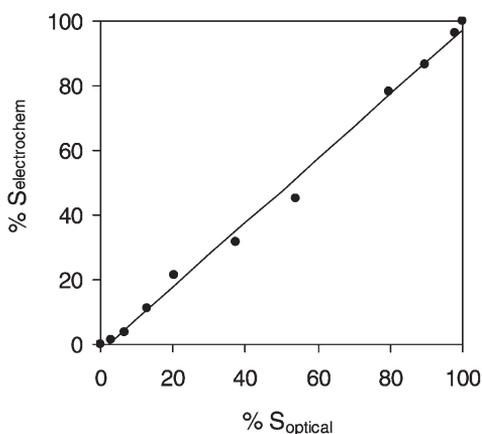


Fig. 5. Relationship between normalized analytical signals obtained after carrying out the ELISA protocol with different concentrations of 33-mer standard with electrochemical and optical detection.

assays that are not compatible with this cocktail. Therefore, the method of choice is the ethanol extraction. The recovery was investigated in a “gluten-free” cookie

Table 2. Comparison of gluten content in ppm obtained using several ELISA format assays in food samples.

Sample	(Standard: 33-mer)		(Standard: kit solutions) Optical	R5 Sandwich ELISA
	Electro-chemical	Optical		
Cookies	<1	<1.5	<1.26	<5
Muffins	1.2	<1.5	<1.26	<5
Sponge cake	<1	<1.5	<1.26	–
Gazpacho	<1	<1.5	<1.26	<5
Asparagus	<1	<1.5	<1.26	<5

sample spiked with 75 ppm of commercial gliadin. After homogenization, the sample was treated as indicated in the experimental section. The unspiked sample gave a result below the limit of detection of the technique confirming the “gluten-free” label. A recovery of $(82.4 \pm 5.0)\%$ was obtained for the enriched sample.

Finally, the complete procedure was applied to other “gluten-free” samples. In Table 2, the results obtained with electrochemical and optical measurements are shown and compared with those obtained independently with the Codex Alimentarius standard method [10] expressed in ppm of gluten. All samples but muffins were below the limit of detection of the technique using both the 33-mer or gliadin as standards for calibration. Given that the limit of detection of the standard method is higher than the reported herein and the fact that the sandwich assay only detect non-hydrolyzed proteins, the gluten content of all samples resulted to be below the detectability level. Muffins contained 1.2 ppm of gluten, which is above the limit of detection of the electrochemical detection but below the one of the optical as it was found. Therefore, all samples are correctly labeled as “gluten-free” and meet the requirements of FACE label, which guarantee a gluten content below 10 ppm.

4 Conclusions

An amperometric flow system of detection coupled to a competitive ELISA assay for the detection of gluten in food samples was described. The sensitivity of the electrochemical technique allowed the reduction of the enzymatic reaction time from 30 to 15 min in comparison with the commercial assay. However, the limit of detection remained nearly constant suggesting that the limiting factor

Table 1. Comparison of the analytical features obtained with electrochemical and optical measurements.

	Electrochemical method	Optical method
Regression plot	$I (\mu\text{A}) = -0.15 \log([33\text{-mer}]/\text{ppb}) + 0.29; r = -0.999$	$A = -0.17 \log([33\text{-mer}]/\text{ppb}) + 0.41; r = -0.999$
Analytical range (ppb peptide)	1.8–27.4	2.8–29.4
Analytical range (ppm gluten)	1.8–28.8	2.9–31.0
Limit of detection (ppb peptide)	1.0	1.5
Limit of detection (ppm gluten)	1.0	1.5

was the affinity of the antibody. A stoichiometry of 2:1 between the antibody mAb G12 and gliadin was found, which permitted to obtain a correlation between the content in peptide units and the content in gluten units in a competitive assay. The assay was applied to food samples using an extraction method with a recovery of 82% and results compared well with optical measurements.

Acknowledgements

S. A. G. and N. S. Á. thanks MICINN for a FPI grant and Ramón y Cajal contract, respectively. This work has been co-financed by Projects CTQ2008-02429 and FICYT IB08-087 and the *European Regional Development Fund*. Authors thanks Dr. Carmen Rodríguez for allowing the use of the microplate reader.

References

- [1] S. Lohi, K. Mustalahti, K. Kaukinen, K. Laurila, P. Collin, H. Rissanen, O. Lohi, E. Bravi, M. Gasparin, A. Reunanen, M. Maki, *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2007**, *26*, 1217.
- [2] B. Moron, A. Cebolla, H. Manyani, M. Alvarez-Maqueda, M. Megias, M. D. C. Thomas, M. C. Lopez, C. Sousa, *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *87*, 405.
- [3] I. Valdes, E. Garcia, M. Llorente, E. Mendez, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2003**, *15*, 465.
- [4] J. H. Skerritt, A. S. Hill, *J. AOAC* **1991**, *74*, 257.
- [5] H. M. Nassef, L. Civit, A. Fragoso, C. K. O'Sullivan, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5299.
- [6] H. M. Nassef, M. C. B. Redondo, P. J. Ciclitira, H. J. Ellis, A. Fragoso, C. K. O'Sullivan, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9265.
- [7] H. Wieser, *Food Microbiol.* **2007**, *24*, 115.
- [8] T. Thompson, E. Mendez, *J. Am. Diet. Assoc.* **2008**, *108*, 1682.
- [9] H. J. Ellis, S. Rosen-Bronson, N. O'Reilly, P. J. Ciclitira, *Gut* **1998**, *43*, 190.
- [10] *Codex Alimentarius Commission. Report of the 27th session of the Codex Committee on methods of analysis and sampling* **2006**, ALINORM 06/29/23.
- [11] *Ridascreen gliadin competitive assay manual R7011* http://www.r-biopharm.com/product_site.php?product_id=345.
- [12] R. van Eckert, E. Berghofer, P. J. Ciclitira, F. Chirido, S. Denery-Papini, H. J. Ellis, P. Ferranti, P. Goodwin, U. Immer, G. Mamone, E. Mendez, T. Mothes, S. Novalin, A. Osman, M. Rumbo, M. Stern, L. Thorell, A. Whim, H. Wieser, *J. Cereal Sci.* **2006**, *43*, 331.
- [13] M. L. Sanchez-Martinez, M. P. Aguilar-Caballo, A. Gomez-Hens, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *523*, 35.
- [14] A. Crew, C. Alford, D. C. C. Cowell, J. P. Hart, *Electrochim. Acta* **2007**, *52*, 5232.

**Sensitive gluten determination in gluten free
foods by an electrochemical aptamer-based**

assay (Submitted Analytical and bioanalytical Chemistry)

**Sensitive Gluten Determination in Gluten Free Foods by an Electrochemical
Aptamer-based Assay**

Sonia Amaya-González, Noemí de-los-Santos-Álvarez, Arturo J. Miranda-Ordieres,
María Jesús Lobo-Castañón*

Departamento de Química Física y Analítica. Universidad de Oviedo. Julián Clavería 8,
33006 Oviedo. Spain

* Corresponding author

Phone: +34 985106235

Fax: +34 985103125

e-mail: mjlc@uniovi.es

Other authors emails:

s.amaya_g@yahoo.es (SAG)

santosnoemi@uniovi.es (NSA)

amir@uniovi.es (AJMO)

Abstract

Enzyme-immune assays are currently the methods of choice for gluten control in foods labelled as “gluten free”, providing a mechanism for assessing food safety for consumption by coeliac and other allergic patients. However, their limitations, many of them associated to the reactivity of the different antibodies used and their degree of specificity, have prevented the establishment of a standardized method of analysis. We explore new methods for quantitatively determine gluten content in foods based on the use of two recently described aptamers, raised against a 33-mer peptide recognised as the immunodominant fragment from α 2-gliadin. The assays use the target peptide immobilized onto streptavidin-coated magnetic beads in combination with a limited amount of biotin-aptamer in a competitive format, followed by streptavidin-peroxidase labelling of the aptamer that remains bound to the magnetic beads. The enzyme activity onto the beads, measured by chronoamperometry in disposable screen-printed electrodes, is inversely related to the target concentration in the test solution. We find that while the assay using the aptamer with the highest affinity towards the target (Gli 4) achieves low detection limits (\sim 0.5 ppm) and excellent analytical performance when challenged in samples containing the intact protein, gliadin, it fails in detecting the peptide in solution. This problem is circumvented by employing another aptamer (Gli 1), the most abundant one in the SELEX pool, as a receptor. The proposed assays allow the convenient detection of the allergen in different kind of food samples, including heat-treated and hydrolysed ones. The obtained results correlate with those of commercially available antibody-based assays, providing an alternative for ensuring the safety and quality of nominally gluten-free foods.

Keywords: Aptamer, Coeliac disease, Electrochemical detection, Gliadin analysis, Gluten, 33-mer peptide.

1. Introduction

Gluten detection is an outstanding problem because of its relation with coeliac disease (CD) and gluten-related allergies or intolerances. CD is one of the most prevalent autoimmune diseases affecting 1% of population and is related to genetic factors and triggered by the ingestion of gluten [1]. The only treatment for CD is the strict following of a lifelong gluten free diet. Because of the seriousness of the CD and its prevalence, EU legislation enforces the labelling of food that may contain gluten-containing cereals, and allows to label as “gluten free” products those containing less than 20 ppm of gluten [2]. However, there is not universal agreement on what the term “gluten free” means. For example, Spanish Federation of CD patients Associations (FACE) establishes a “Gluten Free Certification”, which assures that the product contains less than 10 ppm of gluten. But there are especially sensitive patients who can develop symptomatology after the ingestion of minimal amounts of gluten that makes those limits insufficient. The lowering of the existent limits is being frustrated by the need for more sensitive and reliable gluten detection methods to be applied in the food industry.

The development of gluten detection methods has to confront some challenges because of the nature of the analytical problem. First, the lack of a clearly defined chemical target, as gluten is the popular name given to major storage proteins of certain dietary grains. Gliadins, the alcohol soluble fraction of wheat gluten, and homologous proteins in barley, rye and possibly oats, globally termed as prolamins, are the main target in gluten analysis. Additionally, during food processing the proteins composing gluten may suffer alterations induced by thermal or enzymatic treatments. Gluten proteins have a relatively large amount of –SH containing amino acids. These residues form intrachain S-S bonds that suffer different changes depending on the thermal food processing. Breaking of the S-S intrachain bonds and formation of new ones between

different chains originates a polymeric structure with low solubility, avoiding quantitative extraction of the proteins and affecting its further analysis [3]. The most common sample treatment involves extraction of gluten prolamins using a 60 % ethanol solution. This extraction is not capable of fully dissolving gluten in heat processed foods [4]. In order to overcome this problem different extraction solutions have been developed, incorporating a reducing reagent, for breaking interchain S-S bonds, and chaotropic agents, to solubilize gluten proteins in the extraction solution [4,5]. The most used extraction mixture, called “cocktail” is composed of 2-mercaptoethanol and guanidine hydrochloride [5]. Another important alteration of the proteins occurs when food processing involves treatments in which gluten can be hydrolysed. In the production of starch and syrup and in brewery enzymatic processing breaks down the proteins into small peptides that are also toxic for CD patients [6-8]. These immunotoxic small peptides must also be detected to estimate the toxicity of these products for celiac patients.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) are the currently accepted methods for gluten determination in foods. Several antibodies targeting different fragments of gluten proteins are employed [9-12]. Despite their many positive characteristics, the traditional sandwich ELISA is not suitable for quantifying gluten in hydrolysed foods because it requires the presence of at least two epitopes in the target molecule, which is unlikely in the fragments obtained after hydrolysis. To overcome this drawback, competitive immunoassays have been developed based on the R5 antibody and using as calibration standard gliadin [4] or a mixture of whole protein and hydrolysed fragments [13] or on the G12 antibody and tracing the calibration curve using whole gliadin [11]. However, neither the sandwich assays, nor the competitive ones are fully compatible with the cocktail extraction solution because their components may denature the protein receptor

[14]. A non-protein receptor for gliadin would thus contribute to the improvement of gluten detection methods.

With the aim of solving this problem, we have recently obtained a panel of aptamers for specific binding to gliadin [15]. These non-protein receptors, obtained against one of the main immunogenic gluten peptides known as 33-mer [7], are able to bind not only the peptide used as target for selection but also the whole protein and homologous ones in rye, barley and oats, suggesting they might serve as viable receptors for the detection of gluten in foods at concentrations below the 20 ppm threshold proposed by the Codex Alimentarius Commission. Here, we expand this approach developing and validating two electrochemical competitive assays on magnetic particles for the determination of gluten. These assays rely on the use of two of the selected aptamers i.e. Gli 4, the ligand with the highest affinity towards gliadin, and Gli 1 the most abundant in the selection pool, whose binding to the peptide may be kinetically favoured. Their analytical performance is comparatively evaluated and validated against gliadin-ELISA kits. Both assays are complementary, proving to be reliable tools for sensitive detection of gluten in a wide variety of foods, including heat-treated and hydrolysed ones.

2. Materials and methods

Reagents

DNA aptamers (5'→3'), both labelled in 5' with biotin,

Gli 4: (CCAGTCTCCCGTTTACCGCGCCTACACATGTCTGAATGCC)

and Gli 1: (CTAGGCGAAATATAGCTACAACACTGTCTGAAGGCACCCAAT), which

are tagged with biotin at its 5'-terminus, were obtained from Integrated DNA

Technologies (IDT, Leuven, Belgium).

Unmodified (LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF; 33-mer) and biotinylated (LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPFHHHHHHH-lysine-Biotin; Biotin-33-mer) peptides and QQPF were purchased from Biomedal (Sevilla, Spain).

Streptavidin modified magnetic beads with a binding capacity of 4 nmol mL⁻¹ of free biotin (Dynabeads® MyOne™ streptavidin C1, 1 µm Φ, 10 mg mL⁻¹) were provided by Life Technologies (Madrid, Spain). Gliadin standard solutions were prepared using the gliadin standard provided by the Working Group on Prolamin Analysis (PWG) and acquired to R-Biopharm. Streptavidin-Peroxidase conjugate (Str-HRP₂, 176 units mg⁻¹ peroxidase activity) was obtained from Thermo Fisher (Madrid, Spain). Reagents for buffer preparation, guanidinium hydrochloride, mercaptoethanol, polyvinylpyrrolidone, fish gelatine and enzymatic substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) liquid substrate system for ELISA were purchased from Sigma-Aldrich. Solutions were prepared using MilliQ purified water.

Procedures

Modification of streptavidin coated magnetic beads: An aliquot of 50 µL of the streptavidin-magnetic beads stock solution was washed twice with BLmod (1 mL PBS + 0.01 % Tween-20) for 2 min and then resuspended in 1 mL of 2 µM biotinylated 33-mer in BLmod. The tube was incubated for 30 min at 30 °C in a Thermomixer (Eppendorf Ibérica, Spain) under continuous shaking. After that, the beads were washed twice in BLmod and blocked with 500 µM biotin in BLmod for 30 min. After two new washing steps, they were reconstituted in 500 µL BS (50 mM TRIS pH 7.4+0.25 M NaCl+5 mM MgCl₂) and used within the same day.

Competitive assay: For Gli 1 assay, 30 µL of modified magnetic beads were incubated in 500 µL of BS with 250 nM of biotinylated aptamer and selected amounts of

calibration standard (or 10 μL of extracted sample) for 30 min at 30 $^{\circ}\text{C}$ in Thermomixer under shaking. After that, the beads were washed twice with BSL (50 mM TRIS pH 7.4+0.25 M NaCl+5 mM MgCl_2 + 0.01 % Tween-20), and incubated with an excess of enzymatic conjugate ($2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Str-HRP₂) in 500 μL of BSL for 30 min at 30 $^{\circ}\text{C}$ under shaking. Finally, the beads were washed twice with BSL, once with BS and resuspended in 30 μL of BS.

For Gli 4 assay, 10 μL of modified magnetic beads were incubated in 1 mL of BS with 250 nM of biotinylated aptamer and selected amounts of calibration standard (or 20 μL of extracted sample) for 30 min at 30 $^{\circ}\text{C}$ in Thermomixer under shaking. After that, the beads were washed twice with BSL, and incubated with an excess of enzymatic conjugate ($2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Str-HRP₂) in 1 mL of BSL for 30 min at 30 $^{\circ}\text{C}$ under shaking. Finally, the beads were washed twice with BSL, once with BS and resuspended in 10 μL of BS.

Amperometric measurement: The resuspended beads (10 μL) were captured on screen printed carbon electrodes (Dropsens, Oviedo, Spain) placing a magnet under the working electrode, and the electrochemical cell was covered with 40 μL of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine + H_2O_2 substrate. The enzymatic reaction was developed for 30 s and the enzymatically obtained product measured by chronoamperometry at 0 V using a μ -AutoLab type II potentiostat (Ecochemie, The Netherlands).

Extractions: For the extraction of flours and no heat-processed foods, 0.8 g of flour or homogenised food sample was placed in a 15 mL Falcon tube and washed with an aqueous solution of 2 M NaCl. After 20 minutes of shaking at RT, the tube was centrifuged in a Heraeus Multifuge 1L-R (ThermoScientific) for 15 min at 7500 g and the supernatant was discarded. Prolamins were extracted twice with ethanol 60 % solution. For this purpose 4 mL of ethanol solution were added to the tube and the

mixture was incubated at RT during 20 min and then centrifuged for 15 min at 7500 g, and both supernatants were combined.

Some food samples were also extracted as follows: 0.25 g of ground sample was mixed with 2 mL of cocktail solution (250 mM mercaptoethanol, 2 mM guanidine in 0.1× PBS). The suspension was incubated in an oven at 50 °C for 40 min. Once at room temperature, 3 mL of ethanol were added and extraction in a shaker was extended for 1 hour. Finally the samples were centrifuged for 30 min at 2500 g, and the supernatant was used in the analysis. The sample containing chocolate was extracted in the presence of 0.25 g of gelatin and 0.1 g of polyvinylpyrrolidone, which were added to 0.25 g of ground sample before the extraction.

3. Results and discussion

We chose a competitive assay format, well suited to detect both intact protein and small protein fragments, using two previously selected aptamers targeting the immunotoxic α 2-gliadin fragment, 33-mer [15]. Magnetic microparticles are employed as support for the sensing phase to take advantage of the efficient magnetic separation offered by this platform, which facilitates subsequent exhaustive washing steps thus minimizing major problems associated with non-specific interactions. The preparation of the sensing phase is very simple. A commercially available 33-mer, modified at its carboxy-terminus with a biotin, is immobilized onto the surface of streptavidin-modified magnetic particles and then the unoccupied sites of streptavidin are blocked with biotin. The analytical assay we developed using this platform comprises the following steps (**Figure 1**): first, the sample and the biotin-labelled aptamer are incubated with a fixed amount of the modified magnetic beads. In this step, the analyte from the test solution competes with the immobilized peptide for a limited amount of aptamer. As a result, part of the biotin-

aptamer is specifically captured and separated from the sample after applying an external magnetic field. In order to detect the bound aptamer, particles are incubated in a second step with a streptavidin-peroxidase conjugate containing two molecules of enzyme per streptavidin as reporter molecule. Finally, the enzyme activity on the surface is electrochemically quantified by magnetically entrapping the modified beads onto a screen-printed carbon electrode. After the addition of tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide we measured by chronoamperometry the reduction of the product enzymatically produced. The higher the concentration of gliadin in the sample is the lower the reduction current we obtain.

Figure 1.

3.1. Assay Optimization

To obtain optimal conditions for the competitive assay, the concentration of biotin-aptamer was first selected, fixing the amount of magnetic particles modified with the peptide in 0.06 mg mL^{-1} . In this study, different concentrations of the aptamers in the range 0.5 nM - $2 \mu\text{M}$ were tested without protein or peptide in solution. This analysis produces typical binding curves for both aptamers (**Figure 2**). 250 nM of aptamer, the concentration that yield around 50% of the maximum obtained signal, was selected for competition. In the absence of the aptamers, we observe only a small reduction current ($0.4 \pm 0.1 \mu\text{A}$), which confirmed that the contribution of the nonspecific interaction of Str-HRP₂ conjugate is not significant. The assay also gives negligible responses when it is performed using a randomized biotinylated DNA library at a 250 nM concentration level. Conversely, we registered a maximum signal value of $4.7 \pm 0.1 \mu\text{A}$ and $3.6 \pm 0.1 \mu\text{A}$ for Gli 4 and Gli 1, respectively at this aptamer concentration. These results are consistent with the specific interaction of both aptamers with the immobilized peptide and a higher affinity for the aptamer Gli 4 [15].

Figure 2

The second variable we took into consideration is the composition of the competition buffer. To evaluate the effect of ethanol in the aptamer/peptide interaction, we performed the competitive assay in buffer containing different concentrations of this alcohol. The presence of 1.2% of ethanol, which will correspond to a 1:50 dilution of samples extracted using 60 % ethanol, increases the maximum signal obtained while the blank is not affected. The improved signal amplitude at 1.2% ethanol can be explained given the apolar nature of the peptide modifying the surface of the beads, which may cause their slight aggregation. A small amount of ethanol may act as disaggregating agent, favouring the aptamer/peptide interaction. Consistent with this, the competitive assay achieves improved signal decrease with this amount of ethanol in the buffer. At 3% of ethanol the binding of Gli 1 to the peptide decreases to about 35% of the maximum while Gli 4 interaction is less affected, which again is in agreement with the lower affinity constant for the peptide-Gli 1 reaction.

Therefore, the best performance in terms of sensitivity is obtained employing 0.06 mg mL⁻¹ of the modified beads and 250 nM aptamer, in the presence of 1.2% ethanol. Upon the addition of 10 µg L⁻¹ of PWG standard to the competition buffer in the presence of Gli 1, a 87% of signal decrease is observed with a coefficient of variation of 6%. Under the same conditions, Gli 4 gives rise to higher sensitivity with about 80% of decrease at the same concentration of PWG. We find, however, that this aptamer leads to worse reproducibility, more than 15% of RSD at 10 µg L⁻¹, probably related to the fact that a higher tendency of the 33-mer-modified magnetic particles to aggregate is observed with this aptamer. To overcome this difficulty we performed the competitive assay with Gli 4 using a higher dilution of the magnetic beads during the competition i.e 0.01 mg mL⁻¹, while maintaining the amount of beads on the electrode surface for measurement

(10 µg). In this way sensitivity of the assay was not affected and precision was improved, with a RSD of 6% for 10 µg L⁻¹ of PWG.

3.2. Analytical performance

The performance of both aptamers in competitive assays under the optimum conditions was compared using PWG gliadin or 33-mer peptide as standards. The selection of the standard in order to obtain a calibration to which refer the measurements of the samples have to be carefully done to avoid deviations in the value obtained. Most used calibration and validation standard is PWG gliadin, a material obtained after processing of 28 different cultivars of wheat [16]. We used this material as a gliadin standard to obtain the calibration curve.

In **Figure 3A**, the current intensities obtained after challenging the modified beads with increasing concentrations of PWG using both aptamers is depicted. As expected, aptamer Gli 4 gives rise to higher currents than aptamer Gli 1 as a result of the difference in affinity.

Data were fitted to a four parameters logistic (equation 1)

$$y = A + \frac{(B-A)}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^p} \quad (1)$$

where A is the response at an infinite concentration of analyte, B is the response at a zero concentration of analyte, EC₅₀ is the concentration of analyte that corresponds to the 50 % of the maximum signal and p is the Hill slope that represents the slope at the inflexion point of the sigmoidal curve. Due to the low solubility of gliadin in aqueous solution concentrations higher than 1 µg L⁻¹ were not assayed, which precluded the observation of the complete sigmoidal curve. The best fitting were obtained fixing A parameter to zero and the equations are the following:

$I(\mu A) = (3.60)/(1 + ([PWG (\mu g L^{-1})]/721)^{0.5})$; $r = 0.980$ for Gli 1 and

$I(\mu A) = (5.17)/(1 + ([PWG (\mu g L^{-1})]/273)^{0.6})$; $r = 0.997$ for Gli 4.

The limit of detection of each assay was calculated as the concentration that gives the 95 % of the maximum signal and corresponds to $4.9 \mu g L^{-1}$ of gliadin when using Gli 1 as recognition element and $0.5 \mu g L^{-1}$ of gliadin when using Gli 4. Taking into account the sample extraction, the dilution of the extract and the gliadin to gluten ratio, the limit of detection in real samples can be calculated in order to verify whether the methods meet the requirements to evaluate the accomplishment of the EU legislation. The overall sample dilution is 1:500 and the content of gliadin in gluten is considered as 50 %, [17] though values ranging from 32% to 67 % have been found [18], so the limit of detection expressed in gluten for each assay is 4.9 ppm and 0.5 ppm for Gli 1 and Gli 4, respectively. Those values are below the limits needed to check the legislation accomplishment and are similar or slightly lower than competitive immunoassays even those currently marketed [4,11,19-21].

Figure 3

The repeatability of the assays calculated as the coefficient of variation at 1 and $10 \mu g L^{-1}$ of gliadin concentration were 7 and 8%, respectively for Gli 1 aptamer and 9 and 6 %, respectively for Gli 4. The inter assay reproducibility, calculated with the signal obtained for $10 \mu g L^{-1}$ in three different days is 9.5 % for Gli 1 assay and 6% for Gli 4 assay.

Competitive assays are specifically designed for hydrolysed samples where the proteins are digested to small peptides containing a single epitope for the antibody. The competitive format of R5 antibody uses a peptide fragment (QQFPF) as a standard even though the equivalence between peptide fragments and the intact protein is lacking [13].

This precludes the conversion of the results into gluten content as required in the

legislation [17]. On the contrary, the competitive G12 assay uses the intact protein [11]. We have previously found a correlation between Sigma gliadin and 33-mer using G12 antibody in an electrochemical competitive immunoassay [20]. Therefore, the feasibility of using 33-mer peptide as a standard for the competitive apta-assay was studied. In **Figure 3B**, the response of Gli 1-based method to increasing concentrations of 33-mer is shown and compared with the calibration plot using PWG both expressed in nM. It is apparent that the aptamer recognizes the peptide but at much larger concentrations than the intact protein, which indicates that PWG contains several binding sites in its structure. However, the number of those “aptatopes” would be very high, about 200, which seems unrealistic. In our previous work two binding sites for the antibody G12 were found in each gliadin standard, which is reasonable. Recently, we have found that Gli 1 exhibits positive cooperativity when binding to PWG, which can explain the apparent higher affinity towards the intact protein even taking into consideration the presence of several binding sites [22].

On the contrary, proper calibration plots using Gli 4 aptamer as recognition element and 33-mer peptide as standard were not obtained. This fact is attributed to microscopic aggregation of the beads in presence of this aptamer. Therefore, Gli1 aptamer was selected as the receptor for subsequent testing of hydrolysed samples.

The response of Gli 1 aptamer to the recognition epitope of the official R5 method, that is, the pentapeptide QQPFQ [23] was also tested. This specific sequence is not present in the immunodominant 33-mer peptide used for aptamer selection but it is present in wheat, rye and barley prolamins. The aptamer was able to recognize this peptide but at much higher concentrations than 33-mer (above 1 μ M), which suggests a much lower affinity accordingly to its absence in the selection target.

3.3. Cross-reactivity against other cereals and grains

Not only wheat proteins are toxic for coeliac disease patients, prolamins from barley and rye have almost the same toxicity. However, the toxicity of oat for coeliac patients is still controversial [24][25] and citation therein), so oat prolamins also have to be evaluated towards the quantification of the toxicity in food products. For this reason it is necessary to evaluate the response of the competitive assays using Gli 1 and Gli 4 aptamers against prolamins from other toxic cereals and the selectivity against not-CD-triggering cereals and grains. Because of the unavailability of prolamins standards or reference materials from other grains, the ethanol-soluble fraction was extracted from each grain flour. After the extraction, the total protein present in solution was quantified by the Bradford method using PWT as standard, obtaining a content in prolamins for each extract as follows: wheat 5.4 mg mL⁻¹, rye 4.6 mg mL⁻¹, barley 5.2 mg mL⁻¹ and oat 4.7 mg mL⁻¹. All the extracts were diluted at different levels to obtain the desired protein concentration in the competition buffer. As it can be seen in **Figure 4** both assays with Gli 1 and Gli 4, recognise gliadins (wheat), hordeins (barley) and secalins (rye) in a similar extension within the experimental error. However, the response to avenins (oat) is different. Gli 1 aptamer is not able to bind oat proteins while Gli 4 aptamer recognises avenins but with less affinity than the rest of prolamins from CD toxic cereals. This result is interesting because the antibodies G12 and A1, also raised against the 33-mer peptide, weakly binds to avenins although 33-mer is not present in their sequence [26]. The sensitivity order to prolamins was, however, different: hordenins \approx gliadins > secalins >> avenin for G12 and hordeins \approx rye > gliadin >> avenins for the aptamers. In our case, differences between hordeins, gliadins and secalins are less pronounced in both cases. The official R5 method does not respond to the controversial oat prolamins [10].

Figure 4

It is also important to ensure the non-response of the developed method against proteins from non-toxic flours such as soya, maize and rice often used as substitutes of toxic cereals to elaborate CD-safe food. To evaluate the cross-reactivity, the response to increasing concentrations of proteins extracted from soya, maize and rice flours were assayed. In all concentration range, the analytical responses expressed as current percentage of the maximum current obtained in the absence of protein were around 100%. Specifically, percentages obtained with Gli 1 assay were: soya 112 ± 11 % maize 135 ± 26 % and rice 112 ± 9 %. For the Gli 4 assay were: soya 125 ± 37 %, maize 121 ± 36 % and rice 113 ± 25 %. According to this, aptamers do not cross react with non-toxic proteins.

3.4. Application of the competitive assays to food samples

The competitive methods developed are sensitive and selective enough to be applied to gluten determination in gluten free labelled foods in order to evaluate the compliance with the law and to provide more information to the consumer. To do this, we tested samples provided by two external laboratories. All of them had unknown gluten content. The samples provided by Laboratory I were divided, according to the information given by the company, in two groups: non-hydrolysed (Table 1) to be quantified by the Gli 4 assay that is more sensitive, and hydrolysed samples (Table 2) to be quantified by Gli 1 assay, the peptide-responsive one. Liquid samples were just diluted with 60% ethanol and solid samples were extracted with the conventional extraction procedure using 60% ethanol, which is the method recommended by the commercial kit based on G12, the antibody used by the company for comparison.

All positive samples were also identified as positive with our method, so no false negative were found. Only one out of the 5 liquid non-hydrolysed samples analysed (liquid A) was

negative by the G12 immunoassay. In this sample our method detected gluten but with a content below the 20 ppm threshold level. This difference may be due to the improved sensitivity of our method with respect to G12. Gliadin levels measured in the solid non-hydrolysed samples were comparable with levels detected by G12 assay in 50 % of samples (3 out of 6). Both methods showed non-detectable gluten in a rice sample. In general, our method detects higher gluten content than did the G12 kit. Interestingly, the three discordant samples are negative by G12-assay, and positive by our method. These differences can be explained by variations in the extracted target compounds detected by the two assays.

Attending to the results for hydrolysed samples (Gli 1 assay, Table 2), there is a good correlation between the results provided by the external analysis and those obtained using the competitive assay developed in this work. This correlation demonstrates the applicability of the competitive assay based on the aptamer Gli 1 to quantify gluten in hydrolysed samples. Only a false positive result was obtained, corresponding to a sample of a gluten free beer. However, it is accepted that samples where the gluten content differ most are the hydrolysed ones because the value obtained strongly depends on the target sequence detected [27].

Solid samples provided by Laboratory II (Table 3) were extracted alternatively with the conventional 60% aqueous ethanol extraction method and with cocktail solution to evaluate the influence of reducing and denaturing agents on our method. The results were compared with values obtained with the official method (R5) provided by the company after carrying out the analysis with the Gli 4 competitive method and with an independent analysis performed by a certified Spanish company for gluten analysis (Laboratory III). Most of the values obtained with R5 antibody were comparable with those obtained with our method after ethanol extraction except for cappuccino, where a false positive result is observed. Again, this is probably due to the increased sensitivity of our method. The influence of the cocktail solution on the aptamer-based competitive method was studied. In general higher

results were obtained with the cocktail solution, probably because a larger yield of the extraction. The exception was the sample containing chocolate, even though PVP and fish gelatin were used to assist the extraction. It is remarkable the discrepancy between the analysis using the same procedure, which is an indication of the difficulty of such samples. Additional discrepancies are observed in corn flakes samples which would lead to labelling as gluten free according to one of the laboratories but not to the other. Our results with ethanol extraction are in agreement with laboratory II and are closer to laboratory III after cocktail extraction for one of them. Therefore, it can be concluded that the alteration of the protein conformation during the extraction procedure does not significantly affect its recognition by the aptamer (no false negative detected) and the cocktail solution is compatible with our aptamer-based competitive method unlike competitive immunoassays.

4. Conclusions

The combination of magnetic beads and aptamers as receptors has proved to be an attractive method for the sensitive quantification of gluten, with a detection limit of 0.5 ppm in the case where the aptamer (Gli 4) with the highest binding affinity to the protein is employed, and 4.9 ppm when using Gli 1, the most abundant aptamer. The assays can quantify gluten in food samples below the legally established limits for the labelling of “gluten free” products. Gli 4-based method is compatible with cocktail extraction method, allowing the quantification of gluten in heated foods. The assay using Gli 1 aptamer can quantify gluten in hydrolysed samples. Both methods are complementary and can be valuable tools in the determination of gluten in foods intended for coeliac patients.

Acknowledgements

SAG thanks the Spanish Government for a predoctoral FPI grant. This work was financed by Spanish Government Project CTQ2012-31157, and the European Regional Development Fund.

TABLES

Table 1: Samples extracted with ethanol 60 % and analysed with Gli4 aptamer. They were compared with a G12 method carried out by the external laboratory

Sample	Gli 4 method (ppm gluten)	External Laboratory I (ppm gluten)
Millet flour	16 ± 2	15
Quinoa	76 ± 24	40
Maize flour	35 ± 20	Negative
Rice flour	< LOD	Negative
Chamtor sample	36 ± 25	Negative
Almond flour	116 ± 65	Negative
Liquid sample A	12 ± 1	Negative
Liquid sample B	30 ± 13	Positive
Liquid sample C	1 ± 0.6	Positive
Liquid sample G	35 ± 7	Positive
Liquid sample H	16 ± 5	Positive

Table 2: Analysis of liquid hydrolysed samples by the Gli 1 based competitive method and comparison with the values provided by the external laboratory.

Sample	Competitive Gli 1 (ppm gluten)	External Laboratory I
Wheat beer (Paulaner)	224 ± 5	Positive
Liquid sample D	46 ± 6	Dubious
Liquid sample E	92 ± 29	Positive
Spanish beer (Cruzcampo)	130 ± 27	Positive
Liquid sample F	130 ± 28	Positive
Daura Beer (gluten free)	113 ± 36	Negative

Table 3: Samples analysed with the assay using Gli 4 aptamer after two different extraction protocols and compared with R5 method carried out by two independent laboratories.

Sample	ethanol extraction (ppm gluten)	cocktail extraction (ppm gluten)	Lab II (ppm gluten)	Lab III (ppm gluten)
Cake	>100	>100	78	>80
Fixamyl	8 ± 3	30	7	13.3 ± 1.1
Capuccino	23 ± 3	50	<5	<5
Rolled oats	63 ± 9	97 ± 9	77	>80
Corn flakes 2	34	58 ± 4	38	18.1 ± 1.3
Dessert Chocolate	11	<LD	13	<5
Fit snack	81 ± 8	90	77	>80
Vanilla cream	<6	<LD	<5	<5
Corn flakes 1	13	34 ± 7	17	30.8 ± 1.9
Panna Cotta	6 ± 1	<LD	<5	<5

CAPTION FOR THE FIGURES

Figure 1: Schematic representation of the competitive aptamer-based assay for gliadin determination.

Figure 2: Binding curves of aptamers Gli 4 and Gli 1 to 33-mer-modified magnetic beads.

Figure 3: Calibration curves for the competitive assay: (A) using Gli 1 (•, dotted line) and Gli 4 (□, solid line) aptamers with PWG gliadin as a standard (B) using Gli 1 aptamer with PWG gliadin (□, solid line) and 33-mer peptide (•, dotted line) as standards.

Figure 4: Response of the competitive assay expressed as percentage of the maximum signal obtained in the absence of protein to different toxic prolamins from wheat (◆), rye (■), barley (•), and oats (□) using (A) Gli 1 and (B) Gli 4 aptamers.

REFERENCES

1. Rostom A, Murray JA, Kagnoff MF (2006) American Gastroenterological Association (AGA) institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology* 131 (6):1981-2002.
2. Commission Implementing Regulation (EU) 828/2014 (2014). L228:5-8.
3. Schofield JD, Bottomley RC, Timms MF, Booth MR (1983) The effect of heat on wheat gluten and the involvement of sulfhydryl-disulfide interchange reactions. *Journal of Cereal Science* 1 (4):241-253.
4. Mena M, Lombardia M, Hernando A, Mendez E, Albar J (2012) Comprehensive analysis of gluten in processed foods using a new extraction method and a competitive ELISA based on the R5 antibody. *Talanta* 91:33-40.
5. Garcia E, Llorente M, Hernando A, Kieffer R, Wieser H, Mendez E (2005) Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17 (5):529-539.
6. Tye-Din JA, Stewart JA, Dromey JA, Beissbarth T, van Heel DA, Tatham A, Henderson K, Mannering SI, Gianfrani C, Jewell DP, Hill AVS, McCluskey J, Rossjohn J, Anderson RP (2010) Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease. *Sci Transl Med* 2 (41):41-51.
7. Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C (2002) Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 297 (5590):2275-2279.

8. Anderson RP, Degano P, Godkin AJ, Jewell DP, Hill AVS (2000) In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med* 6 (3):337-342.
9. Skeritt JH, Hill AS (1990) Monoclonal-antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods. *J Agric Food Chem* 38 (8):1771-1778.
10. Valdes I, Garcia E, Llorente M, Mendez E (2003) Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 15 (5):465-474.
11. Moron B, Cebolla A, Manyani H, Alvarez-Maqueda M, Megias M, Thomas MdC, Lopez MC, Sousa C (2008) Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. *Am J Clin Nutr* 87 (2):405-414.
12. Spaenij-Dekking EHA, Kooy-Winkelaar EMC, Nieuwenhuizen WF, Drijfhout JW, Koning F (2004) A novel and sensitive method for the detection of T cell stimulatory epitopes of alpha/beta- and gamma-gliadin. *Gut* 53 (9):1267-1273.
13. Haas-Lauterbach S, Immer U, Richter M, Koehler P (2012) Gluten Fragment Detection with a Competitive ELISA. *J AOAC Int* 95 (2):377-381.
14. Dona VV, Fossati CA, Chirido FG (2008) Interference of denaturing and reducing agents on the antigen/antibody interaction. Impact on the performance of quantitative immunoassays in gliadin analysis. *Eur Food Res Technol* 226 (3):591-602.

15. Amaya-González S, de-los-Santos-Álvarez N, Miranda-Ordieres AJ, Jesus Lobo-Castañón M (2014) Aptamer binding to celiac disease-triggering hydrophobic proteins: a sensitive gluten detection approach. *Anal Chem* 86 (5):2733-2739.
16. van Eckert R, Berghofer E, Ciclitira P, Chirido F, Denery-Papini S, Ellis H, Ferranti P, Goodwin P, Immer U, Mamone G, Mendez E, Mothes T, Novalin S, Osman A, Rumbo M, Stern M, Thorell L, Whim A, Wieser H (2006) Towards a new gliadin reference material-isolation and characterisation. *Journal of Cereal Science* 43 (3):331-341.
17. Gessendorfer B, Koehler P, Wieser H (2009) Preparation and characterization of enzymatically hydrolyzed prolamins from wheat, rye, and barley as references for the immunochemical quantitation of partially hydrolyzed gluten. *Anal Bioanal Chem* 395 (6):1721-1728.
18. Wieser H, Koehler P (2009) Is the calculation of the gluten content by multiplying the prolamins content by a factor of 2 valid? *Eur Food Res Technol* 229 (1):9-13.
19. Redondo MCB, Griffin PB, Ransanz MG, Ellis HJ, Ciclitira PJ, O'Sullivan CK (2005) Monoclonal antibody-based competitive assay for the sensitive detection of coeliac disease toxic prolamins. *Anal Chim Acta* 551 (1-2):105-114.
20. Amaya-González S, de-los-Santos-Álvarez N, Jesus Lobo-Castañón M, Miranda-Ordieres AJ, Tuñón-Blanco P (2011) Amperometric quantification of gluten in food samples using an ELISA competitive assay and flow injection analysis. *Electroanalysis* 23 (1):108-114.

21. Laube T, Kergaravat SV, Fabiano SN, Hernandez SR, Alegret S, Pividori MI (2011) Magneto immunosensor for gliadin detection in gluten-free foodstuff: Towards food safety for celiac patients. *Biosens Bioelectron* 27 (1):46-52.
22. Amaya-González S, López-López L, Miranda-Castro R, de-los-Santos-Álvarez N, Miranda-Ordieres AJ, Lobo-Castañón MJ (2015) Affinity of aptamers binding 33-mer gliadin peptide and gluten proteins: Influence of immobilization and labeling tags. *Anal Chim Acta* In Press:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.1002.1053>.
23. Osman AA, Uhlig HH, Valdes I, Amin M, Mendez E, Mothes T (2001) A monoclonal antibody that recognizes a potential toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13 (10):1189-1193.
24. Fric P, Gabrovská D, Nevoral J (2011) Celiac disease, gluten-free diet, and oats. *Nutr Rev* 69 (2):107-115.
25. Real A, Comino I, de Lorenzo L, Merchan F, Gil-Humanes J, Gimenez MJ, Angel Lopez-Casado M, Isabel Torres M, Cebolla A, Sousa C, Barro F, Piston F (2012) Molecular and immunological characterization of gluten proteins isolated from oat cultivars that differ in toxicity for celiac disease. *PLoS One* 7 (12):e48365.
26. Moron B, Bethune MT, Comino I, Manyani H, Ferragud M, Lopez MC, Cebolla A, Khosla C, Sousa C (2008) Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide. *PLoS One* 3 (5):e2294.
27. Real A, Comino I, de Lourdes Moreno M, Angel Lopez-Casado M, Lorite P, Isabel Torres M, Cebolla A, Sousa C (2014) Identification and in vitro reactivity of celiac immunoactive peptides in an apparent gluten-free beer. *PLoS One* 9 (6):e100917.

FIGURE 1

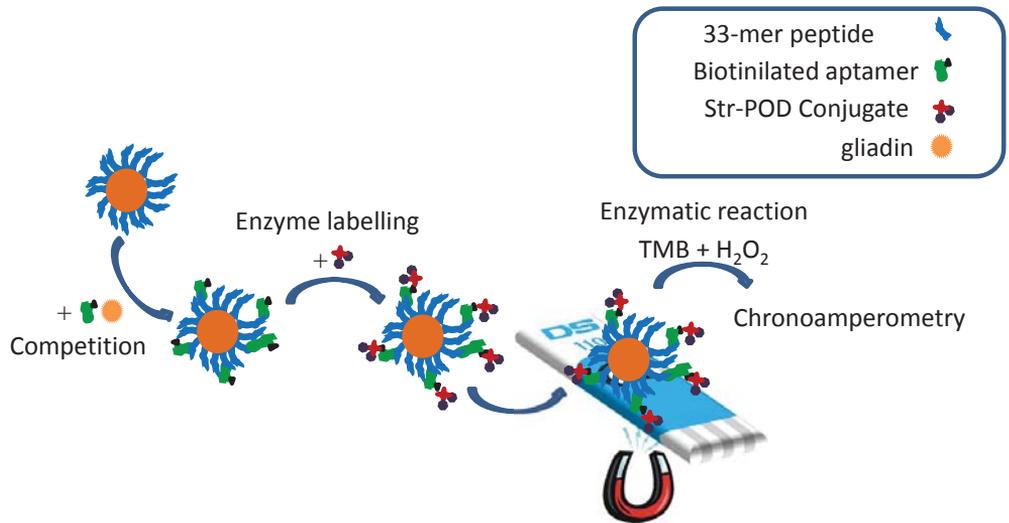


FIGURE 2

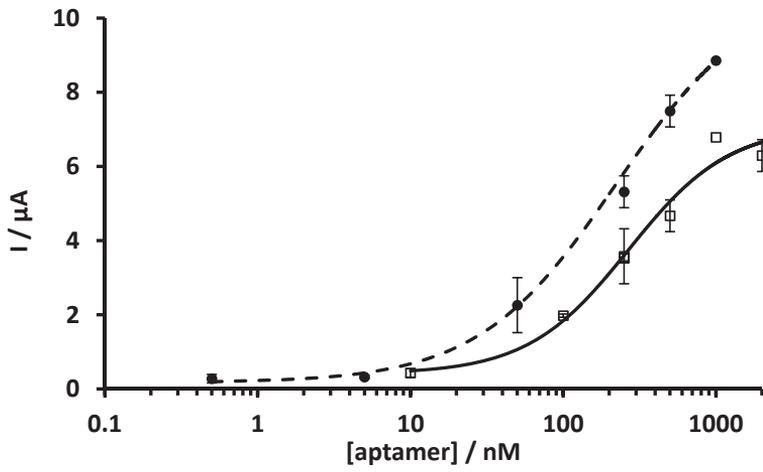


FIGURE 3

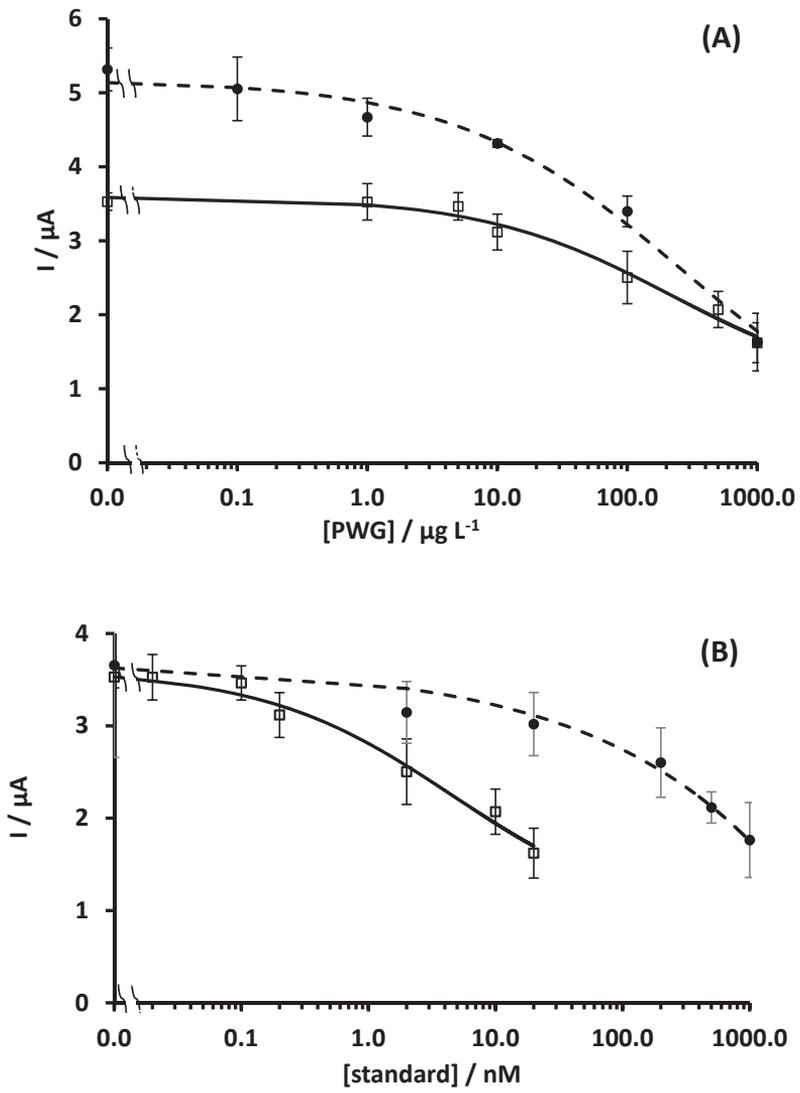
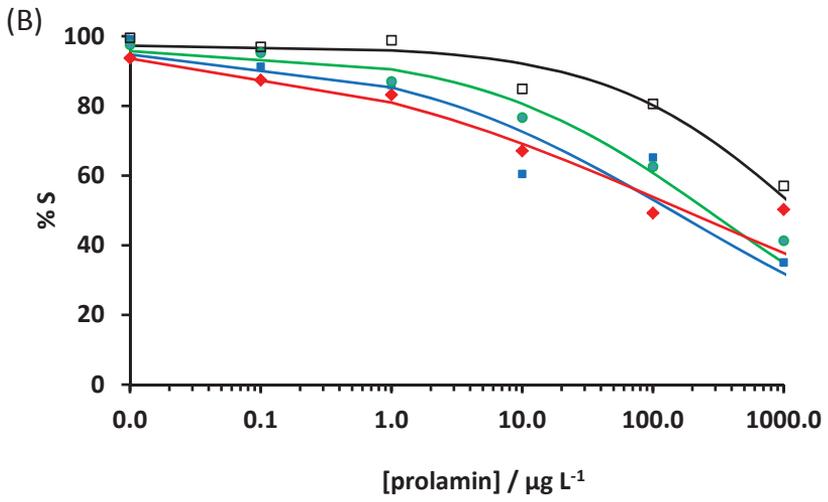
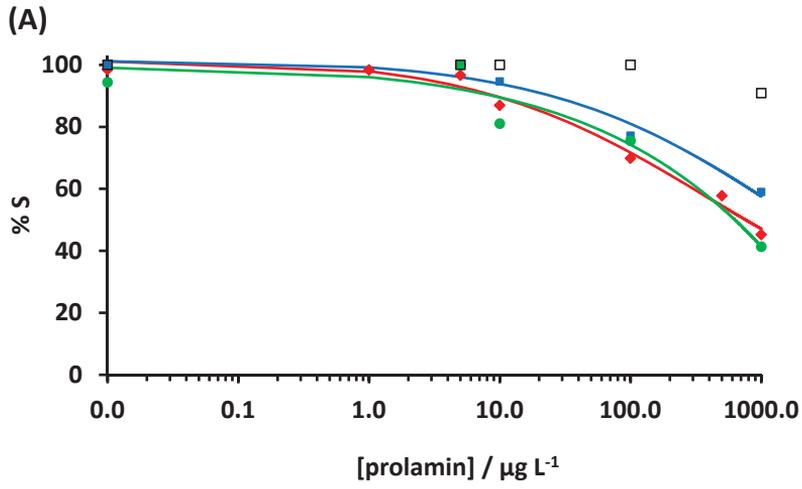


FIGURE 4



**Patente: Aptámeros específicos contra el
gluten y método de detección del gluten
asociado**

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 436 861**

21) Número de solicitud: 201200600

51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22) Fecha de presentación:

31.05.2012

43) Fecha de publicación de la solicitud:

07.01.2014

Fecha de la concesión:

21.04.2014

45) Fecha de publicación de la concesión:

28.04.2014

73) Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO (100.0%)
C/ San Francisco 3
33003 Oviedo (Asturias) ES**

72) Inventor/es:

**DE LOS SANTOS ÁLVAREZ, Noemi;
AMAYA GONZÁLEZ, Sonia;
MIRANDA ORDIERES, Arturo J. y
LOBO CASTAÑÓN, María Jesús**

54) Título: **Aptámeros específicos contra el gluten y método de detección del gluten asociado**

57) Resumen:

Aptámeros específicos contra el gluten y método de detección del gluten asociado.

La presente invención se refiere a unas moléculas de ADN de cadena sencilla, también denominadas aptámeros, capaces de reconocer y unirse específicamente al gluten, a un método de reconocimiento, captura y/o detección de gluten que emplea dichos aptámeros y a un kit que comprende dichos aptámeros.

ES 2 436 861 B2

DESCRIPCIÓN

**APTÁMEROS ESPECÍFICOS CONTRA EL GLUTEN Y MÉTODO DE
DETECCIÓN DEL GLUTEN ASOCIADO**

DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se refiere a unas moléculas de ADN de cadena sencilla, también denominadas aptámeros, capaces de reconocer y unirse específicamente al gluten, y a un método de reconocimiento, captura y/o detección de gluten que emplea dichos aptámeros. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de la biotecnología.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

La enfermedad celiaca es una enfermedad autoinmune de origen genético, que se caracteriza por un proceso inflamatorio permanente del intestino delgado inducido por la ingestión de las proteínas de almacenamiento (gluten) del trigo (todas las especies denominadas *Triticum* como el trigo duro, espelta y kamut), la cebada, el centeno, sus variedades híbridas y probablemente la avena. Según los datos actuales esta enfermedad tiene una prevalencia de aproximadamente el 1 por 100 de la población (S.K. Lee et al. 2006 Curr Opin Rheumatol 18, 101-107). La única terapia efectiva conocida se basa en seguir una dieta exenta de gluten de por vida, lo cual resulta complejo y costoso dado el uso masivo de estos cereales en la alimentación actual. Aunque la relación causal entre la ingesta de gluten y la enfermedad celiaca está perfectamente establecida, no está definida la relación entre la cantidad de gluten ingerida y la gravedad de las manifestaciones clínicas. La variación individual así como la heterogeneidad clínica de los pacientes supone un problema para establecer valores umbral que permitan la protección de todos los individuos susceptibles, ya que incluso trazas de alimentos contaminados con gluten pueden ser perjudiciales para algunos celíacos.

25
30

Para satisfacer las necesidades de este sector de la población, la industria alimentaria ha desarrollado una gama de productos con limitadas cantidades de

gluten, ya que su supresión total en cereales que lo contienen naturalmente es técnicamente difícil y costosa. Además, existen otros productos que, aunque no contienen gluten de forma natural, pueden resultar contaminados durante su recolección, almacenamiento, procesamiento y/o transporte. La Unión Europea ha

5 homogeneizado las normas sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios destinados a este colectivo, basándose en las más recientes directrices de la Comisión del *Codex Alimentarius (Codex Alimentarius ALINORM 08/31/REP, Appendix VII, p 107)*, que indican un umbral de 20 ppm para

10 alimentos denominados “exentos de gluten”, con el fin de que encuentren alimentos adaptados a sus necesidades y nivel de sensibilidad.

Este valor es un compromiso entre la detectabilidad que alcanzan los métodos analíticos actuales basados en ensayos de afinidad con anticuerpos marcados con enzimas y la capacidad tecnológica para reducir la contaminación sin

15 aumentar los costes económicos y medioambientales. Desafortunadamente, este valor no es suficientemente seguro para muchos enfermos celíacos. En 1999, la Federación de Asociaciones de Celíacos de España (FACE) creó la marca de garantía “Controlado por FACE” para aquellos productos que garanticen un valor máximo de 10 ppm, valor muy próximo a los límites de detección de los métodos

20 actuales.

Los métodos de análisis del gluten se basan en la detección directa de la proteína alergénica. El gluten está formado por cientos de proteínas caracterizadas por su alto contenido en prolina y glutamina y bajos contenidos en aminoácidos con

25 cadenas laterales cargadas. Tradicionalmente se subdivide en dos grandes fracciones según su solubilidad en alcohol:agua (60%): las solubles prolaminas (gliadina en trigo, hordeína en cebada, secalina en centeno, avenina en avena) y las insolubles gluteninas. Se han identificado diversos fragmentos tóxicos o inmunogénicos en las prolaminas que son resistentes a la digestión por proteasas

30 humanas (R. Cicciocioppo et al. 2005 Clin Exp Immunol 140, 408-416), aunque estudios recientes apuntan a que las gluteninas también son tóxicas (D.H. Dewar et al. 2006 Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 18, 483-491). Shan et al. identificaron

un péptido de 33 aminoácidos en la α -2-gliadina (L. Shan et al. 2002 Science 297, 2275-2279) que resultó ser inmunodominante (L. Shan et al. 2005 J Proteome Res 4, 1732-1741). Hoy en día, los métodos estándar para la detección de gluten se basan en ensayos tipo ELISA, empleando diferentes anticuerpos que reconocen
5 diferentes epítomos de las prolaminas. Sin embargo, los resultados obtenidos dependen fuertemente del anticuerpo así como del material de referencia empleado (R. van Eckert et al. 2010 J. Cereal Sci. 51, 198-204). El anticuerpo denominado MAb 401.21 desarrollado en 1990 por Skerritt (J.H. Skerritt et al. 1990 J. Agric. Food Chem. 38, 1771-1778) y descrito en la patente australiana
10 AU572955, se comercializa en un ensayo tipo sándwich aprobado por la AOAC International (*"the scientific association dedicated to analytical excellence"*), (J.H. Skerritt et al. 1991 J. AOAC 74, 257-264) descrito en las solicitudes de patente GB2207921, CA1294903 y AU1891788, aunque no es capaz de cuantificar hordeínas (detecta sólo un 4-5%), subestima el trigo duro y sobreestima el triticale
15 y las secalinas (T. Thompson et al. 2008 J. Am. Diet. Assoc. 108, 1682-1687). Tampoco detecta gluten parcialmente hidrolizado debido al formato tipo sándwich. Estudios recientes muestran que también reacciona contra gluteninas (R. van Eckert et al. 2010 J. Cereal Sci. 51, 198-204). Posteriormente se ha desarrollado el anticuerpo denominado R5, que reconoce el epítomo potencialmente tóxico
20 QQPFP y otras secuencias similares presentes en las prolaminas, incluido el 33-mer (L. Sorell et al. Febs Lett 439, 46-50; I. Valdes et al. 2003 Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 15, 465-474). El ensayo sándwich con el R5 ha sido designado como método tipo I por el Comité de métodos de análisis y muestreo del Codex Alimentarius (Codex Alimentarius ALINORM 06/29/23, Appendix II, p.
25 40) y permite la detección de gluten en muestras naturales o procesadas con calor, previa extracción con una disolución que contiene reductores para eliminar los puentes disulfuro intercatenarios que se forman tras el calentamiento (E. Garcia et al. 2005 Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 17, 529-539) descrita en la patente española con número de publicación ES2182698 y familia de patentes
30 (EP1424345, US7585529). Sin embargo, este método no sirve para medir las prolaminas hidrolizadas. Se han desarrollado otros anticuerpos como el PN3 (H.J. Ellis et al. 1998 Gut 43, 190-195), el CDC5 (H.M. Nassef et al. 2008 Anal. Chem.

80, 9265-9271) y el G12 (B. Moron et al. 2008 Am. J. Clin. Nutr. 87 405-414; B. Moron et al. 2008 Plos One 3) contra los epítomos tóxicos o inmunogénicos comprendidos entre los aminoácidos 31-49, 56-75 y 57-89 de la α -gliadina, respectivamente.

5

Con el fin de detectar el gluten hidrolizado, se han propuesto ensayos competitivos, que requieren un único epítomo, y que han sido comercializados usando los anticuerpos R5 descritos en la patente española con número de publicación ES2304874 (ver también WO2008110655) y G12. Sin embargo, estos
10 métodos no son compatibles con el procedimiento de extracción anteriormente citado debido a que desnaturalizan los anticuerpos y marcadores enzimáticos durante la inevitable incubación entre la muestra y el único anticuerpo de detección usado.

15 Los aptámeros son un tipo de receptor molecular no proteico, son estables térmica y químicamente en condiciones extremas y, por tanto, constituyen una alternativa prometedora respecto a los anticuerpos. Los aptámeros son oligonucleótidos que se seleccionan *in vitro* mediante un método combinatorio denominado SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento
20 exponencial) y se caracterizan por presentar una gran afinidad y especificidad hacia un ligando determinado (A.D. Ellington et al. 1990 Nature 346, 818-822; C. Tuerk et al. 1990 Science 249, 505-510). La presencia del ligando puede inducir un cambio conformacional en el oligonucleótido que permite el reconocimiento molecular. Una vez conocida la secuencia del oligonucleótido, su síntesis es
25 química (no requiere el uso de animales), muy reproducible y barata.

El procedimiento SELEX consiste en encontrar la secuencia de mayor afinidad por un ligando en las condiciones experimentales deseadas entre la mayor cantidad posible de hebras diferentes ($\sim 10^{13}$ - 10^{15}) mediante un sistema iterativo de puesta
30 en contacto entre las hebras de ácido nucleico y el ligando, separación de las hebras con afinidad por el ligando y amplificación por PCR de las mismas. La selección de aptámeros contra proteínas se suele realizar empleando como diana

- la proteína completa. Sin embargo, la obtención de aptámeros contra epítopos específicos de proteínas es también posible siguiendo varias estrategias (A.V. Kulbachinsky et al. 2007 *Biochemistry-Moscow* 72, 1505-1518). Una de ellas consiste en emplear la secuencia peptídica específica, mucho más corta que la
- 5 proteína completa. Se ha demostrado que los aptámeros así obtenidos son capaces de reconocer el péptido dentro de la proteína completa (D. Proske et al. 2002 *Chembiochem* 3, 717-725), aunque en algunos casos con menor afinidad (W. Xu et al. 1996 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7475-7480).
- 10 Aunque a priori podría pensarse que la selección de aptámeros es posible para cualquier ligando, hay una serie de prerequisites para tener altas probabilidades de encontrar un aptámero de alta afinidad y especificidad. Ligandos con grupos cargados positivamente, capaces de formar puentes de hidrógeno o estructuras aromáticas planas, son más favorables que los que tienen grupos cargados
- 15 negativamente y, especialmente, que los que tienen una fuerte naturaleza hidrofóbica (R. Stoltenburg et al. 2007 *Biomolecular Engineering* 24, 381-403). Aunque el reconocimiento del ARN/ADN de estructuras hidrofóbicas es conocido, es bastante raro (B.A. Gilbert et al. 1997 *Bioorgan Med Chem* 5, 1115-1122). La estrategia para facilitar la interacción de ácidos nucleicos con moléculas
- 20 hidrofóbicas podría ser el uso de nucleótidos modificados con grupos que le confieran hidrofobicidad, compatibles con las enzimas de amplificación (S.D. Jayasena 1999 *Clin. Chem.* 45, 1628-1650). Por tanto, no es evidente que la selección de aptámeros contra ligandos muy hidrofóbicos, como el péptido 33-mer empleado en esta invención, usando nucleótidos no modificados con grupos
- 25 hidrofóbicos, dé lugar a secuencias consenso de alta afinidad.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- La presente invención se refiere en un primer aspecto a una molécula de ADN de
- 30 cadena sencilla caracterizada por que dicha molécula reconoce y se une específicamente al gluten.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la detección de gluten caracterizado por que comprende una molécula de ADN de cadena sencilla del primer aspecto de la invención.

- 5 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un uso de la molécula de ADN de cadena sencilla del primer aspecto de la invención o del kit del segundo aspecto de la invención, para la detección del gluten.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método de detección
10 del gluten basado en la molécula de ADN de cadena sencilla del primer aspecto de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 15 La presente invención supone una solución a la necesidad de detectar la presencia de gluten en muestras de productos alimentarios o de otro tipo que puedan provocar intolerancia en individuos celíacos.

Los inventores de la presente invención han demostrado la utilidad de unas
20 secuencias de ADN de cadena sencilla, también llamados aptámeros, capaces de unir específicamente gluten, para la separación y/o detección de esta proteína.

Una ventaja de la presente invención es que los aptámeros son moléculas que pueden ser modificadas fácilmente para unirlas a moléculas marcadoras, a
25 diferencia de los anticuerpos, y por tanto presentan una alta versatilidad a la hora de su detección. Además, los aptámeros son moléculas altamente estables, lo cual supone una gran ventaja a la hora de desarrollar ensayos *in vitro* para la detección del gluten. Es importante resaltar que los aptámeros son también mucho más baratos y fáciles de sintetizar que los anticuerpos, que son las
30 moléculas usadas actualmente para la detección del gluten.

La presente invención permite la detección de gluten a nivel de trazas, concretamente menos de 50 ppb (partes por billón) de gliadina patrón PWG pueden ser detectadas con seguridad.

- 5 Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ADN de cadena sencilla caracterizada por que dicha molécula reconoce y se une específicamente al gluten. Preferiblemente, dicho gluten es de trigo, cebada, centeno o avena. Más preferiblemente, dicho gluten es de trigo.
- 10 La expresión "molécula de ADN de cadena sencilla", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una única hebra de nucleótidos unidos, que a su vez están compuestos cada uno de ellos por un azúcar, una base nitrogenada y un grupo fosfato. A diferencia del ADN que se presenta como una doble cadena de nucleótidos, en la que las dos hebras están unidas entre sí por unas
- 15 conexiones denominadas puentes de hidrógeno, el ADN de cadena sencilla presenta una única hebra. En la presente descripción, la expresión "molécula de ADN de cadena sencilla" y el término "aptámero" se usan indistintamente.

La expresión "reconoce y se une específicamente", tal y como se emplea en la

20 presente descripción, se refiere a la capacidad de los aptámeros de la presente invención de interactuar con el gluten de manera específica, es decir, de unirse con una determinada afinidad a dicha proteína y de no unirse a otras. Esta capacidad de los aptámeros de la invención de reconocer y unirse específicamente a gluten es similar a la de los anticuerpos.

25

En la presente descripción, se entiende por gluten una proteína amorfa que se encuentra en la semilla de algunos cereales, como el trigo, el centeno, la cebada y la avena, combinada con almidón. El gluten representa un 80% de las proteínas del trigo. Cuando la harina de uno de estos cereales se mezcla con agua, dos

30 proteínas del grano pertenecientes al grupo de las prolaminas, las gliadinas y las gluteninas, se unen para formar una red proteica llamada gluten. Esta proteína genera en una pequeña parte de la población una enfermedad llamada celiaquía,

- en la cual el sistema inmunológico responde dañando el intestino delgado de las personas que la ingieren al no poder digerirla. La gliadina parece ser la proteína que presenta el mayor problema en la enfermedad celiaca o intolerancia al gluten, es modificada por la transglutaminasa y presentada por el alelo DQ2 del complejo mayor de histocompatibilidad. Esto hace que cada vez que se consuma un alimento con gluten se produzca una reacción inmunológica que deteriora progresivamente el intestino, pudiéndose además complicar con episodios de dermatitis herpetiforme y otras patologías neurológicas, reumáticas, etc.
- 5
- 10 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula de ADN de cadena sencilla reconoce y se une específicamente a gliadina, hordeína, secalina o avenina. Preferiblemente, la molécula de ADN de cadena sencilla reconoce y se une específicamente a gliadina. Los autores de la presente invención han demostrado la capacidad de los aptámeros de la presente
- 15 invención de reconocer y unir específicamente gliadina, como muestra el ejemplo 5 y la figura 4B.

El término "gliadina", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una prolamina que forma parte de la porción proteica del gluten (soluble en etanol) de las semillas del trigo. Las prolaminas son proteínas que poseen grandes cantidades de prolina y ácido glutámico. Existen homólogos de la gliadina en la cebada (hordeína), el centeno (secalina) y algunas variedades de avena (avenina), lo que explica que dichos cereales puedan también provocar la enfermedad celiaca.

25

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula de ADN de cadena sencilla es incapaz de reconocer y unir específicamente proteínas de maíz, soja o arroz. Preferiblemente, la molécula de ADN de cadena sencilla es incapaz de reconocer y unir específicamente proteínas de arroz. Los autores de la presente invención han demostrado que los aptámeros de la presente invención son incapaces de unir y detectar proteínas de arroz, lo cual implica la ventaja de

30

que no van a dar resultados de falsos positivos en ensayos de detección de gluten.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula de
5 ADN de cadena sencilla reconoce y se une específicamente a un péptido que
comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1. El péptido con SEQ ID NO:
1 es el conocido como péptido 33-mer. En la presente descripción, se entiende
por péptido 33-mer un péptido de la α -gliadina de trigo, que es resistente a
10 proteasas y que se ha considerado como el iniciador primario de la respuesta
inflamatoria al gluten en los enfermos celíacos. Así, se ha demostrado mediante
ensayos *in vitro* que el péptido 33-mer es el péptido del gluten más bioactivo
(inmunodominante) que es reconocido por células T procedentes de donantes
celíacos HLA-DQ2⁺. En la presente invención el péptido 33-mer se ha elegido
15 como diana para la evolución de las moléculas de ADN de cadena sencilla
(aptámeros), concretamente la secuencia entre los aminoácidos 57 y 89 de la
gliadina, que corresponde a SEQ ID NO: 1.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula de
ADN de cadena sencilla comprende la secuencia nucleotídica X-GTCT-Y, donde
20 X comprende entre 3 y 29 nucleótidos e Y comprende entre 7 y 33 nucleótidos.
Preferiblemente, la molécula de ADN de cadena sencilla comprende una
secuencia nucleotídica que se selecciona de entre SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3,
SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ
ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10. Preferiblemente, dicha molécula se une a la secuencia
25 aminoacídica SEQ ID NO: 1 con una constante de disociación K_D igual o menor
de 55 nM.

En la presente descripción, se entiende por constante de disociación K_D una
constante que mide la afinidad con la que un ligando, en la presente invención la
30 molécula de ADN de cadena sencilla, se une a una proteína, en la presente
invención el gluten. La afinidad ligando-proteína depende de interacciones
intermoleculares no covalentes entre dos moléculas como puentes de hidrógeno,

interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals e hidrofóbicas. Cuanto menor sea la K_D , mayor será la afinidad con la que el aptámero se una al gluten.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula de
5 ADN de cadena sencilla comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula de ADN de cadena sencilla comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 7.

10 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula de ADN de cadena sencilla comprende además una molécula marcadora. Preferiblemente, la molécula marcadora se selecciona de entre un fluoróforo, una enzima, un péptido, una nanopartícula, una molécula electroactiva, una digoxigenina y una biotina.

15

En la presente descripción, se entiende por molécula marcadora una molécula fácilmente detectable mediante distintos métodos, que puede por ejemplo tener receptores específicos o puede ser una enzima que cataliza una reacción detectable directa o indirectamente tras la adición de los correspondientes
20 sustratos para la detección de la molécula de ADN de cadena sencilla de interés.

El término "fluoróforo", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un compuesto químico fluorescente que emite luz tras su excitación. Un fluoróforo unido a la molécula de ADN de cadena sencilla de interés permite por lo
25 tanto su detección. En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el fluoróforo se selecciona de entre fluoresceína, boro-dipirrometeno, cianina, naftaleno y rodamina y cualquiera de sus derivados.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la enzima se
30 selecciona de entre peroxidasa, fosfatasa alcalina, DNAsimas y NADH deshidrogenasas.

El término "DNAzimas", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a ácidos nucleicos con actividad catalítica que pueden generar con dicha actividad un marcaje detectable asociado a la presencia de dicha DNAzima.

- 5 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el péptido se selecciona de entre una polihistidina, un epítipo myc y un epítipo FLAG. Una polihistidina es un péptido de entre 2 y 12 histidinas, preferiblemente de 6 histidinas. Un epítipo myc es un péptido de 10 aminoácidos derivado del gen c-myc y que por ser altamente inmunogénico es fácilmente detectable mediante anticuerpos, como por ejemplo el anticuerpo monoclonal llamada 9E10 del *Developmental Studies Hybridoma Bank*. Un epítipo FLAG es un octapéptido que también es altamente inmunogénico y por tanto fácilmente detectable mediante anticuerpos. Ambos epítipos son bien conocidos en el estado de la técnica.
- 10
- 15 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la nanopartícula se selecciona de entre una nanopartícula metálica, nanopartícula semiconductor y micro o nanopartícula magnética.

El término "nanopartícula metálica", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un nanoobjeto con sus tres dimensiones en la nanoescala (entre 1 y 100 nm), formada por oro, plata, platino u otros metales, que unida a la molécula de ADN de cadena sencilla de interés permite su detección a través de sus propiedades ópticas, electroquímicas o catalíticas.

20

25 El término "inmovilizado", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a que el péptido 33-mer, la proteína inmunógena o la molécula de ADN de cadena sencilla de la invención pueden estar unidos a un soporte sin perder su actividad. El soporte puede ser la superficie de una placa de microtitulación, superficies de materiales conductores, micro y nanopartículas magnéticas, soportes de vidrio, partículas de látex, nanotubos de carbono, entre otras.

30

El término “nanopartícula semiconductor”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un nanoobjeto con sus tres dimensiones en la nanoescala de material semiconductor, como por ejemplo sulfuros, seleniuros y telururos de Cd, Zn o Pb, que unido a la molécula de ADN de cadena sencilla de
5 interés permite su detección mediante sus propiedades ópticas o electroquímicas.

El término “micro o nanopartícula magnética”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una partícula microscópica con propiedades magnéticas, que unida a la molécula de ADN de cadena sencilla de interés permite su
10 detección mediante el cambio en las propiedades ópticas que tienen lugar tras la unión entre la proteína y la cadena de ADN así marcada. En la presente invención dicha nanopartícula se utiliza para la detección como molécula marcadora y también como soporte sólido para la inmovilización de la molécula de ADN de cadena sencilla, del péptido 33-mer o de la proteína inmunógena (gliadina o
15 gluten).

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula electroactiva se selecciona de entre azul de metileno, ferroceno, antraquinona y tionina, y cualquiera de sus derivados, entre otras.
20

El término molécula electroactiva, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una molécula que puede oxidarse o reducirse dentro de la ventana de potencial de un material electródico y que, por tanto, su presencia puede ser detectada mediante técnicas electroquímicas faradaicas bien conocidas
25 en el estado de la técnica.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula marcadora es biotina. La biotina es también conocida como vitamina H y es una molécula muy usada en biotecnología para marcar otras moléculas, por lo que se
30 conoce como biotinilación. Las proteínas avidina y estreptavidina se unen con una altísima afinidad y especificidad a la biotina, por lo que dicha molécula es un buen marcador.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula marcadora es digoxigenina. La digoxigenina es un hapteno y puede conjugarse a las moléculas de ADN de cadena sencilla de la presente invención como
5 marcador de las mismas, ya que puede ser detectado fácilmente mediante anticuerpos específicos anti-digoxigenina.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula de ADN de cadena sencilla comprende un cebador en cada uno de sus extremos
10 para su detección mediante PCR.

En la presente descripción, se entiende por cebador una cadena de ácido nucleico que sirve como punto de partida para la amplificación de ADN. Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3' hidroxilo libre que
15 forma pares de bases complementarios a la hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar y amplificar la hebra molde. En la presente invención los cebadores se unen a los extremos de la molécula de ADN de cadena sencilla para su amplificación y detección mediante PCR. Los cebadores pueden estar marcados con biotina o el fluoróforo 6-
20 carboxilfluoresceína (6-FAM), o sin marcar.

En la presente descripción, se entiende por PCR la reacción en cadena de la polimerasa. Es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo.
25 Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de los ADN polimerasas para replicar hebras de ADN partiendo de cebadores que se unen en los extremos de las hebras, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y la unión del cebador y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse las
30 polimerasas para que vuelvan a duplicarlas. En la presente invención la PCR se emplea para la amplificación y posterior detección de la molécula de ADN de cadena sencilla unida al gluten, péptido 33-mer, péptido recombinante 33-mer o

péptido control. Existen varios tipos de PCR como la PCR a tiempo real, PCR-ELISA o PCR-ELOSA. La principal característica de la PCR a tiempo real o cuantitativa es que permite cuantificar la cantidad de ADN presentes en la muestra original o identificar con una muy alta probabilidad, muestras de ADN
5 específicas a partir de su temperatura de fusión. La PCR-ELISA (reacción en cadena de polimerasa – ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) es una técnica híbrida entre PCR y ELISA para la cuantificación de productos de ADN. En este ensayo los productos de PCR están marcados con una biotina y con un hapteno para permitir su captura sobre superficies con (estrept)avidina y posterior
10 cuantificación usando un anticuerpo contra el hapteno conjugado con una enzima. La PCR-ELOSA es una técnica muy similar a la PCR-ELISA, en la que los productos de PCR sólo están marcados con el hapteno, de manera que se hibridan con una sonda de captura inmovilizada y se cuantifica mediante la utilización de un anticuerpo contra dicho hapteno conjugado con un enzima.

15

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, al menos un enlace fosfodiéster de la molécula de ADN de cadena sencilla contiene al menos un oxígeno (O) sustituido por un azufre (S).

20 La expresión “enlace fosfodiéster”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un enlace covalente que se produce entre un grupo hidroxilo (OH⁻) en el carbono 3' y un grupo fosfato (PO₄³⁻) en el carbono 5' del azúcar ribosa de los nucleótidos de la molécula de ADN de cadena sencilla, formándose así un doble enlace éster. Para mejorar la resistencia de los
25 aptámeros frente a la degradación por nucleasas, se incluyen en la presente invención aptámeros modificados, en los cuales se ha sustituido al menos uno de los átomos de oxígeno que participan en el enlace fosfodiéster, por un átomo de azufre.

30 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la detección de gluten caracterizado por que comprende al menos una molécula de ADN de cadena sencilla del primer aspecto de la invención. Preferiblemente, dicho kit

además comprende un soporte sólido. Más preferiblemente, la molécula de ADN de cadena sencilla está anclada al soporte sólido. En una realización preferida, el kit comprende al menos dos aptámeros, uno de captura y otro de detección.

- 5 En una realización preferida, el kit además comprende el péptido con SEQ ID NO: 1 o gliadina o gluten, anclado al soporte sólido. Un kit de este tipo permitiría llevar a cabo un ensayo ELISA competitivo, que consistiría en la competición entre el gluten presente en la correspondiente muestra y el péptido SEQ ID NO: 1 inmovilizado sobre soportes sólidos por una cantidad fija y limitada de aptámero
- 10 en disolución previamente marcado y/o modificado como se ha descrito arriba.

Preferiblemente, dicho kit comprende además un anticuerpo que reconoce y se une específicamente a gluten. El gluten tiene varias repeticiones de la SEQ ID NO: 1, es decir, tiene varios sitios de unión por los que tanto los aptámeros de la

15 invención como un anticuerpo específico podrían unirse al mismo tiempo. Por tanto, más de un aptámero o uno o varios aptámeros y uno o varios anticuerpos podrían usarse de manera combinada para la separación y/o detección de gluten.

El kit de la invención pueden comprender además, sin ningún tipo de limitación,

20 anticuerpos primarios conjugados o no conjugados, péptidos, cebadores marcados o sin marcar, tampones, anticuerpos secundarios conjugados, proteínas o péptidos patrones, agentes para prevenir la contaminación, compuestos marcadores, aunque sin limitarnos, fluorocromos, etc. Por otro lado, el kit de la invención puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios

25 para su puesta en marcha y optimización. El kit de la invención pueden contener además otras proteínas o péptidos que sirvan como controles positivos y negativos. Preferiblemente, este kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo la detección y/o cuantificación de la molécula de ADN de cadena sencilla de la invención.

30

El término "anticuerpo", tal como se emplea en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de

moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con la proteína gluten, con alguno de sus fragmentos o con otras moléculas indicadoras utilizadas en el proceso de detección.

5

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un uso de la molécula de ADN de cadena sencilla del primer aspecto de la invención o del kit del segundo aspecto de la invención, para la detección del gluten. Como se demuestra en los ejemplos y figuras de la presente descripción, los aptámeros de la invención han probado ser útiles en la detección específica del gluten.

10

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método de detección del gluten que comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto una molécula de ADN de cadena sencilla del primer aspecto de la invención con una muestra problema; y
- b) detectar la presencia del complejo formado por dicha molécula y el gluten de la muestra problema en la etapa (a).

15

Se entiende por “muestra problema” cualquier muestra, ya sea una muestra alimentaria o de otro tipo, susceptible de contener gluten o fragmentos derivados del gluten que puedan provocar la intolerancia en un individuo celiaco.

20

En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, la etapa (a) se lleva a cabo en disolución.

25

En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, la etapa (a) se lleva a cabo en un soporte sólido.

En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, la etapa (b) se lleva a cabo mediante PCR.

30

En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, la etapa (b) se lleva a cabo mediante un aptaensayo. El término "aptaensayo", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a ensayos de unión donde la molécula receptora que enlaza al gluten es una cadena de ADN sencilla o aptámero de forma completamente análoga a los inmunoensayos donde la molécula receptora es un anticuerpo. Por analogía con los inmunoensayos, en este término se incluyen toda la variedad de formatos conocidos para los inmunoensayos, sin más que sustituir anticuerpo por aptámero.

10 En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, la etapa (b) se lleva a cabo mediante un inmunoensayo. Preferiblemente, dicho inmunoensayo se selecciona de entre *western blot*, *dot blot* o ELISA. Más preferiblemente, dicho inmunoensayo es un ELISA.

15 Los aptámeros de la presente invención pueden ser usados para capturar, concentrar y/o detectar gluten en disolución o anclados sobre superficies sólidas. Por ejemplo, para capturar y/o preconcentrar gluten se podrían usar los aptámeros biotinilados conjugados a un soporte sólido que contenga estreptavidina o alguna de sus variantes (micropartículas magnéticas, placas de microtitulación, etc) que permita su separación de la matriz que contenga el
20 gluten.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos,
25 componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. A) Representación de la concentración de aptámeros de cada ciclo de selección que no se enlazan (gris oscuro) y que se enlazan (gris claro) al péptido con SEQ ID NO: 1 tras su interacción con el mismo durante 10 min en BS (tampón de enlace) obtenidas por fluorescencia. B) Evolución del porcentaje de enriquecimiento en secuencias de ADN de afinidad hacia el péptido con SEQ ID NO: 1 con las sucesivas rondas de selección.

FIG. 2. Estructura secundaria más estable de los aptámeros con A) SEQ ID NO: 2, B) SEQ ID NO: 5, C) SEQ ID NO: 7, D) SEQ ID NO: 8, E) SEQ ID NO: 9 y F) SEQ ID NO: 10, obtenidos mediante el servidor en red (*mfold*) de acceso libre, alojado por "The RNA Institute, College of Arts and Sciences, State University of New York at Albany".

15

FIG. 3. Valoración calorimétrica de 33,4 μ M del aptámero con SEQ ID NO: 2 con 0,338 mM del péptido con SEQ ID NO: 1 en BS (50 mM TRIS pH 7,4+0,25 M NaCl+5 mM MgCl₂) a 15 °C (A) y 35 °C (B). Gráficas superiores: Potencia en función del tiempo obtenida tras cada adición de péptido. Gráficas inferiores: Valores integrados de la variación de calor en cada adición tras la corrección con el calor de dilución.

FIG. 4. Curvas de enlace de los aptámeros con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 a partículas magnéticas modificadas A) con el péptido con SEQ ID NO: 1 B) con el estándar de gliadina PWG (*Prolamin Working Group*).

FIG. 5. Curvas de enlace de los aptámeros con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 a partículas magnéticas modificadas con extractos etanólicos de harina de A) centeno (en porcentaje de fracción enlazada) y B) avena (en intensidad de corriente).

30

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los
5 inventores, que pone de manifiesto la eficacia de los aptámeros de la invención y
del método de detección de gluten de la invención.

Ejemplo 1: Obtención de aptámeros para el péptido con SEQ ID NO: 1 de la α -2-
gliadina.

10

Materiales

La diana seleccionada, el péptido con SEQ ID NO: 1, se obtuvo mediante técnicas
de ADN recombinante. A partir de un oligonucleotido sintético (SEQ ID NO: 20)
obtenido en Sigma-Genosys con la secuencia que codifica para los 33
15 aminoácidos que van desde la posición 57 a la 89 de la gliadina (Gen Bank,
número de acceso AJ133612.1) y los cebadores directo (SEQ ID NO: 11) e
inverso (SEQ ID NO: 12), se obtuvieron múltiples copias por PCR. El péptido
recombinante fue obtenido tras clonar este producto de PCR y expresarlo en el
sistema pETBlue-2, siguiendo las instrucciones del fabricante (Novagen), por el
20 cual se le añade una cola de histidinas. Para la purificación del péptido con la cola
de histidinas (SEQ ID NO: 13) se utilizó una columna HisTrap FF de 1 mL en un
equipo AKTA FPLC (GE Healthcare). Para la contraselección se empleó la cola
de histidinas (péptido control, SEQ ID NO: 14) obtenida con el sistema pETBlue-2.

25 La colección de secuencias de ADN de 80 nucleótidos fue diseñada de forma que
su secuencia general corresponde a la SEQ ID NO: 15. La colección fue
sintetizada y purificada por PAGE por Sigma-Genosys. Las secuencias de los
cebadores empleados en la etapa de amplificación por PCR corresponden a SEQ
ID NO: 16 (cebador directo) y SEQ ID NO: 17 (cebador inverso biotinilado). Para
30 cada ronda se emplearon micropartículas magnéticas (MagneHis™ Ni particles,
de Promega, USA) modificadas con el péptido diana o con el control. El protocolo

de modificación consistió en equilibrar las partículas en tampón de modificación (BM, 100 mM HEPES pH 7,5+10 mM imidazol+0,5 M NaCl). Después se incubaron con péptido con SEQ ID NO: 1 o con péptido control con SEQ ID NO: 14 en concentración comprendida entre 0,25 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en BM durante 15 min con rotación a temperatura ambiente. Tras decantar y lavar 2 veces con BM + 0,01% Tween-20 y 1 vez con tampón de enlace (BS: 50 mM TRIS pH 7,4+0,25 M NaCl+5 mM MgCl_2), las partículas magnéticas modificadas fueron diluidas a 5 pmol de diana/ μL en BS.

10 Procedimiento

Para cada ronda de selección se usaron 250 pmoles de la colección de ADN seleccionada y amplificada en la ronda anterior (1 nmol de la colección inicial en la primera ronda para asegurar una variedad de secuencias de 5×10^{14} - 1×10^{15} moléculas) diluidos en BS. Se calentaron a 98 °C durante 4 min e inmediatamente se enfriaron en hielo otros 4 min. El medio de selección consistió en BS al que se le añadió 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BSA (albúmina de suero bovino) para evitar uniones inespecíficas y un ARN transferente competidor en una concentración 10 veces inferior a la de la colección de ADN. En este medio se pusieron en contacto las moléculas de ADN con una concentración de péptido (péptido con SEQ ID NO: 1 o péptido control con SEQ ID NO: 14 en las contraselecciones) 10 veces inferior a la de ADN para limitar la cantidad de diana y favorecer la competición. Tras un tiempo de incubación que fue disminuyendo progresivamente en las rondas sucesivas según la tabla 1, se hicieron varios lavados en BS+0,01 Tween-20 (ver tabla 1).

25

Finalmente se eluyó el complejo ADN-péptido incubando las partículas en 100 mM HEPES pH 7,5+500 mM imidazol (BME) durante 10 min bajo agitación. El eluato fue transferido a tubos de PCR para proceder a su amplificación. Cada 100 μL de PCR contenía: 2 μL de molde (eluato), 1 μM de cada cebador (SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17), 0,2 mM de dNTP, 3 mM de Mg^{2+} , 1x buffer PCR y 2,8 U de *inmolase DNA polymerase* (Disbiotec). Las condiciones de PCR fueron: incubación inicial a 37 °C durante 10 min, 20 min a 95 °C para activar la enzima y

15 ciclos de 94 °C- 57 °C- 72 °C durante 45 s cada uno. La extensión final fue realizada a 72 °C durante 10 min. La amplificación fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa al 2%. La cuantificación del ADN de cadena doble amplificado se realizó fluorimétricamente con un "MiniFluorímetro" modelo

5 TBS-380 de la casa Turner Biosystems. La obtención de la hebra de ADN de cadena simple se logró usando partículas magnéticas modificadas con estreptavidina (Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1, Life Technologies, Madrid). Estas partículas se pusieron en contacto con el ADN durante 15 min a temperatura ambiente y bajo rotación tras lo cual, se procedió a la separación de

10 las hebras por incubación en NaOH 100 mM durante 10 min bajo agitación. El sobrenadante resultante contiene el ADN de cadena simple que se emplea en la siguiente ronda.

Tabla 1. Condiciones experimentales variables empleadas en las sucesivas

15 rondas de la selección.

Ronda	Contraselección	Tiempo de incubación (min)	Número de lavados
1		60	2
2		60	2
3	si	60	2
4		30	2
5		30	5
6	si	30	5
7		15	5
8		15	10
9	si	15	10
10		15	15

Antes de las rondas 3, 6 y 9 se procedió a hacer una contraselección incubando el ADN de la ronda anterior con partículas magnéticas modificadas con el péptido control con SEQ ID NO: 14 en las mismas condiciones que con el péptido con

20

SEQ ID NO: 1, pero en este caso se desecharon las partículas y se usó el sobrenadante en la correspondiente ronda de selección.

Tras 10 rondas de selección, el 12,8% del ADN seleccionado fue capaz de unirse
5 al péptido recombinante, mientras que no se detectaron secuencias que se uniesen al péptido control. El porcentaje de unión se determinó con alícuotas de cada ciclo amplificadas por PCR en las mismas condiciones experimentales que en cada ciclo salvo que se empleó un cebador directo con SEQ ID NO: 16 marcado con 6-FAM (SEQ ID NO: 18). La hebra marcada con 6-FAM fue
10 separada de la marcada con biotina de manera idéntica a la separación de hebras previa a cada ronda y su concentración fue determinada fluorimétricamente (Biotek Instrument flx800) frente a un calibrado realizado con secuencias aleatorias de ADN-6-FAM de concentración conocida empleando una λ de excitación de 480 nm y una λ de emisión de 528 nm.

15

El ensayo de unión se realizó poniendo en contacto cantidades equimolares de ADN-6-FAM de cada ciclo y péptido recombinante (SEQ ID NO: 13) inmovilizados sobre partículas magnéticas (15 pmoles) durante 10 minutos en BS. La fracción no enlazada se recogió y tras 2 lavados en BS + 0,01% Tween-20, se eluyeron los
20 aptámeros enlazados en BME durante 10 min bajo agitación, obteniendo así la fracción enlazada. Ambas fracciones fueron analizadas fluorimétricamente (figura 1A), observándose una progresiva disminución de la fracción no enlazada con los ciclos simultáneamente a un aumento de la fracción enlazada (figura 1B). Se realizó un ensayo de unión con el péptido control y las secuencias de ADN
25 obtenidas en el ciclo 10. La fluorescencia emitida por la fracción no enlazada fue inferior al límite de detección, lo que indica que no se amplificaron secuencias con afinidad por la cola de histidinas ni por el soporte sólido.

30

Ejemplo 2: Identificación de las aptámeros de ADN obtenidos.

Para identificar los aptámeros con afinidad por el péptido SEQ ID NO: 1 se procedió a amplificar una alícuota del ciclo 10 usando los cebadores no modificados (SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 19) usando las mismas condiciones que en anteriores etapas de amplificación, y se clonó utilizando el sistema pETBlue-1 Acceptor Vector Kit de la casa Novagen. Tras clonarlo se sembraron placas de la cepa huésped (Nova Competent cells, Novagen) y se secuenciaron 25 clones utilizando el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) y un equipo Abi PRISM 3130xl Genetic Analyzer. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el software Chromas Lite 2.01.

10

Se determinó la estructura secundaria de los seis aptámeros SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 usando el servidor en red "mfold" en las condiciones de enlace (25 °C, 250 mM de NaCl y 5 mM de MgCl₂). En la figura 2 y en la tabla 2 se muestra la estructura más estable y las energías libres de Gibbs para cada uno de los aptámeros, respectivamente.

15

Tabla 2. Parámetros termodinámicos de los aptámeros.

Aptámero	ΔG (kcal mol ⁻¹)
SEQ ID NO: 2	-1.24
SEQ ID NO: 5	-3.21
SEQ ID NO: 7	-1.72
SEQ ID NO: 8	-3.06
SEQ ID NO: 9	-2.95
SEQ ID NO: 10	-4.11

20 Ejemplo 3: Caracterización del aptámero SEQ ID NO: 2.

El aptámero con SEQ ID NO: 2 se seleccionó para su posterior caracterización mediante valoración calorimétrica isoterma. Se empleó como molécula diana el péptido SEQ ID NO: 1 sintetizado químicamente por Biomedal (Sevilla, España). El enlace del aptámero con SEQ ID NO: 2 al péptido SEQ ID NO: 1 fue estudiado mediante valoración calorimétrica isoterma. La concentración del aptámero en la celda calorimétrica fue de 33,4 μM , mientras que la concentración de péptido en la jeringa fue de 0,338 mM. Se realizó la siguiente serie de inyecciones de péptido: una primera inyección de 4 μL seguida de 18 inyecciones de 15 μL . En la figura 3 se muestran las valoraciones a ambas temperaturas 15 ° C y 35 ° C. El análisis de las medidas han proporcionado los valores termodinámicos resumidos en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros termodinámicos hallados por ITC.

	15° C	35° C
Constante de enlace, K_B	$(2,2 \pm 0,5) \times 10^7$	$(6 \pm 2) \times 10^7$
Constante de disociación, K_D	45 ± 10 nM	17 ± 10 nM
Cambio de energía libre de enlace, ΔG_B	-10,0 kcal mol ⁻¹	-10,6 kcal mol ⁻¹
Cambio de entalpía de enlace, ΔH_B	+0,70 \pm 0,01 kcal mol ⁻¹	+0,57 \pm 0,01 kcal mol ⁻¹
Cambio de entropía de enlace, ΔS_B	+36,0 cal/(K mol ⁻¹)	+37,4 cal/(K mol ⁻¹)

- 15 La K_D fue determinada mediante valoración calorimétrica isoterma (ITC), técnica habitual para este tipo de medidas. El aptámero fue valorado mediante adiciones sucesivas de péptido SEQ ID NO: 1 sintetizado químicamente, a 15 y 35 °C, obteniéndose unas K_D de 45 ± 10 nM y 17 ± 10 nM, respectivamente.
- 20 Estos datos confirman la unión entre el aptámero con SEQ ID NO: 2 objeto de la invención y el péptido SEQ ID NO: 1. Además el aptámero con SEQ ID NO: 2 presenta una gran afinidad por la diana, como se deduce de una constante de

disociación nM para una molécula hidrofóbica, que no contiene los grupos funcionales que favorecen la interacción con los ácidos nucleicos.

Ejemplo 4 Curvas de enlace de los aptámeros seleccionados al péptido con SEQ

5 ID NO: 1.

La evaluación de la afinidad de los aptámeros por el péptido con SEQ ID NO: 1 se realizó mediante ensayos de unión sobre partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina, sobre los que se inmovilizó el péptido con SEQ ID NO: 1
10 biotinilado en su extremo C terminal. La fracción de cada uno de los seis aptámeros modificados con biotina que se une a dichas partículas fue medida cronopotentiométricamente tras adición del conjugado de estreptavidina-HRP y del sustrato de la enzima (tetrametilbencidina + H₂O₂). Todos los aptámeros seleccionados presentaron afinidad por la diana.

15

Para ello se modificaron partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1, Life Technologies, Madrid) con péptido SEQ ID NO: 1 biotinilado en su extremo C terminal (Biomedal, Sevilla) 2 μM en PBS + 0,01 % Tween-20 durante toda la noche. Tras dos lavados con PBS + 0,01
20 % Tween-20, se bloquearon con 500 μM de biotina en PBS + 0,01 % Tween-20 durante 30 min. Tras 2 nuevos lavados se reconstituyeron en BS. Se pusieron en contacto concentraciones crecientes de cada uno de los aptámeros biotinilados (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10) en BS durante 30 min. Tras 2 lavados con BS + 0,01 % Tween-
25 20, se añadieron 2,5 μg/mL estreptavidina-HRP de Sigma-Aldrich durante 30 min. Tras 3 lavados con BS + 0,01 % Tween-20, una alícuota se colocó sobre un electrodo serigrafiado de carbono (Dropsens, Oviedo) y se añadió el sustrato. Tras 1 minuto de reacción enzimática se midió cronopotentiométricamente a 0 V la cantidad de producto generado usando un potenciostato μ-AutoLab tipo II PGstat-
30 12 equipado con el software GPES 4.9 (EcoChemie, Holanda). En la figura 4A se observa que todos los aptámeros presentan afinidad por la diana (péptido SEQ ID NO: 1).

Ejemplo 5 Curvas de enlace de los aptámeros seleccionados a PWG.

Se realizó la evaluación de la afinidad de los aptámeros por el patrón de gliadina comúnmente usado en los inmunoensayos comerciales obtenido a partir de una mezcla de harinas de trigo de diferente procedencia, denominado PWG. Se llevaron a cabo ensayos de unión sobre partículas magnéticas activadas con grupos tosilo superficiales, sobre los que se inmovilizó el PWG. La fracción de cada uno de los seis aptámeros modificados con biotina que se une a dichas partículas fue medida cronoamperométricamente tras adición del conjugado de estreptavidina-HRP y del sustrato de la enzima (tetrametilbencidina + H₂O₂).

Para ello se modificaron partículas magnéticas con grupos tosilo superficiales (Dynabeads® MyOne™ Tosylactivated, Life Technologies, Madrid) con PWG (estándar de gliadina de *Prolamin Working Group*) en 0,32 mg/mL en Borato 0,058 M pH 9,5 +(NH₄)₂SO₄ 1M durante 24 h a 37 °C. Tras dos lavados en PBS +0,01 % Tween-20, se dejan en el mismo tampón durante la noche a 37 °C. Tras 2 nuevos lavados se reconstituyeron en PBS +0,01 % Tween-20 y se utilizaron para la obtención de las curvas de enlace. Para ello alícuotas idénticas de las micropartículas modificadas con PWG se pusieron en contacto con concentraciones crecientes de cada uno de los aptámeros biotinilados (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9) en BS + 0,01 % Tween-20 durante 30 min. Tras 2 lavados con BS +0,01 % Tween-20, se añadieron 2,5 µg/mL estreptavidina-HRP de Sigma-Aldrich y se incubó durante 30 min. Tras 2 lavados con BS + 0,01 % Tween-20 y uno en BS, se resuspendieron en BS. Una alícuota se colocó sobre un electrodo serigrafado de carbono (Dropsens, Oviedo) y se añadió el sustrato. Tras 1 minuto de reacción enzimática se midió cronoamperométricamente a 0 V la cantidad de producto generado usando un potencióstato µ-AutoLab tipo II PGstat-12 equipado con el software GPES 4.9 (EcoChemie, Holanda). En la figura 4B se observa que todos los aptámeros presentan afinidad por la proteína gliadina completa, como cabe esperar tras la exigente selección efectuada mediante SELEX.

Ejemplo 6: Especificidad de la interacción.

Se evaluó la especificidad de la afinidad de los aptámeros hacia otras proteínas susceptibles de desencadenar la enfermedad celíaca y se evaluó su reactividad cruzada con otras proteínas presentes en cereales que no la desencadenan. Se llevaron a cabo ensayos de unión sobre partículas magnéticas activadas con grupos tosilo superficiales, sobre los que se inmovilizó un extracto etanólico diluido de harinas de centeno, avena y arroz. La fracción de cada uno de los aptámeros modificados con biotina que se une a dichas partículas fue medida cronoamperométricamente tras adición del conjugado de estreptavidina-HRP y del sustrato de la enzima (tetrametilbencidina + H₂O₂) (Figura 5).

Para ello, se realizaron curvas de enlace de los aptámeros con secuencias SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 8, hacia las prolaminas de otros cereales que provocan la enfermedad celíaca (centeno y posiblemente avena) y otros que no la ocasionan (arroz). La extracción de 1 g de cada harina se realizó con 10 mL de etanol al 60% durante 30 min bajo agitación, tras lo cual se centrifugó a 2500 g durante 45 min. El extracto volvió a ser centrifugado y el sobrenadante resultante recogido para su uso. Se modificaron partículas magnéticas tosiladas de la forma indicada en el ejemplo 5 y se realizaron las curvas de enlace de manera totalmente análoga. En la figura 5 se observa que todos los aptámeros ensayados tienen afinidad por el centeno, aunque menor que por el trigo. Como se muestra en la figura 5B el aptámero SEQ ID NO: 7 muestra afinidad por la avena, aunque a concentraciones más elevadas que para el trigo y el centeno, por lo que es capaz de reconocer las aveninas, cuyo papel en el desencadenamiento de la enfermedad celíaca no está aún completamente esclarecido. El aptámero SEQ ID NO: 2 no mostró afinidad por las proteínas de arroz puesto que las señales amperométricas obtenidas son indistinguibles del blanco.

30

REIVINDICACIONES

- 1.- Una molécula de ADN de cadena sencilla, donde dicha secuencia reconoce y se une específicamente a un péptido que comprende la secuencia aminoacídica
5 SEQ ID NO:1.
- 2.- La molécula de ADN según la reivindicación 1, caracterizada por que dicha molécula reconoce y se une específicamente al gluten.
- 10 3.- La molécula de ADN según la reivindicación 2, donde dicho gluten es de trigo, cebada, centeno o avena.
- 4.- La molécula de ADN según la reivindicación 3, donde dicho gluten es de trigo.
- 15 5.- La molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, donde dicha molécula reconoce y se une específicamente a gliadina, hordeína, secalina o avenina.
- 6.- La molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde
20 dicha molécula reconoce y se une específicamente a gliadina.
- 7.- La secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicha secuencia es incapaz de reconocer y unir específicamente proteínas de
25 maíz, soja o arroz.
- 8.- La secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde dicha secuencia comprende la secuencia nucleotídica X-GTCT-Y, donde X
30 comprende entre 3 y 29 nucleótidos e Y comprende entre 7 y 33 nucleótidos.
- 9.- La secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicha secuencia comprende una secuencia nucleotídica que se selecciona de

entre SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

10.- La secuencia de ADN según la reivindicación 9, donde dicha secuencia se une a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 con una constante de disociación K_D igual o menor de 55 nM.

11.- La secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde dicha secuencia comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2.

10

12. La secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde dicha secuencia comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 7.

13.- La secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde dicha secuencia comprende además una molécula marcadora.

15

14.- La secuencia de ADN según la reivindicación 13, donde dicha molécula marcadora se selecciona de entre un fluoróforo, una enzima, un péptido, una nanopartícula, una molécula electroactiva, una digoxigenina y una biotina.

20

15.- La secuencia de ADN según la reivindicación 14, donde dicha molécula electroactiva se selecciona de entre azul de metileno, ferroceno, antraquinona y tionina.

16.- La secuencia de ADN según la reivindicación 14, donde dicho fluoróforo se selecciona de entre fluoresceína, boro-dipirrometeno, cianina, naftaleno y rodamina.

25

17.- La secuencia de ADN según la reivindicación 14, donde dicha enzima se selecciona de entre peroxidasa, fosfatasa alcalina, DNAsimas y NADH deshidrogenasas.

30

18.- La secuencia de ADN según la reivindicación 14, donde el péptido se selecciona de entre una polihistidina, un epítipo myc y un epítipo flag.

19.- La secuencia de ADN según la reivindicación 14, donde dicha nanopartícula se selecciona de entre una nanopartícula metálica, nanopartícula semiconductor y micro o nanopartícula magnética.

20.- La secuencia de ADN según la reivindicación 14, donde la molécula marcadora es biotina.

10

21.- La secuencia de ADN según la reivindicación 14, donde la molécula marcadora es digoxigenina.

22.- La secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, donde al menos un enlace fosfodiéster de dicha secuencia contiene al menos un O sustituido por un S.

23.- Un kit para la detección de gluten caracterizado por que comprende al menos una secuencia de ADN de cadena sencilla según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22.

24.- El kit según la reivindicación 23, caracterizado por que además comprende un soporte sólido.

25.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 23 o 24, donde la secuencia de ADN está anclada al soporte sólido.

26.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 23 o 24, que además comprende el péptido con SEQ ID NO: 1 o gliadina o gluten, anclado al soporte sólido.

30

27.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, donde además comprende un anticuerpo que reconoce y se une específicamente a gluten.

5 28.- Uso de la secuencia de ADN de cadena sencilla según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 o del kit según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27, para la detección del gluten.

29.- Un método de detección del gluten que comprende las siguientes etapas:

- 10 a) poner en contacto una secuencia de ADN de cadena sencilla según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 con una muestra problema; y
b) detectar la presencia del complejo formado por dicha secuencia y el gluten de la muestra problema en la etapa (a).

15 30.- El método según la reivindicación 29, donde la etapa (a) se lleva a cabo en disolución.

31.- El método según la reivindicación 29, donde la etapa (a) se lleva a cabo en un soporte sólido.

20 32.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31, donde la etapa (b) se lleva a cabo mediante PCR.

25 33.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31, donde la etapa (b) se lleva a cabo mediante un aptaensayo.

34.- El método según la reivindicación 33, donde el aptaensayo es un ELOSA.

FIG.1A

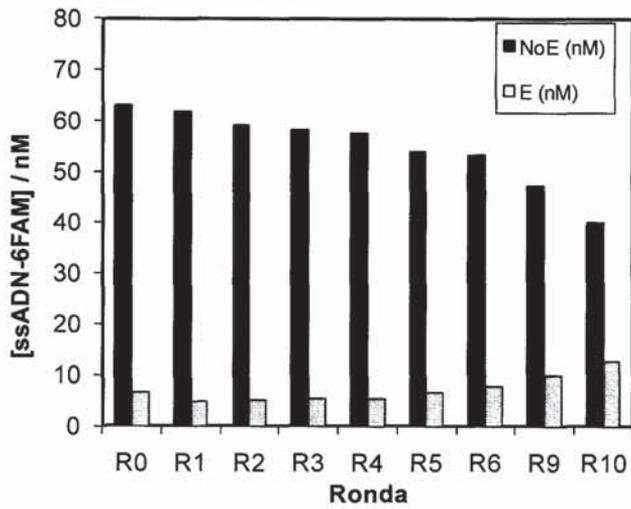


FIG. 1B

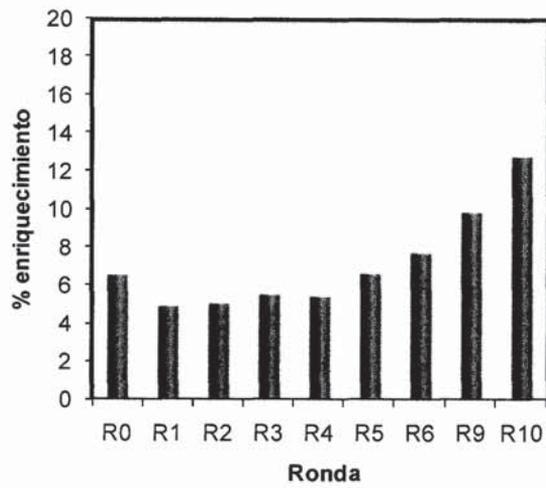


FIG.2A

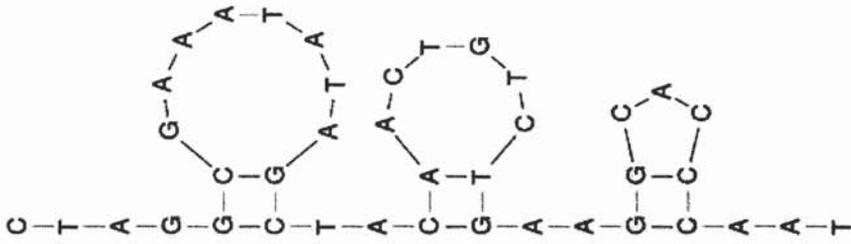


FIG.2B

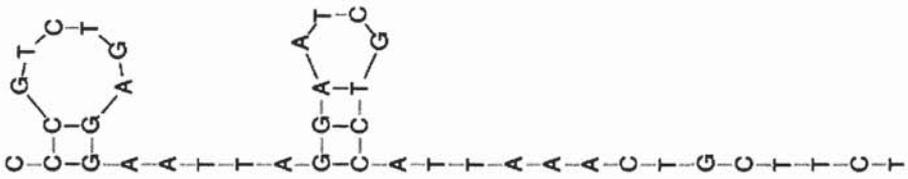


FIG.2C

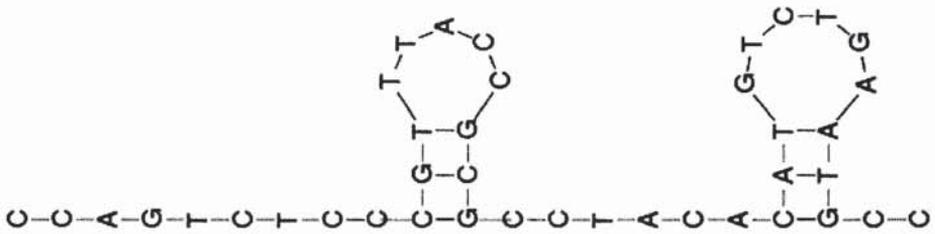


FIG.2D



FIG. 2E

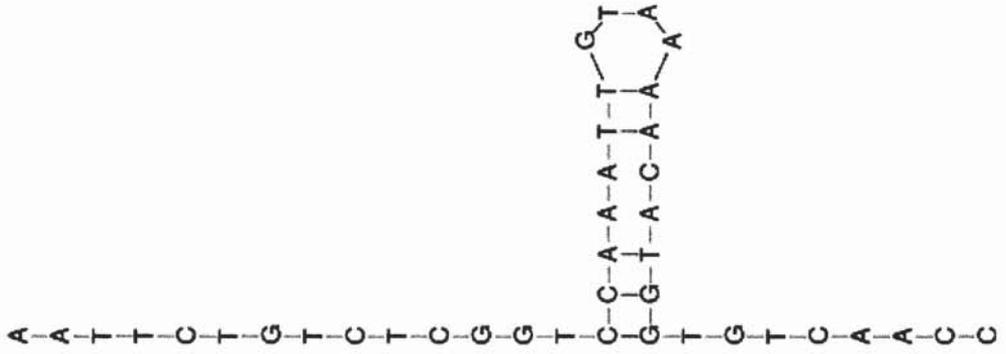


FIG.2F

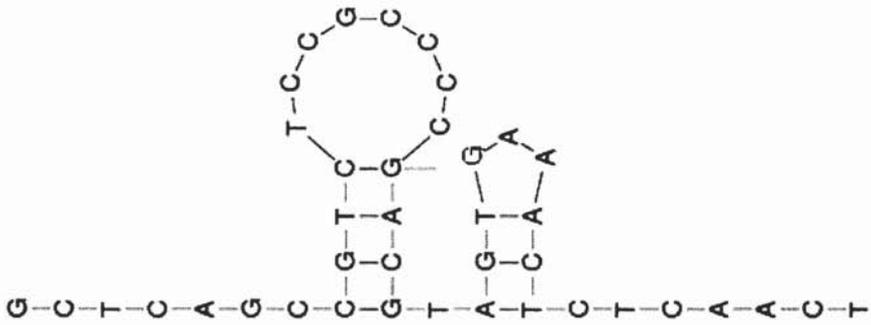


FIG.3

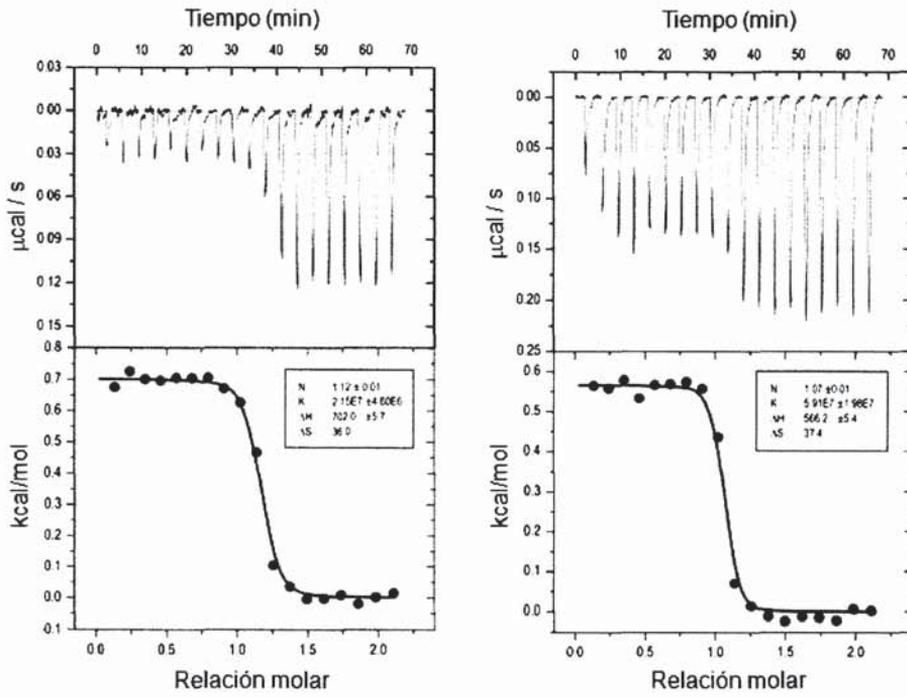


FIG.4A

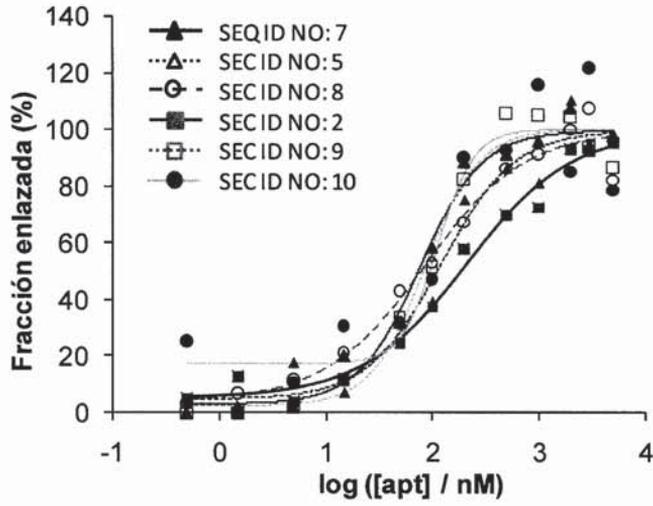


FIG.4B

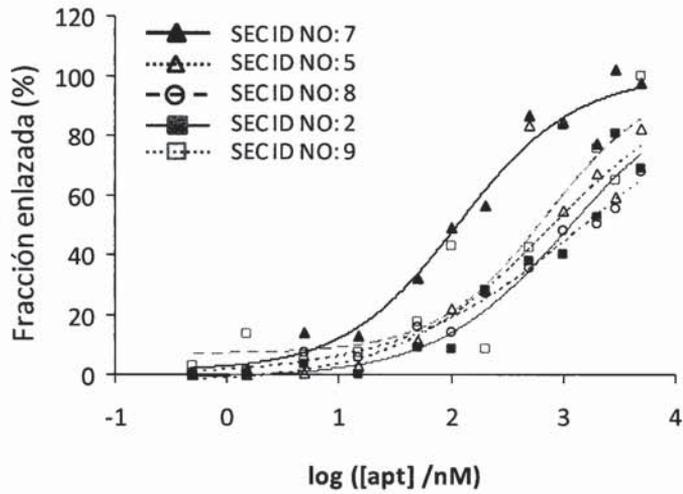


FIG.5A

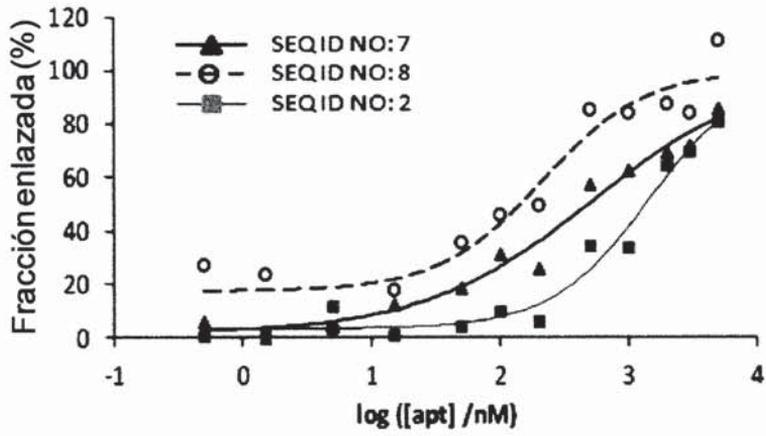
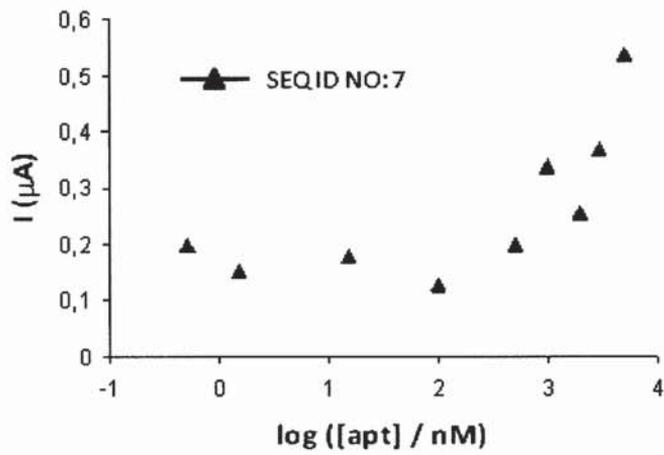


FIG.5B



LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Oviedo

<120> APTÁMERO ESPECÍFICOS CONTRA EL GLUTEN Y MÉTODO DE DETECCIÓN DEL GLUTEN ASOCIADO

<130> ES1624.4

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 1

Leu Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro
1 5 10 15

Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro
20 25 30

Phe

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial que une específicamente SEQ ID NO: 1.

<400> 2

ctaggcgaaa tatagctaca actgtctgaa ggcacccaat 40

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial que une específicamente SEQ ID NO: 1

<400> 3

ctaggcgaga tatagctaca actgtctgaa ggcacctaata 40

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial que une específicamente SEQ ID NO: 1

<400> 4

actgtctgaa ggtaatgctg gcattgactc tgcaacaatc 40

<210> 5
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial que une específicamente SEQ ID NO: 1

 <400> 5
 cccgtctgag gaattaggaa tcgtccatta aactgcttct 40

<210> 6
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial que une específicamente SEQ ID NO: 1

 <400> 6
 ccccgtagca atgaccagta atgtgtctcg aaccttaaat 40

<210> 7
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial que une específicamente SEQ ID NO: 1

 <400> 7
 ccagtctccc gttaccgcg cctacacatg tctgaatgcc 40

<210> 8
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial que une específicamente SEQ ID NO: 1

 <400> 8
 cgtaagtgg tctaaagcgt ctgagcgatc gtagcggccc 40

<210> 9
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial que une específicamente SEQ ID NO: 1

 <400> 9
 aattctgtct cggccaat tgtaaacat ggtgtcaacc 40

<210> 10
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial que une específicamente SEQ ID NO: 1

<400> 10
gctcagccgt ctccgccccg acgtagtgaactctcaact 40

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo clonación

<400> 11
gctgcagctg caaccatttc 20

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso clonación

<400> 12
ataaatgggt gcggctgctg at 22

<210> 13
<211> 91
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido recombinante 33-mer con cola de histidinas

<400> 13

Met Leu Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln
1 5 10 15

Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln
20 25 30

Pro Phe Ile Ser Arg Glu Leu Val Asp Pro Asn Ser Val Gln Ala Arg
35 40 45

Leu Gln Asp Val Asp Gly Thr Ile Asp Thr Arg Ser Lys Leu Ala Ala
50 55 60

Ala Gln Leu Tyr Thr Arg Ala Ser Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp
65 70 75 80

Pro Glu Asp Leu Glu His His His His His His
85 90

<210> 14
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido control: Cola de histidinas del péptido recombinante
33-mer

<400> 14

Met Ile Ser Arg Glu Leu Val Asp Pro Asn Ser Val Gln Ala Arg Leu
1 5 10 15

Gln Asp Val Asp Gly Thr Ile Asp Thr Arg Ser Lys Leu Ala Ala Ala
20 25 30

Gln Leu Tyr Thr Arg Ala Ser Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro
35 40 45

Glu Asp Leu Glu His His His His His His
50 55

<210> 15

<211> 80

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Colección de ADN inicial

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(60)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 15

agggttgata ggtaagagc nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

cgatgtcaac tagctgttg 80

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo amplificación

<400> 16

agggttgata ggtaagagc 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso biotinilado

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(1)

<223> biotina-(CH2)6-

<400> 17

ccaacagcta gttgacatcg 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo marcado con 6-FAM

<220>
 <221> misc_binding
 <222> (1)..(1)
 <223> 6-FAM

<400> 18
 agggttgata ggtaagagc 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador inverso amplificación

<400> 19
 ccaacagcta gttgacatcg 20

<210> 20
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

<400> 20
 gctgcagctg caaccatttc cgcagccgca actaccatat ccgcagccgc aactaccata 60
 tccgcagccg caactacat atccgcagcc gcaaccattt 100



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201200600

22 Fecha de presentación de la solicitud: 31.05.2012

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)
C07H21/04 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SHAN L. et al. Structural Basis for Gluten Intolerance in Celiac Sprue. Science. 2002. Vol. 297, páginas 2275-2279, todo el documento.	1-34
A	LEE JF. et al. Aptamer therapeutics advance. Current Opinion in Chemical Biology. 2006. Vol. 10, páginas 282-289.	1-34
A	WO 2006051145 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS [ES/ES]) 18.05.2006, página 2, línea 10 – página 3, línea 12.	1-34
A	WO 2008110655 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS [ES/ES]) 18.09.2008, resumen.	1-34

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
24.04.2013

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, C07H

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR, EBI.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.04.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-34	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-34	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SHAN L. et al. 2002. Vol. (297), páginas: 2275-2279.	2002
D02	LEE JF. et al. Current Opinion in Chemical Biology. 2006. Vol. (10), páginas: 282-289.	2006
D03	WO 2006051145 A1	18.05.2006
D04	WO 2008110655 A1	18.09.2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga una molécula de ADN de cadena sencilla, preferentemente que contenga las secuencias definidas como SEQ ID NO: 2-10, como aptámero capaz de reconocer y de unirse específicamente al péptido definido como SEQ ID NO: 1 o al gluten, pudiendo ir unida a una molécula marcadora (reivindicaciones 1-22). Se refiere también a un kit y a su uso en un método para detección de gluten en una muestra problema (reivindicaciones 23-34).

El documento D01 divulga un péptido de 33 aminoácidos de la alfa-gliadina, proteína que constituye uno de los principales componentes tóxicos del gluten, y su relación con el inicio de la respuesta inflamatoria del gluten en pacientes celíacos; sugiriendo también su uso en terapia para tratamiento de dicha enfermedad (ver todo el documento).

El documento D02 divulga las ventajas de los aptámeros para uso terapéutico; estas moléculas compiten con los anticuerpos debido a que, además de presentar una gran afinidad y especificidad de unión a proteínas, pueden ser sintetizadas químicamente e introducir en ellas modificaciones que mejoren sus propiedades farmacocinéticas (ver todo el documento).

El documento D03 divulga un método de identificación del gluten hidrolizado en alimentos, o materias primas, dirigidos a pacientes celíacos, mediante un ELISA Competitivo que permite cuantificar las prolaminas total o parcialmente hidrolizadas; así como un kit para llevar a cabo dicho ensayo (ver página 2, línea 10 - página 3, línea 12).

El documento D04 divulga un método de detección y cuantificación de ADN de cereales en alimentos, mediante PCR cuantitativa en tiempo real empleando cebadores específicos para una región conservada de dichos cereales. Dicho método es útil para determinación del gluten en alimentos y control de los dirigidos a pacientes celíacos (ver resumen).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986)

La presente solicitud divulga una molécula de ADN de cadena sencilla, preferentemente que contenga las secuencias definidas como SEQ ID NO: 2-10, como aptámero capaz de reconocer y de unirse específicamente al péptido definido como SEQ ID NO: 1 o al gluten. Se refiere también a un kit y a su uso en un método para detección de gluten en una muestra problema.

1.1. REIVINDICACIONES 1-34

El documento D01 anticipa el péptido de 33 aminoácidos definido en la presente solicitud como SEQ ID NO: 1, proveniente de la alfa-gliadina del gluten, así como su uso en terapia para la enfermedad celíaca. Por otra parte, el documento D02 anticipa el uso de aptámeros en terapia y en clínica por la ventaja que presentan estas moléculas frente a los anticuerpos.

Sin embargo estos documentos no anticipan aptámeros específicos para las proteínas del gluten, ni el uso de aptámeros en terapia para pacientes celíacos. Además, los aptámeros definidos como SEQ ID NO: 2-10 no se han encontrado en el estado de la técnica.

En base a lo expuesto, se concluye que el objeto de las reivindicaciones 1-34 no se encuentra en el estado de la técnica y no podría haber sido deducido del mismo por un experto en la materia a partir de lo divulgado en los documentos D01 y D02. Ninguno de estos documentos, tomados independientemente o en combinación, anticipa los aptámeros objeto de la presente invención, ni su uso en un método para detección del gluten.

En consecuencia, según lo divulgado en los documentos D01 y D02, las reivindicaciones 1-34 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

Los documentos D03 y D04 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.