UNIVERSIDAD DE OVIEDO

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA

PROGRAMA DE DOCTORADO
Análisis químico, bioquímico y estructural avanzados

ÁCIDOS NUCLEICOS ESTRUCTURADOS COMO RECEPTORES DE AFINIDAD PARA EL DISEÑO DE SENSORES ELECTROQUÍMICOS

TESIS DOCTORAL

2012

EVA GONZÁLEZ FERNÁNDEZ

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Ácidos nucleicos estructurados como receptores de afinidad para el diseño de sensores electroquímicos.	Inglés: Structured nucleic acids as molecular recognition elements for the desing of electrochemical sensors.

2.- Autor	
Nombre: Eva González Fernández.	
Programa de Doctorado: Análisis químico bioquímico y estructural avanzados.	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo.	

RESUMEN (en español)

En esta Tesis Doctoral, se exploran diferentes esquemas de integración de ácidos nucleicos estructurados con transductores electroquímicos para la determinación de moléculas de naturaleza no nucleotídica, tanto de pequeño tamaño molecular o haptenos, como proteínas.

Como modelo de hapteno se ha utilizado el antibiótico aminoglicósido tobramicina, para cuya determinación se han desarrollado y evaluado dos estrategias generales de ensayo, basadas en el empleo de aptámeros de ARN modificados como receptor de afinidad. En primer lugar, se ha demostrado que la modificación del aptámero de ARN natural, mediante la introducción de grupos OMe en la posición 2' de los anillos de ribosa, conduce a una pequeña disminución en la afinidad del mismo hacia la tobramicina, medida por espectroscopia de resonancia de plasmón de superficie (SPR). Sin embargo esta modificación, que aumenta la resistencia del receptor a la degradación por nucleasas, no imposibilita la utilización de los aptámeros como elementos de reconocimiento en ambos ensayos. El primero es un sensor impedimétrico que no requiere el empleo de reactivos marcados y utiliza un formato de ensayo de desplazamiento. El sensor se construye inmovilizando el aptámero mediante enlace de afinidad a una superficie de oro modificada con tobramicina, puede ser fácilmente regenerado y presenta excelentes características analíticas, tanto en términos de sensibilidad como de selectividad. Se ha demostrado que este sensor puede utilizarse para medir tobramicina en muestras de suero humano tras una mínima dilución (1 a 1,5) de las mismas. En esta matriz

FOR-MAT-VOA-010-BIS

presenta un límite de detección de 1,8 µM y un intervalo dinámico lineal entre 3 y 70 µM, que cubre el intervalo terapéutico del antibiótico. En segundo lugar, se utilizó el mismo aptámero pero marcado con biotina o fluoresceína para desarrollar un ensayo voltamétrico utilizando micropartículas magnéticas como plataforma sensora. Una vez que se ha producido el proceso de reconocimiento sobre las micropartículas en un formato de ensayo de inhibición, se detecta la cantidad de aptámero marcado mediante la incorporación de la enzima fosfatasa alcalina (ALP). La señal analítica se obtiene utilizando electrodos serigrafiados de carbono sobre los que se fijan con la ayuda de un imán las micropartículas modificadas, midiendo la actividad enzimática enlazada por voltametría diferencial de pulso tras la adición del sustrato de la enzima α-naftilfosfato. Se han evaluado comparativamente dos sistemas diferentes para incorporar la enzima, uno multivalente (biotina-estreptavidina) y el otro monovalente (fluoresceína- antifluoresceína fragmento Fab). El sistema monovalente de marcaje permite obtener un intervalo lineal de respuesta más amplio y un menor límite de detección, además de aportar una mayor reproducibilidad al dispositivo. Este ensayo permite determinar tobramicina en suero humano con un límite de detección 1 µM y un intervalo lineal entre 1 y 200 µM.

Para la detección de proteínas, se tomó como modelo los anticuerpos correspondientes a FLAG y a uno de los epítopos del virus VIH, para los que no se han descrito aptámeros. Se exploró la viabilidad de un nuevo concepto de sensor, denominado “scaffold sensor”, para determinar estas proteínas en suero. Aunque el sensor propuesto genera una señal analítica en presencia del anticuerpo en suero, son necesarias investigaciones adicionales para mejorar su comportamiento en esta matriz compleja.

RESUMEN (en Inglés)

Along the present Doctoral Thesis, different schemes for coupling structured nucleic acids with electrochemical transducers are explored in order to detect non nucleic acid molecules such as small molecules (or haptens) and proteins.

The aminoglycoside antibiotic tobramycin has been selected as a hapten model molecule. Two general approaches have been developed and evaluated for tobramycin detection employing modified RNA aptamers as affinity receptors. Firstly, it has been proved that the modification of the natural RNA anti-tobramycin sequence by means of the introduction of OMe groups in the 2´position of the ribose moiety leads to a slightly decrease of the aptamer affinity towards its target molecule measured using surface plasmon resonance (SPR) as a detection technique. Nevertheless, this modification, which confers higher stability against endonuclease hydrolysis to the affinity receptor, does not preclude the use of these modified aptamers as molecular recognition elements for both proposed assays. The first assay is a label-free impedimetric sensor based on a displacement format. The aptasensor is constructed by immobilizing the anti-tobramycin aptamer via its affinity interaction to a tobramycin-modified gold surface. This sensing phase can be easily regenerated and presents excellent analytical features in terms of both sensitivity and selectivity. It has been proved that the proposed aptasensor can be applied for tobramycin detection in human serum samples after a minimum dilution step (1 to 1.5). The limit of detection and lineal range observed in this complex matrix were 1.8 μM and 3-70 μM, respectively, which completely covers the antibiotic therapeutic range required in serum. Secondly, the same modified aptamer was labeled with a biotin or a fluorescein molecule for the development of a voltammetric assay using magnetic microparticles as a sensing platform. Once the recognition event takes place onto the magnetic microparticles using an inhibition assay format, the amount of bound labeled-aptamer is detected via alkaline phosphatase (ALP) conjugate addition. The analytical signal is recorded on screen-printed carbon electrodes, where the modified magnetic particles are entrapped by means of a magnet, by measuring the bound enzymatic activity by differential pulse voltammetry as an electrochemical

detection technique after the enzymatic substrate (α-naphthyl phosphate) addition. Two different labeling systems have been proposed and compared for the enzyme introduction into the system: a multivalent one (biotin-streptavidin) and a monovalent one (fluorescein-antifluorescein Fab fragment). The monovalent labeling system provides a wider linear range and a lower limit of detection, as well as a better reproducibility. This assay can be applied for tobramycin determination in human serum samples with a limit of detection of 1 μM and a linear range of 1-200 μM.

For protein detection, anti-FLAG and anti-HIV antibodies were selected as model analytes for which no aptamers sequences have been selected. The feasibility of a new sensor concept known as “scaffold sensor” was explored for the determination of these proteins in human serum samples. In spite of the fact that the scaffold sensor provides an analytical signal related to the presence of the antibody in serum, further research has to be conducted in order to improve its performance in this complex matrix.

“No te rindas, aun estás a tiempo
de alcanzar y comenzar de nuevo,
aceptar tus sombras, enterrar tus miedos,
liberar el lastre, retomar el vuelo.

No te rindas que la vida es eso,
continuar el viaje,
perseguir tus sueños,
destrabar el tiempo,
correr los escombros y destapar el cielo

No te rindas por favor no cedas,
aunque el frío queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se ponga y se calle el viento,
aun hay fuego en tu alma,
aun hay vida en tus sueños,
porque cada día es un comienzo,
porque esta es la hora y el mejor momento,
porque no estás sola,
porque yo te quiero”

Mario Benedetti

AGRADECIMIENTOS

¡Cómo pasa el tiempo!

Ya han pasado 5 años desde que acabé la Licenciatura en Químicas en la Universidad de Oviedo y comencé mi andadura investigadora en el Grupo de Electroanálisis del Departamento de Química Física y Analítica de la misma Universidad. Aunque todo comenzó un año antes, en 2006, cuando la profesora que impartía Química Analítica Avanzada, la Dra. María Jesús Lobo Castañón, comentó en una de sus clases la posibilidad de solicitar una Beca de Colaboración en el citado grupo de investigación. No me lo pensé dos veces, me pareció una oportunidad única para conocer un poco más de cerca el mundo de la investigación, aunque por aquel entonces mis planes no eran hacer la tesis, ni mucho menos.

Pero los planes cambiaron. La acogida en el Grupo de Electroanálisis fue inmejorable y el pequeño trabajo que me encomendaron dio sus frutos rápidamente publicándose un artículo en una revista científica internacional (con el tiempo comprendería que normalmente los tiempos en la investigación son más largos). Esto, junto al ambicioso proyecto que me presentaron, me terminó de convencer y durante el verano de 2007 tomé la decisión de embarcarme en la aventura de realizar la Tesis Doctoral.

Y aquí estoy, 6 años después de lo que marca la fecha de mi primera libreta de laboratorio, terminando de escribir con estas líneas lo que conforma mi Tesis Doctoral.

Quisiera aprovechar esta oportunidad para dar las gracias a todas las personas que han contribuido, de una u otra forma, al desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Al Dr., Paulino Tuñón Blanco por haberme abierto las puertas del Grupo de Electroanálisis. Le debo agradecer toda la confianza puesta en mí, sobre todo al ofrecerme, solamente unos meses después de haberme unido a su grupo, la posibilidad de realizar una estancia de 4 meses en el grupo de Biosensori de la Universitá degli Studi di Firenze, dirigido por el Prof. Marco Mascini.

Al Dr. Arturo J. Miranda Ordieres, por las innumerables ideas y comentarios realizados a lo largo de estos años y, especialmente, por su destreza a la hora de resolver cualquier problema o duda “electroquímica”, estoy segura de que echaré de menos tener todos sus conocimientos a disposición.

A la Dra. María Jesús Lobo Castañón, por la confianza que puso en mí desde mi incorporación al Grupo de Electroanálisis. Por su optimismo a la hora de abordar cualquier proyecto, por sus inagotables ideas, comentarios y consejos, tanto en lo científico como en lo personal. Por el esfuerzo puesto en el proceso de revisión de la presente memoria.

A la Dra. Noemí de los Santos Álvarez, por su apoyo a lo largo de estos años de trabajo. Por sus sentido práctico la hora de organizar el trabajo. Por recordarme en los malos momentos que el esfuerzo merecía la pena y que los buenos resultados llegarían. ¡Tenía razón! Por sus comentarios y aportaciones para mejorar esta memoria, sin los que, no cabe duda, no sería la misma.

A todos los integrantes del grupo de Biosensori de la Universitá degli Studi di Firenze y del grupo dirigido por el Prof. Kevin W. Plaxco en la University of California Santa Barbara. Lo aprendido en ambas estancias tanto a nivel profesional como personal es incalculable.

A la Dra. Carmen Blanco por su ayuda en la comprensión del Diseño de Experimentos.

A todos los compañeros que me han acompañado en el día a día del laboratorio, Rebeca, Goretti, Daniel, Sonia, Elena y la Dra. María José González, por haber hecho el día a día de la investigación más llevadero (con unos cuantos “cafeses” de por medio).

A todos mis amigos y amigas, que me han apoyado a lo largo de estos años, especialmente a Laura, Sonia y Esther. Su apoyo y ánimo en todo momento me ha ayudado a llegar hasta aquí.

A mi familia, mis hermanos Manuel y Alba y especialmente a mis padres. Ellos me inculcaron el valor del esfuerzo desde pequeña, y gracias a ellos he conseguido todas mis metas.

A Carlos, porque sin su apoyo incondicional durante todos estos años no hubiese podido llegar a este punto.

GRACIAS GRAZIE MILLE THANK YOU

RESUMEN

En esta Tesis Doctoral, se exploran diferentes esquemas de integración de ácidos nucleicos estructurados con transductores electroquímicos para la determinación de moléculas de naturaleza no nucleotídica, tanto de pequeño tamaño molecular o haptenos, como proteínas.

Como modelo de hapteno se ha utilizado el antibiótico aminoglicósido tobramicina, para cuya determinación se han desarrollado y evaluado dos estrategias generales de ensayo, basadas en el empleo de aptámeros de ARN modificados como receptor de afinidad. En primer lugar, se ha demostrado que la modificación del aptámero de ARN natural, mediante la introducción de grupos OMe en la posición 2' de los anillos de ribosa, conduce a una pequeña disminución en la afinidad del mismo hacia la tobramicina, medida por espectroscopia de resonancia de plasmón de superficie (SPR). Sin embargo esta modificación, que aumenta la resistencia del receptor a la degradación por nucleasas, no imposibilita la utilización de los aptámeros como elementos de reconocimiento en ambos ensayos. El primero es un sensor impedimétrico que no requiere el empleo de reactivos marcados y utiliza un formato de ensayo de desplazamiento. El sensor se construye inmovilizando el aptámero mediante enlace de afinidad a una superficie de oro modificada con tobramicina, puede ser fácilmente regenerado y presenta excelentes características analíticas, tanto en términos de sensibilidad como de selectividad. Se ha demostrado que este sensor puede utilizarse para medir tobramicina en muestras de suero humano tras una mínima dilución (1 a 1,5) de las mismas. En esta matriz presenta un límite de detección de 1,8 µM y un intervalo dinámico lineal entre 3 y 70 µM, que cubre el intervalo terapéutico del antibiótico. En segundo lugar, se utilizó el mismo aptámero pero marcado con biotina o fluoresceína para desarrollar un ensayo voltamétrico utilizando micropartículas magnéticas como plataforma sensora. Una vez que se ha producido sobre las micropartículas el proceso de reconocimiento en un formato de ensayo de inhibición, se detecta la cantidad de aptámero marcado mediante la incorporación de la enzima fosfatasa alcalina (ALP). La señal analítica se obtiene utilizando electrodos serigrafiados de carbono sobre los que se fijan con la ayuda de un imán las micropartículas modificadas, midiendo la actividad enzimática enlazada por voltametría diferencial de pulso tras la adición del sustrato de la enzima α-naftilfosfato. Se han evaluado comparativamente dos sistemas diferentes para incorporar la enzima, uno multivalente (biotina-estreptavidina) y el otro monovalente (fluoresceína-

antifluoresceína fragmento Fab). El sistema monovalente de marcaje permite obtener un intervalo lineal de respuesta más amplio y un menor límite de detección, además de aportar una mayor reproducibilidad al dispositivo. Este ensayo permite determinar tobramicina en suero humano con un límite de detección 1 µM y un intervalo lineal entre 1 y 200 µM.

Para la detección de proteínas se tomó como modelo los anticuerpos correspondientes a FLAG y a uno de los epítopos del virus VIH, para los que no se han descrito aptámeros. Se exploró la viabilidad de una nuevo concepto de sensor, denominado “scaffold sensor”, para determinar estas proteínas en suero. Aunque el sensor propuesto genera una señal analítica en presencia del anticuerpo en suero, investigaciones adicionales son necesarias para mejorar su comportamiento en esta matriz compleja.

ABSTRACT

Along the present Doctoral Thesis, different schemes for coupling structured nucleic acids with electrochemical transducers are explored in order to detect non nucleic acid molecules such as small molecules (or haptens) and proteins.

The aminoglycoside antibiotic tobramycin has been selected as a hapten model molecule. Two general approaches have been developed and evaluated for tobramycin detection employing modified RNA aptamers as affinity receptors. Firstly, it has been proved that the modification of the natural RNA anti-tobramycin sequence by means of the introduction of OMe groups in the 2´position of the ribose moiety leads to a slightly decrease of the aptamer affinity towards its target molecule measured using surface plasmon resonance (SPR) as a detection technique. Nevertheless, this modification, which confers higher stability against endonuclease hydrolysis to the affinity receptor, does not preclude the use of these modified aptamers as molecular recognition elements for both proposed assays. The first assay is a label-free impedimetric sensor based on a displacement format. The aptasensor is constructed by immobilizing the anti-tobramycin aptamer via its affinity interaction to a tobramycin-modified gold surface. This sensing phase can be easily regenerated and presents excellent analytical features in terms of both sensitivity and selectivity. It has been proved that the proposed aptasensor can be applied for tobramycin detection in human serum samples after a minimum dilution step (1 to 1.5). The limit of detection and lineal range observed in this complex matrix were 1.8 µM and 3-70 µM, respectively, which completely covers the antibiotic therapeutic range required in serum. Secondly, the same modified aptamer was labeled with a biotin or a fluorescein molecule for the development of a voltammetric assay using magnetic microparticles as a sensing platform. Once the recognition event takes place onto the magnetic microparticles using an inhibition assay format, the amount of bound labeled-aptamer is detected via alkaline phosphatase (ALP) conjugate addition. The analytical signal is recorded on screen-printed carbon electrodes, where the modified magnetic particles are entrapped by means of a magnet, by measuring the bound enzymatic activity by differential pulse voltammetry as an electrochemical detection technique after the enzymatic substrate (α-naphthyl phosphate) addition. Two different labeling systems have been proposed and compared for the enzyme introduction into the system: a multivalent one (biotin-streptavidin) and a monovalent one (fluorescein-antifluorescein Fab fragment). The monovalent labeling

system provides a wider linear range and a lower limit of detection, as well as a better reproducibility. This assay can be applied for tobramycin determination in human serum samples with a limit of detection of 1 µM and a linear range of 1-200 µM.

For protein detection anti-FLAG and anti-HIV antibodies were selected as model analytes for which no aptamers sequences have been selected. The feasibility of a new sensor concept known as “scaffold sensor” was explored for the determination of these proteins in human serum samples. In spite of the fact that the scaffold sensor provides an analytical signal related to the presence of the antibody in serum, further research has to be conducted in order to improve its performance in this complex matrix.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN……..…1

1.1. Ácidos nucleicos funcionales como reactivos de afinidad: aptámeros…….. 4

1.1.1. Selección de aptámeros. El proceso SELEX…….. 5

1.1.2. Propiedades de los aptámeros como elementos de bioreconocimiento…… 9

1.2. Aplicaciones analíticas de los aptámeros: aptasensores electroquímicos…….. 11

1.2.1. Estrategias de diseño de aptasensores electroquímicos para proteínas…….... 14

1.2.2. Estrategias de diseño de aptasensores electroquímicos para moléculas pequeñas…… 20

1.3. Ácidos nucleicos como andamios de reactivos de afinidad…..... 31

2. OBJETIVOS / OBJECTIVES…… 35

3. DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE APTÁMEROS MODIFICADOS PARA LA DETECCIÓN DE TOBRAMICINA…….. 45

3.1. Estabilización de los ácidos nucleicos frente a la acción de las nucleasas…….. 47

3.2. Aptámero anti-tobramicina. Estructura del complejo de afinidad… 49

3.3. Diseño de aptámeros modificados para la determinación de tobramicina …… 53

3.4. Espectroscopia de plasmón de superficie como técnica para la caracterización de los aptámeros modificados. Principio de medida…… 55

3.4.1. Tipos de instrumentación SPR…… 58

3.5. Preparación de la fase sensora para la caracterización de los aptámero mediante SPR…… 62

3.5.1. Inmovilización del aptámero sobre la superficie del sensor…… 62

3.5.2. Inmovilización de la tobramicina sobre la superficie del sensor... 67

3.6. Interacción tobramicina inmovilizada-aptámero: el ciclo de análisis..... 71

3.7. Obtención de las constantes cinéticas y de disociación……..75

3.7.1. Análisis de equilibrio…… 78

3.7.2. Análisis cinético…… 81

3.7.3. Autoconsistencia de los resultados obtenidos y comparación con resultados previos…… 83

4. DESARROLLO DE UN SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TOBRAMICINA EN SUERO HUMANO…… 85

4.1. Definición del problema analítico…….. 87

4.1.1. Indicaciones terapéuticas de la tobramicina…… 87

4.1.2. Métodos para la determinación de tobramicina…… 88

4.2. La espectroscopia de impedancia faradaica (FIS) como sistema de transducción en biosensores …… 93

4.3. Diseño de un sensor impedimétrico para la determinación de tobramicina…… 96

4.3.1. Construcción de la fase sensora…… 97

4.3.2. Ensayo de desplazamiento empleando ATA …….... 103

4.3.3. Ensayo de desplazamiento empleando ATATM …… 108

4.4. Aplicación del aptasensor a la determinación de tobramicina en suero humano …… 111

5. DISEÑO DE UN APTAENSAYO COMPETITIVO CON CURVA DE RESPUESTA CRECIENTE PARA TOBRAMICINA……... 117

5.1. Introducción…….. 119

5.2. Descripción del esquema de ensayo y construcción de la fase sensora…….... 122

5.3. Diseño experimental: influencia de factores e interacciones sobre la respuesta del ensayo…… 129

5.3.1. Selección de la variable respuesta ……... 130

5.3.2. Identificación de los factores que pueden tener un efecto sobre la variable respuesta. Definición de los intervalos y niveles…… 130

5.3.3. Planteamiento del diseño factorial…… 132

5.3.4. Realización del experimento diseñado…… 134

5.3.5. Análisis de los resultados…… 135

5.4. Optimización del ensayo. Método de la máxima pendiente…….. 139

5.4.1. Obtención del modelo ajustado de primer orden…….. 139

5.4.2. Realización de experimentos a lo largo de la dirección de la máxima pendiente…… 142

5.5. Evaluación de la afinidad del complejo aptámero biotinilado (BATA)-tobramicina…… 145

5.5.1. Medidas de SPR…… 145

5.5.2. Interpretación de los datos SPR obtenidos: Cálculo de las constantes cinéticas y de disociación…….…….. 148

6. APTAENSAYOS DE INHIBICIÓN PARA TOBRAMICINA…….…….. 151

6.1. Introducción…….. 153

6.2. Formato de ensayo de inhibición sobre partículas magnéticas…….... 154

6.3. Aptaensayo de inhibición empleando el sistema de marcaje estreptavidina-biotina..... 156

6.3.1. Optimización del tiempo de reacción enzimática……. 158

6.3.2. Optimización de la concentración de BATA…….... 160

6.3.3. Características analíticas del aptaensayo voltamétrico…..... 161

6.4. Aptaensayo de inhibición empleando el sistema de marcaje FITC:fragmento-Fab anti-FITC……... 164

6.4.1. Selección de la marca enzimática y la concentración óptima de FITC-ATA……..……..…… 164

6.4.2. Características analíticas del aptaensayo voltamétrico en medio acuoso…….. 167

6.5. Sistema de marcaje multivalente frente a sistema de marcaje monovalente…….…… 170

6.6. Aplicación del aptaensayo a muestras de suero humano…….…. 171

7. ADN ESTRUCTURADO COMO BASE PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS…….…… 175

7.1. Introducción…….…… 177

7.2. Diseño de una fase sensora ternaria para la determinación del anticuerpo anti-FLAG en disolución acuosa…….…… 179

7.3. Empleo de una fase sensora ternaria para la determinación del anticuerpo anti-4B3 en disolución acuosa…….…… 185

7.4. Aplicación a la determinación del anticuerpo anti-FLAG en suero humano…… 187

8. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS…… 191

ANEXO I. Orientación para trabajos futuros…… 199

ANEXO II. Reactivos, instrumentación y procedimientos…… 215

ANEXO III. Tablas…….. 223

ANEXO IV. Referencias…… 229

ANEXO V. Publicaciones…… 237

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ALP: Fosfatasa alcalina.

ANOVA: Análisis de la Varianza.

ARN: Ácido ribonucleico.

ATA: Aptámero anti-tobramicina.

ATANM: Aptámero anti-tobramicina no metilado.

ATATM: Aptámero anti-tobramicina totalmente metilado.

ATP: Adenosina Trifosfato.

AuNPs: Nanopartículas de oro.

BATA: Aptámero anti-tobramicina biotinado.

BSA: Albúmina de Suero Bovino.

CE-LIF: Electroforesis Capilar-Fluorescencia Inducida mediante Láser.

CFEIA: Inmunoensayo Enzimático en Flujo Continuo.

CRP: Proteína C-reactiva.

CV: Voltametría Cíclica.

DOE: Diseño de Experimentos.

DPV: Voltametría Diferencial de Pulso.

DTT: Ditiotreitol.

EIA: Inmunoensayo enzimático.

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay.

ELONA: Enzyme Linked Oligonucleotide Assay.

ELSD: Detector Evaporativo de Dispersión.

F: Detector de Fluoresceína.

Fc: Ferroceno.

FIS: Espectroscopía de Impedancia Faradaica.

FITC: Fluoresceína Isotiocianato.

FITC-ATA: Aptámero anti-tobramicina modificado con fluoresceína isotiocianato.

FLAG: Péptido DYKDDDDKGG.

GDH: Glucosa Deshidrogenasa.

HPLC: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución;

HRP: Peroxidasa de rábano silvestre.

IPAD: Detector Amperométrico de Pulso Integrado.

MB: Azul de Metileno.

MS/MS: Espectrometría tándem de Masas

MTL: Limitación por transporte de masa.

OTA: Ocratoxina A.

PCR: Polymerase chain reaction o reacción en cadena de la polimerasa.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

POD: Peroxidasa.

QD: Quantum dot.

RT-HPLC: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución de Fase Inversa.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

SAM: Monocapa autoensamblada.

SELEX: Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment.

SERS: Surface Enhanced Raman Spectroscopy

SPCEs: Electrodos Serigrafiados de Carbono.

SPE-CZE: Extracción en Fase Sólida-Electroforesis Capilar Zonal)

SPR: Resonancia de Plasmón Superficial.

SWV: Voltametría de Onda Cuadrada.

TBA: aptámero anti-trombina

TMB: Tetrametilbenzidina.

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

α-N: α-naftol.

α-NP: α-naftil fosfato.

1. INTRODUCCIÓN

Los ácidos nucleicos son la huella dactilar de la vida: constituyen el material hereditario, encargado de almacenar y transmitir la información genética en todos los organismos vivos.

El descubrimiento, a principios de la década de 1980, de la capacidad de ciertas secuencias naturales de ARN para actuar como enzimas[1,2] (ribozimas), supuso una revolución en el ámbito científico. Los ácidos nucleicos empezaron a considerarse sofisticadas moléculas funcionales más allá de ser meros portadores de la información genética. La existencia de estos ácidos nucleicos funcionales no codificantes de forma natural alentó la idea de "seleccionar" in vitro dichas secuencias, lo que unido a la introducción de la PCR (Polymerase Chain Reaction o reacción en cadena de la polimerasa en sus siglas en inglés) propició que en 1990 tres laboratorios, y de modo independiente, describiesen la selección sistemática de ácidos nucleicos funcionales utilizando técnicas de selección *in vitro*[3-5]. La aplicación de esta técnica denominada SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) permitió la obtención de oligonucleótidos de ARN o ADN capaces de catalizar reacciones bioquímicas (ribozimas, ADNzimas) o de unirse con una elevada especificidad a un ligando (aptámeros).

Más recientemente, el descubrimiento de pequeñas secuencias naturales de ARN no codificantes que desempeñan un papel importante en el control de la expresión genética en bacterias, eucariotas y organismos superiores, denominadas "riboswitches"[6-8] (secuencias de ARN que actúan como interruptores moleculares) ha confirmado la versatilidad de los ácidos nucleicos. La existencia de "riboswitches", capaces de detectar la presencia de pequeños metabolitos, y uniéndose a ellos, producir un cambio conformacional que promueva la expresión de un gen determinado, demuestra que la naturaleza utiliza dominios aptaméricos para asegurar su unión de modo específico y con un elevada afinidad a dichos metabolitos.

Todo ello, unido al desarrollo de sistemas automatizados para la síntesis de oligonucleótidos que permiten la obtención de oligonucleótidos de ADN o ARN a la carta de forma rápida y a un precio competitivo, propició el empleo de secuencias de ARN o ADN como receptores moleculares en el desarrollo de biosensores.

Inicialmente se emplearon los ácidos nucleicos como receptores moleculares para la detección de secuencias oligonucleotídicas específicas basándose en la

complementariedad de las bases. Sin embargo, el empleo de ácidos nucleicos como reactivos de reconocimiento molecular para el desarrollo de biosensores no se limita únicamente a sensores de hibridación, sino que los ácidos nucleicos permiten la determinación de moléculas de distinta naturaleza. El empleo de aptámeros como receptores de afinidad ha abierto la posibilidad de detección de un gran número de analitos de distinta naturaleza, aunque ésta depende de la existencia previa de una secuencia específica que sea capaz de reconocer al analito de interés. Sin embargo, los ácidos nucleicos también han permitido abordar este inconveniente, ya que éstos pueden actuar como estructura sensora para la determinación de moléculas de naturaleza no nucleotídica para las que no se ha seleccionado previamente un aptámero.

1.1. ÁCIDOS NUCLEICOS FUNCIONALES COMO REACTIVOS DE AFINIDAD: APTÁMEROS

Los aptámeros son secuencias oligonucleotídicas artificiales de cadena sencilla (ADN o ARN) capaces de reconocer con una alta especificidad y afinidad moléculas de naturaleza no nucleotídica, desde iones (p.ej. Zn^{2+})[9] y moléculas pequeñas (p.ej. ATP[10], teofilina[11], cocaína[12], antibióticos aminoglicósidos[13,14]), hasta proteínas (p.ej. factor de crecimiento derivado de plaquetas[15], trombina[16], proteína Tat del VIH[17]) o incluso células completas (p.ej. Células leucémicas Jurkat T[18], *Escherichia coli*[19], *Salmonella*[20,21]).

La palabra aptámero, derivada del latín *"aptus"* que significa *"ajustar"* y del griego *"mero"*, que significa *"partícula"*, fue utilizada por primera vez en el año 1990 por Ellington y Szostak para referirse a moléculas de ARN capaces de unirse a un colorante orgánico[3].

Las secuencias oligonucleotídicas de cadena sencilla que conforman los aptámeros, con una longitud típicamente menor de 100 bases, son capaces de adoptar diversas conformaciones tridimensionales (Figura 1.1) lo que les confiere la capacidad de interaccionar con, potencialmente, cualquier tipo de molécula diana. En presencia de la molécula diana para la que han sido seleccionados, la mayor parte de los aptámeros sufren un cambio conformacional de modo que se crea un sitio de enlace específico para dicha molécula. Diversos estudios estructurales han permitido conocer

la naturaleza de las interacciones intermoleculares que se establecen entre el o los sitios de unión del aptámero y la molécula diana: complementariedad en la forma tridimensional, interacciones entre componentes aromáticos y las nucleobases de los aptámeros, interacciones electrostáticas entre grupos cargados y enlaces de hidrógeno[22-24].

El estudio en profundidad de la capacidad de reconocimiento de los aptámeros hacia todo tipo de moléculas no nucleotídicas ha abierto una nueva ventana de aplicaciones que incluye el diagnóstico clínico, biosensores y uso terapéutico.

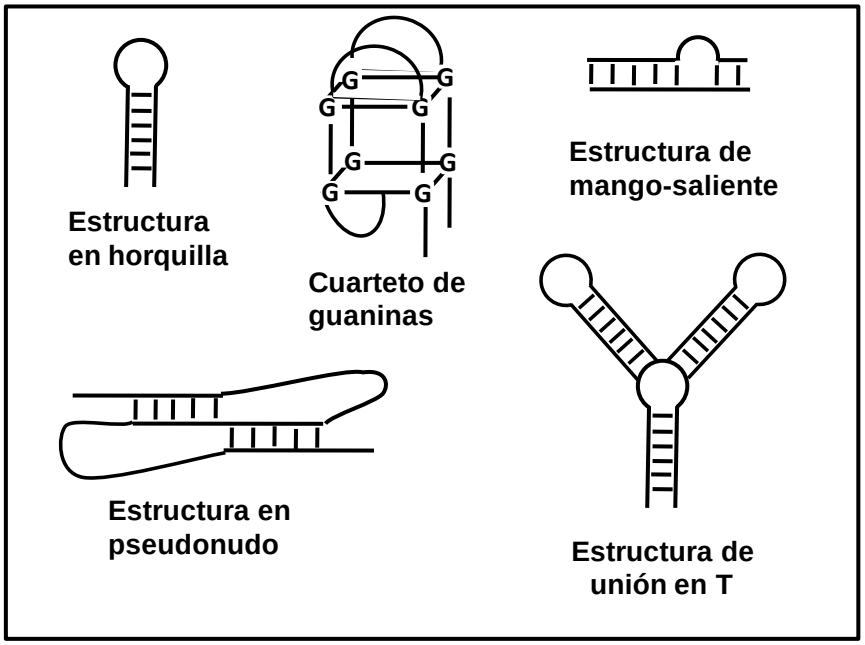

Figura 1.1. Estructuras tridimensionales que adoptan los aptámeros tras el reconocimiento de la molécula diana.

1.1.1. Selección de aptámeros. El proceso SELEX.

Los aptámeros se obtienen mediante un proceso de selección *in vitro* denominado SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment), descrito por primera vez en 1990[3-5]. Se trata de un proceso iterativo de selección y amplificación que se rige por el mismo principio que la selección natural y que permite el aislamiento de moléculas de ARN/ADN que reconocen específicamente a una molécula diana a partir de una biblioteca inicial compuesta por una elevada cantidad de secuencias diferentes.

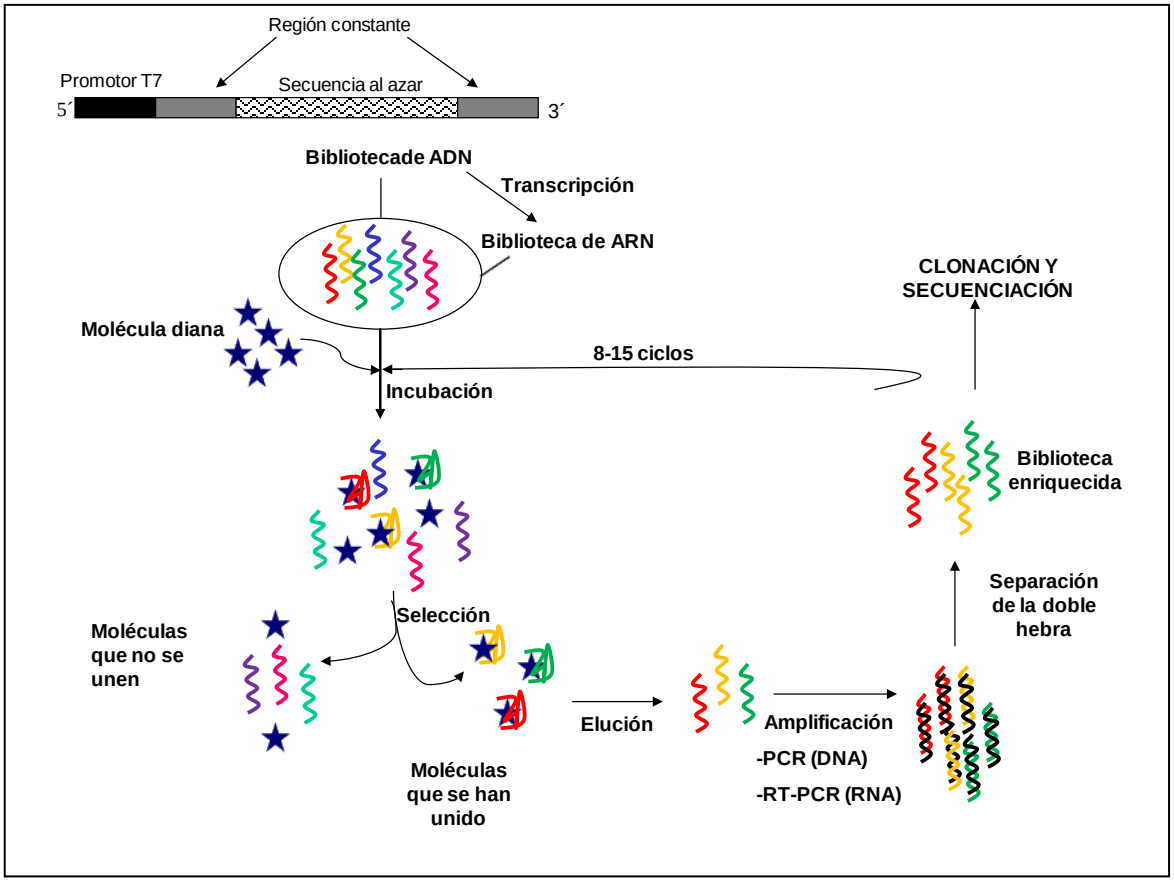

Figura 1.2. Representación esquemática del proceso de selección de un aptámero, SELEX.

El procedimiento SELEX, esquematizado en la figura 1.2, parte de la síntesis de una biblioteca inicial de ADN, compuesta habitualmente por 10^{14}-10^{15} moléculas distintas. Cada molécula está formada por una parte central con igual número de bases (habitualmente 20-80 nucleótidos) pero cuya secuencia es aleatoria flanqueada por dos regiones constantes necesarias para llevar a cabo la etapa de amplificación, ya que la región constante del extremo 5' tiene una secuencia idéntica a uno de los cebadores, mientras que la del extremo 3' es complementaria al otro cebador. Cuando el objetivo es la obtención de un aptámero de ADN la biblioteca se utiliza directamente en el proceso de selección. Sin embargo, cuando se persigue la obtención de un aptámero de ARN, la biblioteca inicial de ADN se somete en primer lugar a un proceso de transcripción obteniéndose una biblioteca de ARN. Para ello es necesario la introducción de un promotor T7 en el extremo 5´ de cada secuencia. Éste permite que la ARN polimerasa T7 sea capaz de transcribir las secuencias de ADN de doble hebra a secuencias de ARN que conformarán la biblioteca aleatoria inicial para la selección de un aptámero de ARN.

Una vez sintetizada la biblioteca inicial se procede a la selección del aptámero. Cada ciclo de selección incluye una etapa de incubación con la molécula diana, seguida de la separación de los oligonucleótidos que se han unido a ésta de los que permanecen libres en disolución y la recuperación o elución de las secuencias de mayor afinidad para su posterior amplificación.

Uno de los puntos críticos en el desarrollo del proceso SELEX es la separación entre las secuencias que se han unido a la molécula diana de las que no lo han hecho. De la eficiencia de este paso dependerán las características de enlace de los aptámeros seleccionados (afinidad y selectividad). Una de las primeras técnicas utilizadas para llevar a cabo dicha separación fue la filtración a través de nitrocelulosa[5,25,26], siendo el principio de separación la exclusión por tamaños. Aunque ampliamente utilizada, se trata de una técnica de separación que acarrea problemas importantes tales como la interacción inespecífica de los oligonucleótidos con la membrana, produciéndose un enriquecimiento en secuencias no afines a la molécula diana. Una solución habitual para mejorar dicha separación es la inmovilización de la molécula diana sobre un soporte. Alguna de las técnicas más ampliamente utilizadas para conseguir una separación eficiente son: cromatografía de afinidad[27], electroforesis capilar[28,29], SPR[30] ,citometría de flujo[31], o la utilización de partículas magnéticas[32].

Una vez realizada la separación, las secuencias oligonucleotídicas unidas, y por tanto, aquellas que son candidatas a constituir un aptámero son recuperadas y amplificadas mediante PCR, si se trata de la selección de un aptámero de ADN, o mediante RT-PCR, si la selección es de un aptámero de ARN. El resultado de esta etapa de amplificación son secuencias de ADN de doble hebra. Éstas deben ser transformadas en secuencias de ADN de hebra sencilla mediante una simple separación de ambas hebras cuando se está seleccionando un aptámero de ADN o serán sometidas a una transcripción *in vitro* para obtener las correspondientes secuencias de ARN en el caso de que se esté seleccionando un aptámero de ARN. El resultado de este proceso es una biblioteca enriquecida en las secuencias que mostraron una mayor afinidad hacia la molécula diana, la cual constituye la biblioteca inicial en el siguiente ciclo de selección.

Típicamente son necesarios de 8 a 12 ciclos de selección y amplificación para que la biblioteca inicial se enriquezca en secuencias que se unen específicamente a la

molécula diana. Es habitual introducir algún ciclo de contra-selección, con el objetivo de minimizar la cantidad de oligonucleótidos que se unen inespecíficamente.

Una vez que la afinidad de la biblioteca inicial se ha enriquecido en un determinado número de secuencias que presentan una elevada afinidad por su molécula diana se procede a su clonación y secuenciación. Tras la secuenciación de los clones (normalmente unos 50) se identifican las secuencias homólogas mediante alineamiento de éstas empleando programas informáticas diseñados al efecto. Los clones que presentan secuencias consenso son sometidos a ensayos de enlace para determinar su afinidad y especificidad. Finalmente se realizan truncados de los clones previamente caracterizados con el objetivo de delimitar las regiones que poseen la capacidad de unirse específicamente a la molécula diana y que suelen estar en el intervalo de 15 a 40 nucleótidos.

Una vez definidas las secuencias que conforman los aptámeros es de crucial importancia la caracterización del enlace aptámero-molécula diana mediante estudios de afinidad, selectividad y conformación tridimensional. El conocimiento de dichas estructuras facilitará el diseño de estrategias que empleen aptámeros como elementos de reconocimiento, como por ejemplo el desarrollo de biosensores.

La naturaleza oligonucleotídica de los aptámeros permite que una vez seleccionados y caracterizados éstos se puedan someter a modificaciones post-SELEX con el objetivo de incrementar su estabilidad (introduciendo modificaciones en las bases nitrogenadas), mejorar sus características de enlace (introduciendo grupos funcionales) o hacer posible su aplicación en distintos campos tales como el diagnóstico o el análisis (introducción de marcadores que permitan una fácil detección o de grupos funcionales que permitan su inmovilización).

El método SELEX ha sido aplicado con éxito en la selección de aptámeros contra todo tipo de moléculas. En la literatura se pueden encontrar gran cantidad de artículos en los que se revisan los procesos de selección empleados así como las distintas modificaciones realizadas sobre el método SELEX con el objetivo de conseguir aptámeros de modo más rápido, eficaz y económico[33-38].

1.1.2. Propiedades de los aptámeros como elementos de bioreconocimiento.

Los aptámeros se presentan como el equivalente oligonucleotídico de los anticuerpos. Dicha naturaleza oligonucleotídica les confiere una serie de características ventajosas respecto a los anticuerpos, de naturaleza proteica, en el campo de las aplicaciones analíticas (Tabla 1.1).

A pesar de que los ácidos nucleicos poseen una cantidad de grupos funcionales notablemente inferior quelas proteínas, la capacidad de enlace de los aptámeros rivaliza con la observada para los anticuerpos. Los aptámeros presentan una elevada afinidad hacia su molécula diana, lo cual se manifiesta en los valores de sus constantes de disociación, situadas en el intervalo pM-μM, y por tanto comparables a las observadas en muchos casos para los anticuerpos. En general los aptámeros de mayor afinidad son aquellos que han sido seleccionados para reconocer a moléculas grandes, como proteínas, mientras que los aptámeros que reconocen moléculas de baja masa molecular suelen presentar una menor afinidad. Esto se debe a que las moléculas de mayor peso molecular presentan estructuras más complejas, y por lo tanto, son capaces de establecer mayor cantidad de interacciones entre la molécula diana y la secuencia oligonucleotídica seleccionada. Además los aptámeros presentan una excelente selectividad, lo que les confiere la capacidad de diferenciar entre moléculas que poseen una estructura muy parecida. Este es el caso del aptámero anti-teofilina[11], el cual se enlaza a su molécula diana con una afinidad 10.000 veces mayor que a la cafeína, estructura que solo se diferencia en un grupo metilo de la teofilina. Los aptámeros también son capaces de mostrar enantioselectividad[39], lo que hace posible su utilización como reactivos quirales en cromatografía de afinidad[40].

Por otro lado, el proceso de selección *in vitro* (detallado en el apartado anterior) ha hecho posible la obtención de aptámeros específicos hacia moléculas diana de muy distinta naturaleza, desde iones, hasta células enteras, pasando por proteínas, aminoglicósidos, virus, incluyendo moléculas no immunogénicas y tóxicas, muchas de las cuales aparecen recogidas en una base de datos específica de aptámeros[41]. La capacidad potencial de obtención de un aptámero frente a cualquier analito contrasta con la obtención de anticuerpos, que es más limitada y requiere la inmunización *in vivo* de un animal. El método SELEX abre también la posibilidad de obtener aptámeros específicos dirigidos hacia una zona concreta de la molécula, lo cual no es posible con los anticuerpos.

Tabla 1.1. Comparación de las propiedades de aptámeros y anticuerpos como elementos de bioreconocimiento

	APTÁMEROS	ANTICUERPOS
Afinidad	pM-μM	pM-μM
Especificidad	Elevada	Elevada
Producción	*In vitro*	*In vivo*
Tipos de analitos	Amplio: iones, moléculas pequeñas, proteínas	Restringido: compuestos immunogénicos y no tóxicos
Variación entre lotes	Baja	Elevada
Modificación química	Sencilla	Limitada
Desnaturalización	Reversible	Irreversible

Una vez conocida la secuencia de bases que exhibe la mayor afinidad hacia la molécula diana, ésta se sintetiza químicamente, lo que elimina las variaciones entre lotes típicas de la producción de anticuerpos. La síntesis química permite además obtener los aptámeros con un elevado grado de pureza. También es posible, si se considera necesario, la modificación química post-SELEX de la secuencia oligonucleotídica con el objetivo de aumentar su estabilidad, afinidad o especificidad[42,43]. Por ejemplo, en el desarrollo de diferentes aplicaciones analíticas, basadas en el empleo de aptámeros como elementos de bioreconocimiento, es habitual la introducción de modificaciones químicas que permitan su inmovilización sobre soportes sólidos[44] o la introducción de marcadores que faciliten la transducción de una señal[45,46].

Otra característica destacable de los aptámeros es su capacidad de recuperación de la conformación inicial tras su desnaturalización térmica o química (en condiciones extremas de pH o cambios en la concentración salina), dato que contrasta con la desnaturalización irreversible que sufren los anticuerpos cuando se ven expuestos a temperaturas elevadas o en condiciones extremas de pH.

Los aptámeros experimentan cambios en su estructura tridimensional como consecuencia del reconocimiento molecular de su respectiva molécula diana. Esta es una de las propiedades más destacables de los aptámeros y que los diferencian por completo de los anticuerpos, los cuales no sufren cambio conformacional alguno como fruto de su enlace. Este cambio conformacional ha sido clave en el desarrollo de numerosas aplicaciones analíticas que emplean los aptámeros como elementos de

reconocimiento[47]. Sin embargo, la magnitud de este cambio conformacional no es igual para todos los aductos aptámero-molécula diana, siendo casi indetectable en el caso de algunos aptámeros seleccionados contra moléculas pequeñas.

Uno de los problemas más importantes que supone el trabajo con aptámeros es su relativa inestabilidad frente a la actividad de las nucleasas (ARNasas y ADNasas), especialmente en el caso de aptámeros de ARN, donde la estabilidad frente a la hidrólisis enzimática es un factor crítico que limita su uso tanto *ex vivo* como *in vivo*. Esta inestabilidad a la degradación por las nucleasas tiene su origen en la capacidad de estos enzimas para catalizar el ataque del grupo hidroxilo situado en la posición 2´ del azúcar al enlace fosfodiéster contiguo, lo que resulta en la destrucción del esqueleto del ácido nucleico.

Con el objetivo de superar esta dificultad se han descrito distintas estrategias entre las que cabe destacar la introducción de modificaciones post-SELEX, la selección de aptámeros modificados y el desarrollo de los llamados "*spiegelmers"*, que serán revisadas en profundidad en el apartado 1 del capítulo 3 del presente trabajo.

1.2. APLICACIONES ANALÍTICAS DE LOS APTÁMEROS: APTASENSORES ELECTROQUÍMICOS.

Las ventajosas y únicas características que muestran los aptámeros como elementos de reconocimiento han permitido su aplicación en el campo de la biotecnología y la investigación biomédica.

No cabe duda de que el gran interés generado alrededor de la investigación que conlleva el empleo de aptámeros como bioreceptores ha sido impulsado por sus aplicaciones en el campo de la biomedicina, en los que se incluyen el diagnóstico clínico[48-50] y su potencial como agentes terapéuticos[51,52]. El primer aptámero aprobado para su uso como agente terapéutico fue el aptámero seleccionado para unirse al factor de crecimiento vascular endotelial[53], VEGF en sus siglas en inglés. El derivado pegilado de dicho aptámero de ARN (Figura 1.3), conocido como Pegaptanib o Macugen, se utiliza para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad[54].

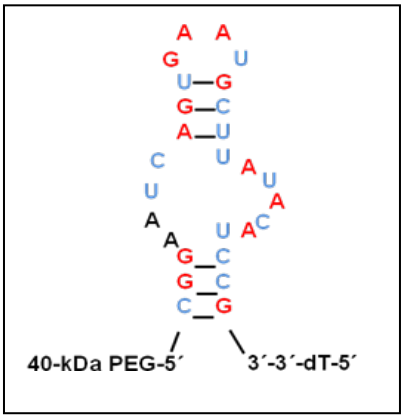

Figura 1.3. Secuencia y estructura secundaria del pegaptanib. En rojo se muestran las bases púricas metiladas; en azul las bases pirimidínicas modificadas con 2´-F y en negro las bases sin modificar.

Sin embargo, el campo de aplicación de los aptámeros no se limita solamente a estas dos líneas de investigación. De la mano de los avances logrados en estos campos han surgido nuevas y prometedoras aplicaciones. Uno de los campos que se encuentra en una fase de gran expansión es el de las aplicaciones analíticas. Los aptámeros fueron utilizados por primera vez con fines analíticos en 1996 por Drolet y colaboradores, quienes describieron el primer ensayo ELONA o ensayo enzimático con oligonucleótidos (Enzyme Linked Oligonucleotide Assay), análogo al ELISA sándwich en el que se substituyen los anticuerpos por aptámeros[55]. Desde entonces, los aptámeros se han empleado como elementos de bioreconocimiento en numerosas aplicaciones analíticas tales como cromatografía de afinidad, electroforesis capilar o electrocromatografía. Se han publicado varios artículos de revisión y libros donde se puede obtener una visión general de dichas aplicaciones[56-62].

Una de las líneas de investigación que desde hace unos años está atrayendo una gran atención es el empleo de aptámeros como elementos de reconocimiento para el desarrollo de biosensores[61,63-70], denominados también **aptasensores**. Un biosensor es un dispositivo que utiliza reacciones biológicas para detectar un analito de interés, integrando un elemento de reconocimiento molecular, que en el caso de los aptasensores se tratará de un aptámero, y un sistema de transducción capaz de traducir el evento de bioreconocimiento en una señal eléctrica. Dependiendo del sistema de transducción los biosensores se pueden clasificar en diferentes categorías p.ej. ópticos[71-74], piezoeléctricos[72] o electroquímicos[47,67,75].

De entre la amplia gama de aptasensores descritos en la literatura merecen una especial atención aquellos con detección electroquímica. La aparición de los aptasensores electroquímicos fue más tardía que en el caso de otros sistemas de transducción como los ópticos. De hecho el primer aptasensor electroquímico fue descrito por Ikebukuro y colaboradores en el año 2005[76]. Sin embargo, las características ventajosas de los métodos electroquímicos para el desarrollo de biosensores han impulsado su desarrollo, que ha experimentado un gran aumento en los últimos años. Una de las ventajas que aportan los métodos de detección electroquímica es la simplicidad de la instrumentación necesaria, lo que la hace barata, fácil de manejar y facilita su miniaturización y, por lo tanto, el desarrollo de dispositivos portátiles que puedan utilizarse fuera de un laboratorio, en el punto de necesidad. Otra ventaja que ofrecen los métodos electroquímicos es la relativa escasez de contaminantes electroactivos en muestras reales capaces de alterar las medidas generando falsos positivos. Esto contrasta con la abundancia de fluoróforos y sistemas que desactivan la fluorescencia (quenchers) en muestras reales, que alteran las medidas obtenidas por métodos ópticos, a lo que hay que sumar la necesidad de instrumentación sofisticada y difícilmente miniaturizable.

En general, el desarrollo de nuevas estrategias en el diseño de aptasensores electroquímicos ha ido ligado a la detección de moléculas diana de elevadamasa molecular como es el caso de las proteínas. Más aún, gran parte de las estrategias propuestas emplean la proteína trombina (factor importante en la cascada de la coagulación sanguínea) como modelo para la detección de este tipo de moléculas. Menos frecuentes son las estrategias descritas para determinar moléculas de baja masa molecular, para las que la aplicación directa de los diseños válidos para proteínas no es siempre exitosa, siendo necesaria su adaptación o el desarrollo de nuevos diseños que se adapten a las características intrínsecas de este tipo de moléculas.

A continuación se revisarán las estrategias más comunes en el diseño de aptasensores electroquímicos para moléculas de elevado peso molecular comentándose la posibilidad de su aplicación para moléculas pequeñas. Seguidamente se revisarán las estrategias propuestas en la literatura para la determinación de moléculas pequeñas mediante la construcción de aptasensores electroquímicos.

1.2.1. Estrategias de diseño de aptasensores electroquímicos para proteínas.

Las estrategias descritas en la literatura para la determinación de proteínas empleando aptasensores electroquímicos se pueden dividir en cuatro grupos: (a) ensayos directos; (b) ensayos tipo sándwich; (c) ensayos de desplazamiento y competitivos y (d) ensayos basados en cambios conformacionales de la estructura tridimensional del aptámero.

(a) Ensayos directos.

El esquema de ensayo directo, el más sencillo de todos los posibles, se beneficia de la capacidad de los aptámeros para generar una señal medible como consecuencia del reconocimiento de la molécula diana sin necesidad de ninguna marca.

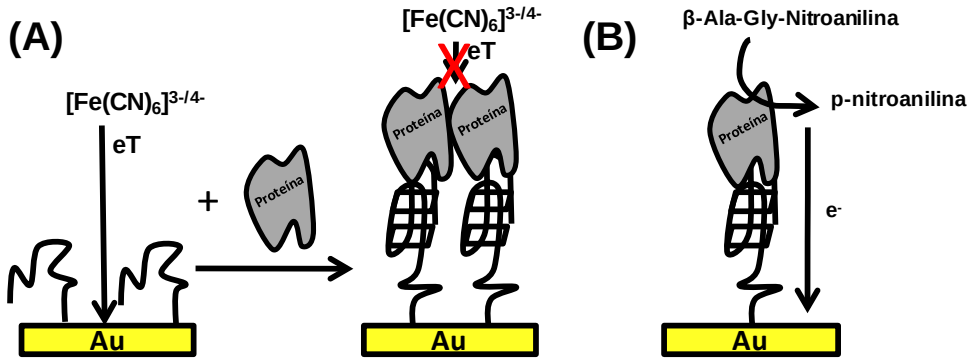

Figura 1.4. Ensayo electroquímico directo para la determinación de proteínas empleando como principio de medida (A) cambios en el comportamiento de la superficie sensora tras el reconocimiento molecular de la proteína y (B) propiedades intrínsecas de la proteína capturada por el aptámero.

Un ensayo directo se basa en la medida de cambios en el comportamiento de la superficie sensora producidos por la formación del complejo aptámero-proteína. Se han descrito varios ensayos directos para la detección de proteínas empleando técnicas de detección que por su principio de medida no necesitan el empleo de marcas como la espectroscopia de impedancia faradaica (FIS). Un ejemplo es la determinación de trombina tras ser reconocida por el aptámero anti-trombina inmovilizado sobre una superficie de oro. Esta interacción provoca un aumento de la resistencia a la transferencia electrónica registrada debido al efecto bloqueante de la proteína[77] (Figura

1.4.A). Se han empleado diseños similares para la detección de las proteínas lisozima[78] y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)[79].

Las posibilidades de aplicación de este esquema de detección a la determinación de moléculas pequeñas son muy limitadas. Su baja masa molecular es responsable de que los cambios producidos en la superficie sensora con motivo del reconocimiento molecular sean prácticamente indetectables.

Otra posibilidad a la hora de diseñar un ensayo directo es aprovechar las propiedades intrínsecas de la molécula diana. Un ejemplo es la determinación de la trombina enlazada midiendo su actividad como proteasa[80] (Figura 1.4.B). Obviamente este esquema no es generalizable debido a que depende de la capacidad del analito para generar un producto electroquímicamente activo.

(b) Ensayos sándwich

Los denominados aptasensores electroquímicos tipo sándwich derivan de los ampliamente utilizados ensayos ELISA los cuales emplean dos anticuerpos diferentes para un mismo analito: el de captura o primario, que se encuentra inmovilizado sobre un soporte sólido, y el de detección o secundario, que incorpora una marca responsable de la obtención de una señal analítica.

La posibilidad de diseño de un aptasensor tipo sándwich para una determinada molécula diana se ve limitada al cumplimiento de dos requisitos imprescindibles: (1) disponibilidad de dos aptámeros distintos descritos que reconozcan una misma molécula diana; (2) el analito debe mostrar dos sitios de unión lo suficientemente diferentes y alejados para que la unión de un ligando no afecte a la unión del segundo.

Prácticamente la totalidad de las estrategias que emplean un ensayo sándwich para la determinación de proteínas toman a la proteína trombina como molécula modelo debido a que se han descrito dos aptámeros capaces de enlazarse a esta molécula en dos sitios de reconocimiento distintos: un aptámero de 15 nucleótidos de longitud (15-mer) que reconoce el sitio de unión del fibrinógeno con una K_D=26 nM[16], y un aptámero 29-mer que reconoce el sitio de unión de la heparina con una K_D=0,5 nM[81].

Ikebukuro y colaboradores desarrollaron el primer aptasensor electroquímico tipo sándwich para la determinación de trombina[76] (Figura 1.5). En este diseño se

inmoviliza el aptámero anti-trombina 29-mer sobre una superficie electródica de oro. Tras el enlace del analito trombina, se añade el aptámero anti-trombina 15-mer marcado con la enzima glucosa deshidrogenasa (GDH), enlazándose al otro sitio de unión de la trombina, que queda capturada entre ambos aptámeros. La cantidad de trombina enlazada se cuantifica mediante la oxidación enzimática de la glucosa en presencia de un mediador que se determina amperométricamente, obteniéndose un límite de detección de 10 nM. Posteriormente, se han propuesto variaciones de este esquema empleando otras marcas enzimáticas para la generación de la señal electroquímica[46].

Debido a que la trombina presenta dos sitios de unión para el aptámero anti-trombina 15-mer se han podido diseñar aptasensores electroquímicos tipo sándwich donde dicho aptámero actúa tanto de aptámero primario como secundario. El grupo del Prof. Willner ha diseñado un ensayo sándwich donde el aptámero 15-mer que actúa como secundario está marcado con nanopartículas de Pt[82]. En este ensayo se utilizó como señal analítica la reducción del H_2O_2 a H_2O catalizada por el Pt, obteniéndose un límite de detección de 1 nM.

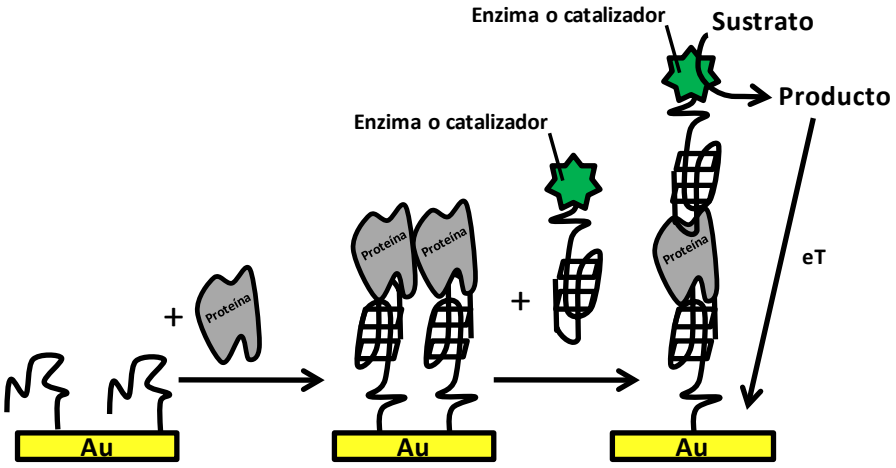

Figura 1.5. Esquema de un aptasensor electroquímico tipo sándwich para la determinación de una proteína.

Es obvio que la aplicación de este tipo de aptasensores está limitada al número de moléculas para las que se ha descrito más de un aptámero. Con el objetivo de ampliar la variedad de analitos para los que se puede diseñar un aptasensor electroquímico tipo sándwich se ha propuesto el empleo de estrategias combinadas,

donde uno de los dos reactivos de afinidad, primario o secundario, es un aptámero y el otro un anticuerpo. El grupo del Prof. Mascini ha diseñado un ensayo para la determinación de la proteína C-reactiva (CRP) empleando dicha estrategia[83]. Otro ejemplo de ensayo sándwich combinado que emplea un aptámero y un anticuerpo como elementos de reconocimiento molecular fue diseñado para la determinación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) empleando un sistema de detección basado en la amplificación de ADN circular (rolling circle amplification). En este caso se aprovechó la naturaleza oligonucleotídica del reactivo secundario, el aptámero, que facilita la introducción de un cebador para iniciar la amplificación isotérmica. De esta forma se pueden generar cientos de copias de la plantilla circular de ADN, que se hibridaron posteriormente con una sonda de captura biotinilada, que permitió la unión de una gran cantidad de conjugado enzimático, ALP unida a estreptavidina. La detección final se llevó a cabo mediante la adición del sustrato de dicha enzima, el ascorbato-2-fosfato, cuyo producto, el ácido ascórbico, reduce los iones plata presentes en el medio (Ag^+) a Ag, que se electrodeposita sobre la superficie del electrodo. La cantidad de plata se cuantifica mediante voltametría de barrido lineal, alcanzándose un límite de detección de 10 fM[84].

La necesidad de disponer de dos sitios de unión independientes, de modo que la unión del primero no impida o modifique el enlace del segundo de ellos, hace imposible que esta estrategia sea aplicable a la determinación de moléculas pequeñas. Más adelante se comentará cómo la tecnología basada en el empleo de aptámeros ha intentado resolver este problema.

(c) Ensayos de desplazamiento y competitivos.

Los formatos de ensayo de desplazamiento y competitivos que emplean aptámeros como elemento de reconocimiento son, al igual que los formatos tipo sándwich, una adaptación directa de los ampliamente empleados inmunoensayos. Se requiere la inmovilización de una de las dos biomoléculas involucradas, aptámero o analito, siendo más habitual la inmovilización del aptámero sobre un soporte sólido, de modo que las moléculas del analito sin modificar compitan con (formato competitivo) o desplazan a (formato de desplazamiento) moléculas del analito marcadas por un número limitado de sitios de enlace. La presente memoria se centra en los aptasensores electroquímicos, por lo que la revisión se restringe a ensayos en los que las marcas introducidas sean moléculas electroactivas, que generan respuestas

electroquímicas directas, o que hagan posible la obtención de éstas, por ejemplo mediante una reacción enzimática en una etapa posterior al evento de reconocimiento.

El grupo de investigación dirigido por C. O´Sullivan fue uno de los pioneros en la aplicación de estos formatos de ensayo a la detección de trombina empleando el aptámero anti-trombina 15-mer (TBA) como receptor de afinidad. Se describieron diversos ensayos competitivos y de desplazamiento en los que se utilizó la enzima HRP como marca, bien unida a la trombina, en cuyo caso el aptámero TBA se inmoviliza sobre la superficie sólida o bien al aptámero, inmovilizándose la trombina sobre el soporte sólido. El formato más adecuado fue un esquema de desplazamiento donde el analito sin marcar desplaza al analito marcado con HRP de los sitios de unión del TBA inmovilizado sobre el soporte sólido. Se llevó a cabo la detección tanto óptica como electroquímica obteniéndose límites de detección de 4,5 y 1 nM, respectivamente[85]. Un formato de desplazamiento similar fue empleado para la determinación simultánea de trombina y lisozima donde ambas proteínas libres en disolución desplazan a las respectivas proteínas marcadas y previamente unidas a los aptámeros anti-trombina y anti-lisozima inmovilizados sobre un soporte sólido[86]. Las marcas escogidas fueron dos tipos de nanopartículas de semiconductores (quantum dot). La cuantificación de cada proteína se obtuvo solubilizando en medio ácido las marcas que permanecieron enlazadas a la superficie y midiendo el metal que las forma mediante voltametría de redisolución anódica. Se obtuvieron límites de detección de 0,5 pM.

Más recientemente se ha descrito un ensayo competitivo para la determinación de trombina empleando partículas magnéticas como soporte sólido sobre el que se inmovilizó el aptámero anti-trombina TBA. La respuesta del ensayo se basa en la competición entre la trombina natural y trombina marcada con biotina, ambas en disolución, por los sitios de unión del aptámero. Tras la competición se llevó a cabo una etapa de marcaje enzimático mediante la adición del conjugado enzimático estreptavidina-ALP, realizándose finalmente las medidas electroquímicas sobre electrodos serigrafiados de carbono. Se obtuvo un límite de detección de 430 nM de trombina[87], valor muy alejado del obtenido con un ensayo tipo sándwich similar, que fue de 0,45 nM[46]. Esta diferencia puede estar asociada a la obtención de una respuesta creciente en el caso del ensayo sándwich, que contrasta con la respuesta decreciente que proporciona el ensayo competitivo.

(d) Detección electroquímica basada en cambios conformacionales en la estructura tridimensional del aptámero.

El principio de medida de esta clase de biosensores electroquímicos recae sobre los cambios conformacionales que experimentan las estructuras tridimensionales de los aptámeros como resultado del reconocimiento molecular de su molécula diana. Por ello, este tipo de diseño es solamente aplicable cuando el elemento de reconocimiento es un aptámero, ya que los anticuerpos no experimentan cambios estructurales derivados del evento de reconocimiento.

Este tipo de diseños tienen su origen en los denominados faros moleculares aptaméricos o "aptabeacons". Estos son secuencias de ácidos nucleicos identificadas como aptámeros que se marcan con dos fluoróforos o con un binomio fluoróforo-desactivador de la fluorescencia en sus dos extremos. Esta configuración permite que el cambio conformacional que se produce tras la interacción del aptámero marcado con el analito, se traduzca en un cambio en la fluorescencia registrada. La adaptación de este tipo de sondas para realizar una detección electroquímica consistió en la inmovilización de la secuencia sobre una superficie electródica mientras que en el otro extremo se introduce una molécula electroactiva, típicamente azul de metileno (MB) o ferroceno (Fc). La interacción de dicha sonda inmovilizada con la molécula diana conlleva un cambio conformacional que provoca una alteración en la distancia de la marca electroactiva a la superficie electródica, provocando un aumento o una disminución de la cinética de la transferencia electrónica, lo que da lugar a un ensayo bien de curva de respuesta creciente ("signal-on") o de curva de respuesta decreciente ("signal-off"), respectivamente (Figura 1.6). En general, la puesta a punto de esta estrategia requiere un conocimiento previo de la conformación del aptámero antes y después del enlace al analito.

Esta metodología ha sido empleada para la determinación de proteínas como la trombina[45,88] o el factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF[89] obteniéndose límites de detección en el intervalo nM-pM. Se trata de un sistema electroquímico muy sencillo y que permite la determinación de moléculas diana sin necesidad de reactivos adicionales, incluso en muestras complejas como suero humano o sangre. Este diseño ha sido también aplicado a la determinación de moléculas pequeñas como es el caso de la cocaína[90] o la teofilina[91]. Sin embargo no se trata de un esquema de aplicación general, debido a que es necesario que el evento de reconocimiento induzca un cambio

importante en la conformación del aptámero (cuarteto de guaninas, estructura de unión en T típicamente). Con el objetivo de aumentar la variedad de analitos que se pueden determinar empleando este tipo de estrategias de análisis se ha propuesto la introducción de cambios en las secuencias aptaméricas de modo que se magnifique el cambio conformacional tras el reconocimiento molecular[92]. Sin embargo, este rediseño de las sondas es costoso y debe realizarse con cuidado de no alterar la afinidad y especificidad de los aptámeros modificados. Por ello suele ser preferible trabajar con las secuencias originalmente seleccionadas.

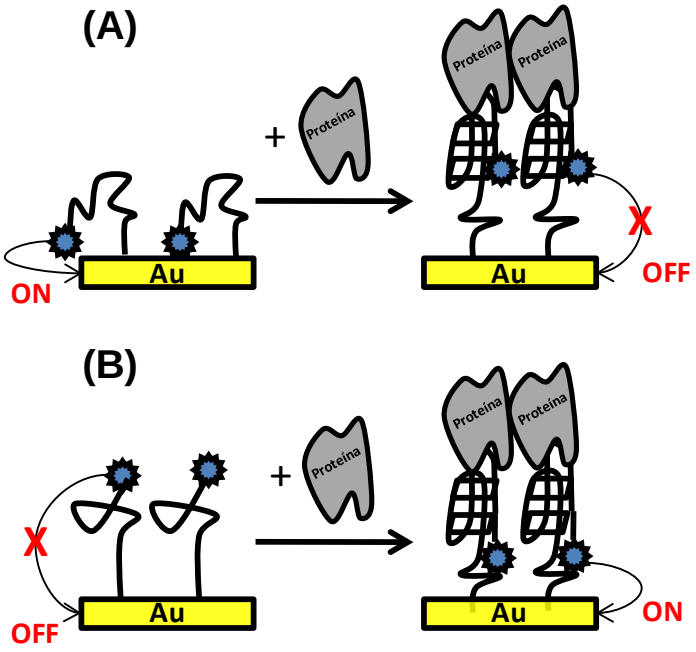

Figura 1.6. Aptasensor electroquímico para la determinación de proteínas basado en cambios conformacionales experimentados por el aptámero tras el reconocimiento molecular de su molécula diana. (A) Esquema "signal-off"; (B) Esquema "signal-on".

1.2.2. Estrategias de diseño de aptasensores electroquímicos para moléculas pequeñas.

La determinación de moléculas de pequeño tamaño molecular como metabolitos, fármacos, drogas sintéticas o herbicidas, es un problema de la máxima relevancia en diversas áreas del análisis. Este tipo de compuestos, comúnmente denominados haptenos en el contexto de los métodos inmunoquímicos de análisis, requieren, pues, una atención especial. La determinación de estos analitos empleando

aptasensores con formatos de ensayo como los descritos para la determinación de proteínas y en general moléculas de elevada masa molecular suele ser ineficaz. Así por ejemplo, los denominados ensayos directos, basados en la medida de los cambios en las propiedades de la superficie de la fase sensora inducidos por la formación del complejo aptámero-analito son de difícil aplicación para este tipo de moléculas, especialmente si se trata de moléculas neutras.

Uno de los pocos ejemplos de aptasensor electroquímico directo para la determinación de moléculas pequeñas es el propuesto recientemente para la determinación del antibiótico tetraciclina[93]. El aptámero anti-tetraciclina (76-mer, K_D= 63,6 nM) fue modificado con una molécula de biotina y se inmovilizó sobre un electrodo serigrafiado de oro mediante la interacción biotina-estreptavidina. La tetraciclina se cuantificó mediante voltametría cíclica debido a la diferencia en la velocidad de transferencia electrónica registrada entre una sonda electroactiva (iones ferrocianuro) y la superficie de oro antes y tras el enlace de la tetraclina. Los cambios observados tras el enlace del analito se asocian a cambios en la permeabilidad de la capa de reconocimiento hacia los iones ferricianuro, debidos tanto a cambios conformacionales del aptámero como fundamentalmente a la incorporación de la tetraciclina que en las condiciones de medida se encuentra ionizada. Este aptasensor permite detectar tetraciclina a concentraciones micromolar con un límite de detección 10 nM.

Para mejorar la sensibilidad de los ensayos para haptenos, en algunos casos es posible aprovechar los cambios conformacionales inducidos por la interacción de afinidad sobre la estructura de los aptámeros. Esta estrategia de ensayo es de aplicación únicamente en aquellos casos en los que el aptámero es capaz.de plegarse en distintas conformaciones tridimensionales tras producirse el enlace a su molécula diana. De ese modo, si el aptámero se inmoviliza sobre una superficie electródica por uno de sus extremos, mientras que en el otro se introduce una marca electroactiva, las reorganizaciones estructurales ligadas al enlace de la molécula diana se traducirán en cambios medibles de la señal electroquímica registrada.

Esta metodología se ha empleado satisfactoriamente para la determinación de moléculas pequeñas como la cocaína[90] (Figura 1.7) o la teofilina[91]. Además se ha integrado en un sistema microfluídico con detección electroquímica que permite la monitorización de forma muy rápida (1-2 min) de cocaína en suero humano y la regeneración del sistema[94].

Generalmente esta estrategia ha dado lugar a ensayos con señales crecientes con la concentración de analito como los señalados aunque en la literatura también se puede encontrar algún ejemplo de ensayo en el que el rediseño del aptámero, resulta en un ensayo de señal decreciente. Este es el caso de la determinación de ATP empleando una secuencia oligonucleotídica que contiene el aptámero anti-ATP. la disminución de la señal registrada tras la interacción de la fase sensora con el analito fue solamente de un 15%[92].

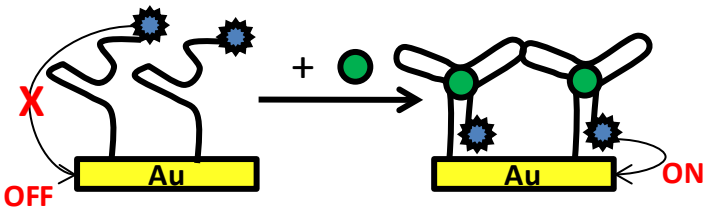

Figura 1.7. Aptasensor electroquímico para la determinación de cocaína basado en cambios conformacionales experimentados por el aptámero tras el reconocimiento molecular de su molécula diana.

También forman parte de este grupo aquellas estrategias que basan su principio de medida en el cambio conformacional experimentado por el aptámero tras el enlace del analito pero que requieren la adición de reactivos en disolución. Se trata de diseños que necesitan la introducción de una etapa sencilla posterior a la reacción de reconocimiento e inherente a la técnica de detección seleccionada. Es el caso de un aptasensor electroquimioluminiscente propuesto para la determinación de cocaína[95], adaptación del esquema propuesto anteriormente por Baker y colaboradores[90], o de un aptasensor electroquímico para la determinación de adenosina que utiliza un aptámero rediseñado que incluye el sitio de unión para la enzima de restricción EcoRI[96]. En el primer caso se inmovilizó un aptámero anti-cocaína modificado en su extremo 3´con un complejo de rutenio sobre un electrodo de grafito. La adición de cocaína acerca la marca hacia la superficie electródica y la medida electroquimioluminiscente se obtiene mediante voltametría cíclica en presencia de tri-n-propilamina, registrándose un límite de detección de 10 pM. En el segundo caso el elemento de reconocimiento propuesto es una sonda con estructura de horquilla que contiene el aptámero anti-adenosina en su bucle y una secuencia que es reconocida específicamente por la enzima EcoRI en su mango, de modo que la marca electroactiva (ferroceno) se encuentra cercana a la superficie electródica. En ausencia de adenosina el mango de la sonda permanece

intacto por lo que la adición de la enzima, cuya diana es el ADN de doble cadena, elimina la marca electroactiva de la superficie electródica. Por el contrario, cuando la adenosina está presente se produce un cambio conformacional en la sonda de captura que provoca la pérdida de la estructura de doble hélice que forma el sitio de unión de la enzima de restricción, por lo que la adición de ésta no elimina la marca electroactiva y se observa un incremento de la señal electroquímica asociada al ferroceno (ensayo "signal-on"). El ensayo presenta un intervalo dinámico lineal muy amplio, 4 órdenes de magnitud y un límite de detección de 100 pM.

Sin embargo esta estrategia no es aplicable a la determinación de moléculas pequeñas cuyos aptámeros previamente seleccionados exhiben estructuras secundarias fuertes en ausencia del analito y experimentan cambios mínimos tras enlazarse la molécula diana. Este es el caso de los antibióticos aminoglicósidos como la neomicina B o la tobramicina, cuyos aptámeros muestran una estructura en forma de horquilla. Para tratar de superar estos inconvenientes, con el objetivo de desarrollar formatos de ensayos con sensibilidad mejorada y que, idealmente sean de aplicación general para moléculas pequeñas, se han propuesto dos estrategias principales: a) empleo de aptámeros fragmentados en ensayos tipo sándwich; (b) ensayos de desplazamiento.

(a) Ensayos tipo sándwich para moléculas pequeñas: aptámeros fragmentados.

Aunque los ampliamente utilizados inmunoensayos tipo sándwich han servido de guía a la hora de desarrollar aptasensores electroquímicos para la determinación de proteínas, la aplicación de este tipo de estrategias no es directamente aplicable a moléculas pequeñas, debido a que su tamaño impide que sean reconocidos por dos ligandos simultáneamente. Incluso cuando se ha seleccionado más de un aptámero que enlaza la misma molécula, estos se enlazan alrededor de la misma región, haciendo imposible la formación del complejo ternario.

Una vez más, la versatilidad que la naturaleza oligonucleotídica confiere a los aptámeros ha abierto una nueva posibilidad para resolver este problema analítico. La clave radica en dividir la secuencia que conforma un aptámero contra una determinada molécula en dos mitades. El excelente comportamiento de los aptámeros como elementos de reconocimiento molecular permite que ambas subunidades sean capaces de reensamblarse en presencia de su molécula diana para dar lugar al complejo de

afinidad analito-aptámero. De esta manera, una de las subunidades en las que se divide el aptámero desempeña el papel de reactivo de captura, mientras que la otra actúa como reactivo de detección.

La primera evidencia de la capacidad de dos subunidades aptaméricas para reagruparse y reconocer específicamente al analito contra el que fueron seleccionados fue descrita por Huizenga y colaboradores[97] al intentar describir cómo la secuencia de ADN que habían desarrollado para enlazarse a la molécula ATP reconocía a su analito.

Esta primera observación culminó en el desarrollo del primer sensor basado en el reensamblaje de dos subunidades aptaméricas para la determinación de cocaína[12]. Como se puede ver en la figura 1.8 el aptámero anti-cocaína fue divido en dos subunidades las cuales se marcaron con una molécula fluorescente y con una molécula que actúa como desactivador de la fluorescencia, respectivamente. De este modo el reconocimiento molecular provocó el acercamiento de ambas marcas y la disminución de la intensidad de fluorescencia.

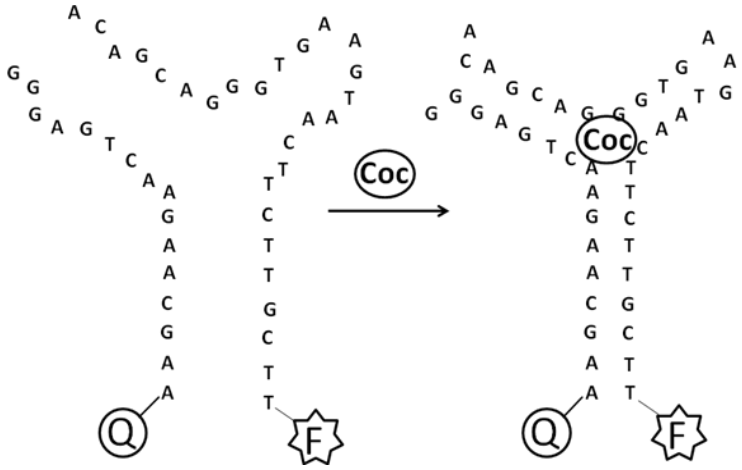

Figura 1.8. Aptasensor homogéneo para la determinación de cocaína basado en el reensamblaje de dos subunidades aptaméricas.

Esta estrategia ha sido posteriormente adaptada al diseño de aptasensores electroquímicos. Para ello fue necesario, en primer lugar, inmovilizar una de las subunidades sobre una superficie electródica. Tras el reconocimiento molecular del analito la segunda subunidad aptamérica permitió llevar a cabo la detección. Esta detección puede estar basada en el acercamiento de una marca electroquímicamente

activa unida covalentemente a la segunda subunidad aptamérica o por el contrario, tratarse de un esquema de detección sin marcas, basado en la incorporación de sondas electroactivas en disolución tras el evento de reconocimiento, cuyo proceso de electrodo se vea afectado por este.

La inmovilización de una de las dos subunidades sobre un electrodo de oro y su posterior detección empleando el azul de metileno como marca electroactiva unida a la segunda subunidad ha sido aplicada a la detección de cocaína y ATP[98] (Figura 1.9). El ensayo es rápido (1-2 min) y permite la determinación de niveles submM de ambos analitos en matrices complejas como suero sanguíneo y lisados celulares.

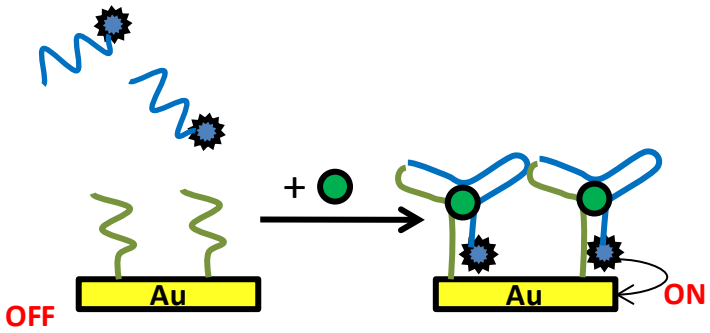

Figura 1.9. Aptasensor electroquímico tipo "sándwich" para la detección de cocaína.

Un diseño similar se empleó para la determinación simultánea de cocaína y ATP utilizando como marca dos tipos de nanopartículas de semiconductores diferentes (CdS y PbS)[99]. Una de las dos subunidades aptaméricas de cada uno de los dos aptámeros se inmovilizaron sobre una superficie electródica de oro. Las otras subunidades marcadas con la correspondiente nanopartícula se incubaron junto con ambos analitos, permitiendo así la reorganización de las subunidades correspondientes a cada aptámero para dar lugar a los dos complejos de afinidad. La detección electroquímica se realizó posteriormente, mediante redisolución en medio ácido de las dos marcas. La cantidad de cationes metálicos (Cd y Pb) liberados se determinó mediante voltametría de redisolución y se relacionó con el número de subunidades marcadas que se unieron a la fase sensora, y por lo tanto, con la cantidad de ambos analitos en disolución. El sistema fue utilizado para la determinación de ambos analitos en suero humano diluido, donde el valor de la intensidad de corriente fue ligeramente inferior a la obtenida en disolución acuosa. Los autores atribuyen este efecto, que no impide la determinación

de ambos analitos en la muestra real, a la degradación de las secuencias aptaméricas en las muestras biológicas.

En lo que se refiere a las estrategias de medida que no necesitan del empleo de oligonucleóticos modificados con una marca, pero si necesitan la adición al medio de medida de sondas electroactivas tras el proceso de reconocimiento, en general se han utilizado como moléculas indicadoras especies que interaccionan con los ácidos nucleicos bien mediante interacciones electrostáticas, intercalación o combinación de ambas. El complejo de rutenio $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ ha sido utilizado como sonda electroactiva para la determinación de ATP y cocaína debido a su capacidad de enlazarse electrostáticamente al ADN[100]. El sistema de detección consistió en dos electrodos de trabajo integrados en un sistema de microfluídica, sobre los cuales se inmovilizaron las subunidades aptaméricas correspondientes a ambos analitos (cada una en un electrodo diferente). Las otras subunidades aptaméricas se conjugaron a nanopartículas de oro (AuNPs), de modo que cada nanopartícula presentó más de una subunidad enlazada. En presencia de ATP y cocaína ambas subunidades fragmentadas se reorganizan para dar lugar a los complejos de afinidad. Seguidamente se añadió el complejo de rutenio, cuya cantidad, determinada mediante cronocolumbimetría, está relacionada con la cantidad de ADN presente sobre el electrodo de trabajo y, por consiguiente, con la cantidad de analito presente en la muestra. Las AuNPs logran una amplificación de la señal debido a que aumentan la cantidad de ADN presente sobre el electrodo de trabajo y, por tanto, la cantidad de sonda electroactiva. Los límites de detección registrados en disolución acuosa fueron bajos (0,3 nM para ATP y 70 nM para la cocaína), aunque la detectabilidad empeoró al aplicar el método a la determinación de ambos analitos en muestras reales. Una estrategia similar se empleó para la determinación de la molécula de baja masa molecular teofilina utilizando como sonda electroactiva la doxorrubicina, un intercalante del ADN de doble hebra, que en este caso se intercala en una doble hélice de ARN[101].

El grupo del Prof. Willner ha propuesto el empleo de distintos sistemas de detección para la determinación de cocaína basada en el empleo de aptámeros fragmentados[102]. En todos ellos uno de los fragmentos se inmovilizó sobre una superficie de oro, actuando como reactivo de captura, mientras que el otro fragmento, que actúa como indicador, se modificó con diversas marcas según la técnica de detección empleada: nanopartículas de Pt que catalizan la reducción del H_2O_2con

detección electroquímica; nanopartículas semiconductoras que en presencia de trietanolamina permiten una detección fotoelectroquímica y nanopartículas de oro que proporcionan una amplificación de la señal registrada mediante SPR. Se obtuvieron límites de detección en el intervalo 1-10 µM.

A pesar de que el empleo de aptámeros fragmentados abre la posibilidad de utilizar esquemas tipo sándwich para la determinación de moléculas pequeñas, esta sigue sin ser una estrategia de aplicación general. Su éxito depende de la conformación tridimensional que presenta el aptámero involucrado en ausencia de la molécula diana, siendo una estrategia no válida para aptámeros cuya estructura tridimensional en ausencia de la molécula diana es muy fuerte. Este es el caso de los aptámeros que muestran una estructura en horquilla. Yamamoto y colaboradores comprobaron que los fragmentos resultantes de la división del aptámero de ARN contra la proteína Tat-1, que muestra una estructura en horquilla, retienen afinidad por su molécula diana[17]. La fragmentación del aptámero consistió en la eliminación de los oligonucleótidos que componen el bucle. Sin embargo es necesario destacar que dichos oligonucleótidos no forman parte del centro de reconocimiento de la molécula diana. Esta estrategia sencilla de fragmentación de aptámeros con estructura en horquilla no es aplicable, por tanto, a aquellos aptámeros donde los oligonucleótidos que forman parte del bucle intervienen en el reconocimiento molecular. Otra desventaja que presenta la aplicación de dicha estrategia a aptámeros con estructura en horquilla es la obtención de señales elevadas para los blancos, en ausencia de analito. Esto se debe a que aunque se fragmente la secuencia del aptámero por su bucle la parte del mango sigue siendo completa o parcialmente complementaria, por lo que ambos fragmentos son capaces de re-ensamblarse aún en ausencia de la molécula diana. Yamamoto y colaboradores proponen cómo solución a este problema el diseño de nuevas secuencias oligonucleotídicas a partir de los dos fragmentos generados tras la división del aptámero. Así, una de las dos mitades se modifica de tal modo que presenta una estructura en horquilla, mientras que la otra mantiene su estructura lineal. La estructura tridimensional presentada por uno de los dos fragmentos evita la unión de ambos en ausencia de la molécula diana. Esta estrategia ha sido aplicada a la determinación óptica de la proteína Tat-1[103].

(d) Ensayos de desplazamiento y competitivos.

Una de las soluciones de aplicación más general a la determinación de moléculas pequeñas mediante aptasensores electroquímicos es el diseño de ensayos de desplazamiento. Esta estrategia explota una capacidad única de los ácidos nucleicos, la de hibridarse con su hebra complementaria. Para ello, se inmoviliza el aptámero en forma de dúplex, es decir, hibridado con su hebra complementaria, bien a través del propio aptámero o de la hebra complementaria. En presencia del analito se forma el complejo de afinidad, produciéndose el desplazamiento de la hebra que no esté enlazada covalentemente al electrodo. Dado que una de las hebras debe estar marcada con una molécula electroactiva, este desplazamiento provoca un cambio en la posición de la misma respecto al electrodo, originando una variación en la intensidad de corriente medida. El empleo de una estrategia de desplazamiento en estos casos tiene dos objetivos: adaptar esquemas desarrollados para moléculas grandes como las presentadas anteriormente ampliando así su campo de aplicación y aumentar la sensibilidad del ensayo, normalmente limitada por la menor afinidad de las moléculas de baja masa molecular por su aptámero.

Un ejemplo de cómo el diseño de un esquema de desplazamiento permite adaptar una estrategia de detección no válida previamente es el caso del aptámero anti-ATP. La estructura en horquilla del aptámero anti-ATP incluso en ausencia de analito es la responsable de que el reconocimiento molecular no se traduzca en un gran cambio conformacional que provoque un cambio apreciable en la eficiencia de transferencia electrónica entre una marca unida al aptámero y la superficie electródica. Sin embargo, la inmovilización del dúplex formado por la secuencia aptamérica modificada con la marca electroactiva y su hebra complementaria permite la obtención de una fase sensora en la que la marca electroactiva se encuentra alejada de la superficie electródica (Figura 1.10.A). La incubación con el analito, ATP, permite su reconocimiento por parte del aptámero provocando el desplazamiento de la hebra complementaria y el acercamiento a la superficie electródica de la marca electroactiva mediante el plegamiento en forma de horquilla, lo que da lugar a un ensayo de señal creciente “signal-on”[104]. Otro ejemplo similar es el desarrollo de un ensayo impedimétrico para la determinación de AMP empleando el aptámero inmovilizado y parcialmente hibridado con una secuencia corta parcialmente complementaria[105]. La impedancia de la fase sensora es elevada. Sin embargo, en presencia del analito la

secuencia aptamérica adopta una conformación tridimensional que genera el desplazamiento de la hebra complementaria y la disminución de la resistencia a la transferencia electrónica de la sonda electroactiva en disolución, obteniéndose en este caso un ensayo de señal decreciente “signal-off”.

Esquemas de desplazamiento similares se han utilizado para la determinación de ATP o adenosina empleando distintos sistemas de amplificación de la señal como nanopartículas de oro[106-108] o de semiconductores[109].

Otra posibilidad en el diseño de aptasensores electroquímicos de desplazamiento es que la hebra que se inmoviliza sobre la superficie electródica sea la complementaria, en lugar del propio aptámero como ocurre en los ejemplos comentados anteriormente. De esta forma, al producirse la incubación con la molécula diana se produce un desplazamiento del aptámero desde la superficie electródica a la disolución donde se formará el complejo aptámero-analito.

Si la marca está enlazada covalentemente a la secuencia aptamérica inevitablemente se obtiene un esquema de señal decreciente “signal off” (Figura 1.10.B). Este esquema se ha utilizado para la determinación de adenosina, obteniéndose un límite de detección de 20 nM[110]. Un esquema similar se ha empleado para la determinación de la micotoxina ocratoxina A (OTA). El aptámero anti-OTA no se modificó con ninguna marca sino que se hibridó con dos secuencias oligonucleotídicas parcialmente complementarias a este y que forman con él un dúplex perfecto. Una de ellas sirvió de anclaje a la superficie electródica y la otra, marcada con una nanopartícula de oro fue la responsable de la amplificación de la señal. Al producirse el reconocimiento molecular entre el analito y el aptámero, éste se desplaza de la superficie electródica para formar el complejo de afinidad en disolución, al igual que la hebra parcialmente complementaria marcada. De este modo, tras la incubación con el analito la cantidad de azul de metileno capaz de intercalarse sobre la superficie sensora disminuyó drásticamente[111].

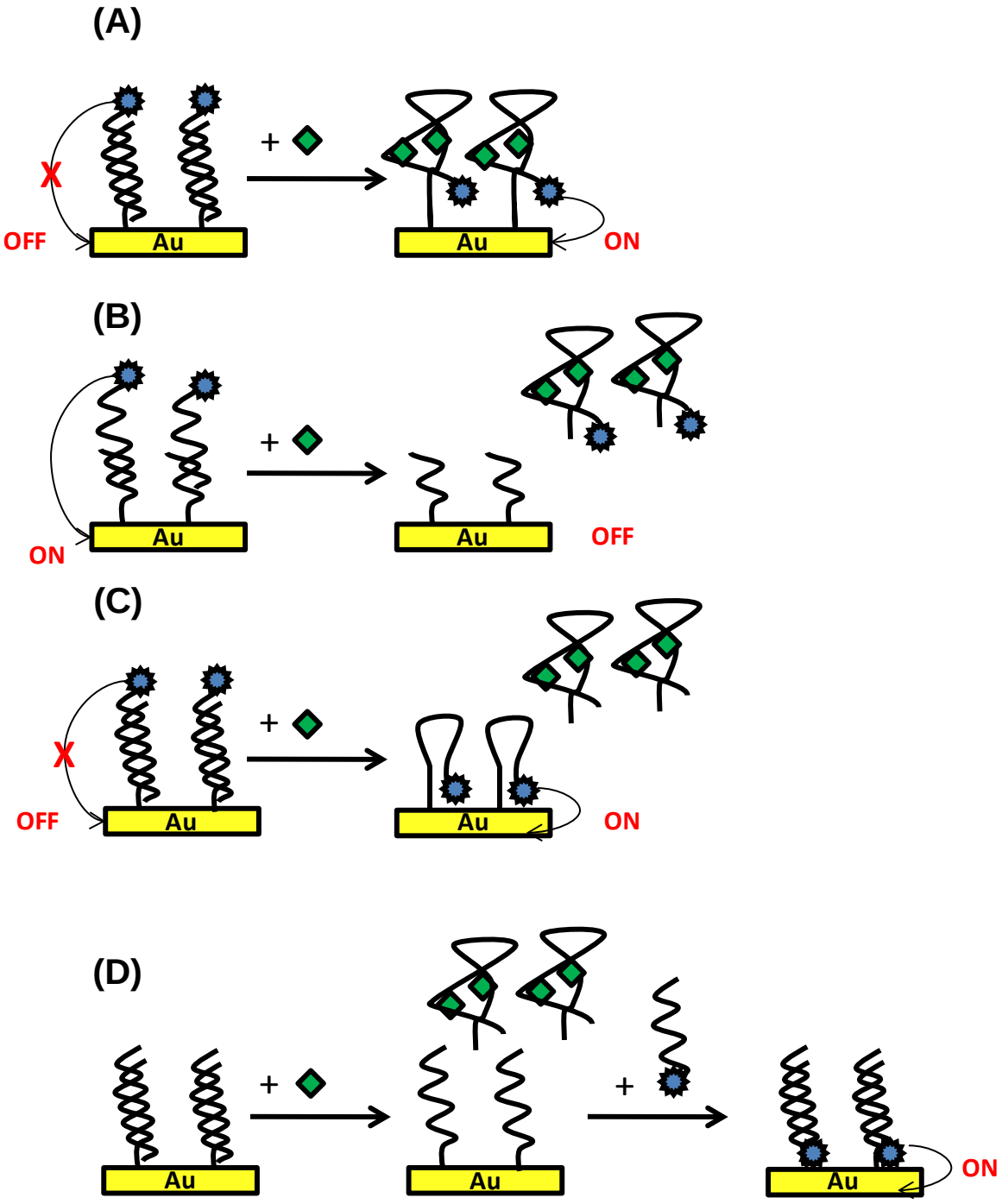

Figura 1.10. Aptasensor basado en un ensayo de desplazamiento para la determinación de moléculas pequeñas (A) esquema "signal-on"; (B) esquema "signal-off"; (C) esquema "signal-on" donde la hebra marcada es la complementaria al aptámero; (D) esquema "signal-on" basado en la rehibridación con una hebra parcialmente complementaria marcada.

Por el contrario, si la marca se enlaza a la secuencia complementaria se obtiene un esquema de señal creciente "signal-on"[112] (Figura 1.10.C). Dicho esquema se aplicó

a la detección de ATP con un límite de detección de 10 nM, empleando una hebra complementaria, que tras el desplazamiento de la hebra de aptámero, adquiere una conformación en forma de horquilla, que acerca la marca a la superficie del electrodo. .

Una estrategia relativamente nueva consiste en el rellenado o rehibridación de las hebras que quedan libres tras el desplazamiento con hebras de detección marcadas, que sonparcialmente complementarias a la hebra que sirve de enlace a la superficie electródica. En estos casos ninguna de las hebras del dúplex inicial que contiene la secuencia aptamérica está marcada. La hebra de detección debe marcarse con la molécula electroactiva en el extremo que quede más próximo al electrodo tras la hibridación, para maximizar la transferencia electrónica (Figura 1.10.D) y, por tanto, la sensibilidad. Se han descrito ensayos de este tipo para ATP con detección por DPV[113]. Esta estrategia es fácilmente adaptable a la detección multianalito, sin más que inmovilizar varios dúplex de aptámeros para diferentes moléculas y rellenar con la correspondiente secuencia marcada con moléculas electroactivas distintas y que presenten procesos redox a potenciales bien diferenciados[114]. También es posible usar como marcas nanopartículas de semiconductores para la detección multianalito, en cuyo caso se prefirió que la marca quedase expuesta a la disolución, alejada del electrodo para proceder finalmente a su disolución y posterior detección del metal correspondiente[115].

Los ensayos competitivos se han utilizado en mucha menor medida que los de desplazamiento, probablemente porque los esquemas que inmovilizan el aptámero requieren disponer de analito convenientemente marcado, lo que no siempre es sencillo ni económico. Como ejemplo cabe citar el método propuesto por Bonel y colaboradores[116] para la detección de la micotoxina OTA que utiliza partículas magnéticas modificadas con estreptavidina como soporte. El ensayo es de señal decreciente puesto que se produce una competición entre OTA de la muestra y OTA marcada con HRP, midiéndose el producto generado enzimáticamente mediante DPV y se aplicó a muestras de trigo.

1.3. ÁCIDOS NUCLEICOS COMO ANDAMIOS DE REACTIVOS DE AFINIDAD

Hasta el momento se han descrito las estrategias que permiten integrar los ácidos nucleicos funcionales denominados aptámeros en dispositivos sensores. Sin

embargo, la posibilidad de diseñar nuevos biosensores basados en aptámeros recae, en primera instancia, en la existencia de una secuencia oligonucleotídica que reconozca específicamente la molécula diana. A pesar de la revolución que ha generado el método SELEX y la aparición de aptámeros, existen numerosos moléculas con un gran interés desde un punto de vista analítico (marcadores de enfermedades, contaminantes, etc.) para los que aún no se ha seleccionado un aptámero y que necesitan detectarse de un modo rápido, sencillo y fiable.

Una vez más, la versatilidad de los ácidos nucleicos como reactivos analíticos permitió el desarrollo de una nueva categoría de biosensores, denominados “sensores andamio” o “scaffold sensors” que permiten determinar moléculas de naturaleza no nucleotídicas, que además, se caracterizan por no necesitar la adición de reactivos externos.

Los sensores andamio se han desarrollado acoplados a detección electroquímica y por tanto, se pueden considerar una adaptación de los esquemas basados en cambios conformacionales de secuencias aptaméricas autoinformadoras, es decir, aptámeros marcados que se inmovilizan sobre la superficie electródica bien en forma monocatenaria o bien en dúplex revisados en los apartados 1.2.1 d y 1.2.2. d respectivamente. El grupo dirigido por el profesor Kevin W. Plaxco es pionero en su descripción y aplicación a la determinación de proteínas[117,118].

Este tipo de sensores consiste en la inmovilización sobre un soporte sólido (típicamente un electrodo de oro) de una sonda de ADN de doble hebra, la cual actuará como una estructura o andamio, sobre la que se fijan tanto el elemento de reconocimiento como la marca electroquímica, facilitando la reacción de reconocimiento y la generación de una señal electroquímica. El elemento de reconocimiento es una molécula pequeña, por ejemplo en el caso de que el analito sea un anticuerpo, se tratará de su antígeno, que se introduce en el extremo 5´de una de las hebras que forman el dúplex, la cual se conoce como hebra de reconocimiento (Figura 1.11, hebra de color verde). La otra hebra, conocida como hebra de anclaje es una secuencia de ADN modificada con un grupo tiol en su extremo 5´, que permite su inmovilización sobre una superficie de oro y con una molécula electroactiva, por ejemplo, azul de metileno o ferroceno, en su extremo 3´, que permitirá la detección del reconocimiento molecular que se produce en el extremo de la otra hebra (Figura 1.11, hebra de color azul).

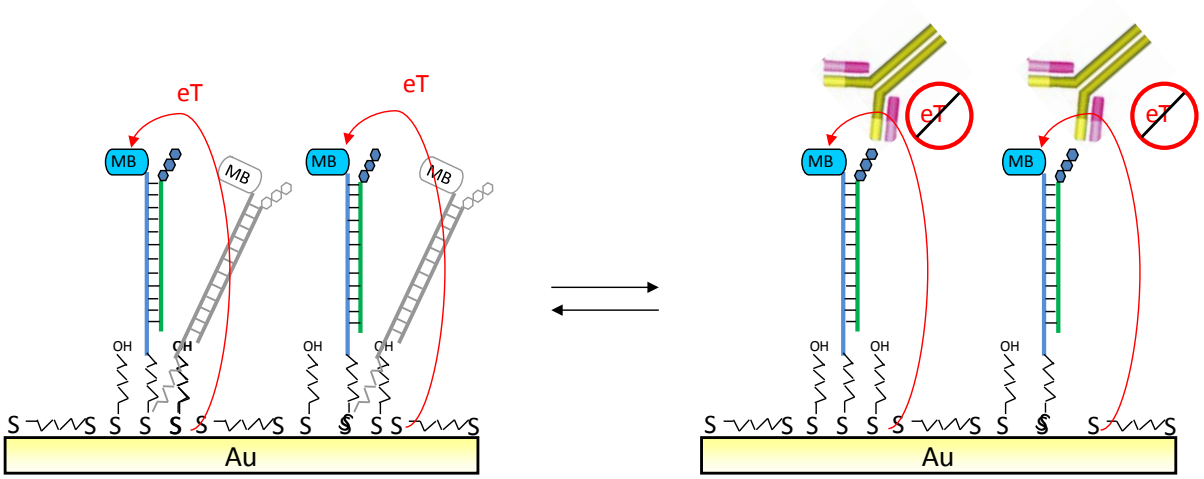

Figura 1.11. Principio de medida de un "sensor andamio" diseñado para la determinación de un anticuerpo donde la marca electroactiva es el azul de metileno y el antígeno un péptido.

En ausencia del analito, la doble hebra presenta una cierta flexibilidad que permite el acercamiento de la marca electroactiva a la superficie electródica, permitiendo el intercambio de electrones. La unión del analito (por ejemplo un anticuerpo) a su correspondiente ligando (en este caso sería una secuencia peptídica) impide este acercamiento, de modo que la transferencia electrónica con la superficie electródica disminuye, dando lugar a un ensayo de curva de respuesta decreciente con la concentración de analito o "*signal-off*". El principio de medida, esquematizado en la Figura 1.11, se basa, pues, en el cambio de rigidez que experimenta la estructura formada por la doble hebra fruto de la unión de la molécula diana. Esto se traduce en la alteración de la eficiencia con la que la marca electroactiva, covalentemente unida a la estructura de ADN, colisiona con la superficie electródica y por lo tanto, intercambia electrones con ésta.

La capacidad de este tipo de fase sensora para determinar macromoléculas fue comprobada inicialmente con los receptores biotina y digoxigenina[117] unidos covalentemente a hebras de ADN, consiguiéndose detectar estreptavidina y el anticuerpo anti-digoxigenina en suero humano diluido al 50%. El mismo esquema ha sido empleado para la determinación de distintos anticuerpos correspondientes a varios epítopos del VIH en suero humano sin diluir[118]. En este caso la estructura que forma la fase sensora se trató de un dúplex híbrido de ADN/PNA, de modo que la hebra de

anclaje es ADN, mientras que la de reconocimiento es ácido nucleico peptídico, es decir, una secuencia de bases nitrogenadas unidas a un esqueleto peptídico en vez de al de azúcar-fosfato de los ácidos nucleicos convencionales. Los PNAS son capaces de hibridarse con su correspondiente secuencia complementaria de ADN, aportando una mayor estabilidad al dúplex. Tienen la particularidad de que no incorporan cargas negativas en su esqueleto, lo que le proporciona ventajas para la hibridación. Adicionalmente, este esquema fue adaptado para la determinación de una molécula de baja masa molecular, como es el TNT, empleando un formato de ensayo de desplazamiento, de forma que se obtienen una curva de respuesta creciente con la concentración de analito[119]. Una molécula de TNT se enlaza a la superficie sensora mediante la unión de una doble de ADN, cuya hebra complementaria es modificada con una molécula de azul de metileno, que actúa como marca electroactiva. La flexibilidad de la doble hebra permite obtener una señal electroquímica como consecuencia de su colisión con la superficie electródica. La unión del anticuerpo anti-TNT aumenta la rigidez de la estructura, lo que conlleva una disminución de la señal registrada. La posterior incubación con el analito, TNT provoca el desplazamiento del anticuerpo unido a la fase señora dando lugar a un aumento de la señal registrada.

2. OBJETIVOS / OBJECTIVES

Los ácidos nucleicos desempeñan diferentes funciones, cruciales para los procesos biológicos, como son el almacenamiento, procesamiento y expresión de la información genética. La capacidad de las hebras de ADN o ARN para unirse a una hebra complementaria con gran afinidad y especificidad mediante la reacción de hibridación, es una de las interacciones básicas para estas funciones. Es precisamente esta característica la que se ha aprovechado para el diseño de una gran variedad de ensayos analíticos, ensayos y sensores de hibridación, para la determinación de secuencias específicas de ácidos nucleicos. Sin embargo, más allá de estas funciones se han identificado otras, que implican a los denominados ácidos nucleicos funcionales, en las que se producen interacciones de los mismos con moléculas no nucleotídicas. En la mayor parte de los casos la función va asociada a una estructura característica, por lo que también se pueden denominar ácidos nucleicos estructurados. Estas interacciones han permitido ampliar desde un punto de vista analítico el número de moléculas que pueden detectarse empleando oligonucleótidos como receptores de afinidad. En este trabajo se exploran diferentes esquemas de integración de ácidos nucleicos estructurados con transductores electroquímicos que permitan el desarrollo de estrategias generales de detección de moléculas de naturaleza no nucleotídica.

Como elemento de reconocimiento molecular se seleccionaron en primer lugar los **aptámeros**, secuencias oligonucleotídicas de ADN o ARN capaces de reconocer a una amplia gama de analitos mostrando una elevada afinidad y especificidad. La obtención de estos receptores de afinidad consiste en un proceso iterativo *in vitro* denominado SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential amplification), basado en los mismos principios que la selección natural: amplificación, mutación y selección. Muchos de los aptámeros seleccionados hasta el momento se dirigen contra proteínas y, consecuentemente, una buena parte de los aptaensayos desarrollados son de aplicación general para la determinación de este tipo de dianas moleculares.

La detección de moléculas de pequeño tamaño molecular, o haptenos, constituye un problema de máxima importancia en muchos campos del análisis: farmacéutico, clínico, alimentario, ambiental, etc., que conlleva una especial dificultad. En general, las estrategias descritas para la determinación de moléculas de elevado peso molecular como proteínas, no son directamente aplicables a la determinación de este tipo de compuestos, siendo necesario el diseño de nuevas estrategias que permitan su detección en muestras reales con una elevada sensibilidad y selectividad.

Por esta razón, se ha planteado como primer objetivo de este trabajo el **diseño de estrategias generales que permitan la detección de moléculas pequeñas mediante el empleo de aptámeros (aptasensores)**.

Como analito modelo se escogió la tobramicina, un antibiótico aminoglicósido utilizado clínicamente en el tratamiento de numerosas infecciones. Su empleo lleva asociada la necesidad de controlar exhaustivamente los niveles séricos del antibiótico en los pacientes a los que se les suministra, debido a los importantes efectos secundarios que puede llevar asociados. La existencia en la literatura científica de varias secuencias aptaméricas de ARN capaces de reconocer específicamente la tobramicina fue también un factor clave en su selección como molécula diana modelo para el desarrollo de estrategias generales que permitan el desarrollo de aptasensores electroquímicos para moléculas pequeñas. Se pretende evaluar la posibilidad de emplear alguno de estos aptámeros para la construcción de una fase de reconocimiento integrada con un transductor electroquímico, que permita obtener un sensor que responda de forma rápida y fiable al antibiótico.

Para alcanzar este objetivo general se proponen una serie de objetivos específicos que se recogen a continuación:

1. Diseño de fases sensoras que incorporen aptámeros anti-tobramicina resistentes a la acción de las endocucleasas y evaluación de sus características de afinidad mediante SPR.

Se plantea modificar la estructura de las moléculas de ARN descritas como aptámeros contra tobramicina con el objetivo de aumentar su resistencia a la hidrólisis producida por las endonucleasas. Las moléculas de ARN modificadas se integrarán sobre superficies de oro, de manera que mediante espectroscopia de resonancia de plasmón de superficie (SPR) sea posible monitorizar en tiempo real la interacción de dichos aptámeros con su molécula diana, la tobramicina. Las características cinéticas y termodinámicas de esta interacción serán comparadas con las correspondientes a la interacción de la tobramicina con el aptámero natural para evaluar la validez de los diferentes aptámeros modificados como receptores de afinidad de la tobramicina.

2. Diseño y evaluación de un sensor impedimétrico para la determinación de tobramicina basado en un ensayo de desplazamiento que no necesita del empleo de marcas.

Se evaluará la viabilidad de un formato de ensayo de desplazamiento para la determinación de tobramicina utilizando como receptor de afinidad uno de los aptámeros anti-tobramicina seleccionados en la etapa anterior. La selección de la espectrocopia de impedancias como sistema de transducción hace posible el empleo del aptámero sin ningún tipo de marcas. En caso de que el ensayo sea viable, se optimizarán los diferentes parámetros de diseño y se evaluarán las características de respuesta, selectividad y reproducibilidad del dispositivo. Se comprobará la aplicabilidad del aptasensor propuesto a la determinación del antibiótico en muestras de suero humano.

3. Diseño, optimización y evaluación de un ensayo voltamétrico con aptámeros marcados para la detección de tobramicina.

Se evaluarán comparativamente distintos formatos de ensayo para la detección voltamétrica de tobramicina basados en el empleo de los aptámeros anti-tobramicina modificados y caracterizados previamente. Para esto resulta necesaria la introducción de una marca en la secuencia oligonucleotídica de los aptámeros anti-tobramicina que permita la obtención de la señal voltamétrica. Esta modificación de la secuencia aptamérica puede conllevar cambios en la afinidad hacia la molécula diana, por lo que la interacción entre cada uno de los aptámeros propuestos y la tobramicina será caracterizada mediante SPR, empleando la fase sensora diseñada anteriormente. Para cada uno de los formatos de ensayo diseñados, se optimizarán las variables que afectan a la señal analítica registrada y se evaluará su validez para determinar la tobramicina en muestras de suero humano.

Aunque desde su descripción en 1990 el método SELEX ha sido satisfactoriamente empleado para la selección de secuencias capaces de reconocer específicamente todo tipo de analitos, entre los que se incluyen proteínas, iones, moléculas orgánicas pequeñas, virus, bacterias, etc., su número aún es limitado, lo que restringe la posibilidad de desarrollo de métodos de detección para gran cantidad de analitos de interés. Por ello, se planteó como segundo objetivo general explorar nuevas estrategias que emplean ácidos nucleicos como elemento sobre el que recae el principio de detección pero que no requieren de la existencia de un aptámero previamente seleccionado hacia el analito en cuestión.

Recientemente, el grupo de investigación dirigido por el Profesor K. W. Plaxco, de la Universidad de California Santa Barbara, ha descrito un nuevo concepto de sensor denominado “scaffold sensor” que puede ser de aplicación general a la detección de macromoléculas que interaccionan específicamente con moléculas de pequeño tamaño sin necesidad de reactivos añadidos. Esta estrategia se basa en el empleo de una doble hebra de ADN que actúa como una estructura andamio, capaz de sostener todos los elementos necesarios para la detección: el elemento de reconocimiento molecular (molécula de pequeño tamaño que interaccionará específicamente con el analito) y la marca electroactiva, que permite la detección electroquímica, evitando, de este modo, la necesidad de reactivos exógenos. La única condición que se requiere es que la unión de la macromolécula produzca un cambio en la dinámica de la marca electroactiva enlazada al ADN.

Los anticuerpos son moléculas de elevado tamaño capaces de unirse con una elevada afinidad a sus correspondientes antígenos y cuya detección resulta de suma importancia tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de numerosas enfermedades. La carencia de aptámeros seleccionados hacia este tipo de moléculas se puede suplir con el empleo de esta nueva estrategia. Por tanto, se plantea como segundo objetivo de esta Tesis **examinar la aplicabilidad del nuevo concepto de sensores “scaffold” a la determinación de anticuerpos.**

Se diseñará una fase sensora que emplea un dúplex de ADN como estructura sensora para la determinación de un anticuerpo específico del péptido FLAG, que se toma como modelo. Se evaluarán las características analíticas que ofrece el nuevo diseño y se compararán con las correspondientes a fases sensoras similares descritas con anterioridad en la literatura científica. Si es viable se planteará la posibilidad de aplicarlo a uno de los anticuerpos asociados a un epítopo del virus del VIH, dada su relevancia en el diagnóstico. Asimismo, se evaluará su aplicabilidad para la determinación de anticuerpos en muestras de suero humano. El trabajo para completar este último objetivo ha sido desarrollado en el laboratorio del Prof. Plaxco durante una estancia que la autora realizó en la Universidad de California Santa Barbara por un período de cuatro meses.

Nucleic acids have different functions, all of them crucial for biological processes, such as storage, processing and expression of genetic information. The ability of DNA or RNA strands to bind a complementary strand with a high affinity and specificity by means of the hybridization reaction is one of the essential interactions for the performance of these functions. This unique characteristic has been employed for designing a great variety of analytical assays and hybridization biosensors for the determination of specific nucleic acids sequences. Nevertheless, additional functions have been identified entailing the so-called functional nucleic acids, which involve interactions between nucleic acids and non-nucleic acid molecules. Function and specific structure are usually related, so they can also be designated as structured nucleic acids. These interactions have allowed expanding the range of molecules that can potentially be detected employing oligonucleotides as affinity molecular receptors. Herein, different approaches to incorporate structured nucleic acids to electrochemical transducers for the design of general strategies for detecting non-nucleic acid molecules are explored.

As molecular recognition element, aptamers (DNA or RNA oligonucleotide sequences able to recognize a wide range of analytes with a high affinity and specificity), were firstly selected. The obtention of these affinity receptors is an *in vitro* iterative process called SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment), which is based on the same principles as the Darwinian evolution: amplification, mutation and selection. Most of the aptamers described in the literature are raised against proteins, therefore, the majority of the developed aptassays allow the determination of this type of molecular targets.

The detection of small molecules, also known as haptens, constitutes an important problem in several fields of the analysis: pharmaceutical, clinical, food, environmental, etc. that entails singular difficulties. The described strategies for high molecular weight molecules detection such as proteins are not directly applicable to the determination of this type of analytes. This way, the design of new strategies to detect small molecules in real samples with high affinity and specificity is lacking and highly desirable in the analytical chemistry field.

Thus, the first aim of this work is **the design of general strategies for small molecule detection employing aptamers (aptasensors).**

Tobramycin was selected as a model target. It is an aminoglycoside antibiotic employed for treating several infectious diseases. An exhaustive control of the antibiotic serum levels in patients is needed because of the potential side effects that can appear. The fact that RNA aptamer sequences to specifically recognize tobramycin had been reported in scientific literature also played an important role for its selection as a target molecule for the design of general strategies that allowed the development of electrochemical aptasensors for small molecules. The ability of some of these aptamers for the construction of a sensing phase coupled to an electrochemical transducer to obtain a fast and reliable sensor for the detection of the antibiotic is proposed.

To develop this general aim several specific objectives are proposed:

1. Design of sensing phases employing endonuclease resistant anti-tobramycin aptamers and assessment of their affinity features by means of SPR.

With the purpose of increasing the resistance to the hydrolytic digestion caused by endonucleases the introduction of a modification on the structure of the previously selected RNA molecules against tobramycin is proposed. The modified RNA molecules will be coupled to gold surfaces and a real-time monitoring of the interaction between these aptamers ant its target molecule, tobramycin, will be carried out by surface plasmon resonance (SPR). Kinetic and thermodynamic characteristics of this interaction will be compared to those related to tobramycin and natural RNA aptamer interaction as a method to evaluate the ability of the modified aptamers to act as molecular recognition elements for tobramycin detection.

2. Design and evaluation of an impedimetric sensor for tobramycin detection employing a label-free displacement assay.

The possibility of employing a displacement assay for tobramycin detection using a previously designed modified aptamer as an affinity receptor will be evaluated. The selection of impedance spectroscopy as a detection technique allows working with a label-free aptamer sequence. If the assay is found to be feasible, optimization of several parameters will be required. The response characteristics, selectivity and reproducibility, will be evaluated. The applicability of the proposed aptasensor to tobramycin detection in human serum samples will be also assessed.

3. Design, optimization and evaluation of a voltammetric assay using labeled aptamers for tobramycin detection.

Different assays formats will be critically evaluated for the voltammetric tobramycin detection using the previously characterized modified anti-tobramycin aptamers. For this purpose it is necessary to introduce a label in the anti-tobramycin aptamer sequence, thus a voltammetric signal is provided. This modification of the aptamer sequence could induce changes in the affinity towards the target molecule. In order to assess the extent of these changes, the interaction between tobramycin and the proposed labeled anti-tobramycin aptamers will be evaluated by means of SPR measurements using the previously designed sensing phase. Optimization studies will be carried out for each format assay proposed and the ability for tobramycin determination in human serum samples will be also conducted.

Although the SELEX method described in 1990 has been successfully applied for the selection of sequences able to specifically recognize a wide range of analytes, including proteins, ions, small organic molecules, viruses, bacteria, etc., the number of aptamer sequences is still small, limiting the development of detection methods for a large amount of potential analytes of paramount importance. This way, as a second aim, it is proposed to explore new strategies employing nucleic acids as foundation for detection but without the need for a known previously aptamer sequence towards the selected target molecule.

Recently, the research group headed by Prof. Kevin W, Plaxco at the University of California Santa Barbara, has described a new sensor concept known as “scaffold sensor” that can be generally applied for the reagentless detection of macromolecules that specifically interact with small molecules. This strategy relies on the employment of a double stranded DNA that acts as a scaffold structure, where all needed elements for the detection are supported: the molecular recognition element (small molecule that specifically interacts with the analyte) and the electroactive reporter, which allows the electrochemical detection avoiding the need for exogenous reagents. The only requirement is that the macromolecule binding generates a change in the dynamic structure of the electroactive marker bound to DNA.

Antibodies are high weight compounds able to bind with high affinity to their cognate antigens, whose detection is very important for both the diagnosis and

monitoring of many diseases. The lack of selected aptamers towards this type of molecules can be overcomed by employing this new strategy. This way, it is proposed as a second aim of this work, **to evaluate the feasibility of the new "scaffold sensors" concept for antibodies detection.**

A double stranded DNA based sensing phase will be designed for the anti-FLAG antibody determination, taken as a model. The analytical features will be evaluated and compared to those obtained for similar previously described sensing phases in the scientific literature. If the proposed design is feasible, it will be tested for a HIV antibody determination because of its relevance in diagnosis. The feasibility of the scaffold sensor for antibody determination in human serum samples will be also assessed. The work needed for completing this second objective has been developed in the Plaxco research group at the University of California Santa Barbara for a four-month period.

3. DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE APTÁMEROS MODIFICADOS PARA LA DETECCIÓN DE TOBRAMICINA

El empleo de aptámeros de ARN con fines analíticos está limitado por su susceptibilidad a la hidrólisis enzimática catalizada por las nucleasas. En este capítulo se revisan las modificaciones propuestas en la literatura con el fin de tratar de resolver este problema. A continuación se analiza el caso concreto del aptámero de ARN previamente seleccionado contra la tobramicina, centrando la discusión en su estructura tridimensional y en el modo en que se establece el reconocimiento molecular entre el aptámero y la molécula diana, imprescindible para poder diseñarlas modificaciones más adecuadas para evitar su degradación en medios biológicos. Finalmente, se presentan los diferentes diseños de aptámeros modificados propuestos para la detección de tobramicina, así como la caracterización de su afinidad mediante medidas de espectroscopia de resonancia de Plasmón de superficie.

3.1. ESTABILIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS FRENTE A LA ACCIÓN DE NUCLEASAS.

A pesar de que la gran mayoría de los aptámeros descritos son secuencias oligonucleotídicas de ARN, la mayor parte de los aptámeros empleados con fines analíticos son secuencias de ADN. Esto se debe a la mayor resistencia de éstos últimos a la digestión hidrolítica causada por las nucleasas.

Las nucleasas son enzimas capaces de catalizar la degradación de los ácidos nucleicos (ADN o ARN) mediante la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster. Desempeñan un papel vital en el metabolismo, por lo que están presentes en todo tipo de muestras biológicas. Las nucleasas pueden clasificarse en exo- o endo-nucleasas dependiendo de la posición del enlace fosfodiéster hidrolizado dentro del polímero que constituye la secuencia oligonucleotídica. Las exonucleasas rompen los enlaces fosfodiéster que se encuentran en los extremos de las secuencias, mientras que las endonucleasas afectan a los enlaces fosfodiéster internos. La degradación por parte de las nucleasas afecta en mayor medida a las secuencias de ARN, de tal modo que su vida media en fluidos biológicos es de tan solo unos minutos[56,68]. Esto hace que el empleo de aptámeros de ARN con fines analíticos conlleve más dificultad que la utilización de aptámeros de ADN.

Afortunadamente la degradación de los ácidos nucleicos causada por las nucleasas puede ser controlada mediante la introducción de modificaciones en las

secuencias oligonucleotídicas, sin que su afinidad o actividad se vea alterada significativamente. Se han propuesto diversas estrategias de modificación, resumidas a continuación, que pueden clasificarse en: modificaciones *pre-SELEX* (se modifica la biblioteca inicial que luego se someterá al proceso iterativo) o *post-SELEX* (una vez seleccionado el aptámero se modifica la estructura de sus bases).

Las **modificaciones pre-SELEX** pueden ser de dos tipos: modificación del esqueleto de fosfatos o introducción de modificaciones en el azúcar. Las modificaciones del esqueleto de fosfatos más habituales consisten en la sustitución del oxígeno no enlazado de la unión fosfodiéster por un átomo de azufre (fosfotioatos)[120], o en el empleo de enlaces boranofosfato[121]. La introducción de modificaciones en el azúcar que forma parte del nucleósido es otra estrategia ampliamente utilizada. Consiste en la sustitución del grupo 2´-OH de la ribosa por los grupos O-metil, O-metoxietil, $-F^-$, $-NH_2$, empleando una biblioteca que contiene dichos nucleótidos modificados para llevar a cabo el proceso SELEX. Lógicamente el éxito de esta estrategia recae sobre la compatibilidad de dichos nucleótidos modificados con las polimerasas utilizadas durante el proceso de selección[122]. Se demostró que la sustitución de los grupos 2´-OH por los grupos 2´-NH_2 o 2´-F en todas las bases pirimidínicas aumenta la estabilidad de la secuencia completa[37]. El primer aptámero obtenido mediante SELEX que incorpora la modificación 2´-OMe en todas sus bases fue descrito en 2005[123]. La principal ventaja de este método es que la afinidad del aptámero modificado por su molécula diana está asegurada.

Las **modificaciones post-SELEX**, como su nombre indica, son aquellas que se realizan tomando como punto de partida un aptámero previamente seleccionado. De este modo no es necesario realizar un proceso de selección adicional para conseguir un aptámero modificado para un analito determinado. Sin embargo, se debe prestar especial atención al efecto que la introducción de dichas modificaciones tenga sobre su afinidad. Las modificaciones post-SELEX más habituales consisten en la introducción de modificaciones en el azúcar de los nucleótidos. Éstas pueden afectar a todas las bases o solamente a aquellas que no estén involucradas directamente en el reconocimiento molecular de la molécula diana. Por ejemplo, la introducción del grupo 2´-OMe en todas las bases de una secuencia aptamérica que reconoce al elemento de ARN-TAR del virus VIH produce un gran aumento en la estabilidad del aptámero, mientras que su afinidad por la molécula diana no se ve afectada[124]. Sin embargo no

siempre la modificación de todas las bases es la mejor opción. Conviene estudiar las características intrínsecas de cada complejo aptámero-molécula diana con el objetivo de modificar lo menos posible las características del aptámero. Por ejemplo se comprobó que la modificación de todas las bases púricas de un aptámero dirigido contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) conlleva una pérdida de afinidad, mientras que la modificación de 10 de las 14 bases púricas da lugar a un incremento en la afinidad[42].

A la vista de estos estudios, se concluye que el empleo de un aptámero modificado después de su selección, como elemento de reconocimiento molecular para el desarrollo de biosensores debe ir precedido de la evaluación de su afinidad hacia su molécula diana. De este modo se valora la influencia que la introducción de la modificación post-SELEX tiene sobre el aptámero.

Una tercera estrategia que se describe en la literatura con el objetivo de evitar la degradación de los ácidos nucleicos causada por las nucleasas es el empleo de los denominados "***spiegelmers"***(del alemán *spiegel*, que significa espejo)[125]. Son ácidos nucleicos sintetizados químicamente y que no se encuentran en la naturaleza, ya que se trata de los enantiómeros de las secuencias naturales seleccionadas, *L*-ribosa o *L*-desoxiribosa, que no son susceptibles de ser degradadas por nucleasas. La idea que subyace detrás del desarrollo de los "spiegelmers" es que si existe un ARN natural que se una específicamente al enantiómero del analito, el enantiómero de este ARN, el "spiegelmer", reconocerá al analito. Esto supone que el analito existe en dos formas enantioméricas, por lo que no es de aplicabilidad general.

3.2. APTÁMERO ANTI-TOBRAMICINA. ESTRUCTURA DEL COMPLEJO DE AFINIDAD.

Como modelo de moléculas de bajo peso molecular, para las que tanto la selección de un aptámero como su utilización en el desarrollo de sensores son especialmente difíciles, como ya se señaló en el capítulo 2 se seleccionó el antibiótico tobramicina. En la bibliografía se pueden encontrar descritos diversos aptámeros capaces de reconocer específicamente este antibiótico[13,126-128], tanto secuencias de ADN como de ARN, cuyas características se resumen en la Tabla 3.1. El más reciente se trata de un aptámero de ADN seleccionado contra el antibiótico kanamicina, cuya

estructura está muy relacionada con la de la tobramicina (Figura 3.1), y que además también es capaz de reconocer específicamente a esta última[128]. La afinidad del aptámero hacia ambos antibióticos es similar, con una constante de disociación, K_D, alrededor de 100 nM. El resto de aptámeros seleccionados para reconocer específicamente a la tobramicina son secuencias de ARN. Uno de los aptámeros seleccionados es un faro molecular que presenta una afinidad (K_D=16 μM)[127] del orden de la que presentan aptámeros dirigidos contra otras moléculas pequeñas. Sorprendentemente, mediante el empleo de un SELEX automatizado[126] se han logrado seleccionar otras tres secuencias capaces de reconocer a la tobramicina que presentan constantes de disociación mucho menores, comprendidas entre 30-500 nM. Por último, las secuencias de ARN descritas con mayor afinidad por la tobramicina, entre las que se encuentra la seleccionada para la realización de este trabajo, son las presentadas por Wang y Rando. Se trata de dos secuencias de ARN que reconocen la tobramicina con una elevada afinidad y selectividad, especialmente difícil de conseguir cuando se trata de moléculas pequeñas.

Tabla 3.1. Características de los aptámeros descritos en la literatura científica que reconocen específicamente a la tobramicina.

Naturaleza (nº bases)	Denominación aptámero	Estructura	K_D	Nº ciclos SELEX	Ref.
ADN (21)	Ky2	Horquilla	103 nM	9	[128]
ARN (80)	Tobra12CA	Horquilla compleja	30-100 nM	12	[126]
ARN (80)	Tobra12CB	Horquilla compleja	100-500 nM	12	[126]
ARN (80)	Tobra12CC	Horquilla compleja	100-500 nM	12	[126]
ARN (61)	BA-14-2	Horquilla	16 μM	14	[127]
ARN (27)	Aptámero-1	Horquilla	9±3 nM	6	[13]
ARN (26)	Aptámero-2	Horquilla	12±5 nM	6	[13]

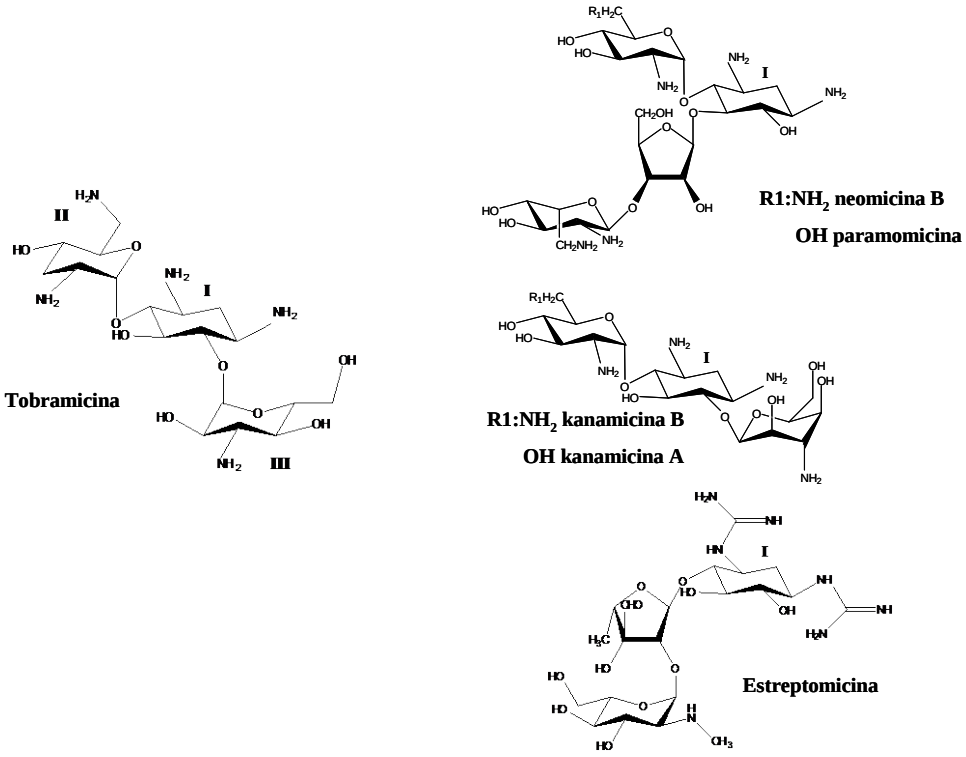

Figura 3.1. Estructura de la tobramicina y de otros antibióticos aminoglicósidos.

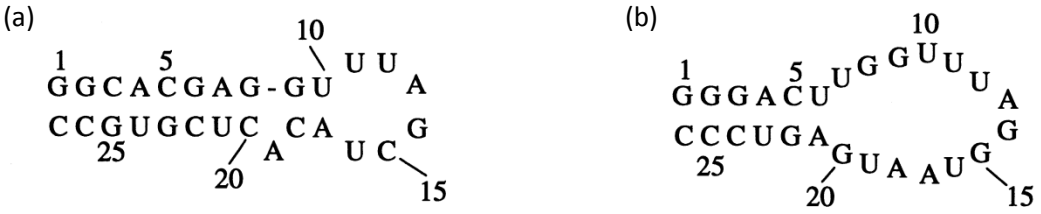

Figura 3.2. Secuencias de los dos aptámeros seleccionados por Wang y Rando que reconocen específicamente a la tobramicina: (a) aptámero I; (b) aptámero II.

Estos dos aptámeros descritos poseen una estructura molecular en forma de horquilla, bastante similar, diferenciándose en los valores de las constantes de disociación: K_D=9±3 nM para el denominado aptámero I y K_D=12±5 nM para el aptámero II (Figura 3.2). En ambos casos la estequiometría de enlace del complejo aptámero-tobramicina es 1:2 en las condiciones en las que se llevó a cabo la selección[13]. El valor de las constantes descritas fue el criterio utilizado para seleccionar

el aptámero I, con mayor constante de afinidad, como elemento de reconocimiento para la detección de tobramicina a lo largo del presente trabajo.

La estructura del aptámero I, que a partir de este momento denominaremos aptámero anti-tobramicina, ha sido ampliamente estudiada con el objetivo de tratar de comprender el mecanismo de reconocimiento existente entre el aptámero y el ligando de interés[22,23,129,130]. Se trata de una secuencia de ARN de 27 nucleótidos (Figura 3.2.(a)) que adopta una estructura secundaria formada por una parte troncal con estructura de Watson y Crick exceptuando la base A19, que constituye una perturbación en la estructura, y un bucle formado por 6 bases, que aparece como consecuencia de un error en el emparejamiento de las bases U11●U16, alineadas a través de la formación de dos enlaces de hidrógeno, tras el cual las tres bases siguientes U12, A13 y G14 dan lugar a un giro en *U* que supone un cambio direccional en el apilamiento de las bases. La estabilidad de este giro se debe a la interacción entre A13 y G14 (error de emparejamiento con mayor estabilidad) y a la formación de dos enlaces de hidrógeno entre las bases U12 y G14. El protón del grupo imino de la base U12 establece un enlace de hidrógeno con el grupo fosfato situado entre G14 y C15 y el protón del grupo 2´-OH de U12 forma un segundo enlace de hidrógeno con el nitrógeno en la posición 7 (N7) del anillo de G14. La base C15 del bucle se desconecta de éste en disolución hacia el surco principal de la hebra de ARN desempeñando un papel importante en el reconocimiento de la tobramicina[130]. Todos los estudios conformacionales, llevados a cabo en disolución reguladora 10 mM de fosfato pH 6,8 a 5 ºC, señalan que la estequiometría del complejo aptámero-tobramicina en estas condiciones es 1:1[130].

En el proceso de reconocimiento de la tobramicina por el sitio de unión del aptámero están involucrados tanto elementos de la zona del tronco como del bucle. Los elementos clave encargados de definir dicho sitio de unión son las dimensiones del surco principal de la doble hebra y las orientaciones de la base C15 que se encuentra fuera del bucle, la base A19 que forma una perturbación en la parte troncal de la molécula y el grupo 2´-OH de la base U12. La importancia de la base C15 reside en su capacidad para encapsular los anillos I y III de la tobramicina (Figura 3.1), aislándolos de la disolución. Dichos anillos I y III, son los que se ven involucrados en un mayor grado en la formación del complejo antibiótico-aptámero, mientras que el anillo II está más expuesto hacia el disolvente. Esto no debería de resultar sorprendente teniendo

en cuenta que el anillo II es el que sirve de anclaje para la inmovilización de la tobramicina en la columna en la que se llevó a cabo el SELEX[13]. La base A19 contribuye a que el surco principal de la hebra muestre el tamaño adecuado para lograr albergar a la tobramicina. Adicionalmente, Jiang et al. atribuyeron una gran importancia al papel desempeñado por el grupo hidroxilo de la base U12 a partir de la interpretación del espectro de RMN de los protones imino del aptámero libre y del complejo 1:1 aptámero-tobramicina[130].

3.3. DISEÑO DE APTÁMEROS MODIFICADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE TOBRAMICINA.

Uno de los principales objetivos del presente trabajo es la determinación de tobramicina en muestras biológicas empleando aptámeros como elemento de reconocimiento molecular. El primer obstáculo para alcanzar dicho objetivo es la corta vida media que presentan los aptámeros de ARN en medios biológicos. Con el fin de incrementar su estabilidad se optó por introducir una modificación post-SELEX en la secuencia, previamente conocida, del aptámero anti-tobramicina. La modificación escogida fue la sustitución de los grupos 2´-OH de las ribosas por grupos 2´-OMe (Figura 3.3). Esta modificación ya ha sido empleada con éxito con anterioridad para otros aptámeros[42,124], incluyendo trabajos previos de nuestro grupo de investigación en los que se utiliza un aptámero dirigido contra el antibiótico neomicina B[126]. En este último caso se utilizó una secuencia oligonucleotídica de ARN modificada mediante metilación en todas las bases, observándose que no se produce alteración en las propiedades de reconocimiento molecular del receptor, el cual fue empleado satisfactoriamente en el diseño de un sensor impedimétrico que permite el análisis del antibiótico en muestras de leche[131].

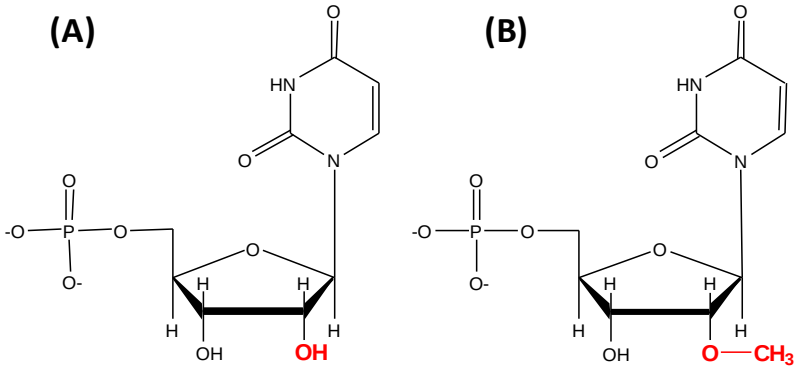

Figura 3.3. Estructura de una nucleósido de ARN (A) natural; (B) tras la introducción de la modificación 2´-OMe.

Teniendo en cuenta toda la información disponible sobre la estructura del aptámero anti-tobramicina seleccionado y la del correspondiente complejo de afinidad, expuesta en la sección anterior, se diseñaron dos aptámeros anti-tobramicina con diferente grado de metilación, con el objetivo de evaluar si esta modificación altera las características de reconocimiento del receptor por la molécula diana correspondiente.

El primer aptámero anti-tobramicina modificado que se diseñó fue un aptámero totalmente metilado. La modificación se introduce en todas las ribosas de las 27 bases que conforman su secuencia. Este aptámero será denominado ATATM (aptámero anti-tobramicina totalmente metilado).

El segundo aptámero diseñado consistió en la modificación de 26 de las 27 ribosas totales. Únicamente se dejó intacta la posición 2´-OH correspondiente a la base U12 de la secuencia del aptámero. La exclusión de la modificación del nucleótido U12 se debe a la implicación directa del correspondiente grupo hidroxilo en el proceso de reconocimiento de la tobramicina[130]. Este aptámero será denominado ATA (aptámero anti-tobramicina).

La introducción de modificaciones post-SELEX en secuencias aptaméricas previamente seleccionadas puede resultar en la alteración de sus características para actuar como receptores. Por ello, antes de ser empleados como receptores de afinidad es necesario evaluar la influencia que la modificación tiene sobre el aptámero.

En nuestro caso se caracterizaron ambos aptámeros modificados (ATATM y ATA) mediante la evaluación de su constante de disociación y la cinética de enlace a la

molécula diana, la tobramicina. Los valores obtenidos se compararon con los correspondientes para el aptámero anti-tobramicina natural, sin modificar, ATANM (aptámero anti-tobramicina no metilado).

La técnica seleccionada para llevar a cabo dicha caracterización fue la espectroscopia de resonancia de plasmón de superficie o SPR por sus siglas en inglés. Se trata de una técnica de análisis óptica que permite el seguimiento directo (sin marcas) y en tiempo real de interacciones moleculares y puede, por tanto, utilizarse para estudiar no sólo la afinidad de unión receptor-ligando sino también la cinética de la interacción. Dicha interacción se estudia mediante la monitorización continua de los procesos de enlace y de disociación que se producen cuando una disolución del ligando en disolución se pone en contacto con el receptor inmovilizado sobre una superficie metálica. Este registro aporta la información necesaria para la determinación de las constantes de disociación (K_D) y cinéticas (k_a, k_d) de la interacción molecular objeto de estudio.

3.4. ESPECTROSCOPÍA DE PLASMÓN DE SUPERFICIE COMO TÉCNICA PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS APTÁMEROS MODIFICADOS. PRINCIPIO DE MEDIDA.

Desde que Wood lo observara por primera vez en 1902[132], el fenómeno físico de la resonancia de plasmón superficial ha abierto un amplio camino para el desarrollo de equipos capaces de detectar recubrimientos superficiales de orden molecular. La primera aplicación de este fenómeno al estudio de interacciones moleculares fue desarrollada por Liedberg[133] en 1983, y desde este momento hasta hoy en día esta técnica ha logrado establecerse como una de las más adecuadas para el estudio de interacciones moleculares que tienen lugar sobre superficies metálicas.

El SPR y los dispositivos analíticos que se basan en él, miden cambios en el índice de refracción (n) de la disolución en contacto con el sensor, que pueden estar asociados a eventos de reconocimiento molecular, adsorción, etc. La mayoría de los instrumentos de SPR consisten en un prisma ópticamente denso (n elevado) sobre el que se coloca un sensor compuesto por una fina capa metálica, típicamente de Au, que está en contacto con un dieléctrico de índice de refracción menor que el del prisma, habitualmente medios acuosos (Figura 3.4).

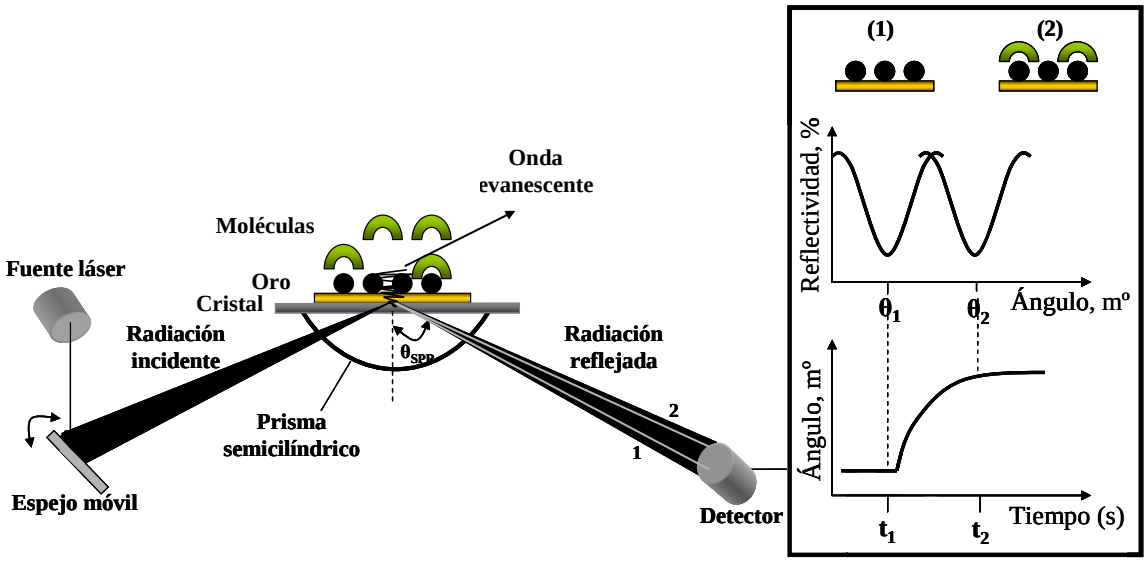

Figura 3.4. Representación esquemática del principio de SPR.

Cuando un haz de radiación atraviesa el prisma e incide sobre el metal con un ángulo superior al crítico, se refleja totalmente en un fenómeno conocido como reflexión total interna. Al mismo tiempo que se produce la reflexión total, los fotones reflejados generan un campo electromagnético que se extiende por el metal y por el dieléctrico (si el espesor metálico es suficientemente pequeño), produciendo una onda electromagnética no homogénea paralela a la superficie denominada onda evanescente, ya que la amplitud de su campo eléctrico decae exponencialmente en la dirección perpendicular a la interfase. Tiene una profundidad de penetración que depende de la longitud de la onda incidente (λ) y es igual a $1/2\lambda$. Esto es importante para el fenómeno de resonancia en el que se basa el SPR.

Por otra parte, la aplicación de un campo electromagnético con unas características determinadas sobre la interfase metal-dieléctrico puede provocar la aparición de ondas de plasma de superficie, que no son más que ondas de densidad electrónica que se propagan a lo largo de la interfase longitudinalmente, y son también evanescentes, ya que su magnitud es máxima en la interfase y decrece según se penetra en el dieléctrico o en el metal. Para el Au en contacto con el aire, la profundidad de penetración (distancia a la cual el campo electromagnético ha disminuido por un valor de 1/e) es de entre 100-500 nm, mientras que en el metal es de 20-40 nm. La profundidad de penetración en el dieléctrico es muy importante porque va a determinar el alcance de la técnica, la distancia a la que es sensible, la distancia

sensora. Las ondas de plasma superficial, como cualquier onda, se caracterizan por la constante de propagación, que depende de la frecuencia angular y de los índices de refracción del dieléctrico y del metal. De esta manera, si varía n del dieléctrico, por ejemplo, por unión de una molécula a la superficie metálica, cambiará la constante de propagación, que es lo que realmente se mide. Los plasmones, partícula asociada a la onda de densidad electrónica, aparecen en los metales puesto que están íntimamente relacionados con los electrones de la banda de conducción, que se comportan como un plasma, es decir, tienen efectos colectivos. De hecho, los plasmones no son más que cambios de conductividad que se producen como consecuencia de oscilaciones colectivas de la densidad de carga superficial.

Si la capa metálica es muy fina, los fotones de la onda evanescente provenientes del campo electromagnético generado por la radiación incidente interacciona con los electrones libres de la superficie metálica externa. Si y solo si su energía coincide con la de los plasmones se produce la resonancia de plasmón superficial o acoplamiento de energía. En estos casos se produce una transferencia energética de unos a otros, que se traduce en la aparición de un mínimo en la radiación reflejada, ya que parte de la energía del haz incidente se transmite a los electrones y no se refleja, no llega al detector. En definitiva, cuando se produce la resonancia, se observa un mínimo en la reflectividad.

La condición de resonancia se produce en condiciones muy determinadas. Requiere que la longitud de onda de la luz incidente sea superior a un valor crítico. Para el Au estas longitudes se encuentran en el espectro visible. Además debe emplearse luz polarizada, ya que la excitación de los plasmones superficiales sólo tiene lugar cuando la componente del vector de onda de la luz incidente que es paralela a la superficie metálica iguala a la de la onda de plasma superficial. Por tanto, sólo la luz polarizada en el plano de incidencia puede inducir un cambio en la densidad de carga superficial.

En general, la constante de propagación de una onda de plasma superficial en la interfase es mayor que la de la componente del vector de onda de la luz en un dieléctrico. Esto explica por qué los plasmones no son excitados por la luz incidente sobre una superficie metálica lisa. Hay que recurrir a configuraciones específicas para incrementar esta constante. Una de las más comunes es la configuración de Kretschmann en la que se usa un prisma de alta densidad óptica sobre el que se

coloca un disco del mismo material que el prisma, sobre el que se ha adherido una fina capa de Au. Normalmente para mejorar la adhesión entre el sustrato del disco y el Au se suele colocar una pequeñísima capa de Ti. Entre el prisma y el disco se pone un aceite de n igual al del prisma para que la luz no se desvíe antes de llegar a la capa metálica. La elección de Au como sustrato para los experimentos de SPR no sólo es ventajoso por permitir el uso de luz visible, sino que además es más resistente a oxidaciones y contaminaciones que otros metales como Ag o Al, y a la vez es compatible con muchas modificaciones químicas.

Debido a su principio físico la técnica carece de selectividad intrínseca, ya que todo cambio en el índice de refracción que se produzca en la proximidad de la superficie metálica genera una variación en la señal, que puede ser debida a un cambio en la composición de la disolución reguladora empleada, a una adsorción inespecífica de material sobre dicha superficie, etc. Para conseguir una detección selectiva, la superficie del sensor debe ser modificada con un receptor adecuado para el reconocimiento del analito de interés, de modo que la condición de resonancia se vea afectada por las moléculas enlazadas específicamente. De este modo cualquier cambio experimentado por la molécula inmovilizada, ya sea un cambio conformacional, una modificación química posterior a su inmovilización o su interacción con cualquier tipo de molécula presente en la disolución, puede ser detectado.

3.4.1. Tipos de instrumentación SPR.

Un instrumento SPR está integrado por 3 sistemas principales: el óptico, el de manejo de fluidos y la superficie sensora.

En un sensor de SPR, un cambio en el n del dieléctrico produce un cambio en la constante de propagación de la onda de plasma superficial, alterando la condición de resonancia o acoplamiento entre la luz y los plasmones. Esta variación puede observarse como un cambio en una de las características de la onda incidente. Atendiendo a la configuración del sistema óptico, que determina la característica de la onda medida, los instrumentos de SPR se pueden clasificar en tres grupos: (1) aquellos donde se monitoriza el ángulo de incidencia al que se produce el mínimo de la luz reflejada frente al tiempo; (2) instrumentos en los que se monitoriza la longitud de onda respecto al tiempo y (3) instrumentos en los que se monitoriza el tanto por ciento de reflectividad medido a un ángulo fijo.

El primer grupo lo constituyen los sensores con modulación angular. Usan luz monocromática que se hace incidir con diferentes ángulos siempre superiores al crítico, hasta encontrar el ángulo al que se produce la condición de resonancia, es decir, el mínimo de reflectividad (Figura 3.4). Es la configuración más utilizada, ya que es en la que se basan los instrumentos de SPR comercializados por dos de las compañías que dominan el mercado: Biacore y Autolab. La configuración empleada en el instrumento comercializado por Autolab (empleado a lo largo del presente trabajo), utiliza un haz de luz polarizada dirigida hacia la superficie del sensor gracias a un espejo móvil que escanea muy rápidamente una ventana muy estrecha de ángulos de incidencia., que tras reflejarse en la superficie metálica llega a un fotodetector (Figura 3.4). En este caso se excita una superficie del sensor relativamente grande, de modo que la reflectividad medida es un promedio de la del área iluminada, lo que contribuye a mejorar la relación señal/ruido. Los instrumentos Autolab consiguen barrer la ventana completa de ángulo (4º) unas 76 veces por segundo. Sin embargo, la presencia de elementos móviles conlleva la desventaja de ser susceptibles de desgaste con el tiempo. En el caso del equipo comercializado por la casa Biacore, la fuente de excitación es un haz de luz polarizada en forma de abanico que cubre un determinado intervalo de ángulos. Una matriz lineal de diodos detecta la intensidad de luz a cada ángulo simultáneamente y mediante un rápido procesamiento informático identifica el ángulo de mínima reflectividad, por lo que no precisa de elementos móviles (Figura 3.5.(A)). En ambos casos el ángulo de resonancia se monitoriza en continuo obteniéndose el denominado sensorgrama o representación del ángulo respecto al tiempo.

En el segundo grupo se encuentran aquellos dispositivos de SPR con modulación de la longitud de onda. La fuente de excitación es una luz policromática y el detector es un espectrofotómetro que monitoriza el desplazamiento de la longitud de onda a la cual se produce la resonancia (Figura 3.5.(B)). La empresa ThermoElectron Corp. (Waltham, MA, USA) comercializa un instrumento basado en esta configuración.

El tercer grupo se corresponde con aquellos instrumentos con modulación de la intensidad, que monitorizan el tanto por ciento de reflectividad en función del tiempo. En este caso se mide la reflectividad manteniendo constante tanto ángulo de incidencia como la longitud de onda. En muchos instrumentos el ángulo de medida óptimo se

puede ajustar para localizar el ángulo de inflexión de la señal de SPR, donde los cambios en la reflectividad registrada son mayores (Figura 3.5.(C)).

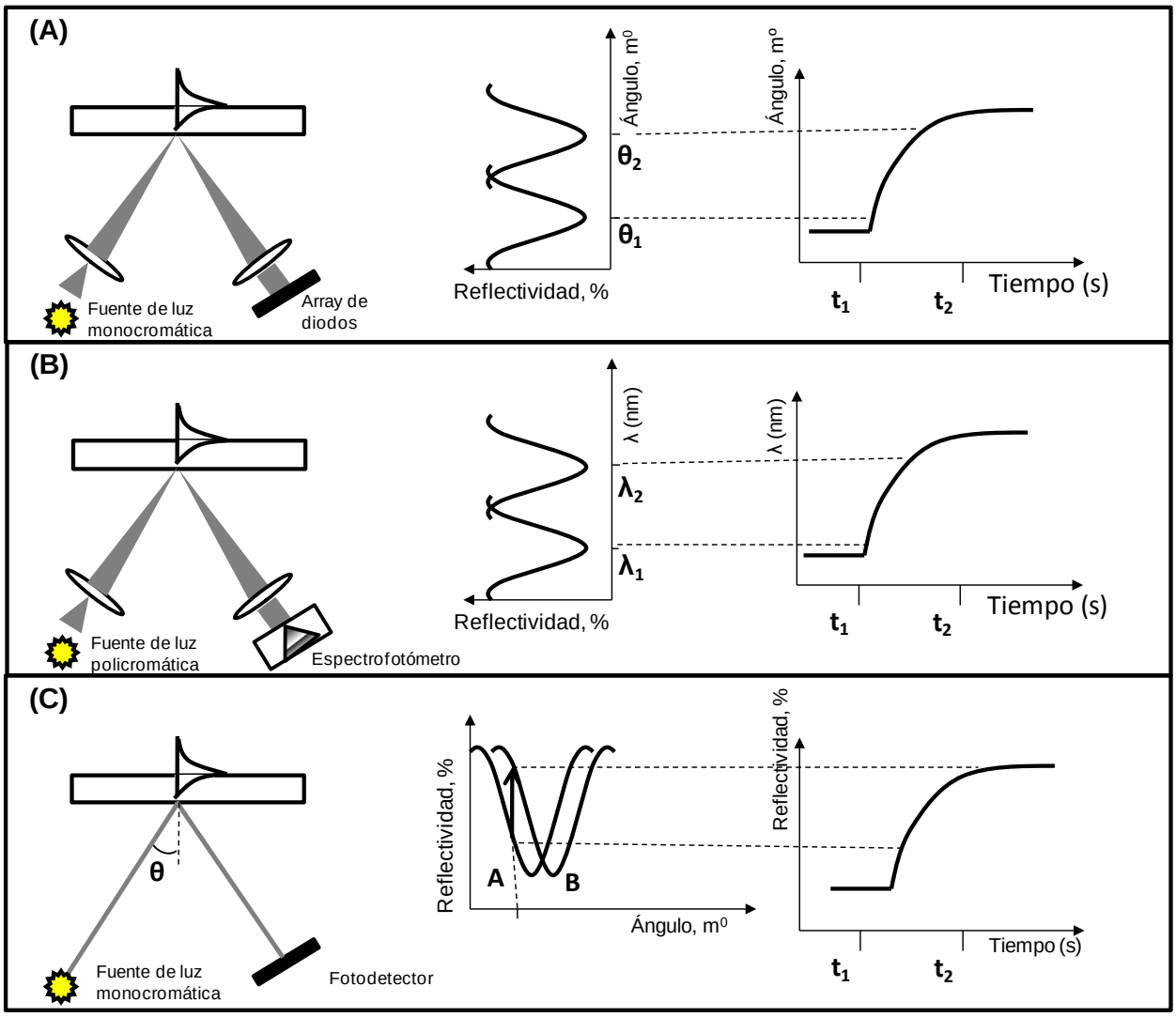

Figura 3.5. Configuraciones ópticas más habituales para medir el fenómeno de SPR: (A) modulación angular; (B) modulación de la longitud de onda y (C) modulación de la intensidad.

El modo en el que la muestra se pone en contacto con la superficie del sensor resulta determinante a la hora de estudiarlas características cinéticas de las interacciones, y viene definido por el sistema de manejo de fluidos. Existen dos configuraciones principales: los sistemas en flujo y los de cubeta. En ambos casos existen instrumentos con distintos grados de automatización.

En los sistemas de flujo, los líquidos son transportados hacia la celda de flujo mediante bombas peristálticas o jeringas a través de canales. Este es el sistema empleado en los instrumentos comercializados por Biacore. Esta casa comercial ha diseñado un sistema de microfluídica que permite el transporte continuo de la muestra sobre la superficie del sensor a una velocidad controlada. La interpretación cinética de los resultados está especialmente indicada en este tipo de configuración.

La configuración en cubeta es semejante a un pequeño reactor en cuyo fondo, se sitúa la superficie sensora, sobre la que tienen lugar los eventos de reconocimiento molecular. El equipo empleado a lo largo de este trabajo, ESPRIT (Autolab), presenta este tipo de configuración. La cubeta, de 150 µL de capacidad, es el recipiente en el que se introduce la muestra mediante un sistema robotizado que incluye agujas y jeringas que permiten la agitación continua de la muestra mediante sucesivos ciclos de aspiración/dispensación, de modo que se garantice el transporte de las biomoléculas desde el seno de la disolución hasta la superficie del sensor durante el tiempo de interacción que puede variarse a voluntad. El software del instrumento permite seleccionar una amplia gama de velocidades de agitación que se adapten a las necesidades de la aplicación concreta. Además este tipo de configuración permite trabajar con muestras en las que pueden estar presentes partículas de gran tamaño, ya que al contrario de lo que ocurre en los sistemas de flujo, no existe el peligro de obstrucción de la celda de flujo o de los tubos por los que se conduce la muestra.

La cubeta del equipo ESPRIT consta de dos canales, sistema que permite operar con una superficie de referencia, para asegurar la especificidad de las interacciones observadas (Figura 3.6). El equipo está totalmente robotizado, de forma que todas las etapas, incluidas las inyecciones de todos los reactivos necesarios, se llevan a cabo mediante un brazo automatizado controlado por ordenador (Figura 3.7). Ambos canales constan de un sistema de lavado y drenaje que permite eliminar una disolución e inyectar la siguiente asegurando la limpieza del sistema. La luz monocromática empleada como fuente de excitación tiene una longitud de onda de 670 nm y el intervalo dinámico es de 4 grados, con una resolución menor de 0,04 mº.

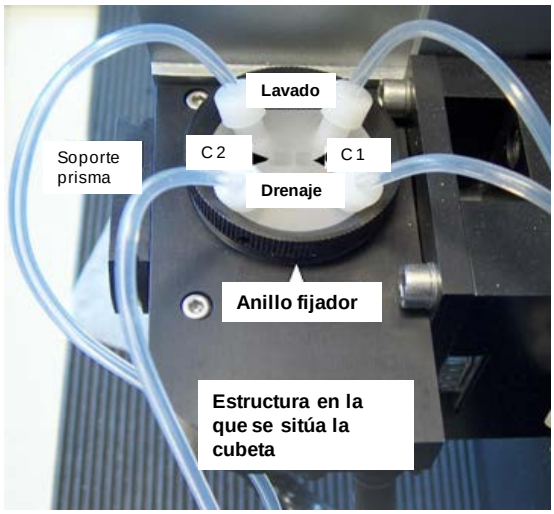

Figura 3.6. Imagen de la cubeta del instrumento ESPRIT.

Figura 3.7. Imagen del instrumento ESPRIT.

3.5. PREPARACIÓN DE LA FASE SENSORA PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS APTÁMEROS MEDIANTE SPR.

El diseño de un experimento de SPR conlleva la inmovilización de una de las biomoléculas involucradas en la interacción objeto de estudio sobre una superficie de oro, la cual se expone a una disolución que contiene la otra biomolécula. La primera decisión a tomar es, por tanto, cuál de las dos moléculas (tobramicina o aptámero) inmovilizar. Para ello se deben de tener en cuenta distintos aspectos tales como tamaño, estabilidad, solubilidad y grupos funcionales disponibles en ambas moléculas.

3.5.1. Inmovilización del aptámero sobre la superficie del sensor.

En el diseño de experimentos de SPR suele estar más indicada la inmovilización de la molécula que posea mayor masa molecular, de modo que sea la molécula de menor masa molecular la que tenga que difundir desde el seno de la disolución hasta la superficie del sensor. En el caso particular de este estudio, y siguiendo estas recomendaciones, se debería de inmovilizar el aptámero anti-tobramicina sobre la superficie del sensor. Esta superficie sensora se pondría en contacto, posteriormente, con concentraciones crecientes de tobramicina en disolución y la interacción entre ambas moléculas sería registrada en continuo. La menor masa molecular de la tobramicina evitaría la aparición de limitaciones cinéticas por efectos de transporte de masa (MTL).

De este modo, una primera aproximación a la caracterización de la interacción aptámero-tobramicina consistió en la inmovilización del aptámero anti-tobramicina parcialmente metilado (ATA) modificado con un grupo tiol en su extremo 5´ (SHATA) sobre la superficie de oro del disco de SPR mediante la formación de una monocapa autoensamblada (SAM). Para evitar las adsorciones de las bases de la secuencia oligonucleotídica sobre el oro, que podrían impedir que el aptámero adoptase la conformación adecuada para la interacción, se diseñó una monocapa binaria, en la que el segundo componente es el mercaptohexanol (MCH).

La inespecificidad de la técnica hace que sea necesario el uso de una referencia. Dado que el equipo SPR dispone de dos canales, en uno se formó una SAM mixta formada por una mezcla del aptámero tiolado y mercaptohexanol (MCH) (Figura 3.8, canal 1) mientras que en el otro canal, que actúa como referencia, se inmovilizó únicamente MCH (Figura 3.8 canal 2, referencia). De esta manera será posible evaluar, si las hubiera, las interacciones inespecíficas de la tobramicina con la superficie sensora.

El protocolo para la formación de la fase sensora fue el siguiente:

La superficie del disco recubierta por una capa de oro se trata con disolución piraña (H_2SO_4 (conc.)+H_2O_2 (33%) (70:30)) durante 10 min con el objeto de que la superficie de oro esté completamente libre de materia orgánica antes de su uso. Tras lavar el cristal con agua y con etanol, se seca con una corriente de nitrógeno. Una vez que el cristal está completamente seco se coloca cuidadosamente sobre el prisma semicilíndrico previamente cubierto con un aceite de inmersión que posee un índice de refracción conocido ($n_D^{25ºC}$=1,518±0,002) y el soporte del prisma se coloca en el equipo. Se acondiciona el sensor con agua hasta que la señal registrada sea estable, momento en el que se introduce manualmente en el canal 1 de la celda una disolución de aptámero anti-tobramicina tiolado (SHATA) 0,1 µM, preparada en la disolución utilizada para llevar a cabo el SELEX[13] (disolución de afinidad, Anexo II) conteniendo NaCl 0,3 M para conseguir una mayor fuerza iónica. De este modo se minimizan las fuerzas de repulsión presentes entre las moléculas de aptámero debido a su carga negativa, lo que permite aumentar el número de moléculas inmovilizadas sobre la superficie. El oligonucleótido es comercializado con enlaces disulfito, que serán reducidos previamente a su uso siguiendo el protocolo detallado en el Anexo II. Paralelamente, en el canal 2 se introduce una disolución de MCH 1 mM preparada en

el mismo medio. Se registra la señal obtenida durante toda la noche (Figura 3.8), permitiendo la formación de una SAM sobre la superficie de oro del sensor, tras lo cual se drena la disolución y se inyecta manualmente en ambos canales la disolución de MCH. Esta disolución se mantiene en contacto con la superficie del sensor durante 1 h. Con la adición de MCH en el canal 1 se forma una monocapa mixta. Sus funciones son varias: desplazar las moléculas de aptámero que se hubiesen quedado adsorbidas sobre la superficie de oro de forma inespecífica (no a través del tiol), bloquear los sitios de la superficie del oro que no hayan sido modificados con el aptámero tiolado y orientar hacia la disolución las moléculas de aptámero tiolado que se hayan unido a la superficie de oro para que sean más accesibles a las moléculas de tobramicina en disolución. En la figura 3.8, se observa cómo el ángulo de resonancia medido tras la modificación de ambos canales es superior al inicial, lo que indica que la superficie de oro ha sufrido una modificación. La diferencia en el ángulo registrado en el canal 1 es superior a la diferencia registrada en el canal 2. Esto se debe a la clara diferencia de tamaño entre el SHATA, inmovilizado en el canal 1 (MW=9188 Da) y el MCH, inmovilizado en el canal 2 (MW=134,24 Da). La diferencia entre el ángulo registrado antes y después de la inmovilización de una biomolécula permite conocer la cantidad de ésta que se ha inmovilizado sobre la superficie del sensor como se expondrá más adelante.

Una vez modificados ambos canales satisfactoriamente, se procedió al registro de la interacción con la tobramicina en disolución. Para ello el primer paso consistió en la estabilización de la fase sensora para lo cual se inyectaron sucesivamente 50 µL de la disolución reguladora de afinidad (5 min) y 50 µL de HCl 0,05 M (1 min) hasta la obtención de una señal estable. A continuación se procedió a la inyección sucesiva de concentraciones crecientes de tobramicina preparadas en la disolución de afinidad (50 µL, 10 min). La inyección de estas disoluciones se realizó simultáneamente en ambos canales mediante el autoinyector. Se espera que, tras la introducción del antibiótico tobramicina, tenga lugar el reconocimiento molecular de éste por el aptámero inmovilizado, lo que se debe traducir en un aumento de la señal de SPR registrada en el canal 1. Por el contrario, en el canal 2, donde no se ha inmovilizado aptámero, la señal registrada tras la inyección de la tobramicina no debe presentar ningún cambio. Una vez obtenido el registro durante esta etapa (fase de asociación) se drena la disolución y se introducen 50 µL de la disolución reguladora de afinidad exenta de

tobramicina con el objetivo de registrar, durante 5 min, el proceso de disociación del complejo de afinidad que se hubiese formado en la etapa anterior (fase de disociación).

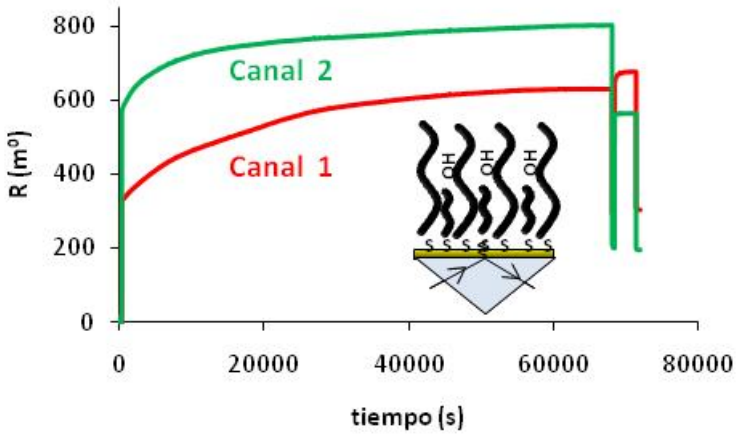

Figura 3.8. Sensorgrama correspondiente a la formación de la SAM mixta: SHATA+MCH (canal 1) y SAM de MCH (canal 2).

Sin embargo, tal como se observa en la figura 3.9, tras la adición de una disolución de tobramicina 0,1 µM, no se observa cambio alguno de la señal en ninguno de los canales. Se realizaron otras dos adiciones de disoluciones con concentración creciente de tobramicina (1 µM y 10 µM), pero ninguna de ellas generó una señal de SPR medible. Sí se observa cómo, durante el período de tiempo en el que la disolución de tobramicina está en contacto con la fase sensora, la señal de SPR es superior a la registrada tras llevarse a cabo la inyección de la disolución reguladora, esto se debe al cambio de índice de refracción de la disolución como consecuencia del cambio en su composición.

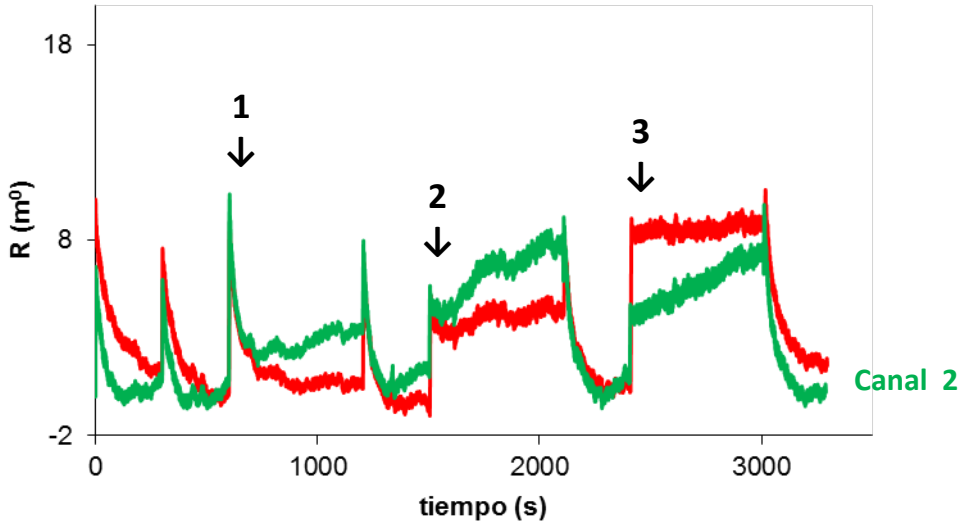

Figura 3.9. Sensorgrama correspondiente a la adición de tobramicina (1) 0,1; (2) 1 y (3) 10 µM sobre la fase sensora modificada con una monocapa mixta de aptámero anti-tobramicina+MCH (canal 1); monocapa de MCH (canal 2, referencia).

A pesar de que estos resultados parecen indicar la ausencia de reconocimiento molecular de la tobramicina en disolución por parte del aptámero enlazado en el canal 1, también se debe tener en cuenta que la ausencia de señal neta se puede deber a una falta de sensibilidad del instrumento para detectar el enlace de moléculas de baja masa molecular, como es el caso de la tobramicina (467,51 Da). Una estrategia para aumentar la sensibilidad en estos casos sería la obtención de superficies modificadas con una elevada capacidad de enlace. Sin embargo, las superficies con una elevada densidad de la molécula inmovilizada no son adecuadas para llevar a cabo estudios cinéticos, debido a las limitaciones por transporte de masa que se presentan, como se discutirá más adelante.

Se decidió, por lo tanto, inmovilizar la tobramicina sobre la superficie de oro del sensor. De este modo, la interacción se efectuará poniendo en contacto la superficie modificada con distintas disoluciones de aptámero con concentraciones crecientes, realizando el registro del proceso en continuo.

3.5.2. Inmovilización de la tobramicina sobre la superficie del sensor.

Examinando la estructura de la tobramicina y los grupos funcionales disponibles, se decidió inmovilizar el antibiótico covalentemente a una monocapa autoensamblada (SAM), previamente formada sobre la superficie de oro del sensor, que aporte a la superficie los grupos funcionales adecuados para el posterior enlace. Concretamente, se seleccionó el ácido mercaptopropanoico, que permite la posterior formación de un enlace tipo amida entre sus grupos carboxilo y uno de los grupos amino presentes en el antibiótico, mediante el empleo de carbodiimida. Se trata de un método ampliamente utilizado y que es selectivo al único grupo amino unido a un carbono secundario (los grupos amino restantes se encuentran enlazados a carbonos terciarios)[134].

Al igual que en la estrategia anteriormente descrita, se modificaron de distinta forma los dos canales disponibles con el objetivo de disponer de un canal de referencia. En uno de los dos canales se procedió a la inmovilización de tobramicina y en el otro se bloqueó toda la SAM con etanolamina. De esta manera se pueden evaluar las posibles interacciones inespecíficas del aptámero con la superficie sensora.

El procedimiento experimental para llevar a cabo la inmovilización de la tobramicina sobre la superficie de oro fue el siguiente:

1. Formación de una monocapa autoensamblada de ácido mercaptopropanoico.

Una vez se ha limpiado y colocado el disco de oro tal como se ha detallado en el apartado anterior, se acondiciona el sensor con agua hasta que la señal registrada sea estable, momento en el que se introduce manualmente en ambos canales una disolución de ácido mercaptopropanoico 40 mM preparado en una disolución EtOH:H_2O (3:1). La cubeta se tapa con un pequeño trozo de parafilm para evitar la evaporación de la disolución y se registra la señal obtenida durante toda la noche (Figura 3.10), periodo durante el cual se forma una SAM sobre la superficie de oro del sensor. Se observa cómo el ángulo de resonancia medido tras el tratamiento del sensor con el ácido mercaptopropanoico es superior al inicial, lo que indica el incremento de masa sobre la superficie sensora

2. Incorporación mediante enlace covalente de la tobramicina.

La inmovilización de tobramicina consta de 3 etapas (Figura 3.11):

- ✓ Activación de los grupos carboxilo presentes en la superficie del sensor. Se lleva a cabo mediante tres inyecciones sucesivas de 50 µL de una mezcla de 200 mM EDC y 50 mM NHS, con tiempos de reacción de 5 minutos cada vez.
- ✓ Enlace de la tobramicina (canal 1) y de la etanolamina (canal 2) mediante tres inyecciones sucesivas de tobramicina 10 mM en HEPES 0,1 M, pH 8,64 (valor de pH al cual la mayor parte de los grupos amino presentes en la tobramicina carecen de carga, ya que su punto isoeléctrico es 8,2[135]), o etanolamina 1 M en HEPES 0,1 M pH 8,64, durante 20 min cada vez.
- ✓ Bloqueo de los grupos carboxilo que permanecen activados y sin reaccionar mediante la inyección en ambos canales de etanolamina 1 M preparada en HEPES 0,1 M pH 8,64 durante 30 min

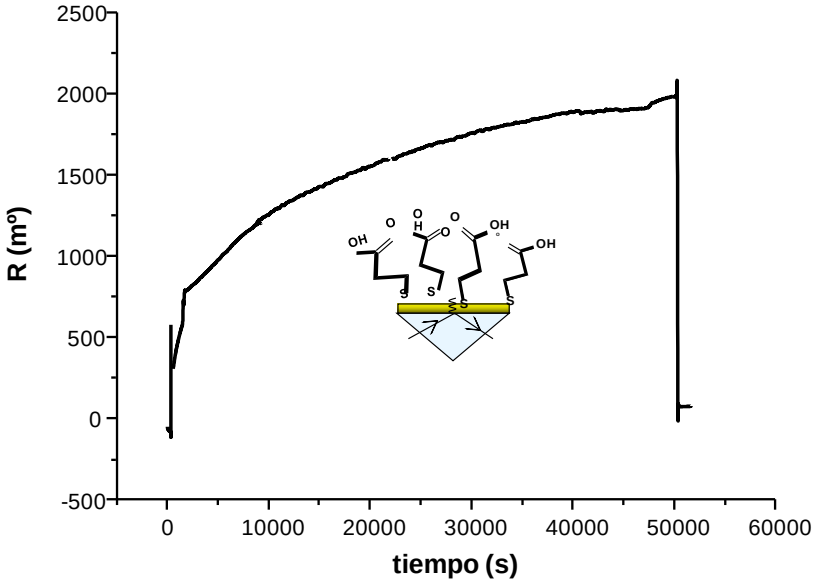

Figura 3.10. Sensorgrama obtenido durante la formación de una monocapa autoensamblada de ácido mercaptopropanoico 40 mM durante toda la noche.

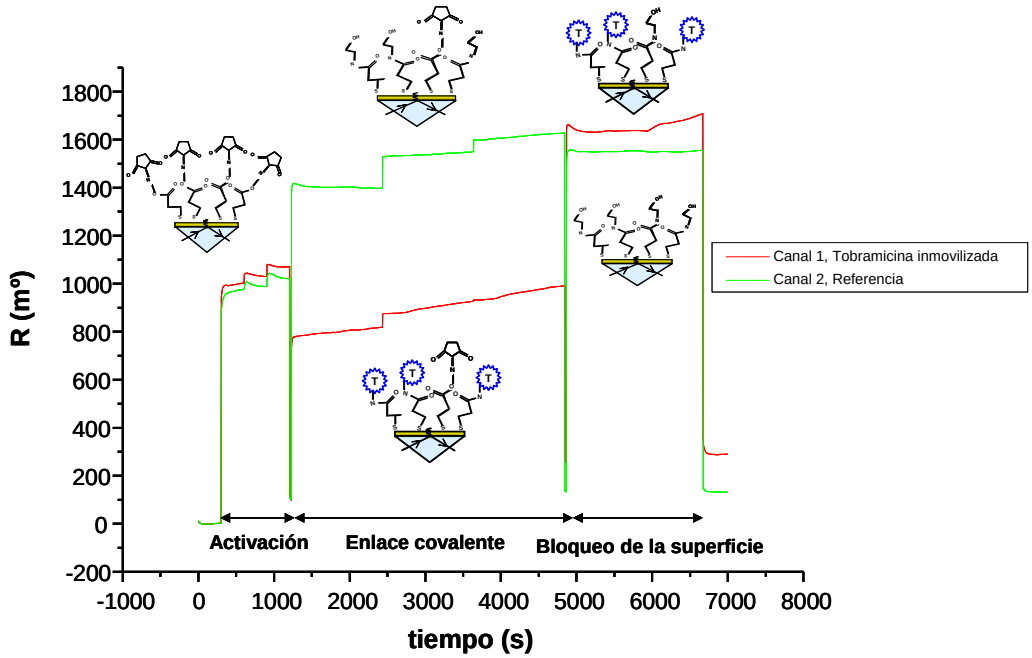

Figura 3.11. Sensorgrama correspondiente a la inmovilización de tobramicina (canal 1) y etanolamina (canal 2, referencia).

El empleo de esta configuración, en la que la molécula que presenta menor masa molecular se inmoviliza sobre la superficie, puede ser el origen de efectos limitantes por transporte de masa (MTL), debido a que el aptámero, con mayor masa molecular tiene que difundir desde el seno de la disolución hacia la superficie sensora (Figura 3.12). Estas limitaciones por transporte de masa aparecen cuando la velocidad de enlace de la molécula a la superficie es mayor que su velocidad de difusión desde la disolución a la superficie, y afectan por igual a las fases de asociación y disociación. Cuanto mayor es la concentración de sitios de enlace disponibles mayor es el consumo de aptámero en la superficie del sensor, siendo más evidente el efecto de la limitación por transporte de masa. El hecho de que haya una limitación por transporte de masa implica que la constante cinética medida no sería la correspondiente a la reacción de afinidad sino a la de la difusión del aptámero hacia el sensor. La forma de minimizar dicho efecto es, por tanto, la construcción de fases sensoras que posean una baja capacidad de enlace. Se considera que cuando se trabaja con interacciones donde k_a (constante cinética de asociación) es mayor o igual a 10^6 $M^{-1}s^{-1}$ se debe tener en cuenta este efecto en el modelo de enlace empleado para interpretar los datos cinéticos correctamente[136].

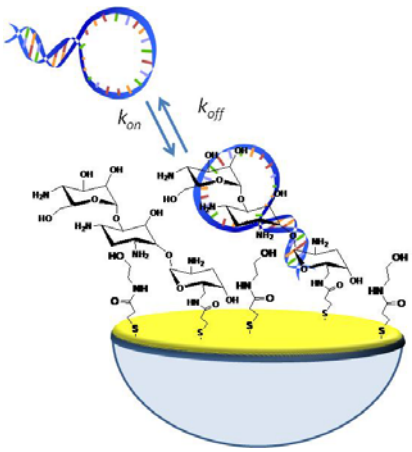

Figura 3.12. Esquema de la fase sensora empleada para llevar a cabo los ensayos de enlace mediante SPR.

En las condiciones experimentales utilizadas, se obtuvieron variaciones en el ángulo medido antes y después de la inmovilización de tobramicina sobre la superficie (R_{tob}) del canal 1 entre 15-30 mº. Estos valores se encuentran en el intervalo recomendado para la caracterización cinética de interacciones en las que participa una especie de pequeño tamaño molecular y es esta la que se inmoviliza sobre la superficie sensora (en torno a los 25 mº, que equivalen a 250 RU, unidades empleadas por los instrumentos Biacore)[137]. Este cambio de ángulo medido puede utilizarse para calcular el recubrimiento superficial de la tobramicina inmovilizada, expresado en masa por unidad de superficie. De acuerdo con las especificaciones del equipo, una variación en el ángulo de 120 mº se corresponde con 1 ng·mm^{-2} de proteína enlazada. Sin embargo debe tenerse en cuenta que esta relación entre el cambio de ángulo y la masa de material enlazado depende del índice de refracción de la molécula que se une. En la bibliografía se informa de que el incremento en el índice de refracción por unidad de concentración para antibióticos aminoglicósidos es de 0,153[138]. Considerando este valor, la relación entre este incremento y el considerado como promedio para una proteína modelo (0,173) es de 0,884. Por tanto para obtener un cambio de 120 mº en el ángulo de resonancia, se debe enlazar una cantidad de antibiótico aminoglicósido de1,13 ng·mm^{-2}[137]. De esta forma en las condiciones experimentales descritas la cantidad de tobramicina inmovilizada se encuentra en el intervalo 141-282 pg mm^{-2}.

3.6. INTERACCIÓN TOBRAMICINA INMOVILIZADA- APTÁMERO: EL CICLO DE ANÁLISIS.

Una vez se ha modificado satisfactoriamente la superficie del sensor con la tobramicina se procede a realizar el registro de la señal de SPR correspondiente a la interacción con distintas concentraciones de aptámero en disolución, información necesaria para calcular la constante de afinidad entre ambas moléculas. Estas medidas se realizan en una disolución 20 mM de Tris de pH 7,4 que contiene 150 mM de NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ y 1 mM $CaCl_2$, medio idéntico al utilizado durante el proceso de selección del aptámero[13], en el que la interacción de afinidad estará favorecida.

La obtención de los datos es un proceso totalmente automatizado, consistente en la repetición sucesiva de ciclos de análisis. El diseño del equipo ESPRIT, tipo cubeta, hace que sea necesaria la agitación constante de las disoluciones con el objetivo de controlar las condiciones hidrodinámicas del sistema. Cada ensayo de interacción (o ciclo independiente de análisis), consta de una serie de etapas: acondicionamiento, asociación, disociación, regeneración y nuevo acondicionamiento (Figura 3.13).

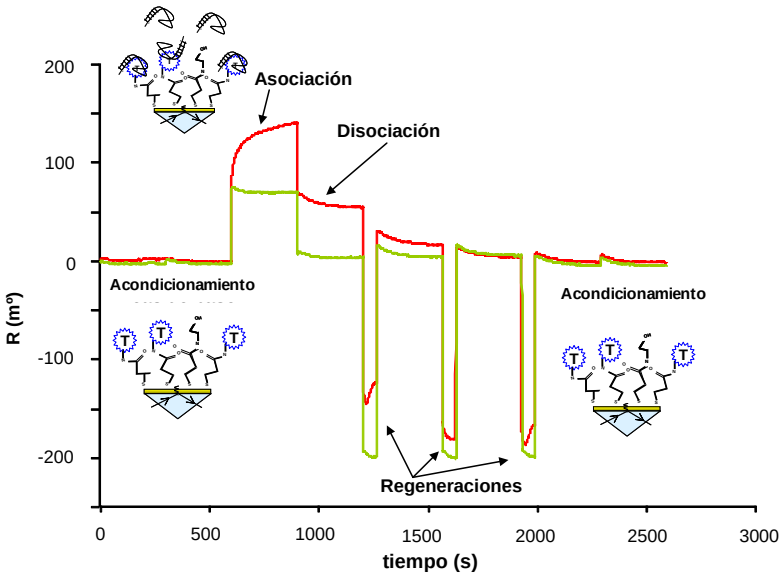

Figura 3.13. Sensorgrama en el que se muestra un ciclo completo de análisis correspondiente a una superficie modificada con tobramicina (línea roja) y con etanolamina, que actúa como canal de referencia (línea verde).

El protocolo para su registro se detalla a continuación. Durante la etapa de acondicionamiento se registra la señal para inyecciones sucesivas de 50 µL de disolución reguladora, durante 5 min, hasta obtener una señal estable, tomada como línea de base. A continuación, se introducen simultáneamente en ambos canales disoluciones que contienen distintas concentraciones de aptámero preparadas en la disolución reguladora de afinidad (35 µL) y se registra durante 10 min el cambio en el ángulo de resonancia producido por el enlace del aptámero (fase de asociación). Tras drenar la disolución de la cubeta, se introducen en ésta 50 µL de disolución reguladora y se registra la denominada fase de disociación durante 5 min, en la que se producirá la disociación parcial (o total) del complejo, hasta obtenerse una señal estable. En la siguiente etapa, se llevan a cabo varias inyecciones de 50 µL de HCl 0,05 M (1 min) para favorecer la disociación completa del complejo de afinidad que pudiera permanecer en la superficie (regeneración). Finalmente, se realizan inyecciones sucesivas de disolución reguladora hasta obtener una señal similar a la inicial (línea de base).

Al inyectar la disolución de aptámero en la cubeta se monitorizó la cantidad de complejo aptámero-tobramicina que se forma sobre la superficie del sensor mediante la variación del ángulo de resonancia medido (R_t) en función del tiempo, como se muestra en la figura 3.14. Tras cada inyección se produce un rápido aumento de la señal registrada asociada al cambio en la composición de la disolución en contacto con la fase sensora. Se debe señalar que solamente en el canal 1 se observa un incremento gradual de la señal registrada, mientras que se obtiene una señal constante para el canal 2, de referencia. Esto es una indicación de que los tres aptámeros ensayados (el natural (Figura 3.14 A) y los dos modificados (Figura 3.14 B y C)) se unen específicamente al canal 1, donde se ha inmovilizado la tobramicina, y que la unión inespecífica de cualquiera de los aptámeros sobre la superficie modificada únicamente con etanolamina es inexistente. Tras drenar la disolución que contiene el correspondiente aptámero de la cubeta e introducir en ésta la disolución de afinidad, se observa una disminución en la variación del ángulo de resonancia con el tiempo como consecuencia de la disociación del complejo aptámero-tobramicina inmovilizada. En el canal 1 no se llega a recuperar el nivel de la línea de base, lo cual indica que los aptámeros ensayados se han unido específicamente a la superficie modificada con tobramicina. Por el contrario, en el canal 2 la señal registrada permanece al nivel de la

línea de base, confirmándose que los aptámeros no se unen inespecíficamente a la superficie sensora en ausencia de tobramicina inmovilizada.

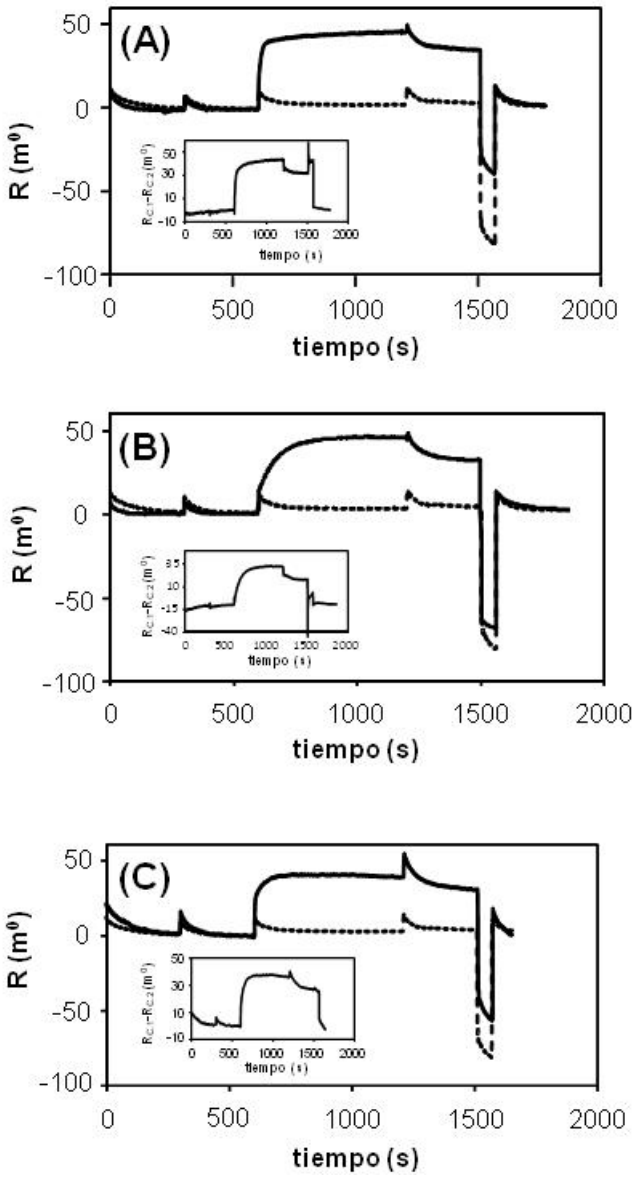

Figura 3.14. Sensorgramas que muestran un ciclo de análisis completo correspondiente a la interacción entre una superficie modificada con tobramicina (canal 1, línea sólida) o una superficie modificada con etanolamina (canal 2, línea de puntos) con (A) ATANM 0,5 µM; (B) ATA 0,3 µM; (C) ATATM 0,75 µM. En cada uno de los recuadros se muestra la señal diferencial obtenida restando la señal del canal 2 a la del canal 1.

Finalmente se logra la disociación completa del complejo aptámero-tobramicina inmovilizada empleando unas condiciones ácidas suaves durante la etapa de regeneración. Bajo estas condiciones, los grupos amino presentes en la estructura de la tobramicina adquieren una carga positiva, de modo que se eliminan los enlaces de unión que estabilizan el complejo aptámero-tobramicina. La estabilidad de la SAM no se ve afectada por esta regeneración, por lo que se puede comenzar otro ciclo. En la figura 3.15 se muestra la reproducibilidad correspondiente al registro de la señal de SPR inter- e intra-sensor.

Para obtener información sobre las características termodinámicas y cinéticas de la reacción de afinidad entre la tobramicina inmovilizada y los distintos tipos de aptámeros diseñados, se registraron las curvas de asociación y disociación correspondientes a los tres aptámeros objeto de estudio ATA, ATATM y ATANM. En cada caso, se obtuvo el sensorgrama correspondiente a un ciclo de enlace completo para cada una de las concentraciones de aptámero ensayadas, comprendidas entre 0,05-3 µM, permitiendo que se alcance el equilibrio para cada uno de los experimentos que se llevaron a cabo. Según aumenta la concentración de la disolución de aptámero ensayada, mayores son tanto la pendiente del aumento del ángulo registrado (R_t) en la etapa de asociación como la señal registrada en el equilibrio (R_{eq}) (Figura 3.16). Esto indica que la cantidad de complejo aptámero-tobramicina inmovilizada que se ha formado es también mayor.

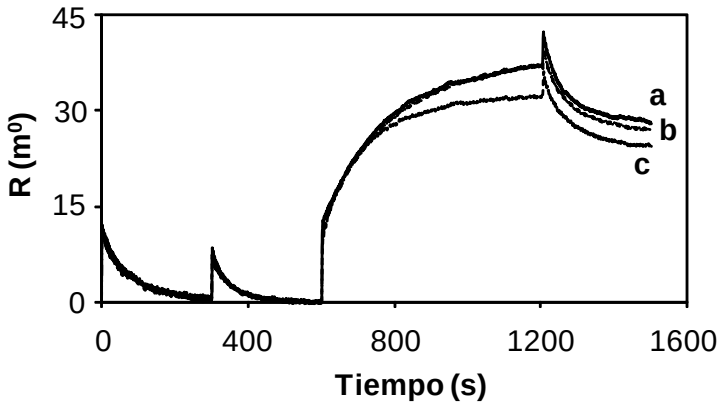

Figura 3.15. Superposición de los sensorgramas correspondientes a la interacción de una concentración de aptámero anti-tobramicina no metilado, ATANM 0,15 µM con (a) y (b) la misma fase sensora y (c) otra fase sensora.

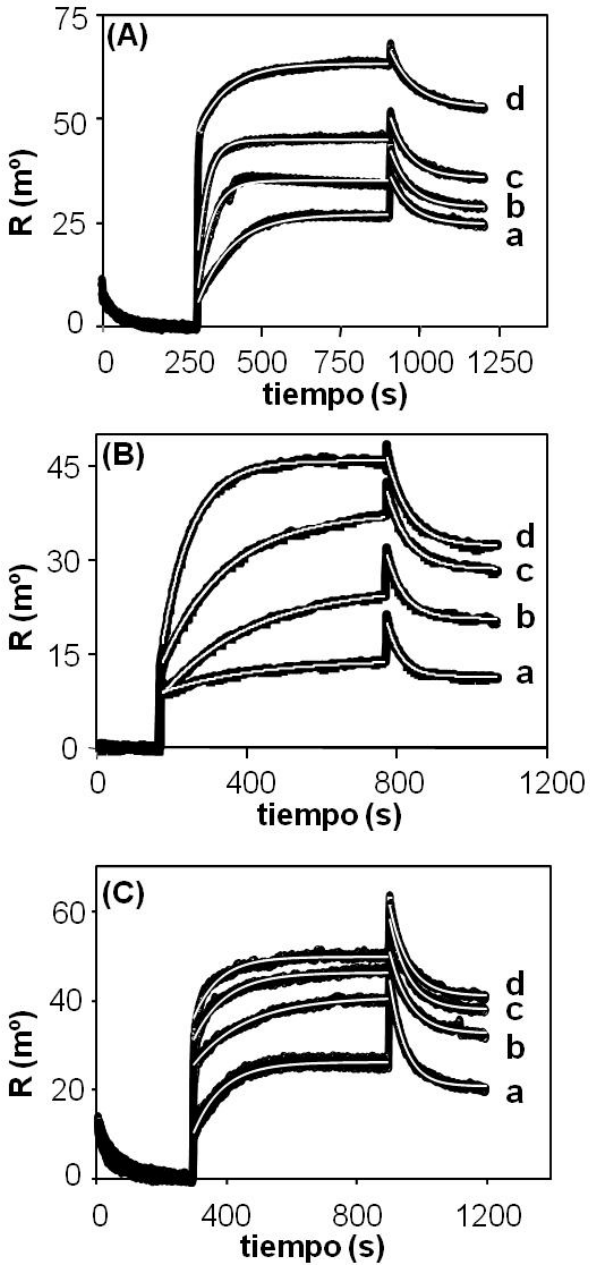

Figura 3.16. Superposición de sensorgramas de SPR correspondientes a la adición de (A) ATANM (a) 0,05; (b) 0,1; (c) 0,25 y (d) 1 µM; (B) ATA (a) 0,08; (b) 0,1; (c) 0,15 y (d) 0,3 µM; (C) ATATM (a) 0,2; (b) 0,5; (c) 1 y (d) 1,5 (líneas negras) en la disolución de afinidad. Ajuste no-lineal a las fases de asociación y disociación (líneas blancas).

3.7. OBTENCIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS Y DE DISOCIACIÓN.

Los sensorgramas obtenidos contienen tanto información cinética, como información una vez alcanzado el equilibrio del proceso de reconocimiento de la tobramicina por el aptámero correspondiente. La señal de equilibrio puede utilizarse

directamente para la determinación de las constantes de equilibrio, bien de formación del complejo aptámero-tobramicina (K_A) o bien de disociación (K_D) (ambas se encuentran relacionadas (K_A = 1/K_D), que son una medida de la afinidad que existe entre el antibiótico y el receptor. De la variación de la señal con el tiempo se puede obtener el valor de las constantes cinéticas de asociación (k_a) y disociación (k_d), y además, si se seleccionan las condiciones adecuadas de medida, también se puede obtener el valor de la constante de equilibrio. Es conveniente comparar los valores de las constantes de equilibrio obtenidos por ambos métodos, siendo necesaria una convergencia de los valores encontrados a modo de test de autoconsistencia.

La interpretación de los datos de SPR tanto por el método cinético como por el de equilibrio requiere un ajuste no lineal de la fase de asociación a un modelo matemático (Figura 3.16., líneas blancas), que se describe a continuación.

En el modelo se asume que la interacción entre la molécula inmovilizada (tobramicina) y la presente en disolución (aptámero) tiene una estequiometría 1:1 y sigue una cinética de orden 1. La reacción entre ambos se puede escribir mediante la ecuación 3.1.

$$Tobramicina + Aptámero \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftarrows}} Tobramicina:Aptámero \quad \text{ec. (3.1.)}$$

donde el aptámero es la molécula en disolución, y la tobramicina la inmovilizada. La ecuación de velocidad para este proceso es:

$$\frac{d[T:A]}{dt} = k_a[Tobramicina][aptámero] - k_d[T:A] \quad \text{ec. (3.2.)}$$

Teniendo en cuenta que la concentración de tobramicina libre en cada instante de tiempo t ([T]) se puede obtener si se conoce la concentración inicial en superficie ($[T]_0$) y la cantidad de complejo formado ([T:A]):

$$[T] = [T]_0 - [T:A]$$

La ecuación anterior puede escribirse:

$$\frac{d\,[T:A]}{dt} = k_a[aptámero]([T]_0 - [T:A]) - k_d[T:A] \quad ec. (3.3.)$$

La señal observada en SPR, R, es proporcional a la concentración de complejo formado en superficie, [T:A] y la señal máxima medida, R_{max}, depende de la

concentración total de tobramicina activa en superficie, $[T]_0$, por lo que la ecuación 3.3 puede escribirse en términos de la señal medida como se indica en la ecuación 3.4.

$$\frac{d\,R}{dt} = k_a[aptámero](R_{max} - R) - k_d R \;\; ec.(3.4.)$$

Al integrar esta ecuación se obtiene la ecuación 3.5., que describe cómo varía la señal de SPR medida en cada instante de tiempo t, R_t, con la concentración de aptámero

$$R_t = \frac{R_{max}[aptámero]k_a}{k_a[aptámero] + \; k_d}\left(1 - e^{-(k_a[aptámero]_{libre} + k_d)t}\right) + R_0 \;\; \text{ec.}(3.5.)$$

donde, R_{max} es el máximo cambio registrado en el ángulo de resonancia en mº, una medida de la máxima capacidad de enlace cuando todos los sitios de enlace sobre la superficie sensora están ocupados; R_0 es el cambio en el ángulo de resonancia registrado a t=0; $[aptámero]_{libre}$ es la concentración de aptámero en ese instante de tiempo, que coincide con la concentración de aptámero empleada en la medida una vez corregida como se explica a continuación y k_a y k_d son las constantes cinéticas de asociación y disociación del complejo aptámero-tobramicina, respectivamente. Esta ecuación suele escribirse de forma más simple como se muestra en la ecuación 3.6.

$$R_t = R_0 + \; E(1 - e^{-k_s t}) \;\; ec.(3.6.)$$

donde $E+R_0$ representa la señal de SPR registrada cuando el sistema alcanza el equilibrio para cada una de las concentraciones de aptámero ensayadas (R_{eq}) y $k_s = k_a[aptámero]_{libre} + k_d$.

Cuando los experimentos de SPR se llevan a cabo en un instrumento de cubeta, como en el presente trabajo, se debe tener en cuenta que se puede producir una disminución de la concentración del aptámero en el volumen fijo inyectado. Este efecto se debe a la pérdida de material resultante del evento de enlace. Esto contrasta con lo que ocurre en los instrumentos de SPR basados en sistemas de flujo, donde existe un aporte continuo del analito y por tanto, se puede considerar que la concentración de aptámero en el sistema se mantiene igual a la inicial. Este efecto fue cuantificado y corregido mediante la aplicación de la ecuación 3.7.

$$[aptámero]_{libre} = [aptámero]_0 - \frac{R_{eq} S\; 10^{-3}}{f\; PM\; V} \;\; ec.(3.7.)$$

donde, $[aptámero]_0$ es la concentración de aptámero introducida en la celda en molar; $[aptámero]_{libre}$ es la concentración de aptámero corregida también en molar; S es el área de la superficie del sensor en contacto con la disolución (2,8 mm^2); *f* es el factor de conversión entre unidades de ángulo, mº, y la cantidad de aptámero unida a la superficie enng·mm^{-2}, para un ácido nucleico este factor es *f*=120 mº/0,8 ng·mm^{-2}; PM es la masa molecular del aptámero y V es el volumen de disolución inyectada (35 µL en todos los casos). Esta corrección fue tomada en consideración en todos los cálculos realizados a continuación. Como primera aproximación, se considera que si la concentración de aptámero libre fuese inferior en más del 10% al valor de la concentración de aptámero inicial, sería necesario utilizar un modelo cinético de orden dos para explicar el evento de enlace[139]. En el presente trabajo los valores calculados correspondientes a esta disminución en la concentración de aptámero son siempre menores al 5% de la concentración inicial del aptámero, siendo más importantes para las concentraciones más bajas ensayadas, como cabría esperar. Por todo ello se aplicaron las ecuaciones correspondientes a cinéticas de primer orden.

3.7.1. Análisis de equilibrio.

Para caracterizar la afinidad de la interacción utilizando el modelo de equilibrio debe tenerse en cuenta que la expresión de la constante del equilibrio de disociación del complejo tobramiciana:aptámero es:

$$K_D = \frac{[T]_{eq}[aptámero]_{eq}}{[T{:}A]_{eq}} \quad ec.(3.8.)$$

Donde se cumple:$[T]_{eq} + [T{:}A]_{eq} = [T]_0$

Si se tiene en cuenta, como se comentó anteriormente, que la señal de SPR máxima, R_{max}, depende de la concentración inicial de tobramicina disponible y que la señal obtenida en el equilibrio, R_{eq} es una medida de la concentración de complejo de afinidad formado, la expresión anterior se transforma en la que se indica en la ecuación 3.9.

$$K_D = \frac{(R_{max} - R_{eq})[aptámero]_{eq}}{R_{eq}} \quad ec.(3.9.)$$

Si se reorganiza esta expresión se obtiene la ecuación de una isoterma de Langmuir:

$$R_{eq} = \left(\frac{[aptámero]_{eq}}{[aptámero]_{eq} + K_D}\right) R_{max} \quad ec.(3.10.)$$

Además, la ecuación 3.9. puede escribirse en función de la constante de asociación, K_A:

$$K_A = \frac{1}{K_D} = \frac{R_{eq}}{(R_{max} - R_{eq})[aptámero]_{eq}} \quad ec.\ (3.11.)$$

Que puede reorganizarse en la forma de la típica representación de Scatchard:

$$\frac{R_{eq}}{[aptámero]_{eq}} = K_A R_{max} - K_A R_{eq} \quad ec.(3.12.)$$

Para la aplicación de este modelo, los valores de R_{eq} para cada una de las concentraciones de aptámero ensayadas fueron estimados a partir de los ajustes no-lineales de la fase de asociación a la ecuación 3.6. Por un lado, estos valores se representaron frente a la concentración de aptámero corregida ($[aptámero]_{libre}$= $[aptámero]_{eq}$) y se ajustaron a una isoterma de Langmuir (ecuación 3.10), obteniéndose de los parámetros de ajuste el valor de K_D. En la Figura 3.17 se muestran las isotermas de Langmuir para cada uno de los aptámeros objeto de estudio en este trabajo.

Otra forma habitual de calcular la constante de disociación, K_D, es el empleo de la representación lineal definida en la ecuación 3.12 (R_{eq}/$[aptámero]_{libre}$ vs. R_{eq}). La constante de disociación, K_D, se obtiene como el inverso de la pendiente de la recta obtenida al representar los datos como se indica. Debe tenerse en cuenta que, en general, la representación de Scatchard conduce a mayores errores en la estimación de los valores de K_D, por ello, en este caso se utilizaron ambas representaciones y los resultados obtenidos se resumen para su comparación en la Tabla 3.2.

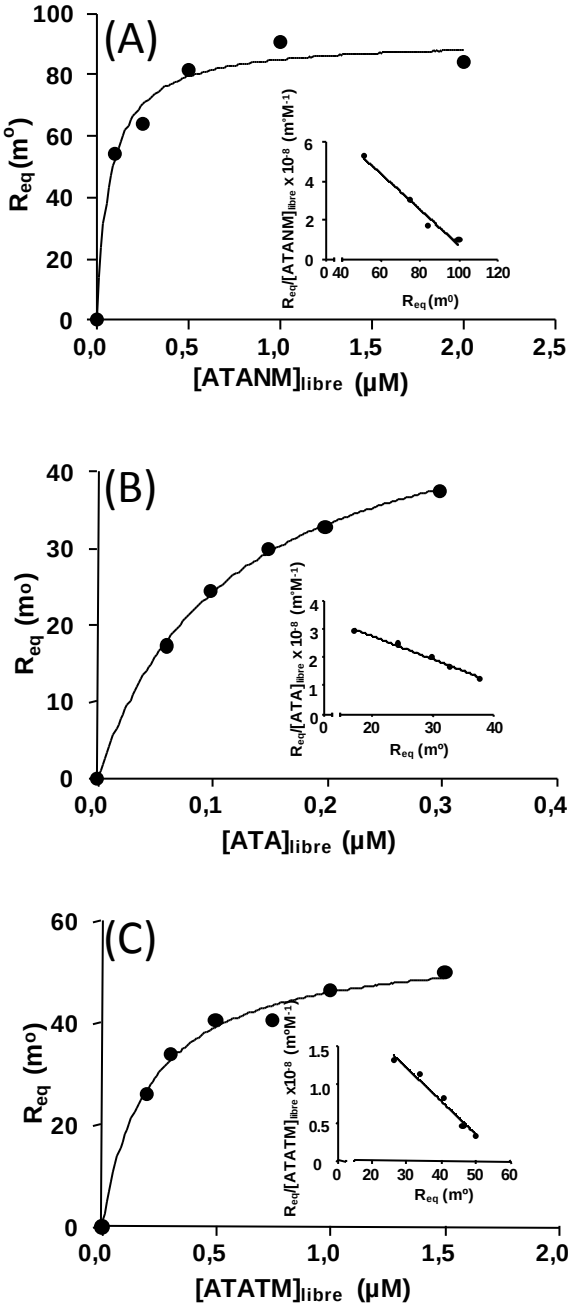

Figura 3.17. Isotermas de enlace de Langmuir obtenidas incubando una fase sensora modificada con tobramicina con concentraciones crecientes de (A) ATANM; (B) ATA y (C) ATATM en disolución de afinidad durante 10 min.

Las constantes de disociación, K_D, obtenidas por ambos métodos son similares para los tres aptámeros con diferente grado de metilación estudiados (ATA, ATATM y ATANM). El valor más pequeño, menor de 100 nM, lo presenta el aptámero anti-tobramicina natural, no metilado, ATANM. Los aptámeros modificados, ATA y ATATM,

mostraron valores de K_D superiores a 100 nM. ATA mostró una K_D ligeramente menor (mayor afinidad) hacia su molécula diana, la tobramicina que el aptámero totalmente metilado, ATATM. A partir de este resultado se puede concluir que la afinidad exhibida por el aptámero disminuye a medida que se incrementa su grado de metilación. No obstante, esta disminución no es muy grande, observándose una disminución de la afinidad de unas 4 veces entre los aptámeros natural y totalmente metilado.

La introducción de la modificación 2´-OMe en el grupo 2´-OH de la base U12, que, según se ha descrito, juega un papel importante en el reconocimiento molecular de la tobramicina, supuso una disminución adicional en la K_D de 1,5 veces respecto a la observada para el aptámero donde 26 de las 27 ribosas habían sido modificadas. La pérdida en afinidad de ambos aptámeros modificados es asumible si se tiene en cuenta el aumento en estabilidad que dicha modificación confiere a ambas secuencias.

Tabla 3.2. Análisis de equilibrio para los tres aptámeros objeto de estudio (ATA, ATATM, ATANM) empleando dos métodos: Representación de Scatchard y ajuste a la isoterma de enlace de Langmuir.

ANÁLISIS DE EQUILIBRIO					
Aptámero	**Ecuación**	**K_D nM)[a]**	**R_{max} (mº)[a]**	**K_D(nM)[b]**	**R_{max} (mº)[b]**
ATA	$R_{eq}/[ATA]_{libre}(mºM^{-1}) = -(83\pm6)x10^{5}\ (M^{-1})$ $R_{eq}(mº)+(44\pm2)x10^{7}\ (mºM^{-1})$; r=0,994	116±8	51±6	130±20	52±5
ATATM	$R_{eq}/[ATATM]_{libre}(mºM^{-1}) = -(44\pm5)x10^{5}\ (M^{-1})$ $R_{eq}(mº)+(25\pm2)x10^{7}\ (mºM^{-1})$; r=0,99	210±30	58±6	170±50	46±9
ATANM	$R_{eq}/[ATANM]_{libre}(mºM^{-1}) = -(19\pm1)x10^{6}\ (M^{-1})$ $R_{eq}(mº)+ (104\pm4)x10^{7}\ (mºM^{-1})$; r=0,995	50±20	60±10	60±40	60±10

[a] Representación de Scatchard; [b] Isoterma de enlace de Langmuir

3.7.2. Análisis cinético.

Adicionalmente, se llevó a cabo una interpretación cinética de los datos de SPR obtenidos que permitió evaluar las constantes cinéticas (de asociación, k_a, y de disociación, k_d) correspondientes a la interacción aptámero-tobramicina para cada uno de los tres aptámeros estudiados. Estos parámetros cinéticos permitieron realizar una

evaluación de la constante de disociación que fue comparada con los valores obtenidos mediante el análisis de equilibrio realizado en el apartado anterior.

El ajuste no lineal de todos los sensorgramas a la ecuación 3.6 proporcionó un valor de k_s para cada una de las concentraciones de aptámero ensayadas. La representación del valor de k_s frente a la concentración de aptámero libre, $[aptámero]_{libre}$ da lugar a una función lineal cuya pendiente y ordenada en el origen se corresponden con los valores de k_a y k_d respectivamente. Se acepta que el valor de k_a estimado a partir de esta representación es correcto. Sin embargo, se asocian elevados errores al cálculo de k_d mediante este método[140]. Una estimación más adecuada es la obtención de k_d a partir del ajuste no lineal de la fase de disociación de cada uno de los sensorgramas. El modelo empleado para realizar dicho ajuste es una exponencial decreciente de primer orden que incluye un término de compensación (ec. 3.13), R_∞, que hace referencia a un valor no nulo del ángulo medido tras la disociación, lo cual se interpreta como una disociación incompleta del complejo, típica de los instrumentos SPR que emplean un sistema cerrado (cubeta).

$$R_t = R_0 e^{-k_d t} + R_\infty \quad ec. 3.13.$$

Tabla 3.3. Análisis cinético para los tres aptámeros objeto de estudio (ATA, ATATM, ATANM).

ANÁLISIS CINÉTICO				
Aptámero	k_a **(Ms)$^{-1}$**	k_d **(s^{-1})^a**	k_d **(s^{-1})^b**	**K_D (nM)**
ATA	$(12\pm2)\cdot10^4$	0,017±0,001	0,014±0,003	140±30
ATATM	$(93\pm3)\cdot10^3$	0,018±0,002	0,020±0,003	190±30
ATANM	$(14\pm4)\cdot10^4$	0,013±0,003	0,007±0,004	90±40

$^a k_d$ del ajuste de disociación; $^b k_d$ calculado a partir de la expresión $k_d = K_D \cdot k_a$

En la tabla 3.3 se muestran los valores obtenidos para las constantes cinéticas y el cálculo de la constante de disociación, K_D, derivada de dichos parámetros cinéticos. Para los tres aptámeros estudiados, el valor de k_a es menor de 10^6 $M^{-1}s^{-1}$, confirmándose la aplicabilidad de un modelo bimolecular sencillo sin necesidad de incluir limitaciones por transporte de masa, MTL. Tanto k_a como k_d cambian ligeramente con el grado de metilación, siendo más favorables (lo que supone una

mayor afinidad de enlace) para el aptámero natural sin modificar, ATANM, que para ATA y ATATM (k_a mayor y k_d menor para ATANM). Los valores de la constante de disociación, K_D, fueron calculados para cada uno de los tres aptámeros de acuerdo a la expresión $K_D=k_d/k_a$.

Los valores de k_d obtenidos a partir de un ajuste no lineal a una fase de disociación donde ésta no alcanza el valor inicial de la línea de base, es decir, donde la disociación es incompleta, pueden desviarse de su valor real. La aparición de una disociación incompleta puede ser debida a dos causas: efectos por transporte de masa, MTL, los cuales han sido descartados en el presente trabajo teniendo en cuenta los valores de k_a, como ya se ha explicado, o efectos de reenlace. El efecto de reenlace está siempre presente al trabajar con instrumentos basados en la medida de SPR en una cubeta, incluso cuando se trabaja en condiciones donde el transporte de masa no es limitante. Con el objetivo de evitar este efecto, se calculó la k_d a partir de la k_a obtenida previamente a partir del ajuste no lineal de la fase de asociación y la K_D obtenida mediante el análisis de equilibrio, según la expresión $k_d=k_a \cdot K_D$ (Tabla 3.3). Los valores obtenidos mediante este método alternativo son muy similares a los obtenidos a partir del ajuste no lineal a la fase de disociación, lo que incide sobre la calidad de los datos mostrados en el presente estudio. Estos datos se ajustan a la misma tendencia observada en el análisis de equilibrio. El aptámero que muestra una mayor afinidad (K_D<100 nM) es el no modificado, ATANM, mientras que el valor más elevado de K_D corresponde al aptámero totalmente metilado, ATATM.

3.7.3. Autoconsistencia de los resultados obtenidos y comparación con resultados previos.

Finalmente se sometió los valores obtenidos (Tablas 3.2 y 3.3) a un test de autoconsistencia basado en la comparación de las constantes de disociación K_D, obtenidas por ambos métodos, de equilibrio y cinético[141].

Observando las tablas 3.2 y 3.3 se puede concluir que los valores de K_D obtenidos mediante la representación de Scatchard y por el ajuste no lineal a la isoterma de enlace de Langmuir son iguales entre sí, teniendo en cuenta el error experimental, y similares a los valores de K_D calculados a partir de parámetros cinéticos. Esta sencilla comparación confirma la veracidad de los datos calculados.

En trabajos previos, se ha evaluado la constante de afinidad del complejo formado por la tobramicina y el aptámero anti-tobramicina natural ATANM. Rando et al., autores de la obtención mediante SELEX del aptámero anti-tobramicina, describen la interacción entre ambas moléculas con una estequiometría 1:2, aportando sendos valores de K_D: K_{D1}=9±3 nM y K_{D2}=2,7±0,3 µM obtenidas mediante medidas de desactivación de la fluorescencia en disolución con tobramicina marcada (PYT)[13]. La constante K_{D1} es notablemente inferior al valor estimado en este trabajo, hecho posiblemente derivado de medir la constante de afinidad en disolución y no con una de las moléculas inmovilizadas.

Por el contrario, Verhelst et al. asignaron a dicha interacción un valor de K_D=1,1±0,15 µM, mediante medidas de SPR, siendo el aptámero la molécula inmovilizada sobre la superficie del sensor a través de un enlace biotina-estreptavidina[142]. Este valor es más alto que el estimado en este trabajo. Esta diferencia en la constante medida puede deberse al empleo de una disolución reguladora diferente de la utilizada durante la selección del aptámero y, por tanto, no óptima, así como el empleo de un aptámero marcado como elemento de reconocimiento molecular. Adicionalmente, Verhelst y colaboradores observaron una disociación muy rápida, que confirma que el complejo aptámero-tobramicina formado en las condiciones experimentales utilizadas por estos autores posee una menor afinidad que el complejo aptámero-tobramicina observado en el presente trabajo.

4. DESARROLLO DE UN SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TOBRAMICINA EN SUERO HUMANO

La tobramicina es un antibiótico aminoglicósido empleado en tratamientos clínicos para combatir gran cantidad de infecciones. En este capítulo se presenta el problema analítico que supone la determinación de tobramicina y se revisan los métodos que se describen en la literatura científica para resolverlo. Como alternativa a dichos métodos se propone el empleo de los aptámeros anti-tobramicina modificados (diseñados y caracterizados en el capítulo anterior) como elementos de reconocimiento molecular para el desarrollo de un aptasensor impedimétrico. La descripción del diseño y optimización de este sensor, así como de sus características analíticas constituye la parte central de este capítulo. Finalmente se demuestra la validez del aptasensor propuesto para la determinación de tobramicina en muestras de suero humano.

4.1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA ANALÍTICO.

Los aminoglicósidos son un grupo de antibióticos de amplio espectro, caracterizados por presentar dos o más grupos aminoazúcares en su estructura unidos a un aminociclitol mediante enlaces glucosídicos. En la mayoría de los casos, el ciclitol (anillo I, figura 3.1) es una 2-desoxiestreptamina, excepto en el caso de la estreptomicina, que se trata de una estreptidina.

Los antibióticos aminoglicósidos se clasifican habitualmente atendiendo a la sustitución del ciclitol, siendo los dos grupos más importantes los 4,5-disustituídos, en el que se encuentra la neomicina, y los 4,6-disustituídos en el que se incluyen gentamicina, kanamicina y tobramicina, molécula objeto de análisis en este trabajo. Las estructuras de alguno de estos aminoglicósidos se muestran en el capítulo anterior (Figura 3.1). La mayoría de estos compuestos se generan de forma natural como productos de diferentes actinobacterias, más concretamente del género *Streptomyces*. Aunque es posible la síntesis química de gran parte de dichos aminoglicósidos, la fermentación sigue siendo la ruta más económica para su producción.

4.1.1. Indicaciones terapéuticas de la tobramicina.

Los aminoglicósidos, y entre ellos la tobramicina, constituyen un grupo de antibióticos de gran importancia en el tratamiento de enfermedades infecciosas debido a su capacidad para inhibir el crecimiento de algunas bacterias *Gram-positivas* y gran parte de las *Gram-negativas* (especialmente *Pseudomonas*), que son con frecuencia resistentes a otros antibióticos. Dicha actividad tiene su origen en su capacidad para

unirse irreversiblemente a los ribosomas interfiriendo de este modo en la síntesis proteica de las bacterias. Se han descrito también mecanismos adicionales de acción, como alteraciones en la membrana citoplasmática con salida de elementos intracelulares, y alteraciones en el metabolismo y respiración celulares, además de otros posibles mecanismos aún sin aclarar[143].

La aplicación clínica de los antibióticos aminoglicósido se ve limitada debido a su estrecho intervalo terapéutico y a los efectos de ototoxicidad y nefrotoxicidad que pueden aparecer a niveles séricos elevados. En el caso de la tobramicina dicho intervalo es de 2-12 µg/mL (4,3-25,7 µM) en suero[144]. Esto genera la necesidad de llevar a cabo un control exhaustivo de los niveles de estos antibióticos en líquidos biológicos (fundamentalmente suero) cuando se está siguiendo un tratamiento que los incorpore.

4.1.2. Métodos para la determinación de tobramicina.

La determinación de antibióticos aminoglicósidos, y en particular de tobramicina, no es sencilla, debido a que carecen de propiedades espectroscópicas o electroquímicas útiles.

Tradicionalmente el análisis de aminoglicósidos se ha llevado a cabo mediante ensayos microbiológicos. Este ha sido el método oficial dictado por la *European Pharmacopoeia* (EP)[145] hasta el año 2005 para la determinación de tobramicina, momento en el que se sustituyó por un método cromatográfico debido a las numerosas deficiencias mostradas por el primero, como tiempos de análisis prolongados, escasa especificidad frente a otros antibióticos (lo que puede suponer un problema en el caso de tratamientos que combinen más de uno de estos compuestos), precisión baja cuando las concentraciones a determinar son pequeñas e intervalos lineales estrechos.

Los métodos más comunes que se encuentran en la bibliografía para la determinación de antibióticos aminoglicósidos, y en concreto de la tobramicina, son los basados en separaciones cromatográficas[146-151].

Los métodos cromatográficos desarrollados para la determinación de tobramicina son, en general, complejos, debido a la necesidad de derivatización asociada a la ausencia de grupos cromóforos o fluoróforos fuertes en la estructura del antibiótico. Los inconvenientes asociados a estas metodologías son, por un lado, la

necesidad de llevar a cabo largos procesos de pretratamiento de las muestras, y por otro, la posibilidad de que se produzcan derivatización es incompletas o productos que carecen de estabilidad. Teniendo en cuenta estas premisas se han buscado sistemas de detección alternativos a los espectroscópicos (UV o fluorescencia), como por ejemplo la detección electroquímica[146,150]. El método escogido por la *European Pharmacopoeia* (EP) como más adecuado para la determinación de tobramicina o gentamicina[150] consiste en la determinación por amperometría de pulso sobre electrodos de oro, de uno u otro antibiótico, tras una separación por cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC). En el caso de la tobramicina el límite de detección y el intervalo lineal que se obtienen son 4 µg/mL y 15-140 µg/mL, respectivamente.

Tabla 4.1. Límite de detección e intervalo lineal de alguno de los métodos para análisis de tobramicina descritos en la bibliografía.

Técnica	L. D. (µg/mL)	Intervalo lineal (µg/mL)	Muestra real	Pretratamiento muestra	Ref.
HPLC-IPAD	0,006	0,09-0,7	No aplicación	No	[146]
HPLC-ELSD	0,33	1-38	Orina; Suero humano	Si	[147]
HPLC-MS/MS	0,1	> 50	Suero humano	Si	[148]
HPLC-MS/MS	0,05	0,05-1	Plasma humano	Si	[149]
HPLC-IPAD	4	15-140	No aplicación	No	[150]
HPLC-F	0,07	0,25-20	Orina	Si	[151]
EIA	0,01	0,04-0,8	Suero humano	No	[152]
CFEIA	0,06	0,1-10	Suero humano	Si	[153]
CE-LIF	0,004	0,005-2,34	Plasma humano	Si	[154]
SPE-CZE	0,1	0,3-30	Suero humano	Si	[155]

Otros métodos usados para la determinación de tobramicina son los inmunoensayos[152,153,156] y los métodos electroforéticos[157,158]. Los inmunoensayos han sido ampliamente utilizados en el análisis de gran número de compuestos de importancia farmacológica. Se trata de métodos que poseen una especificidad intrínseca, alta sensibilidad y son susceptibles de ser aplicados a un gran número de analitos, tanto de baja masa molecular como macromoléculas, en matrices complejas. En el caso particular de la tobramicina se pueden encontrar descritos en la bibliografía varios ejemplos de inmunoensayos para su análisis, tales como radioinmunoensayos[159], inmunoensayos de polarización de fluorescencia[154,160] e inmunoensayos enzimáticos[152,153,156]. Sin embargo, la determinación de aminoglicósidos mediante inmunoensayos también muestra diversos inconvenientes. Los inmunoensayos que utilizan isótopos radiactivos como marcadores muestran una evidente limitación derivada de los residuos radioactivos que se generan y la necesidad de acreditación del laboratorio. En el desarrollo de inmunoensayos enzimáticos tradicionales, tipo ELISA, para moléculas de pequeño tamaño se suele optar por la inmovilización de éstas sobre la placa y su aplicación en la práctica a la detección de aminoglicósidos está muy limitada debido a la dificultad para adsorber estas moléculas sobre la fase sólida[161]. En algunos casos se observa además una baja especificidad de los anticuerpos utilizados, que también reconocen otros antibióticos con estructuras similares[162].

Con el objetivo de superar estas limitaciones, en el presente trabajo se propone el empleo de dos aptámeros de ARN dirigidos contra tobramicina, previamente descritos, pero modificados para aumentar su estabilidad y facilitar su manejo como elementos de reconocimiento para la determinación de tobramicina en muestras reales.

Hasta el momento, han sido escasos los avances dirigidos hacia el empleo de estas secuencias para la determinación de tobramicina. Se pone de manifiesto de este modo, que la aplicación de los aptámeros para el desarrollo de ensayos y/o biosensores capaces de detectar con adecuada especificidad y sensibilidad la molécula diana para la que fueron seleccionados no es un paso trivial.

Los dos aptámeros de ARN seleccionados contra la tobramicina fueron empleados como elementos de reconocimiento molecular en el diseño de un ensayo fluorescente de desplazamiento empleando el naranja de tiazol como colorante[163]. El naranja de tiazol posee una fluorescencia débil en disolución, pero se convierte en un

potente fluoróforo al intercalarse inespecíficamente en ácidos nucleicos de doble hebra. Una vez formado el complejo aptámero-naranja de tiazol, la presencia de tobramicina en disolución provoca el desplazamiento del colorante a la disolución observándose una disminución en la fluorescencia medida. De los dos aptámeros, únicamente el aptámero de ARN de 26 bases (Figura 3.2.(B)) fue capaz de producir una disminución de la fluorescencia que permitiese la determinación de tobramicina. El límite de detección se situó en el intervalo 50-100 nM de tobramicina. El empleo del aptámero de ARN de 27 bases (el empleado en el presente trabajo (Figura 3.2.(A)) no dio lugar a una disminución significativa en la fluorescencia medida.

El mismo aptámero de ARN de 26 bases seleccionado por Wang y Rando fue empleado sin éxito como elemento de reconocimiento molecular en el diseño de un aptasensor electroquímico para la determinación de tobramicina en suero[164]. Los autores emplearon la secuencia natural de ARN, a la que introdujeron una marca electroactiva (azul de metileno) en uno de sus extremos, mientras que el otro extremo se empleó para la inmovilización del oligonucleótido sobre una superficie de oro mediante la introducción de un grupo tiol. El pequeño cambio conformacional que experimenta el aptámero al producirse el reconocimiento molecular de la tobramicina, asociado a que posee una estructura en horquilla incluso en ausencia de la molécula diana, derivó en una supresión de la señal medida de aproximadamente un 40% tras la adición de una concentración de tobramicina de 1 mM. Sin embargo, el diseño no resultó aplicable a muestras de suero reales debido a la degradación del ARN por las nucleasas. Esto condujo a los autores a diseñar un aptámero modificado. Se sustituyeron los grupos 2´-OH por grupos 2´-OMe, aunque solamente en las ribosas unidas a las bases que forman el tronco de la horquilla. Esta metilación parcial no confirió a la secuencia oligonucleotídica la suficiente estabilidad para poder emplearse en muestras reales. La modificación de todos los grupos hidroxilo por 2´-F tampoco resultó exitosa debido a que provocó una gran disminución de la afinidad que no fue acompañada de un aumento aceptable en la estabilidad. Finalmente, con el objetivo de aumentar la estabilidad del aptámero, los autores optaron ingenuamente por transformar la secuencia de ARN de 26 bases en una secuencia de ADN del mismo número de bases. Este cambio supuso una reducción en la afinidad del aptámero que anuló la capacidad de dicha secuencia para detectar tobramicina en un rango clínicamente relevante. Este resultado era totalmente esperado ya que es bien sabido

que la transformación directa de ARN en ADN o viceversa, cambia las características de enlace por completo.

4.2. LA ESPECTROSCOPÍA DE IMPEDANCIA FARADAICA (FIS) COMO SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN EN BIOSENSORES

La Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS) es una herramienta muy poderosa capaz de aportar información acerca de propiedades físicas y químicas de superficies electródicas modificadas. Las técnicas impedimétricas han ido desarrollándose con el objetivo de caracterizar adecuadamente la fabricación de biosensores y monitorizar todo tipo de reacciones electródicas, como pueden ser las catalizadas por enzimas o el reconocimiento molecular de determinadas moléculas como proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, etc.

La EIS posee un elevado potencial para el análisis de propiedades interfaciales de superficies electródicas, mostrándose capaz de aportar información acerca de cambios de resistencia/capacitancia que tienen lugar sobre superficies conductoras o semiconductoras. Estos cambios en las propiedades eléctricas de la interfase electrodo disolución pueden producirse como consecuencia de un proceso de reconocimiento molecular. Por tanto, esta técnica se ha utilizado como sistema de transducción en diferentes tipos de biosensores, con la particularidad de que permite el desarrollo de dispositivos que no precisan del empleo de biorreactivos marcados.

La impedancia Z de un sistema se obtiene a partir de la medida de la corriente generada como respuesta a la aplicación a la celda electroquímica de un potencial de corriente alterna, perturbación sinusoidal del voltaje con una pequeña amplitud y frecuencia angular de variación, ω. La impedancia se calcula como el cociente entre la función voltaje, V(t) y la función de la corriente resultante I(t).

$$Z = V(j\omega)/I(j\omega) = Z_{re}(\omega) + jZ_{im}(\omega) \text{ec.}(4.1.)$$

Como se puede observar en la ecuación (4.1.) la impedancia se describe mediante un número complejo, ya que la función de la corriente puede variar de la de voltaje no sólo en su amplitud sino en el ángulo de fase (φ). De este modo el valor de la impedancia puede expresarse con su módulo $|Z|$ y el ángulo de fase φ o como la

suma de una parte real, $Z_{re}(\omega)$ y otra imaginaria, $Z_{im}(\omega)$, componentes que se originan principalmente de la resistencia y capacitancia de la celda, respectivamente.

Dentro de las técnicas impedimétricas destacan la Impedancia no Faradaica que se basa en medidas de capacitancia y la Espectroscopia de Impedancia Faradaica (FIS) en la que tiene lugar un proceso faradaico. La FIS permite el estudio de la cinética y el mecanismo de las reacciones que tengan lugar sobre la superficie modificada del electrodo de trabajo.

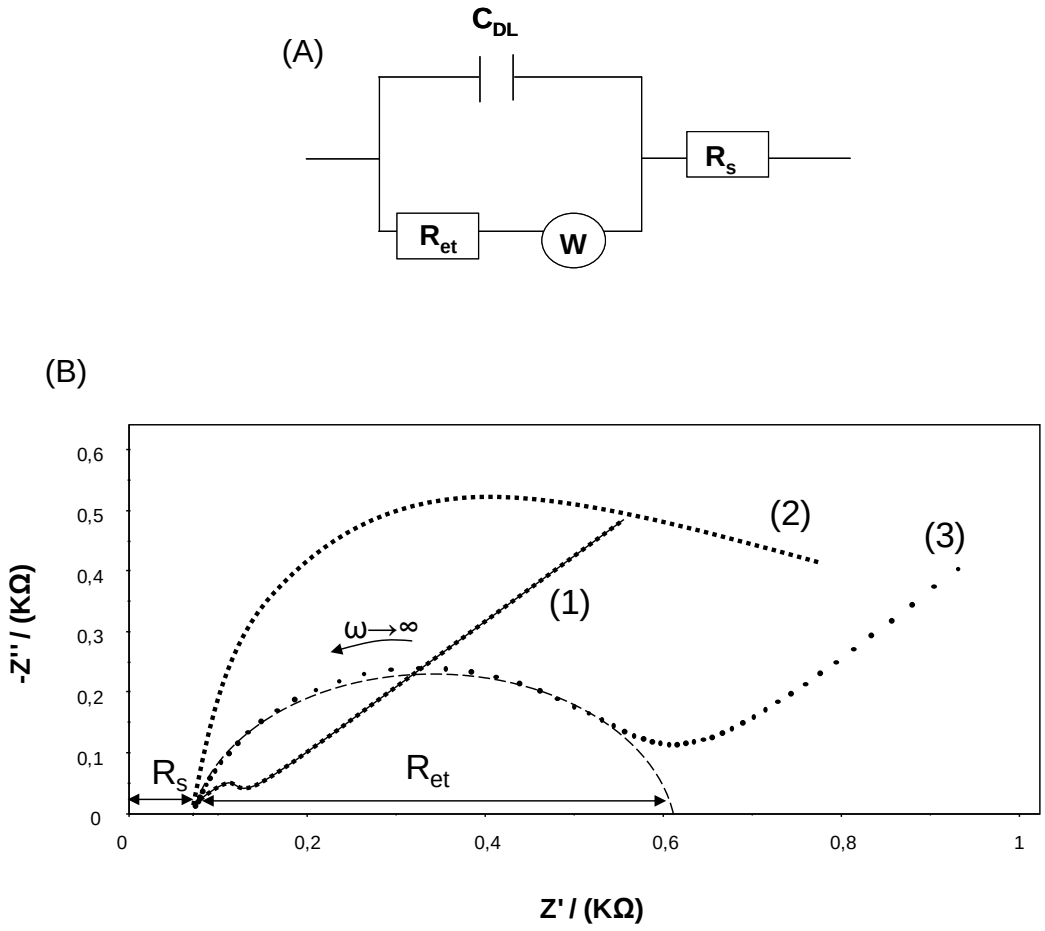

Figura 4.1. (A) Representación esquemática de un circuito de Randles. (B) Representaciones de Nyquist en diferentes supuestos (1) transferencia electrónica rápida; (2) transferencia electrónica lenta; (3) control mixto.

En la terminología electroquímica un proceso faradaico es aquel en el cual se transfiere una carga a través de una interfase electrodo-disolución. Para llevar a cabo

medidas de FIS debe existir una especie electroactiva en la disolución, habitualmente $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$.

Las transformaciones electroquímicas que tienen lugar en la interfase electrodo-disolución pueden modelizarse de acuerdo a circuitos equivalentes, dentro de los cuales el circuito general más utilizado para modelizar los fenómenos interfaciales es el circuito de Randles (Figura 4.1.A.). En dicho circuito equivalente se incluye la resistencia óhmica de la disolución (R_s), la impedancia de Wargburg (W), que está asociada a la difusión de los iones desde el seno de la disolución hacia la interfase electródica, la capacitancia de la doble capa (C_{DL}) y la resistencia a la transferencia electrónica que aparece debido a la existencia de una molécula electroactiva en la disolución (R_{et}). R_s y W representan propiedades de la disolución, por lo que no se ven afectados por las transformaciones químicas que tienen lugar sobre la superficie electródica, mientras que C_{DL} y R_{et} dependen de las propiedades dieléctricas y aislantes de la interfase electrodo-disolución.

La R_{et} está relacionada con la cinética de transferencia electrónica de la molécula electroactiva presente en disolución a través de la interfase electródica. Esto quiere decir que, una modificación de la superficie electródica cuya naturaleza sea aislante disminuirá la velocidad de transferencia de carga a través de la interfase electródica, aumentando, por lo tanto, la resistencia a la transferencia electrónica, R_{et}.

La obtención de un espectro de impedancias supone la obtención de la impedancia, Z, a distintas frecuencias de variación del voltaje aplicado a la celda electroquímica. Una de las representaciones más habituales de un espectro de impedancias es la representación de Nyquist, que supone la representación de la $Z_{im}(\omega)$ frente a $Z_{re}(\omega)$ (Figura 4.1.B.). Esta representación puede tomar diferentes formas dependiendo de las condiciones experimentales y del sistema examinado, siendo una de las más habituales aquella en la que se observa una región que forma un semicírculo seguida de una línea recta (Figura 4.1.B.(1)). La zona semicircular, aparece a valores de ω a los que el proceso está limitado por la velocidad de transferencia electrónica. A frecuencias bajas aparece una zona lineal, lo que indica que el proceso de electrodo está limitado por la difusión de especie electroactiva hacia el electrodo, ya que el tiempo de muestreo es suficientemente largo comparado con la velocidad de transferencia electrónica. En el caso de procesos cuya transferencia electrónica es muy rápida, el semicírculo de la representación de Nyquist puede quedar

muy reducido observándose una región lineal en la mayor parte del intervalo de frecuencias utilizado (Figura 4.1.B.(2)), mientras que en el caso de procesos en los cuales la transferencia electrónica es muy lenta dicha representación está formada solamente por un semicírculo de gran amplitud (Figura 4.1.B.(3)). Del espectro obtenido, se pueden, por tanto, extraer las características de la cinética de transferencia electrónica. El diámetro del semicírculo se corresponde con el valor de R_{et}, mientras que la intersección de dicho semicírculo con el eje X a valores de frecuencias altos ($\omega \rightarrow \infty$) es igual a la resistencia de la disolución, R_s (Figura 4.1.B). La extrapolación del semicírculo hacia valores de frecuencia más bajos, permite obtener en el punto de la intersección con el eje X, el valor de R_s+R_{et}.

Normalmente un espectro de impedancias con fines analíticos se traza empleando valores de frecuencias comprendidos en el intervalo 10 mHz-100 KHz, dentro del cual la impedancia está controlada por las propiedades interfaciales de los electrodos modificados, siendo mínimas las contribuciones debidas a otros fenómenos, tales como la inductancia de la celda o el efecto de las conexiones.

4.3. DISEÑO DE UN SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TOBRAMICINA.

En respuesta a la elevada demanda de estrategias que permitan la determinación de tobramicina en muestras reales de forma rápida, sencilla y fiable, en el presente capítulo se propone la integración de un aptámero, que actuará de receptor de afinidad, con un transductor electroquímico que aporta la sensibilidad necesaria para lograr detectar concentraciones clínicamente relevantes del antibiótico. Se emplean los dos aptámeros de ARN modificados, previamente diseñados y caracterizados (capítulo 3), como elementos de reconocimiento molecular en el diseño de un aptasensor para la determinación de tobramicina. La modificación de las ribosas del ARN escogida (2´-OMe) se propone como alternativa a las descritas previamente sin éxito[118], para conseguir la determinación de tobramicina en muestras reales.

El sistema de transducción escogido es la espectroscopia de impedancia faradaica (FIS), técnica que muestra una excelente sensibilidad en el desarrollo de biosensores basados en aptámeros, desde que se combinó por primera vez con este tipo de reactivos analíticos[165]. Como se ha comentado en el apartado anterior, la

obtención de un espectro de impedancias requiere la presencia en la disolución de medida de una molécula electroactiva que actúa como sonda, en este caso, $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. La adquisición de dicho espectro antes y después del proceso de modificación de la superficie electródica permite medir los cambios en la resistencia a la transferencia electrónica (R_{et}) que se producen como consecuencia de tal modificación. Mientras que la inmovilización de una molécula cargada positivamente sobre la superficie del electrodo de trabajo produce una disminución en la R_{et} medida, es decir, la transferencia de electrones es más fácil, la inmovilización de una molécula cargada negativamente produce el efecto opuesto. Ambas situaciones derivan del efecto atractivo o repulsivo que ejerce la modificación de la superficie electródica sobre la molécula electroactiva seleccionada, cargada negativamente. Este efecto se puede confirmar mediante voltametría cíclica (CV), ya que la mayor resistencia a la transferencia de carga se manifiesta en un aumento de la separación entre los potenciales de pico (E_p) de los procesos de oxidación y de reducción del proceso de la sonda electroactiva, así como una disminución en las corrientes de pico obtenidas.

4.3.1. Construcción de la fase sensora.

Una de las etapas claves en el desarrollo de un biosensor es el diseño de la fase sensora, lo que supone la inmovilización de una de las moléculas involucradas en la interacción de afinidad utilizada como reacción de reconocimiento molecular; en el caso particular de este trabajo, el aptámero anti-tobramicina.

El primer diseño que se propuso para abordar la construcción de una fase sensora que fuese capaz de reconocer a la tobramicina fue la inmovilización del aptámero anti-tobramicina modificado en todas sus bases excepto en la base U12, sobre una superficie de oro. Para ello se introdujo un grupo tiol en el extremo 5´de la secuencia oligonucleotídica del aptámero, que permite la inmovilización del aptámero (SHATA) mediante su quimisorción sobre una superficie de oro dando lugar a una monocapa autoensamblada (SAM). La construcción de la fase sensora se completó mediante su exposición a una disolución de mercaptohexanol, generándose una SAM mixta. El oligonucleótido tiolado (SHATA) es comercializado con enlaces disulfito, que serán reducidos previamente a su uso siguiendo el protocolo detallado en el Anexo II La idoneidad de esta configuración fue descartada tras comprobarse que la incubación de dicha fase sensora con disoluciones de concentración variable de tobramicina daba lugar a medidas aleatorias de la resistencia a la transferencia electrónica, R_{et}. La

pequeña masa molecular de la tobramicina es la causa de este efecto. Su interacción con la fase sensora no da lugar a un cambio en la resistencia a la transferencia electrónica significativo que pueda relacionarse con la concentración del antibiótico en disolución. Se procedió, consecuentemente, al diseño de una fase sensora basada en la inmovilización covalente de la tobramicina sobre la superficie electródica y la posterior inmovilización de un aptámero de ARN anti-tobramicina a través de su interacción de afinidad con el antibiótico inmovilizado, en un formato de ensayo por desplazamiento[131] (Figura 4.2).

El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. Formación de una monocapa autoensamblada sobre la superficie de oro.

El electrodo, previamente sometido al proceso de limpieza descrito en el Anexo II, se introdujo en una disolución de ácido mercaptopropanoico 40 mM preparada en EtOH:H_2O (75:25 v/v) durante toda la noche en oscuridad y bajo agitación, permitiendo la formación de una monocapa autoensamblada sobre su superficie.

2. Enlace covalente de la tobramicina a la SAM de ácido mercaptopropanoico.

Tras lavar la superficie modificada con etanol y agua sucesivamente, el electrodo se introdujo en una disolución acuosa que contenía EDC 2 mM y NHS 5 mM durante una hora y bajo agitación. De este modo se activaron los grupos carboxílicos presentes en la superficie electródica tras la formación de la SAM. A continuación el electrodo se sometió a un lavado con agua y se introdujo en una disolución de tobramicina 5 mM preparada en la disolución de inmovilización (HEPES 0,1 M, pH 8,64), en la que permaneció durante la noche bajo agitación. Así se formó un enlace covalente tipo amida entre los grupos carboxílicos previamente activados y el único grupo amino unido a un carbono secundario presente en la estructura de la tobramicina. Tras esta etapa se procedió a bloquear los grupos carboxílicos activados que no hubiesen reaccionado con ninguna molécula de antibiótico. Para ello se realizó un lavado con la disolución de inmovilización y se introdujo el electrodo en una disolución de etanolamina 1 M, preparada en la disolución de inmovilización, durante una hora bajo agitación.

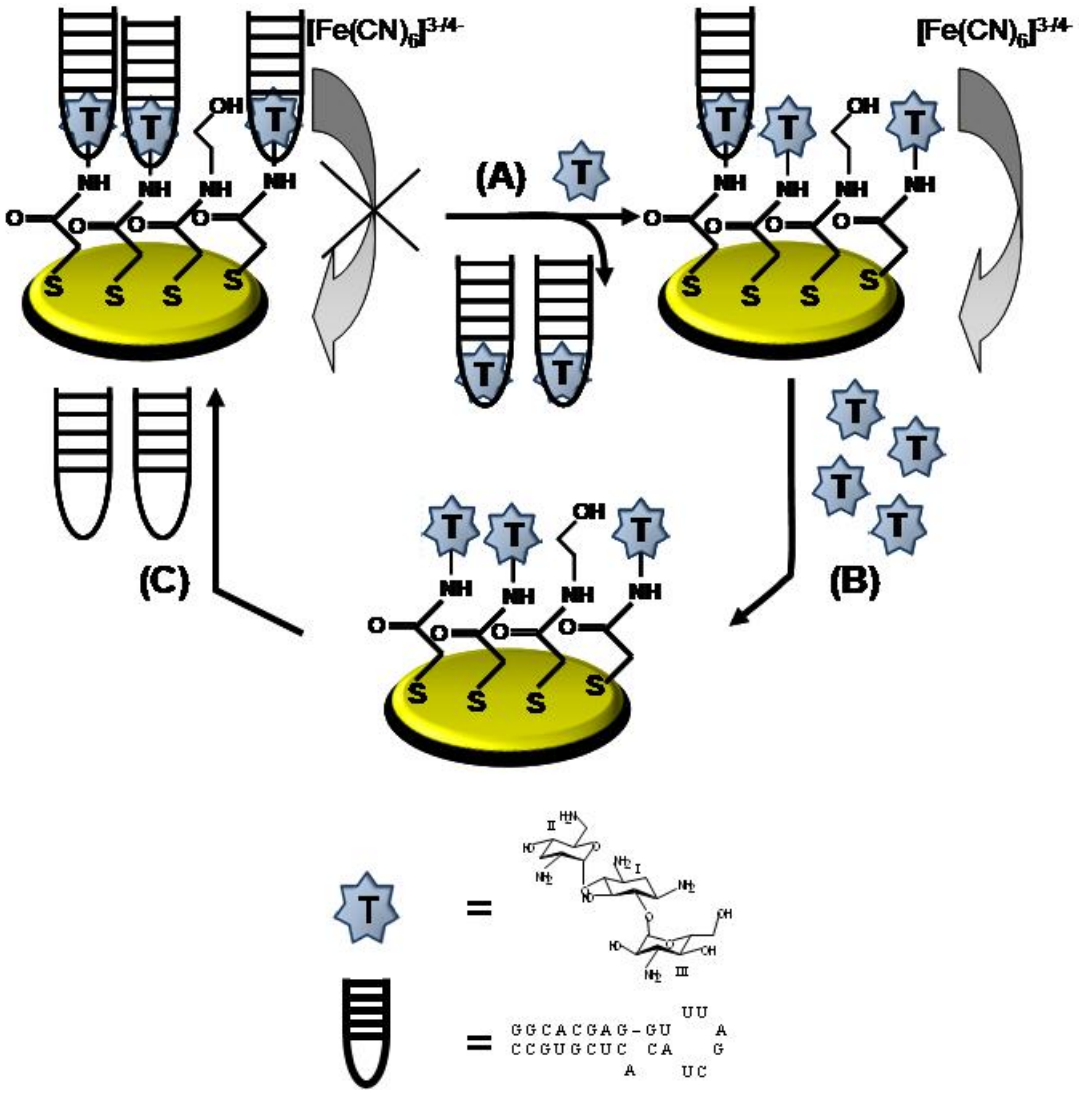

Figura 4.2. Representación esquemática del ensayo de desplazamiento propuesto para la determinación de tobramicina. (A) Incubación de la fase sensora, consistente en el aptámero anti-tobramicina inmovilizado sobre un electrodo de oro mediante su interacción específica con la tobramicina enlazada covalentemente a dicha superficie, con una disolución que contiene tobramicina; (B) Regeneración de la fase sensora mediante una incubación con una disolución con concentración elevada de tobramicina; (C) Saturación de la fase sensora con aptámero anti-tobramicina.

3. Inmovilización del aptámero anti-tobramicina sobre la superficie electródica modificada con el antibiótico.

La preparación de la fase sensora finalizó realizando un lavado del electrodo con la disolución de afinidad e introduciéndolo en una disolución de aptámero anti-tobramicina 5 µM durante 5 minutos bajo agitación (la selección de estos parámetros

se detalla a continuación). Esto permite el reconocimiento molecular de la tobramicina enlazada sobre la superficie por el aptámero en disolución.

Para controlar el proceso de formación de la fase sensora se registró el espectro de impedancias tras cada una de las etapas de modificación descritas, introduciendo el electrodo en una disolución de TRIS/HCl10 mM de pH 7,4, que contenía KCl 100 mM y $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 5 mM. En todos los casos se obtuvo el espectro de impedancias en el intervalo de frecuencias 10 kHz-100 mHz, a un potencial de +225 mV y con una amplitud de alterna de 5 mV. De esta forma, la medida de los cambios en la resistencia a la transferencia electrónica (R_{et}) que se producen como consecuencia de la modificación de la superficie permiten seguir la correcta construcción del sensor. La caracterización de la fase sensora se completó mediante la realización de medidas de voltametría cíclica (CV).

El electrodo de oro limpio posee un valor bajo de R_{et} (~200 Ω) (Figura 4.3.a y Tabla 4.2.), valor que aumenta drásticamente tras la formación de la SAM de ácido mercaptopropanoico (~2000 Ω) (Figura 4.3.b. y Tabla 4.2) debido a la introducción de grupos carboxílicos, que al pH de medida (7,4) se encuentran cargados negativamente y que constituyen una barrera electrostática para la sonda redox presente en disolución, cargada también negativamente. Dicho efecto también se observa en la separación de los picos del proceso redox del $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ registrado por voltametría cíclica (recuadro Figura 4.3 y Tabla 4.2).

La unión covalente de la tobramicina sobre la SAM previamente formada sobre la superficie electródica se traduce en un notable descenso de la resistencia a la transferencia electrónica (R_{et}) respecto a la observada tras la formación de la SAM (Figura 4.3.c. y Tabla 4.2). Este hecho se comprende fácilmente teniendo en cuenta que la tobramicina, al pH de medida, se encuentra cargada positivamente, lo que produce una atracción electrostática de la molécula electroactiva, $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, hacia la superficie del electrodo, facilitándose notablemente la transferencia electrónica.

Por último, la unión del aptámero anti-tobramicina mediante su interacción de afinidad, produce un aumento en la R_{et} (Figura 4.3.d. y Tabla 4.2) debido al efecto del esqueleto de fosfatos del aptámero, que posee carga negativa y que repele a la molécula electroactiva, desfavoreciendo la transferencia electrónica sobre el electrodo de trabajo. El desplazamiento del aptámero inmovilizado sobre la superficie electródica

por formación de un complejo con tobramicina en disolución debe producir de nuevo la disminución de la R_{et}. Se espera que la magnitud de esta disminución proporcione información sobre la cantidad de antibiótico presente en la disolución en contacto con la superficie sensora.

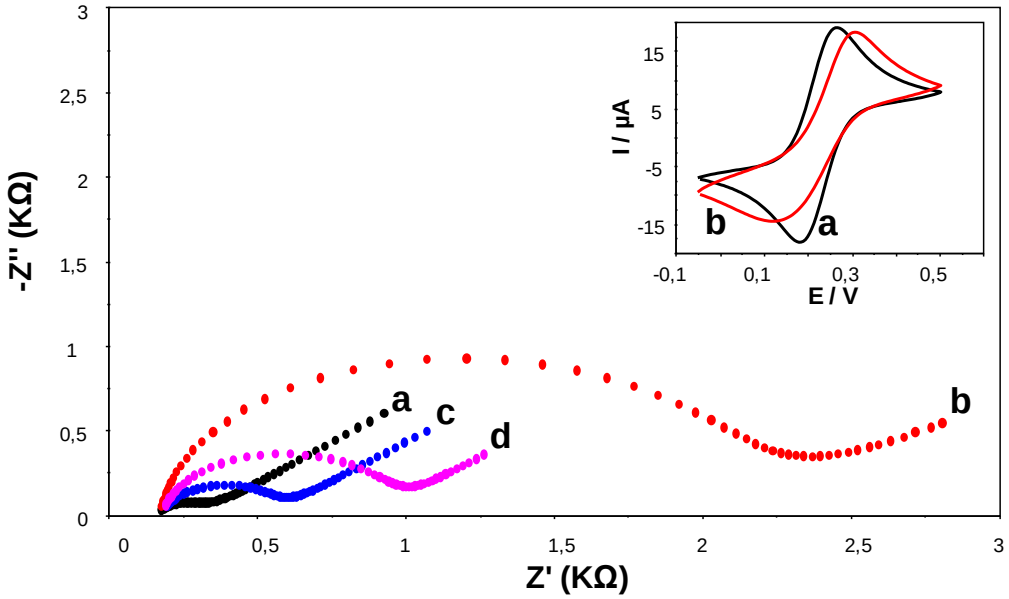

Figura 4.3. Representación de Nyquist correspondiente al electrodo de oro a) no modificado; modificado con b) SAM de ácido mercaptopropanoico; c) SAM + tobramicina; d) SAM+ tobramicina + aptámero. En el recuadro se muestran los voltagramas correspondientes a) oro no modificado y b) SAM de ácido mercaptopropanoico.

Tabla 4.2. Valores de la R_{et} y ΔE correspondientes a las representaciones de Nyquist y voltagramas representados en la figura 4.3.

	R_{et} (Ω)	E_{ox} (V)	E_{red} (V)	ΔE_p (V)
Oro no modificado	221,5	0,268	0,181	0,087
SAM	2017,0	0,310	0,119	0,191
SAM+tobramicina	430,4	0,278	0,178	0,100
SAM+tobramicina+aptámero	827,7	0,294	0,171	0,123

La elección de un formato de ensayo de desplazamiento se justifica teniendo en cuenta que el analito, la tobramicina, es una molécula pequeña, factor que limita el empleo de la FIS como transductor de un ensayo directo, ya que al realizar medidas sin marcas se espera que los cambios de impedancia sean tanto más elevados cuanto mayor sea el tamaño molecular del analito.

Para diseñar un sensor con este principio de medida es necesario encontrar las condiciones de saturación de la superficie modificada con aptámero. Por tanto, se procedió a la selección tanto de la concentración de aptámero, como del tiempo de incubación durante la etapa de fijación del mismo sobre la superficie electródica. En primer lugar se estudió cómo varía la señal medida con la concentración de aptámero, para lo cual el electrodo de trabajo se introdujo durante 30 minutos en disoluciones con concentraciones variables de aptámero, en el intervalo 0,1-5 μM preparadas en la disolución de afinidad, registrándose a continuación el espectro de impedancias. En el intervalo de concentraciones ensayado no se observaron grandes variaciones de R_{et}, apareciendo un ligero aumento en el valor medido para una concentración de aptámero 0,5 μM (Figura 4.4.A.). Éste fue el valor escogido para estudios posteriores.

A continuación se procedió a la selección del tiempo que el electrodo con la tobramicina inmovilizada debe permanecer en contacto con la disolución de aptámero para conseguir la saturación de dicha superficie. Para ello, un electrodo modificado se introdujo durante períodos de incubación crecientes en una disolución 0,5 μM de aptámero, registrándose, seguidamente, el correspondiente espectro de impedancias. La representación gráfica (Figura 4.4.B) de la R_{et} obtenida para cada uno de los tiempos ensayados conduce a la elección de 5 minutos como el tiempo más adecuado para llevar a cabo esta última etapa de la formación de la fase sensora. Se debe señalar que se obtuvo el 70% de la máxima señal registrada tras una incubación de sólo 30 s, lo que indica que la interacción entre aptámero y tobramicina inmovilizada, en el intervalo de concentraciones ensayadas, es muy rápida.

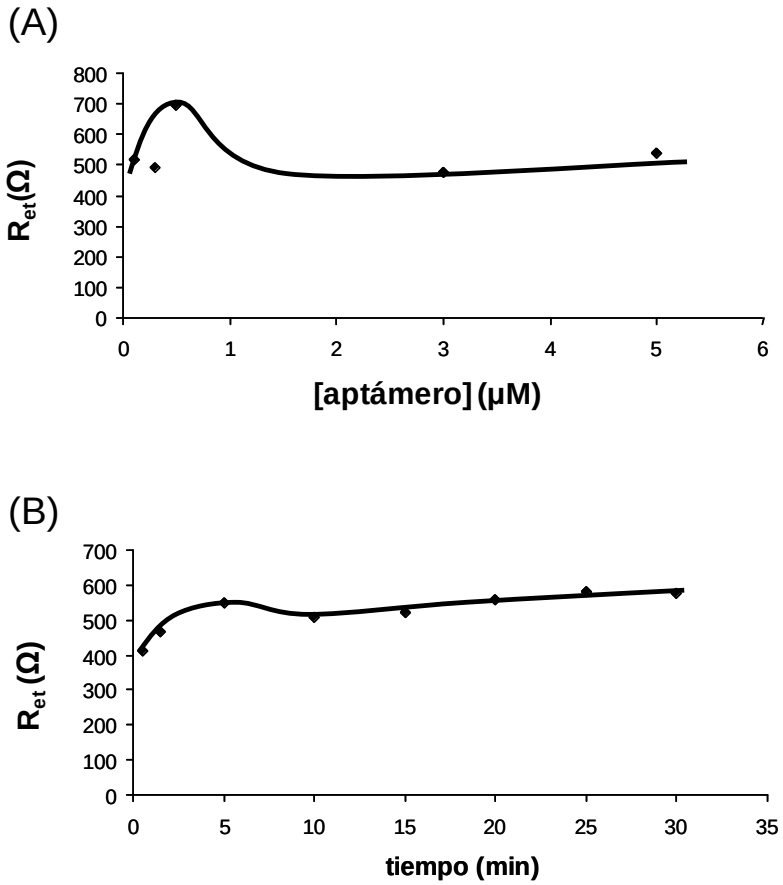

Figura 4.4. Variación de R_{et} con (A) la concentración de aptámero para un tiempo de incubación de 30 minutos y (B) el tiempo de incubación empleando una concentración de aptámero de 0,5 μM.

4.3.2. Ensayo de desplazamiento empleando ATA.

Se pretende utilizar la fase sensora diseñada para llevar a cabo un ensayo de desplazamiento para la determinación de tobramicina (Figura 4.2). Para comprobar que dicho esquema funciona se procedió a realizar incubaciones sucesivas poniendo en contacto el sensor con disoluciones de concentración creciente de antibiótico, preparadas en la disolución de afinidad, bajo agitación durante un tiempo controlado de 5 minutos. En la figura 4.5 se muestran algunos de los espectros de impedancia obtenidos para distintas concentraciones de tobramicina en disolución. Como se puede ver, cuanto mayor es la concentración de tobramicina menor es la R_{et} registrada debido a la formación del complejo aptámero-tobramicina en disolución, es decir, a la disminución de la cantidad de aptámero inmovilizado sobre la superficie electródica, lo que confirma la validez del ensayo propuesto. Una limpieza del electrodo con la disolución de lavado (de alto contenido salino) permite continuar con el ensayo para

una concentración de tobramicina diferente. Este lavado elimina por completo el $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ que pudiese permanecer sobre la superficie del sensor debido a la atracción electrostática.

El cambio registrado en la R_{et} resultó ser dependiente de la concentración de tobramicina presente en disolución, lo que permitió llevar a cabo un análisis cuantitativo de tobramicina. Para poder comparar diferentes fases sensoras los valores obtenidos se expresaron en porcentaje de disminución de R_{et} (S%), de acuerdo a la siguiente expresión:

$$S\% = \frac{(R_i - R_g)}{(R_a - R_g)} \times 100$$

Donde R_i representa la R_{et} tras la incubación con una disolución con concentración *i* de tobramicina, R_g es la R_{et} medida tras la unión covalente de la tobramicina sobre la superficie electródica (valor más bajo) y R_a la R_{et} medida tras la saturación del electrodo modificado con tobramicina con aptámero (valor máximo). La representación de S% frente al logaritmo de la concentración de tobramicina en disolución da lugar a una representación sigmoidal (Figura 4.6).

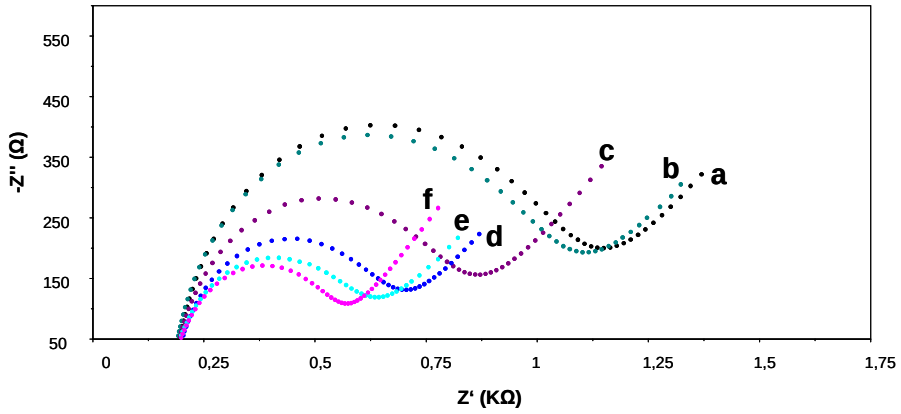

Figura 4.5. Representación de Nyquist correspondiente a la incubación de la fase sensora con disoluciones de distinta concentración de tobramicina: a) 0; b) 1; c) 10; d) 50; e) 500 µM; f) fase sensora en ausencia de aptámero.

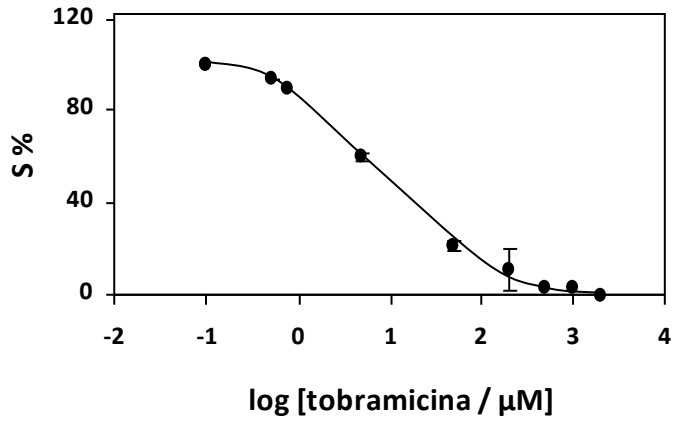

Figura 4.6. Curva dosis-respuesta obtenida para distintas concentraciones de tobramicina.

Siguiendo el criterio ampliamente utilizado en el tratamiento de los datos correspondientes a inmunoensayos competitivos, que generan un tipo de respuesta sigmoidal similar al obtenido en este caso, se estableció como intervalo analítico útil el comprendido entre las concentraciones correspondientes al 20% y 80% de la señal máxima ([tobramicina]=0), y el límite de detección como la concentración correspondiente al 90% de la señal máxima registrada. Con este criterio, el sensor diseñado presenta un intervalo dinámico lineal entre 1,4 µM y 70 µM, en el que se observa una variación del %S obtenido con la concentración de tobramicina que se ajusta a la ecuación: S%=(-35±0,6) log[tobramicina(µM)]+(84,6±0,8); r = 0,9995. El límite de detección es 0,70 µM. Por tanto, con el sensor descrito se cubre por completo las concentraciones correspondientes al intervalo terapéutico de la tobramicina en suero (4,3-25,7 µM)[144].

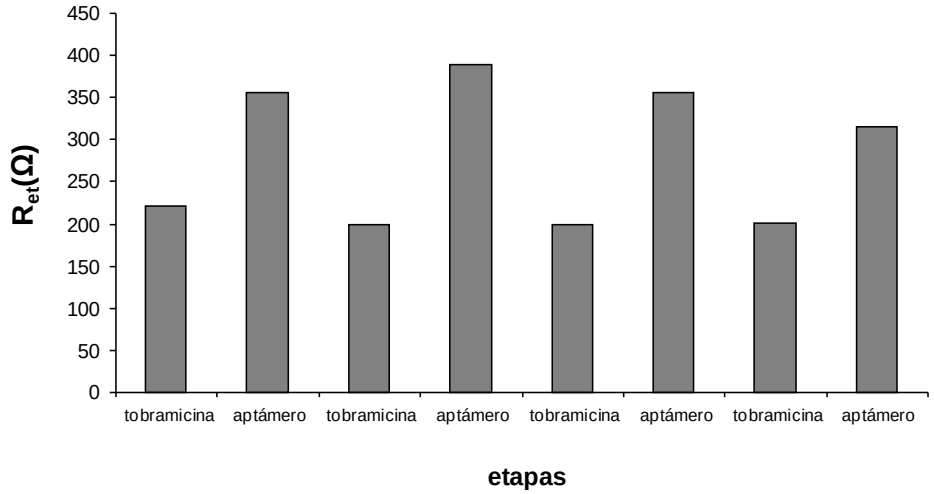

Figura 4.7. Valores de R_{et} correspondientes a la mínima señal (tobramicina) y a la máxima señal (saturación con aptámero) para 4 regeneraciones sucesivas de una misma fase sensora.

La fase sensora puede ser regenerada fácilmente mediante su incubación durante 1 h en la disolución de regeneración, que contiene una concentración de tobramicina elevada (ver Anexo II) capaz de desplazar por completo todas las moléculas de aptámero que hubiesen quedado sobre la superficie. La etapa de regeneración se completa volviendo a saturar la superficie con aptámero, como ya se explicó con anterioridad en este mismo apartado. En la figura 4.7 se muestran los valores de R_{et} correspondientes a los valores mínimos (tobramicina) y máximos (aptámero) para 4 ciclos de regeneración sucesivos. La reproducibilidad de una misma fase sensora fue del 6%, para sucesivas medidas de una concentración de tobramicina de 500 µM (n=3).El aptasensor impedimétrico desarrollado permite su reutilización durante una semana llegándose a realizar hasta 7 regeneraciones sucesivas de una misma fase sensora, lo que sumado a las pequeñas cantidades de aptámero utilizadas hace que el coste del ensayo se minimice.

La selectividad de la superficie sensora fue estudiada usando distintos antibióticos aminoglicósidos: kanamicina, que posee una estructura similar a la de la tobramicina (desoxi-estreptamina 4,6-disustituída), neomicina B, paromomicina (desoxi-estreptamina 4,5-disustituída) y estreptomicina (estreptidina). Con este objetivo se realizaron diversas incubaciones del electrodo modificado con distintas concentraciones de los posibles interferentes y se representó la curva dosis-respuesta

para cada uno de ellos (Figura 4.8.A.). Los datos obtenidos permiten concluir que el ensayo propuesto es altamente selectivo respecto a la paromomicina, la estreptomicina y la kanamicina. Esta última posee una estructura casi idéntica a la tobramicina, diferenciándose únicamente en un grupo OH. Estos resultados contrastan con los obtenidos previamente empleando el aptámero anti-tobramicina natural inmovilizado sobre una superficie de oro utilizada en medidas SPR[142], en los que se muestra reactividad cruzada con respecto a diferentes antibióticos aminoglicósidos, incluída la kanamicina. Probablemente la inmovilización del aptámero restringa las conformaciones tridimensionales que pueda adoptar, afectando a su selectividad.

Por el contrario se observó que la neomicina B proporciona una respuesta similar a la obtenida para la tobramicina (Figura 4.8.A.). Con el objetivo de conocer más a fondo la naturaleza de este resultado se construyó una fase sensora en la que en lugar de tobramicina se inmovilizó neomicina B, y a continuación, se saturó la superficie con el aptámero anti-neomicina B totalmente modificado (ver secuencia en Anexo II). Se registró la curva-dosis respuesta para tobramicina y neomicina B empleando esta nueva fase sensora (Figura 4.8.B.). Se observó cómo el aptámero anti-neomicina B también muestra una elevada reactividad cruzada hacia la tobramicina. Estos resultados se pueden explicar teniendo en cuenta que ambos aptámeros poseen una estructura muy similar (en horquilla). Además muestran un (pequeño) cambio estructural similar como resultado del reconocimiento molecular de sus respectivas moléculas diana. Ambos aptámeros encapsulan al correspondiente antibiótico entre la base y las paredes del surco principal de la hebra y, también en los dos casos, el anillo de estreptamina del antibiótico queda encapsulado por una base que se encuentra fuera del bucle[166]. Teniendo estos datos en cuenta se puede concluir que el reconocimiento molecular entre el aptámero anti-tobramicina y el antibiótico depende en gran medida de la conformación tridimensional del aptámero. No obstante, conviene señalar que la interferencia con la neomicina B no supone un problema para la aplicación del presente aptasensor a muestras reales, puesto que no es habitual su uso conjunto con fines terapéuticos.

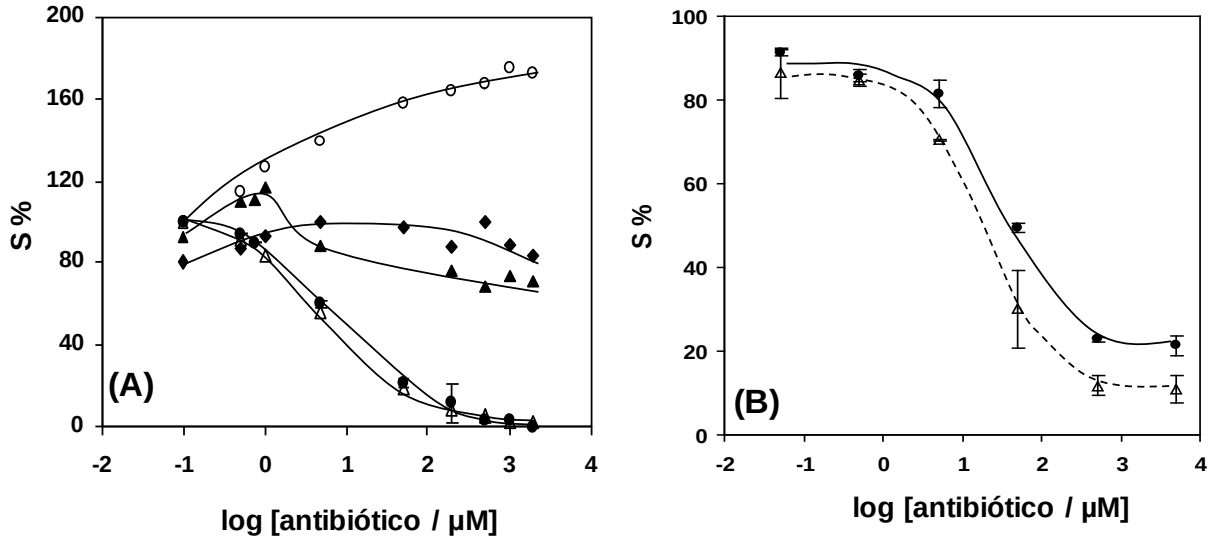

Figura 4.8. Curvas dosis-respuesta obtenidas empleando diferentes antibióticos amioglicósidos (●) tobramicina; (▲) kanamicina; (Δ) neomicina B; (♦) paromomicina; (○) estreptomicina empleando (A) una fase sensora modificada con tobramicina; (B) una fase sensora modificada con neomicina B-aptámero anti-neomicina B.

4.3.3. Ensayo de desplazamiento empleando ATATM.

Hasta el momento se describió el empleo del aptámero anti-tobramicina modificado en 26 de las 27 bases que conforman la secuencia de ARN del aptámero (ATA). Solamente el grupo 2´-OH de la base U12 no fue modificado, debido a su implicación en el reconocimiento molecular de la tobramicina. Sin embargo, dicha base no modificada puede derivar en una menor resistencia al ataque de las nucleasas por parte de dicha secuencia, ATA, lo que limitaría el empleo del aptasensor para la determinación de tobramicina en muestras reales. Teniendo esto en cuenta se decidió comprobar la posibilidad de desarrollar un ensayo de desplazamiento similar pero empleando como receptor de afinidad el aptámero anti-tobramicina totalmente metilado (ATATM). El diseño y caracterización de dicho aptámero totalmente metilado fueron detallados en el capítulo 3 del presente trabajo. Se comprobó que el ATATM conserva la capacidad de reconocer a la tobramicina con una elevada afinidad (K_D=170 nM), si bien, esta es ligeramente inferior a la observada para ATA (K_D=130 nM).

La construcción de la fase sensora se llevó a cabo mediante un protocolo similar al utilizado con el sistema basado en el aptámero ATA, aunque fue necesario seleccionar de nuevo el tiempo de incubación del aptámero para obtener una completa saturación de la superficie sensora, puesto que podría variar respecto a ATA. Para ello, se introdujo el electrodo previamente modificado con tobramicina en una disolución de ATATM 0,5 µM preparada en la disolución de afinidad y se varió el tiempo de incubación (1-10 min) hasta obtener una R_{et} constante. Se observó que la R_{et} medida alcanza su valor máximo tras una incubación de 5 min (Figura 4.9.A.), al igual que para el ATA. Para tiempos más largos la R_{et} registrada permaneció constante.

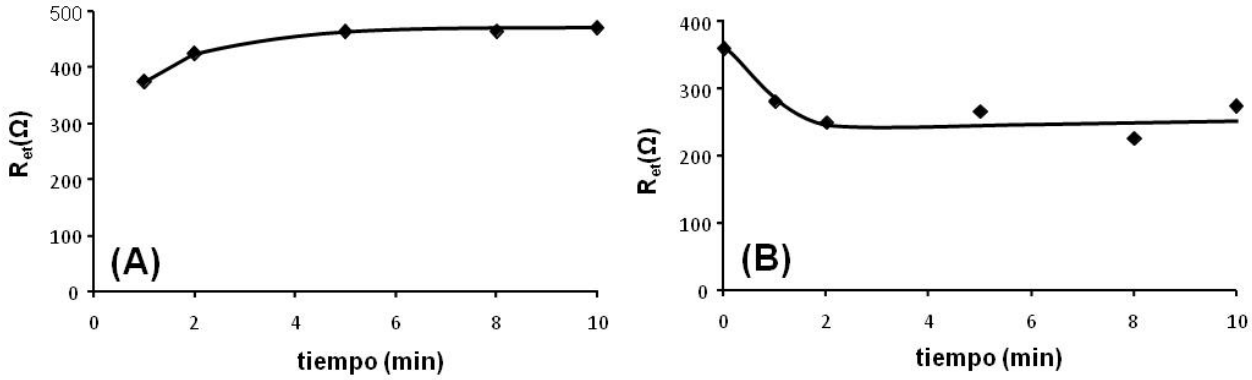

Figura 4.9. Influencia sobre R_{et} de (A) tiempo de incubación de la superficie modificada con tobramicina con ATATM 0,5 µM y (B) tiempo de incubación de la fase sensora tobramicina-ATATM con una disolución de tobramicina 50 µM.

Del mismo modo, fue necesario seleccionar el tiempo de incubación de la fase sensora con las disoluciones de patrones o muestras que contienen tobramicina con objeto de garantizar que se produce el desplazamiento del aptámero enlazado a la misma. Para ello se introdujo la fase sensora en una disolución de tobramicina 50 µM preparada en la disolución de afinidad y se varió el tiempo de incubación (1-10 min) hasta obtenerse un valor de R_{et} constante. Tal como se observa en la figura 4.9.B., la interacción entre la tobramicina en disolución y ATATM inmovilizado sobre la superficie del electrodo es rápida, de tal modo que tras una incubación de tan sólo 2 min se obtiene el máximo desplazamiento, registrándose una señal constante para tiempos de incubación más largos.

Empleando las condiciones seleccionadas se llevó a cabo el ensayo de desplazamiento en disolución acuosa. Para ello, la fase sensora se introdujo en disoluciones con concentración creciente de tobramicina, preparadas en la disolución de afinidad. Tras cada incubación de 2 min, el electrodo fue introducido en la disolución de medida registrándose un espectro de impedancias. El valor de R_{et} obtenida, expresada en %S de descenso de la señal, se representó frente al logaritmo de la concentración de tobramicina empleada en cada caso. La curva dosis-respuesta (Figura 4.10) muestra un perfil sigmoidal con una región lineal que se ajusta a la ecuación S(%)=(-37±2)log[tobramicina(µM)]+(77±2), r=0,997. El límite de detección y el intervalo analítico útil fueron 0,4 y 0,8-34,9 µM, respectivamente. La sensibilidad es similar a la obtenida para el ensayo de desplazamiento que emplea ATA como receptor de afinidad, descrito en el apartado anterior, como muestra la similitud en las pendientes de la curva de calibrado.

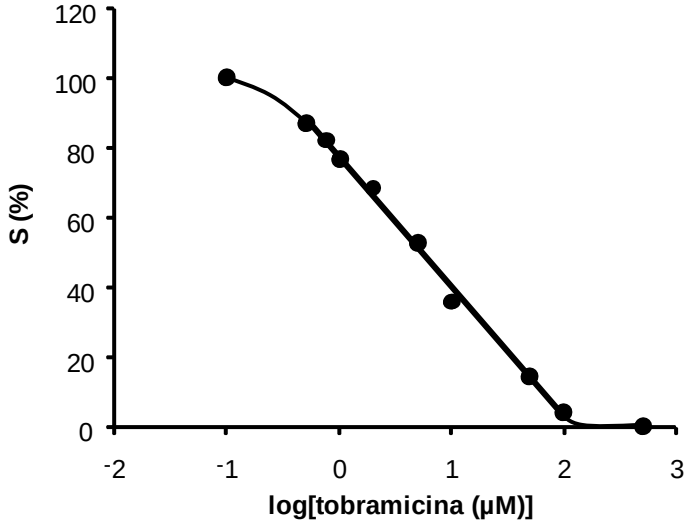

Figura 4.10. Curva dosis-respuesta tras la incubación de la fase sensora (tobramicina-ATATM) con distintas concentraciones de tobramicina en disolución.

De igual modo, la reproducibilidad del ensayo empleando ATATM, 5,5% (n=5) para un nivel de concentración de tobramicina 100µM, fue similar a la registrada para ATA. Estos datos verifican por completo la posibilidad de desarrollar el ensayo de desplazamiento empleando como receptor de afinidad el aptámero anti-tobramicina totalmente metilado, la cual había sido anticipada en el capítulo 3 del presente trabajo

tras un profundo análisis comparativo de las constantes de disociación calculadas para ambos aptámeros modificados, ATA y ATATM, y para el aptámero natural no modificado, ATANM.

4.4. APLICACIÓN DEL APTASENSOR A LA DETERMINACIÓN DE TOBRAMICINA EN SUERO HUMANO.

Finalmente, se comprobó la validez del aptasensor propuesto para la determinación de tobramicina en muestras de suero humano. Para ello se decidió emplear como reactivo de afinidad el aptámero anti-tobramicina totalmente metilado, ATATM, debido a su mayor resistencia a la degradación por parte de las nucleasas respecto al aptámero parcialmente metilado, ATA.

El suero humano es una matriz altamente compleja constituida por proteínas (excepto las proteínas de coagulación, eliminadas mediante el proceso de coagulación del plasma que da lugar al suero sanguíneo), iones, nutrientes y otras sustancias. Dichos componentes son capaces de interactuar electrostáticamente o por simple adsorción con la fase sensora, pudiendo provocar un aumento o disminución inespecífica de la resistencia a la transferencia electrónica, R_{et}. Estudios preliminares indican que típicamente la exposición de la fase sensora a una disolución de suero (sin tobramicina) conlleva un aumento de la R_{et} medida de 400-500 Ω. Por esta razón, se consideró necesario acondicionar la fase sensora antes de utilizar esta en medidas en esta matriz. El acondicionamiento propuesto consistió en la realización de sucesivas incubaciones de la fase sensora en una disolución de suero diluido y exento de tobramicina, durante períodos de 5 minutos hasta obtener una medida de R_{et} constante, la cual actuará como el valor R_a (máxima señal) en el cálculo del tanto por ciento de la señal. En todos los casos se ajusto la concentración salina de la disolución reguladora utilizada en la dilución, de manera que tras ésta, la disolución resultante tenga un contenido en sales comparable al de la disolución de afinidad.

Tras la etapa de acondicionamiento de la fase sensora con el suero, se procede a llevar a cabo el ensayo de desplazamiento mediante la incubación de la fase sensora en disoluciones de tobramicina de concentraciones variables preparadas en suero humano diluido en distinto grado. El primer lugar se seleccionó de nuevo el tiempo de incubación necesario para que se produzca el desplazamiento del aptámero ATATM en

la superficie sensora por la tobramicina en disolución para formar el complejo ATATM-tobramicina en disolución. Para ello se introdujo la fase sensora acondicionada en una disolución de tobramicina 200 µM preparada en suero diluido 1:1 y se registró la R_{et} tras distintos tiempos de incubación (1-15 min). Como se ve en la Figura 4.11, la interacción entre el aptámero inmovilizado y la tobramicina en disolución no se ve impedida por la interacción inespecífica de componentes del suero sobre la fase sensora. Más aún la interacción entre ambos es rápida, siendo necesario tan solo 1 minuto de incubación para que se produzca el desplazamiento del aptámero. A tiempos de incubación superiores se observa un ligero aumento de la R_{et} registrada, probablemente asociada a la adsorción inespecífica de componentes de la matriz.

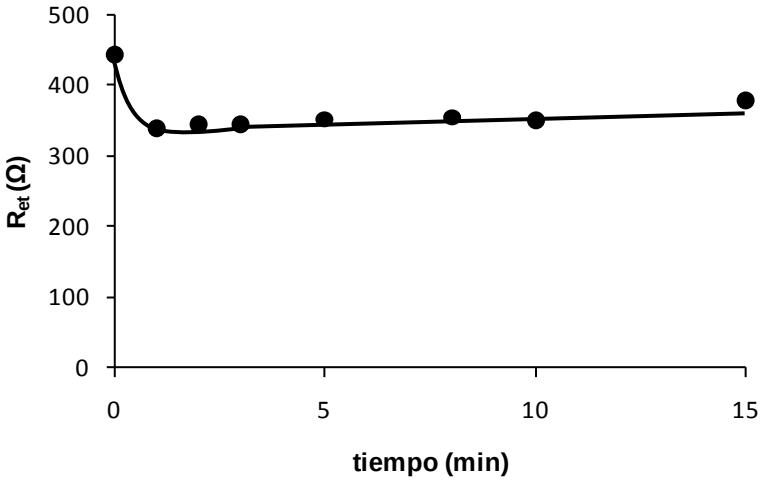

Figura 4.11. Efecto sobre la señal del tiempo de incubación de la fase sensora tobramicina-ATATM con tobramicina 200 µM preparada en suero diluido en un factor 1:1.

Se evaluó en primer lugar la posibilidad de utilizar el sensor diseñado para determinar directamente la tobramicina en suero humano sin diluir. Como se puede observar en la figura 4.12, el cambio en el valor de la R_{et} registrada tras las diferentes incubaciones realizadas en sueros no diluidos con concentración creciente de tobramicina no sigue ningún patrón y resulta totalmente aleatorio, lo que invalida la posibilidad de realizar el ensayo en 100% de suero humano. La ausencia de sales en dicha matriz impide que el aptámero reconozca específicamente a su molécula diana. De este modo se concluye que será necesaria, al menos una pequeña dilución de la matriz que permita corregir la fuerza iónica de la matriz diluida.

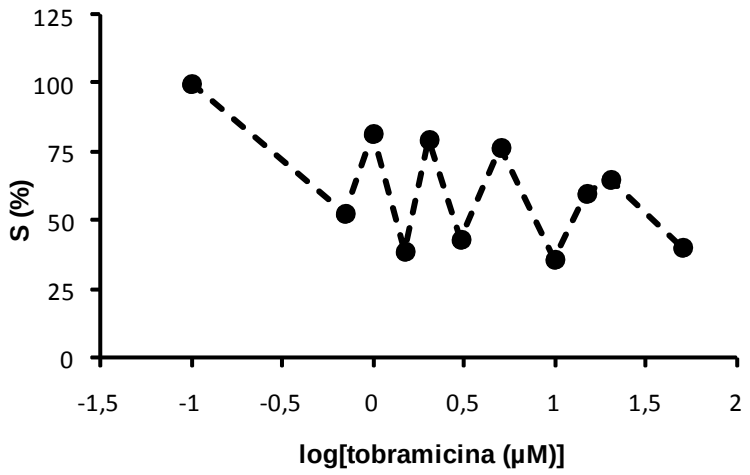

Figura 4.12. Respuesta obtenida tras la incubación de la fase sensora (tobramicina-ATATM) con distintas concentraciones de tobramicina preparadas en suero humano sin diluir.

A la vista de estos resultados se decidió llevar a cabo el ensayo de desplazamiento empleando suero humano diluido. Se debe tener especial atención en que la dilución no altere la concentración salina de la disolución reguladora de afinidad, que debe mantenerse constante. Para ello se prepararon distintas disoluciones reguladoras que contenían una concentración de sales tal que, tras la dilución del suero, la concentración salina final fuese igual a la de la disolución de afinidad. Se registró la curva dosis-respuesta correspondiente a factores de dilución del suero 1:0,5; 1:1; 1:2 y 1:5 (Figura 4.13). Se observa que las cuatro diluciones ensayadas proporcionan una curva dosis-respuesta sigmoidal, similar a la obtenida en disolución acuosa, lo que corrobora la necesidad de una fuerza salina elevada para que la reacción de reconocimiento entre aptámero y tobramicina tenga lugar.

Las características analíticas correspondientes a cada una de las curvas de calibrado registradas se resumen en la Tabla 4.3 Se observa como todas las expresiones de la curva de calibrado presentan una pendiente similar, incluso para la dilución más pequeña (1:0,5). El límite de detección en el suero diluido calculado para cada uno de los casos solamente depende del grado de dilución empleado. Cuanto mayor es la dilución peor es el límite de detección.

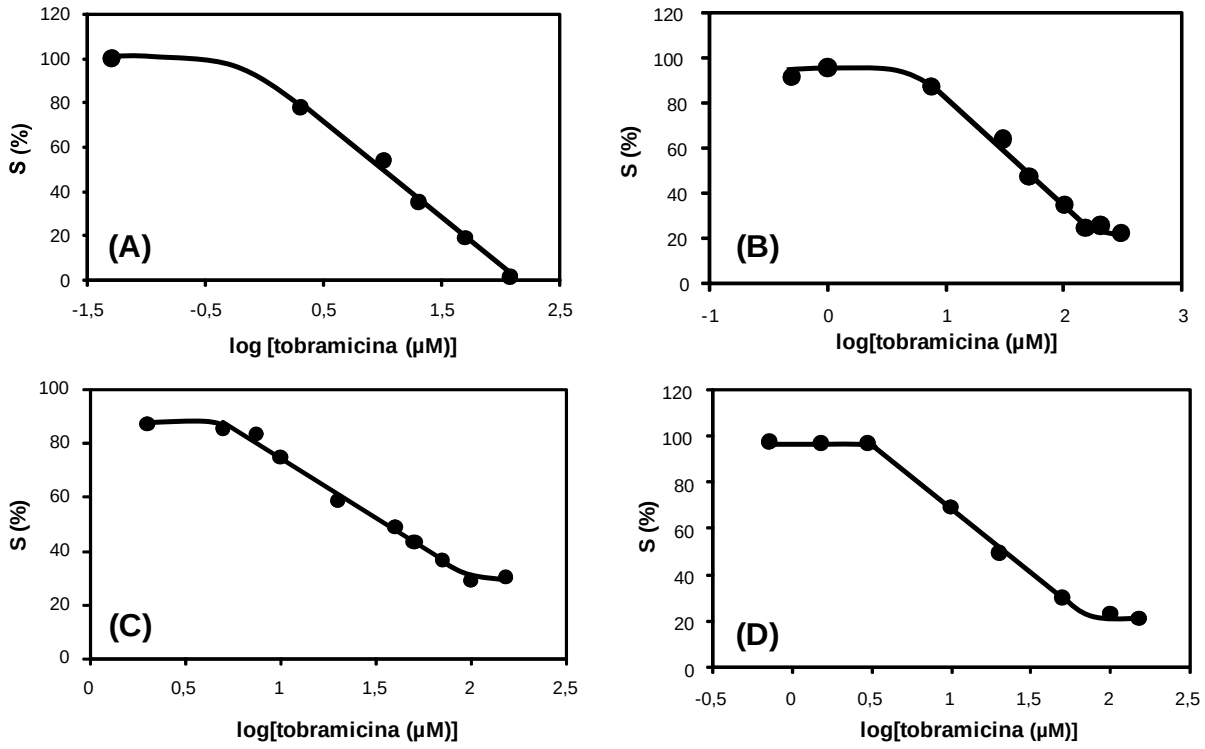

Figura 4.13. Curva dosis-respuesta tras la incubación de la fase sensora (tobramicina-ATATM) con distintas concentraciones de tobramicina preparadas en suero humano diluido en un factor (A) 1:0,5; (B) 1:1; (C) 1:2 y (D) 1:5.

Atendiendo al límite de detección e intervalo analítico útil calculados, la dilución 1:0,5 permite llevar a cabo la determinación de tobramicina en muestras de suero dentro del intervalo clínicamente relevante (4,3-25,7 µM[144]) con una elevada reproducibilidad y sin necesidad de ningún pretratamiento de la muestra, más allá de la simple dilución.

Tabla 4.3. Características analíticas correspondientes al ensayo de desplazamiento desarrollado en suero humano diluido en distinta proporción.

Dilución (suero:disolución reguladora)	Curva de calibrado	Intervalo lineal (μM)	L.D.(μM)
1:0,5	S(%)=(-44±3)log[tobramicina(μM)] + (93±3); r=0,997	3 – 72,1	1,8
1:1	S(%)=(-48±3)log[tobramicina(μM)] + (132±6); r=0,994	23,3 – 406,6	14,5
1:2	S(%)=(-45±3)log[tobramicina(μM)] + (119±3); r=0,995	22,5 – 496,6	13,5
1:5	S(%)=(-55±3)log[tobramicina(μM)] + (123±3); r=0,999	36,5 – 451,1	24

5. DISEÑO DE UN APTAENSAYO COMPETITIVO CON CURVA DE RESPUESTA CRECIENTE PARA TOBRAMICINA

En el capítulo anterior se describió el diseño, construcción y evaluación de un aptasensor impedimétrico, que no requiere reactivos marcados, para la determinación de tobramicina. Aunque las características analíticas del mismo hacen posible su aplicación a la determinación de tobramicina en muestras de suero humano, el método se caracteriza por una curva de respuesta decreciente, la señal medida disminuye al aumentar la concentración del antibiótico, con las limitaciones que esto conlleva. En este capítulo se describe la evaluación de un diseño de ensayo alternativo, que teóricamente da lugar a una curva de respuesta creciente. Para este diseño se propone el empleo de partículas magnéticas como soporte de la fase sensora. Además se utiliza aptámero marcado con biotina con el objetivo de utilizar una etapa de amplificación enzimática previa a la generación de la señal, voltamétrica en este caso. La complejidad del ensayo que se propone hizo que se considerase necesario utilizar una estrategia de diseño factorial para obtener una máxima eficacia en el proceso de optimización.

5.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha señalado en la revisión de los diferentes formatos de ensayo utilizados hasta el momento para el diseño de aptasensores, realizada en el capítulo 1, entre los ensayos más sensibles se encuentran los que utilizan alguno de los reactivos de afinidad marcados para facilitar el proceso de generación de la señal. Al igual que en el caso de los inmunoensayos, se presenta una amplia variedad de posibilidades, tanto en la elección de la marca como en el diseño del ensayo. Sin embargo, se pueden diferenciar dos grandes grupos de ensayos: competitivos y no competitivos.

De manera general, los ensayos no competitivos son, al menos teóricamente, más sensibles y permiten alcanzar límites de detección mucho más bajos. Se trata de ensayos en los que el receptor de afinidad, el aptámero en este caso, se encuentra en exceso y la señal registrada informa sobre la cantidad de sitios de reconocimiento del receptor que permanecen ocupados una vez se ha llevado a cabo la reacción receptor-analito. De esta forma, se obtiene una curva de respuesta creciente, por lo que el límite de detección está fundamentalmente determinado por la magnitud de las interacciones inespecíficas de los reactivos de marcaje utilizados en el ensayo. A pesar de estas ventajas, el empleo de ensayos no competitivos para la determinación de moléculas de

pequeño tamaño molecular, como es la tobramicina, está muy limitado. El principal formato de ensayo no competitivo es el ensayo sándwich que exige la unión del analito a dos moléculas de receptor simultáneamente, que en el caso de moléculas de pequeño tamaño no es posible. Aunque se han descrito algunos intentos de desarrollar ensayos no competitivos para moléculas pequeñas, basados en el empleo de aptámeros fragmentados[98-104], estos no tienen carácter general y se encuentran limitados a aquellos casos en los que se produce un cambio importante en la estructura tridimensional del aptámero tras su interacción con la molécula diana.

Una de las diferencias fundamentales entre los ensayos no competitivos y los competitivos se refiere a cómo se obtiene la señal analítica. En los ensayos competitivos o con reactivo limitante, en lugar de obtener la señal a partir de la medida de la cantidad de receptor que permanece ocupado tras la interacción de reconocimiento, se mide directa o indirectamente el receptor no enlazado por el analito, por lo que la curva de respuesta suele ser decreciente. Este tipo de ensayos suelen presentar una serie de inconvenientes derivados del hecho de que una mayor concentración del analito genera una menor señal de salida del sistema. Uno de estos problemas es la posibilidad de aparición de falsos positivos como consecuencia del deterioro de la fase sensora o de la adsorción inespecífica de otros componentes y la incapacidad de esta clase de sistemas de discriminar entre la señal generada por la interacción del analito objeto de estudio y las que no lo son. Este tipo de problemas desaparecen al trabajar con ensayos en los que la curva de respuesta es creciente ("*signal-on*").

Para desarrollar un ensayo competitivo con curva de respuesta creciente válido para la determinación de moléculas pequeñas, proponemos un modelo en dos etapas, cuya aplicación sería generalizable, basado en la inmovilización sobre un soporte sólido de la especie que se desea determinar. La primera etapa consiste en el desarrollo de la reacción de competición por el aptámero no marcado (reactivo limitante) entre el analito de la muestra y el inmovilizado. En una segunda etapa, se utiliza el mismo aptámero, pero marcado, para medir la cantidad de analito inmovilizado que ha quedado libre tras la etapa anterior. De esta forma, la señal medida, asociada al aptámero marcado, aumenta a medida que aumenta la cantidad de analito enlazado al aptámero en la primera etapa (curva de respuesta creciente).

Para evaluar la viabilidad del ensayo propuesto se seleccionaron partículas magnéticas como plataforma sobre la que se inmovilizará la molécula de pequeño tamaño a medir, en este caso la tobramicina. Las excepcionales características que presentan estas partículas unido a la gran variedad de funcionalizaciones disponibles en el mercado, han sido responsables del reciente incremento en el número de bioensayos analíticos descritos en la literatura científica que emplean partículas magnéticas como plataforma sensora[167,168]. Las partículas magnéticas facilitan el desarrollo de las etapas de incubación, separación y lavado, necesarias en el desarrollo de formatos de ensayos complejos que involucran el empleo de varios reactivos. Por un lado, la cinética de la interacción entre ligando y receptor se ve favorecida debido a que las partículas magnéticas se encuentran en suspensión y su superficie esférica permite la inmovilización de un mayor número de moléculas en comparación con los electrodos convencionales. Adicionalmente, el empleo de esta plataforma facilita el desarrollo de las etapas de lavado y separación debido a que su paramagnetismo les confiere la capacidad de ser atraídas por un imán permanente. Las partículas se pueden resuspender fácilmente retirando el imán. Así se facilita la eliminación del material no enlazado o la separación de la matriz, en el caso del tratamiento de muestras. La sencillez de manejo de las mismas permite además llevar a cabo varias determinaciones de forma simultánea.

El grupo de investigación de la Universidad de Florencia dirigido por el profesor Marco Mascini ha sido pionero en la integración de elementos de reconocimiento molecular oligonucleotídicos y partículas magnéticas. Se han descrito ensayos de hibridación para la determinación de secuencias de ADN donde la sonda de captura biotinada se inmoviliza sobre partículas magnéticas modificadas con estreptavidina mediante la interacción biotina-estreptavidina. La detección se lleva a cabo mediante un marcaje enzimático y realizando una medida voltamétrica sobre electrodos serigrafiados de carbono[169] o introduciendo las partículas en un sistema de microfluídica seguido de una medida cronoamperométrica sobre electrodos de oro[170,171]. El mismo grupo ha empleado esta plataforma sensora en el desarrollo de inmunosensores[172,173] y aptasensores[46,83,87]. En lo que se refiere al empleo de aptámeros como receptores, sus esfuerzos han ido dirigidos a la determinación de proteínas (trombina y proteína C reactiva) mediante distintos formatos de ensayos ELISA (sándwich y competitivo) que ya han sido revisados en el primer capítulo del presente trabajo. En todos los casos la reacción de reconocimiento tiene lugar sobre

las partículas magnéticas y la detección electroquímica se lleva a cabo sobre electrodos serigrafiados de carbono (SPCEs) gracias a la introducción de una marca enzimática. Un ensayo competitivo similar ha sido descrito para la determinación de la molécula de bajo peso molecular ocratoxina A[116]. No se han encontrado antecedentes en la bibliografía que describan un esquema de ensayo competitivo sobre partículas magnéticas para la determinación de moléculas pequeñas y con curva de respuesta creciente.

5.2. DESCRIPCIÓN DEL ESQUEMA DE ENSAYO Y CONSTRUCCIÓN DE LA FASE SENSORA

Para el desarrollo del ensayo competitivo de curva de respuesta creciente se seleccionó como elemento de reconocimiento molecular el aptámero anti-tobramicina parcialmente metilado (ATA), cuya habilidad para reconocer con elevada afinidad y actuar como receptor de afinidad en el diseño de un aptasensor para la determinación de su molécula diana, la tobramicina, ha sido evaluada y discutida en los capítulos 3 y 4 del presente trabajo. La obtención de la señal electroquímica se lleva a cabo gracias a la introducción de una marca enzimática, la fosfatasa alcalina (ALP), que ha sido probada con anterioridad en nuestro laboratorio en ensayos de hibridación[174,171]. Para ello es necesario el empleo de un sistema de marcaje que permita la introducción sencilla de la marca, proporcionando una unión estable. El sistema seleccionado fue estreptavidina-biotina, ampliamente utilizado en el desarrollo de inmuno y aptasensores. El aptámero ATA fue convenientemente modificado mediante la introducción de una molécula de biotina en su extremo 5´ (BATA), mientras que como conjugado enzimático se seleccionó la estreptavidina-fosfatasa alcalina ($Strep_2$-ALP).

El ensayo propuesto consta de dos etapas sucesivas de reconocimiento en las que se emplearon dos receptores de afinidad: el aptámero anti-tobramicina ATA y el aptámero anti-tobramicina biotinilado en su extremo 5´, BATA (Figura 5.1). En la primera etapa (Figura 5.1.(A)) se establece la competición entre concentraciones crecientes de tobramicina en disolución correspondientes a la muestra y la tobramicina enlazada sobre las partículas magnéticas por los sitios de unión del aptámero anti-tobramicina, ATA. De este modo, cuanto mayor sea la concentración de tobramicina

presente en la muestra menor cantidad de moléculas de ATA se unirán a la tobramicina enlazada sobre las partículas magnéticas

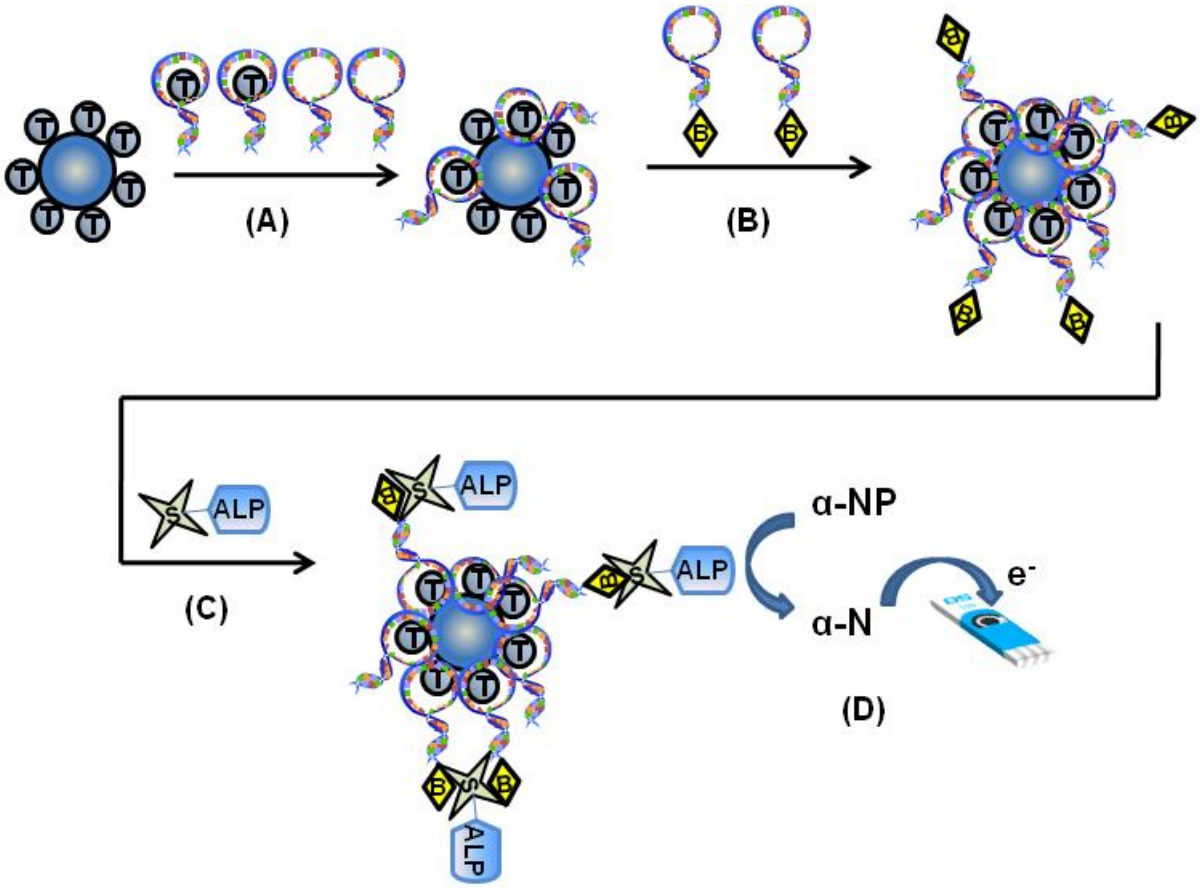

Figura 5.1. Esquema que muestra el ensayo propuesto. (A) Incubación de las partículas magnéticas modificadas con tobramicina con una concentración constante de ATA y concentraciones crecientes de tobramicina, (B) incubación de las partículas modificadas con una disolución de BATA, (C) marcaje enzimático con el conjugado Strep$_2$-ALP y (D) reacción enzimática y detección electroquímica sobre SPCEs.

A continuación se realiza una segunda etapa de incubación con el aptámero anti-tobramicina biotinado, BATA, que se une a las moléculas de tobramicina presentes sobre la superficie de las partículas magnéticas que no han sido previamente reconocidas por el aptámero ATA en la primera etapa (Figura 5.1.(B)). Esta etapa se puede considerar una etapa de rellenado. Así, cuanto mayor es la concentración de tobramicina presente en la muestra durante la primera etapa, mayor será la cantidad de moléculas de BATA que quedan enlazadas sobre las partículas magnéticas y mayor

será la cantidad de conjugado enzimático, $Strep_2$-ALP que se une mediante el sistema de marcaje biotina-estreptavidina (Figura 5.1.(C)). La actividad enzimática enlazada se mide mediante voltametría de pulso diferencial (DPV), utilizando como sustrato enzimático el α-naftilfosfato (α-NP) sobre SPCEs (Figura 5.1.(D)).

El diseño y construcción de la fase sensora constituye una fase clave en el proceso de desarrollo de un ensayo como el esquematizado en la figura 5.1. En este caso, la construcción de la fase sensora se realizó mediante la inmovilización de la tobramicina sobre micropartículas magnéticas funcionalizadas con grupos carboxilo (Dynal, MyOneCarboxylicacid, 1,05 μm de diámetro), mediante la formación de un enlace covalente empleando la reacción de la carbodiimida.

El protocolo de modificación de las partículas magnéticas, adaptación de los protocolos de inmovilización de la tobramicina sobre oro empleados en los capítulos anteriores, se detalla a continuación.

Las partículas funcionalizadas se obtienen comercialmente como una suspensión de concentración 10 mg/mL.

Lavado: una alícuota de 50 μL de esta suspensión se somete a dos lavados consecutivos con 500 μL de una disolución acuosa que contiene Tween 20® 0,01% durante 2 min bajo agitación, con el objetivo de eliminar los conservantes y otros reactivos de la disolución de almacenamiento. Tras la etapa de incubación los viales se colocan en un soporte imantado de modo que las partículas magnéticas se acumulan sobre sus paredes facilitando la eliminación del sobrenadante mediante aspiración.

Etapa de activación: las partículas magnéticas se resuspenden en 500 μL de una disolución acuosa que contiene EDC 0,2 M y NHS 0,05 M y se incuban en esta disolución durante 30 minutos bajo agitación. En esta etapa se activan los grupos carboxilo presentes sobre la superficie de las partículas.

Lavado: a continuación las partículas se someten a un doble lavado con 500 μL de una disolución HEPES 0,1 M de pH 8,64 (disolución de inmovilización) que contiene Tween 20® 0,01% durante 2 minutos bajo agitación.

Formación del enlace amida: tras los lavados las partículas activadas se incuban en 500 μL de una disolución de tobramicina 40 mM preparada en la disolución de

inmovilización durante 1 hora, bajo agitación (cualquier cambio en estas condiciones será especificado en el texto).

Lavado: una vez que se ha formado el enlace covalente del antibiótico a la superficie de las partículas se realizan dos lavados con la disolución de inmovilización que contiene Tween 20® 0,01% durante 2 min bajo agitación.

Bloqueo: a continuación se procede al bloqueo de los grupos carboxilo activos que no hayan reaccionado con la tobramicina, mediante la incubación de las partículas con una disolución de etanolamina 1 M preparada en la disolución de inmovilización durante 1 hora, bajo agitación.

Lavado y reconstitución: una vez bloqueadas, las partículas se someten a dos lavados con 500 μL de disolución de afinidad que contiene Tween 20® 0,01% y, finalmente, se resuspenden en 500 μL de disolución de afinidad (ya empleada en los capítulos anteriores), siendo la concentración final de partículas 1 mg/mL. Esta disolución se deberá almacenar a 4 ºC y debe ser utilizada dentro de las primeras 24 horas de modo que se garantice el perfecto estado de la tobramicina inmovilizada sobre su superficie.

La figura 5.2.muestra una representación esquemática de la fase sensora construida siguiendo el protocolo detallado.

Las partículas magnéticas proporcionan un gran aumento de la superficie efectiva en comparación con otros soportes sólidos como los electrodos tradicionales. Esto hace necesario el control de la etapa de modificación con el objetivo de que el antibiótico recubra por completo la superficie de las partículas, evitando en lo posible zonas sin modificar, fuente de adsorciones inespecíficas.

Se llevó a cabo, por lo tanto, la optimización de la concentración de tobramicina necesaria para saturar la superficie de las partículas. Siguiendo el protocolo detallado con anterioridad se modificaron tres lotes de partículas empleando tres concentraciones diferentes de tobramicina durante el proceso de modificación: 20, 40 y 80 mM. Una vez completado el proceso de modificación, cada uno de los lotes se sometió a una incubación con una concentración fija de aptámero anti-tobramicina biotinilado, BATA, con el objetivo de conocer qué concentración de tobramicina proporciona la fase sensora más adecuada para llevar a cabo el ensayo propuesto.

Para ello se comparó la señal obtenida tras la incubación con BATA (máxima señal obtenible) con la señal registrada para un blanco, obtenido tras la etapa de marcaje con el conjugado enzimático sin la incubación previa con tobramicina ni BATA. Se evalúa de este modo la adsorción inespecífica del conjugado enzimático sobre la fase sensora.

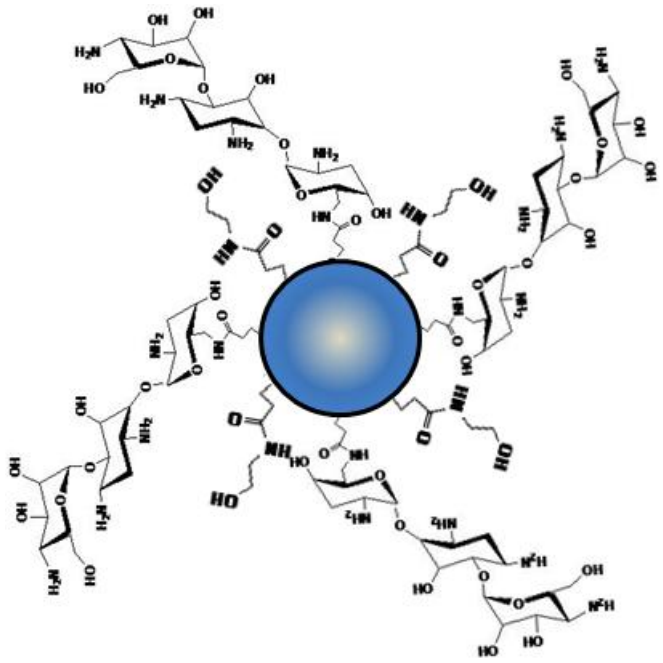

Figura 5.2. Representación esquemática de la fase sensora consistente en la unión covalente de la tobramicina sobre las partículas magnéticas mediante el enlace amida. La superficie de las partículas está bloqueada con etanolamina.

El protocolo seguido para llevar a cabo este experimento se detalla a continuación.

Lavado: Se toma una alícuota de 10 μL de las partículas modificadas y se somete a dos etapas de lavado con 1 mL de disolución de afinidad con Tween 20® 0,01% durante 2 min y bajo agitación.

Interacción: se incuban las partículas con 1 mL de una disolución de aptámero biotinilado, BATA 0,5 μM preparada en la disolución de afinidad que contiene BSA

0,1% durante 15 minutos bajo agitación. En el caso de los blancos esta incubación se realiza solamente con la disolución de afinidad con BSA 0,1%.

Lavado: se realizan a continuación dos etapas de lavado empleando 1 mL de la disolución de detección (ver composición en Anexo II) que contiene Tween 20® 0,01% y BSA 1% durante 2 min.

Marcaje enzimático: las partículas se incuban con el conjugado enzimático, 1 mL de disolución de $Strep_2$-ALP $4{,}3 \cdot 10^{-3}$ g/mL preparada en la disolución de detección que contiene Tween 20® 0,01% y BSA 1% durante 10 minutos, bajo agitación. En esta etapa el conjugado enzimático se une a las moléculas de BATA enlazadas sobre la superficie de las partículas.

Lavado y reconstitución: Por último, las partículas se lavan dos veces con 1 mL de disolución de detección durante 2 minutos, bajo agitación y, finalmente, se resuspenden en 100 μL de la disolución de detección, siendo 0,1 mg/mL la concentración final de las partículas.

Una vez realizado el ensayo, se lleva a cabo la reacción enzimática que permitirá la detección electroquímica, sobre electrodos serigrafiados de carbono, SPCEs. Para ello se toma una alícuota de 15 μL de las partículas modificadas que se depositan y fijan sobre el electrodo de trabajo gracias a la colocación de un imán bajo éste. Es importante para obtener una buena reproducibilidad en las medidas electroquímicas que el imán solamente cubra al electrodo de trabajo, y no toda la celda electroquímica, de forma que todas las partículas estén sobre él. A continuación se cubren los 3 electrodos que componen la celda electroquímica mediante la adición de 25 μL del sustrato enzimático α-naftilfosfato (α-NP) preparado en la disolución de detección, siendo la concentración final de sustrato en los 40 μL totales de 4 mM. Tras 10 minutos de reacción enzimática se detecta la cantidad del producto enzimáticamente generado, α-naftol (α-N), mediante voltametría diferencial de pulso DPV (ver condiciones en el Anexo II).

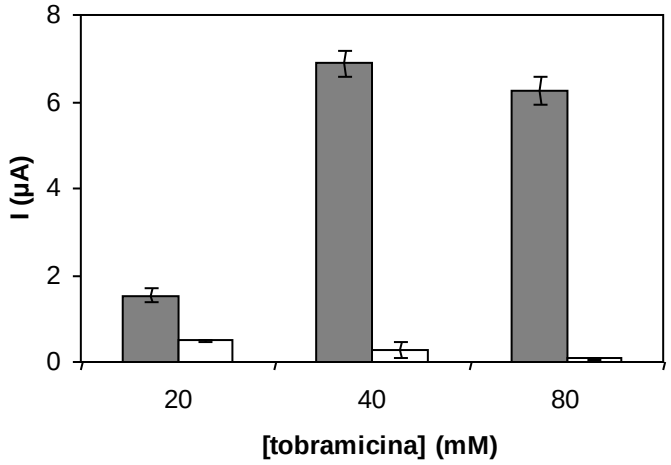

Figura 5.3. Variación de la intensidad de corriente con la concentración de tobramicina empleada para recubrir las partículas magnéticas obtenida para [BATA]=0,5 µM y [tobramicina]=0 (gris) y [BATA]=0 µM y [tobramicina]=0 (blanco).

La diferencia en la señal analítica registrada para la señal específica tras la incubación con BATA y la señal correspondiente a la adsorción inespecífica del conjugado enzimático fue evaluada para los tres recubrimientos de tobramicina obtenidos. En la Figura 5.3 (columnas blancas) se observa cómo la adsorción inespecífica del conjugado enzimático disminuye al aumentar el grado de recubrimiento de las partículas con el antibiótico. Es evidente que un mayor recubrimiento superficial de tobramicina da lugar a un menor número de sitios de adsorción inespecífica, así como un mayor impedimento estérico, que dificulta la interacción del conjugado enzimático con la superficie de las partículas magnéticas. En cuanto a la interacción específica entre la tobramicina inmovilizada y el aptámero en disolución, se comprobó que al aumentar la concentración de tobramicina durante la modificación de las partículas, de 20 mM a 40 mM, se produce un claro aumento en la señal electroquímica, como cabe esperar al aumentar los sitios de unión, mientras que para concentraciones superiores de tobramicina la señal permanece constante dentro del error experimental.

Estos resultados indican que cuando en el proceso de modificación de las partículas magnéticas se emplea una disolución de tobramicina de 20 mM, no se alcanza una concentración superficial del antibiótico de saturación, de modo que una gran parte de los grupos carboxilo presentes sobre la superficie de las partículas son

bloqueados posteriormente con etanolamina, que no exhibe una interacción específica por el aptámero BATA. Al aumentar la concentración de tobramicina a 40 mM se satura la superficie de las partículas con tobramicina, la señal específica aumenta y la señal correspondiente a la adsorción inespecífica del conjugado disminuye. Considerando los valores correspondientes tanto a las señales específicas como a las inespecíficas, se escogió para el proceso de preparación de la fase sensora una concentración de tobramicina de 40 mM.

Debe señalarse que la selección de las partículas magnéticas como soporte sólido para llevar a cabo el presente ensayo facilita y simplifica enormemente el proceso de construcción de la fase sensora en comparación con el proceso de modificación necesario al trabajar con electrodos sólidos convencionales, que se ve reducido de 2 días a 3 horas.

No obstante, el ensayo propuesto es un sistema complejo en el que la respuesta registrada se ve afectada por un gran número de variables (concentración de los distintos reactivos, tiempos de incubación, etc.), que están además, íntimamente relacionadas entre sí, resultando complicado diseñar una estrategia de optimización basada en la variación una a una de las variables implicadas. Se decidió, por lo tanto, recurrir a las herramientas estadísticas conocidas como Diseño de Experimentos, con el fin de planificar y desarrollar el experimento de un modo sistemático que permita obtener la máxima información posible (influencia de las distintas variables sobre la respuesta, interacciones, valores óptimos, etc.) en el menor número de etapas.

5.3. DISEÑO EXPERIMENTAL: INFLUENCIA DE FACTORES E INTERACCIONES SOBRE LA RESPUESTA DEL ENSAYO.

Aunque los experimentos preliminares, realizados para una concentración de tobramicina 200 µM mostraron que hay diferencia entre la señal obtenida para la muestra y la medida para el blanco, el diseño de un ensayo como el descrito, con diferentes etapas que implican reacciones de afinidad, exige seleccionar las condiciones experimentales más adecuadas para cada etapa con el objetivo de obtener la máxima sensibilidad en la respuesta. La optimización de las variables experimentales o factores en esta clase de ensayos es un proceso complejo, ya que muchas de ellas pueden estar interrelacionadas, pero que resulta clave para el éxito del mismo.

Tradicionalmente el proceso de optimización de un experimento se lleva a cabo siguiendo una estrategia **univariante** consistente en la modificación una a una de las variables seleccionadas, mientras el resto se mantiene a un valor constante. Cada una de las experiencias permite la selección de un valor óptimo para la variable seleccionada. A pesar de la gran aceptación de este método de optimización entre la comunidad científica, éste ignora por completo aspectos tan importantes para la correcta interpretación de las señales registradas como es la interacción entre distintas variables.

En primer lugar se utilizó la herramienta estadística de diseño factorial para determinar cuáles de los diferentes factores e interacciones entre estos tienen una influencia significativa sobre la respuesta del ensayo.

5.3.1. Selección de la variable respuesta.

La señal analítica que se registra para cada una de las experiencias llevadas a cabo es la intensidad de corriente medida por DPV, correspondiente a la oxidación del producto de hidrólisis enzimática del α-naftilfosfato, sustrato de la fosfatasa alcalina. El ensayo propuesto debe proporcionar una señal analítica creciente con la concentración del analito. El objetivo es por tanto seleccionar las condiciones experimentales que permiten obtener la máxima intensidad de corriente para una concentración de tobramicina dada ($I_{[tobramicina]}$). Sin embargo, la consideración de esta intensidad de corriente como la variable respuesta llevaría a conclusiones erróneas, ya que además de buscar el máximo valor para esa variable, al mismo tiempo es necesario minimizar la señal analítica correspondiente al blanco (sin tobramicina en la muestra). De nada sirve que la intensidad de corriente para una concentración dada de tobramicina sea elevada, si a su vez ésta resulta indistinguible del valor registrado para el blanco. Con el objetivo de tener en cuenta ambos efectos, se tomó como variable respuesta el cociente de intensidades de corriente registradas para una concentración de tobramicina de 200 μM y para el blanco, $y=I_{[tobramicina]=200\ \mu M}/I_{blanco}$.

5.3.2. Identificación de los factores que pueden tener un efecto sobre la variable respuesta. Definición de los intervalos y niveles.

El ensayo propuesto es un sistema complejo que involucra gran cantidad de factores, tanto controlables como no controlables o aleatorios. Los factores controlables identificados para cada etapa del ensayo se resumen en la Tabla 5.1. Además, como

factores incontrolables se identificó la temperatura a la que se desarrolla cada una de las diferentes etapas del ensayo: competición entre la tobramicina de la muestra y la tobramicina inmovilizada sobre las partículas magnéticas por ATA, incubación con BATA, marcaje enzimático y reacción enzimática Estos últimos son factores que se pueden cuantificar, pero no controlar, puesto que los experimentos se realizaron a temperatura ambiente en un espacio en el que no es posible controlar dicha variable.

Tabla 5.1. Variables, o factores controlables, identificados en cada una de las etapas del ensayo.

Etapa	Descripción	Factores
1	Reacción de competición por ATA	[ATA]; t_1 = 15 min
2	Incubación con BATA	[BATA]; t_2
3	Marcaje con el conjugado $Strep_2$-ALP	[$Strp_2$-ALP]= $4{,}3\times10^{-3}$ g/L t_3= 10 min
4	Medida de la actividad enzimática inmovilizada	[α-NP] = 4 mM; t_4 = 10 min

Un diseño factorial a dos niveles (alto y bajo) que tenga en cuenta todos estos factores supondría la realización de 2^8=356 experimentos que se convierten en 712 si se tiene en cuenta la necesidad de llevar a cabo, al menos, dos réplicas de cada una de las experiencias. Se trataría de un diseño factorial capaz de aportar información valiosa, aunque excesivamente extenso. Además solamente se podrían ensayar dos niveles, ya que la posibilidad de introducir un tercer nivel (alto, intermedio, bajo) queda totalmente descartada teniendo en cuenta la necesidad de llevar a cabo 3^8=6581 experimentos, sin tener en cuenta las réplicas.

Por esta razón, se decidió fijar los valores para alguna de las variables, basándose en la experiencia previa de la investigadora y se realizó un diseño factorial para los factores que podrían ejercer una mayor influencia sobre la respuesta. Los factores fijados aparecen también reflejados en la Tabla 5.1. Se seleccionó el tiempo de competición de la tobramicina presente en la muestra con la tobramicina inmovilizada sobre la fase sensora por los sitios de unión de ATA en 15 minutos. Este

tiempo se considera suficiente dado la rapidez con la que se produce la interacción entre antibiótico y aptámero (<10 minutos en estudios de SPR; ≤5 minutos mediante medidas de FIS). También se optó por fijar las condiciones relativas a las etapas de marcaje enzimático y de reacción enzimática, empleando valores que aseguran las condiciones de saturación tanto en la etapa de marcaje como de la reacción enzimática.

Los factores que se consideraron más relevantes, a tener en cuenta en el planteamiento del diseño factorial fueron: A: $[ATA]_{competición}$; B: [BATA] y t: tiempo de incubación con BATA (t_{BATA}). Una vez escogidos, se definieron los intervalos de valores a ensayar y los niveles exactos (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Intervalos y niveles para cada uno de los factores seleccionados para llevar a cabo el diseño factorial.

FACTOR	A	B	t
Variable	[ATA] (μM)	[BATA] (μM)	$tiempo_{BATA}$(min)
Intervalo	0,05-1	0,05-5	2-10
Niveles	0,05; 1	0,05; 0,5; 5	2; 6; 10

5.3.3. Planteamiento del diseño factorial.

Se planteó un diseño factorial en el que se varían los tres factores seleccionados al mismo tiempo, de modo que cada experimento se lleva a cabo bajo condiciones diferentes, con valores a tres niveles diferentes para los factores B y t y a dos niveles diferentes para el factor A. Se trata, por lo tanto de un diseño factorial mixto. Para llevar a cabo la aleatorización y la formación de bloques se empleó el programa informático para el tratamiento de datos estadísticos Minitab®. Los valores que toman cada uno de los factores se introducen en el programa informático de forma codificada, siguiendo las claves especificadas en la Tabla 5.3. Se planifican dos réplicas para cada uno de los experimentos.

Tabla 5.3. Codificación correspondiente para cada uno de los niveles que adquieren cada uno de los factores.

Variable	Factor	Nivel	Nivel codificado
[ATA] (µM)	A	0,05	1
		1	2
[BATA] (µM)	B	0,05	1
		0,5	2
		5	3
tiempo$_{BATA}$(min)	t	2	1
		6	2
		10	3

Tabla 5.4. Diseño factorial completo, mixto y aleatorizado.

Orden	Bloque	A	B	t
1	1	1	3	1
2	1	1	1	1
3	1	1	1	3
4	1	1	2	3
5	1	1	3	3
6	1	1	3	2
7	1	1	2	1
8	1	2	2	2
9	1	1	2	2
10	1	2	2	1
11	1	2	3	1
12	1	2	2	3
13	1	2	3	2
14	1	2	1	1
15	1	2	3	3
16	1	2	1	2
17	1	2	1	3
18	1	1	1	2
19	2	2	1	3
20	2	2	3	2
21	2	2	2	2
22	2	2	1	2
23	2	1	3	1
24	2	2	2	1
25	2	2	3	3
26	2	2	1	1
27	2	1	3	2
28	2	1	2	2
29	2	1	1	2
30	2	1	1	1
31	2	2	3	1
32	2	1	1	3
33	2	2	2	3
34	2	1	2	3
35	2	1	2	1
36	2	1	3	3

El programa informático proporcionó un diseño factorial completo, mixto y totalmente aleatorizado (Tabla 5.4) que indica el orden en el que se deberán desarrollar los experimentos. Los dos bloques hacen referencia a las dos réplicas que se registraron para cada una de las combinaciones.

5.3.4. Realización del experimento diseñado.

El protocolo empleado para cada uno de los 36 experimentos resumidos en la Tabla 5.4. se detalla a continuación:

Lavado: una alícuota de 10 μL de las partículas modificadas se somete a dos etapas de lavado con 1 mL de disolución de afinidad con Tween 20® 0,01% durante 2 min y bajo agitación.

Etapa de competición: se incuban las partículas con 1 mL de una disolución que contiene tobramicina 200 μM y la concentración de ATA indicada en el diseño factorial (nivel 1 ó 2) preparadas en la disolución de afinidad que contiene BSA 0,1% durante 15 minutos, bajo agitación.

Lavado: se realizan dos etapas de lavado empleando 1 mL de disolución de afinidad con Tween 20® 0,01% durante 2 min y bajo agitación.

Etapa de rellenado: se lleva a cabo una incubación con 1 mL de una disolución de BATA preparada en la disolución de afinidad con BSA 0,1%. La concentración de BATA y el tiempo de incubación son las indicadas en el diseño factorial.

Lavado: a continuación se realizan dos lavados con 1 mL de la disolución de detección con Tween 20® 0,01% y BSA 1% durante dos minutos, bajo agitación.

Marcaje enzimático: se incuban las partículas con el conjugado enzimático, 1 mL de disolución de $Strep_2$-ALP $4{,}3 \cdot 10^{-3}$ g/mL preparada en la disolución de detección con Tween 20® 0,01% y BSA 1%, durante 10 minutos, bajo agitación.

Lavado y reconstitución: Por último las partículas se lavan dos veces con 1 mL de disolución de detección durante 2 minutos, bajo agitación y, finalmente, se resuspenden en 100 μL de la disolución de detección siendo 0,1 mg/mL su concentración final.

Detección: La reacción enzimática y la detección electroquímica mediante medidas de DPV se llevan cabo sobre SPCEs tal y como se describió previamente.

Se registró la temperatura a la que tiene lugar cada una de las etapas, con el objetivo de cuantificar, *a posteriori*, la influencia que la fluctuación de este parámetro ejerce sobre la variable respuesta.

5.3.5. Análisis de los resultados

La forma más sencilla de comprobar cuál es la influencia de cada uno de los factores e interacciones entre los mismos es la representación gráfica de cómo cambia la respuesta registrada al variar el nivel del factor o interacción estudiada (Figuras 5.4. y 5.5.).

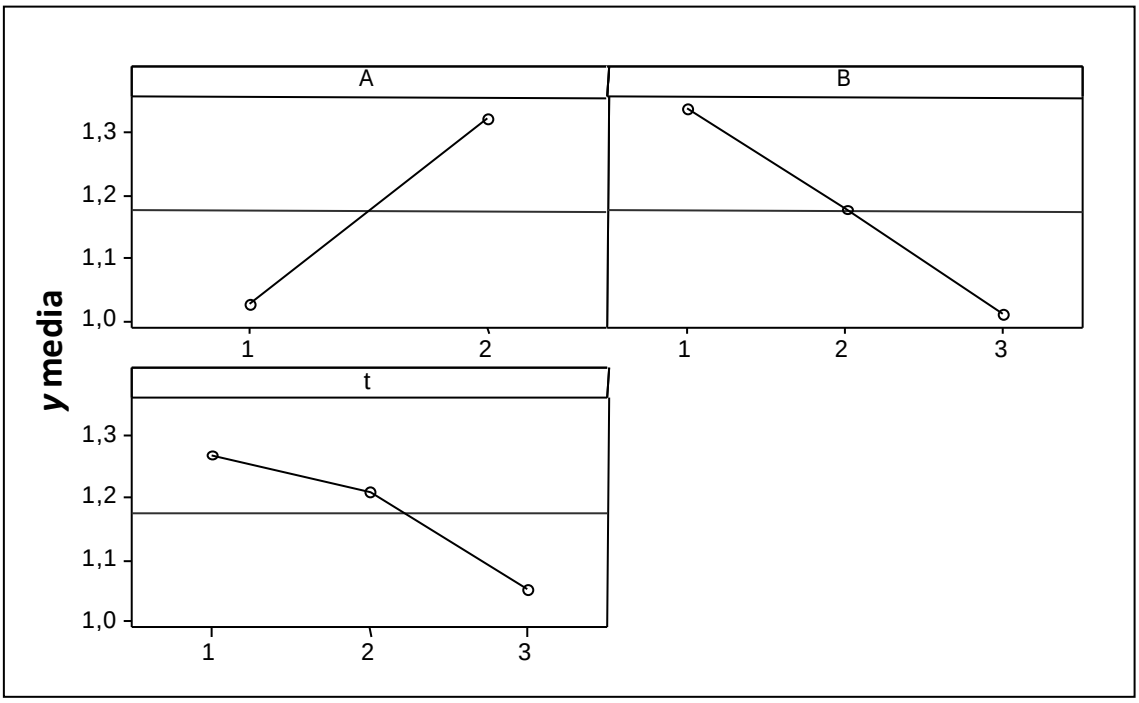

Figura 5.4. Efectos principales de los factores A ([ATA]), B ([BATA]) y t (tiempo$_{BATA}$).

Del análisis de los efectos principales se obtiene que el aumento en la concentración de ATA (factor A) provoca un aumento de la relación señal/ blanco registrada, mientras que un aumento de la concentración de BATA, factor B, o del tiempo de incubación del mismo, ejercen el efecto contrario, es decir, la relación señal/ blanco disminuye. La relación señal/blanco obtenida empleando el nivel bajo de A ([ATA]=0,05 μM) es 1, es decir, no existe diferencia alguna entre la señal específica y el blanco, por lo que la concentración de ATA debe fijarse por encima de este valor.

La representación del valor medio de la variable registrada en función de los niveles ensayados para cada uno de los factores involucrados en el diseño experimental da lugar a la representación de las interacciones (Figura 5.5). La

divergencia o convergencia de las líneas que componen esta representación indica la existencia o no de interacciones entre los factores involucrados.

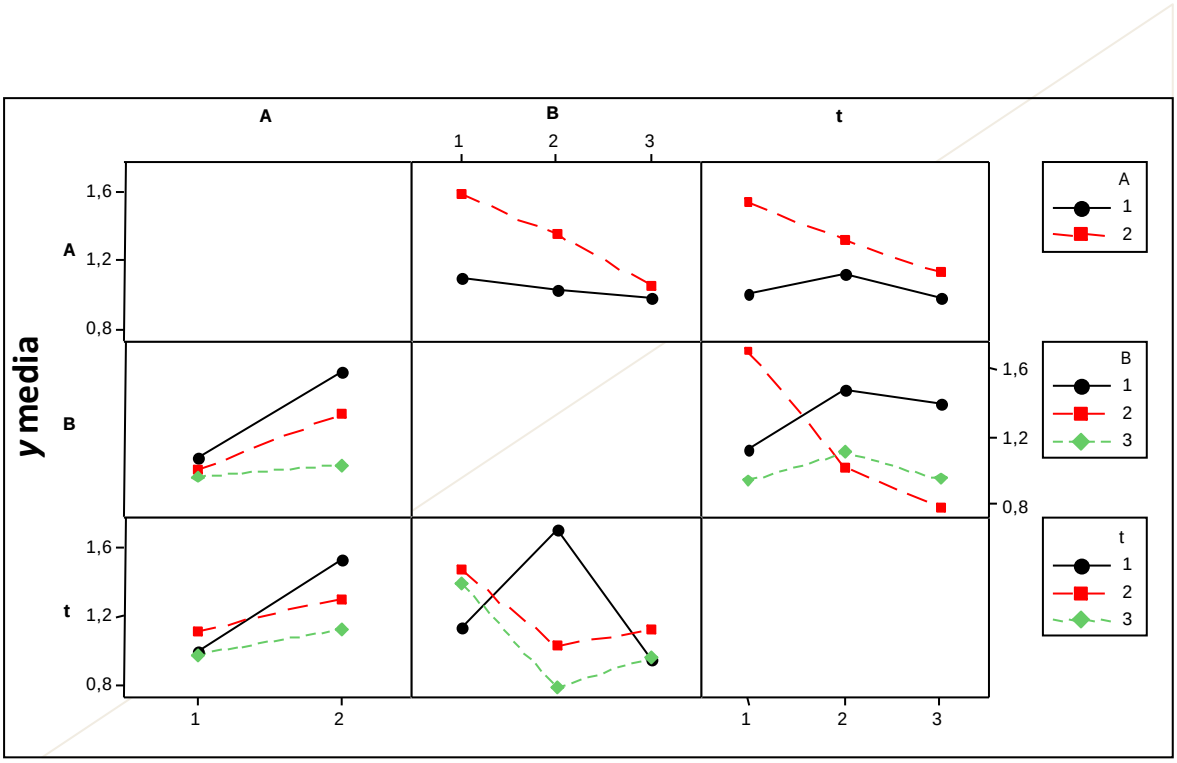

Figura 5.5. Interacciones entre los factores estudiados.

El análisis de los resultados resumidos en la Figura 5.5 pone de manifiesto que:

- El efecto de interacción entre las concentraciones de ATA y BATA empleadas en el ensayo se manifiesta a niveles altos de la concentración de Ata. Por el contrario, al nivel bajo de ATA, la concentración de BATA no afecta a la relación señal / blanco obtenida, que en todos los casos es próxima a 1, es decir, no existe diferencia alguna entre la señal específica y el blanco. Lo mismo sucede para el efecto de la interacción entre la concentración de ATA y el tiempo de incubación de BATA.
- El efecto de interacción más importante es el que se produce entre la concentración de BATA y el correspondiente tiempo de incubación, t. Si la concentración de BATA es elevada (nivel de B=3), la variación del factor t no tiene influencia sobre la respuesta, siendo ésta próxima a 1 (ausencia de diferencia entre señal específica y blanco). Si la concentración de BATA es baja (nivel de BATA=1), la variación del nivel de t tampoco tiene importancia, siendo en este caso *y*~1,3. El valor de t sí influye para el nivel intermedio de

BATA (nivel de BATA=2), de tal modo que la relación señal/ blanco aumenta cuanto menor es el valor de t. Estos datos permiten llegar a la misma conclusión que se llegó tras el análisis de los efectos principales: a mayor interacción con el aptámero biotinado, ya sea en términos de concentración o de tiempo de incubación, menor es la magnitud de la relación señal /blanco. Cabe resaltar que para alguna de las combinaciones de factores ensayadas la relación señal/blanco llega incluso a ser inferior a 1, lo que parece indicar que bajo estas condiciones el aptámero marcado no sólo se enlaza a las moléculas de tobramicina presentes sobre la superficie de las partículas, sino que es capaz de desplazar una parte de las moléculas de ATA que se habían enlazado previamente.

Para valorar si la influencia de los diferentes factores estudiados es significativa desde el punto de vista estadístico, se utilizó el análisis de la varianza(ANOVA) de los mismos, mediante el programa informático Minitab®(Tabla 5.5).

Tabla 5.5. Cálculo ANOVA para el proceso bajo estudio proporcionado por el programa de análisis estadístico Minitab®.

Fuente	GL	SC	CM	F	p
Bloques	1	0,3143	0,3143	1,36	0,259
A	1	0,7903	0,7904	3,43	0,082
B	2	0,6460	0,3230	1,40	0,274
t	2	0,3075	0,1538	0,67	0,526
A*B	2	0,2719	0,1359	0,59	0,566
A*t	2	0,2820	0,1410	0,61	0,554
B*t	4	1,8603	0,4651	2,02	0,138
A*B*t	4	0,8751	0,2188	0,95	0,460
Error	17	3,9211	0,2307		
Total	35	9,2685			

GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados de los residuales; CM: cuadrado medio.

Atendiendo estrictamente al valor p proporcionado por el cálculo ANOVA correspondiente a cada uno de los términos (efectos principales, interacción entre dos factores e interacción entre tres factores) no se puede rechazar la hipótesis nula, H_0 de que la diferencia entre las respuestas registradas se debe simplemente al azar y no al

cambio de los niveles de los factores. Aunque al nivel de significación α=0,05 ninguno de los efectos parece ser el causante de las diferencias entre las respuestas registradas, si se toma como nivel de significación α=0,1 se consideran significativos el efecto principal debido al factor A, concentración de ATA y la interacción entre los factores B, concentración de BATA y t, cuyo p-valor son 0,082 y 0,138, respectivamente.

Comparando la suma de cuadrados (SC) se observó que el error experimental es elevado, ya que supone un tercio de la variación total (3,9211 frente a 9,2685). Por lo que en este caso se optó por comparar directamente la media de los cuadrados correspondientes a cada factor o interacción estudiados. Realizando ese contraste se llegó a la misma conclusión: el efecto más importante es el efecto principal de A, ya que la media de cuadrados correspondiente al factor, 0,7903, es mayor que la media de cuadrados correspondiente al error experimental, 0,2307. Siguiendo este mismo criterio se comprobó que el siguiente efecto más importante es la interacción B*t cuya suma de cuadrados es 0,4651.

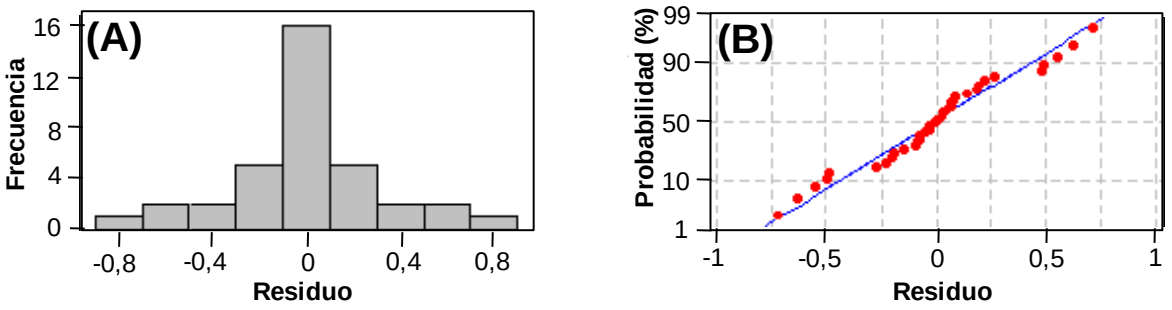

Figura 5.6. Representación de los residuales del cálculo ANOVA: (A) Histograma; (B) Distribución de probabilidad.

Adicionalmente, se verificó que en los resultados obtenidos se cumple la premisa necesaria para poder utilizar un cálculo ANOVA: que los errores sigan una distribución normal e independiente, con media cero y varianza desconocida pero constante ($N(0,\sigma^2)$). El estudio de los residuales (diferencia entre el valor real y el esperado para un determinado punto), representado en el histograma de la Figura 5.6.(A), así como la gráfica de probabilidad normal de los mismos (Figura 5.6. (B)), permiten concluir que los errores siguen una distribución normal.

Por último, y para completar el estudio del diseño factorial propuesto, se evaluó la contribución de la temperatura de incubación en cada una de las etapas, que como se señaló se consideró como factor no controlable, sobre la variable respuesta. Para evaluar si el efecto de cada uno de estos factores no controlables es significativo o no se introdujeron uno a uno en el cálculo ANOVA como co-variables. Si el efecto es significativo, el p-valor correspondiente a la co-variable introducida será menor de α=0,05, y la contribución del error se verá reducida, debido a que se eliminará la contribución de la variación debida al cambio de dicha temperatura. El efecto de la temperatura solamente resultó significativo (p-valor=0,006<0,05) en el caso de la temperatura correspondiente a la etapa de marcaje enzimático. En todos los otros casos el p-valor correspondiente a las co-variables fue muy superior a α=0,05. Esto sugiere que la etapa de marcaje enzimático es clave en el desarrollo de este tipo de sistemas en los que se ven involucradas distintas etapas.

5.4. OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO. MÉTODO DE LA MÁXIMA PENDIENTE.

Una vez se han identificado los diferentes factores e interacciones que afectan a los resultados del ensayo, se utilizó el método de la máxima pendiente para tratar de localizar los valores o niveles de dichos factores que conducen a la máxima respuesta (relación señal/blanco).

5.4.1. Obtención del modelo ajustado de primer orden.

El primer paso en el proceso de optimización es encontrar un modelo que relacione la variable respuesta (relación señal/ blanco) con el conjunto de variables dependientes identificadas: concentración de ATA, concentración de BATA y tiempo de incubación con el aptámero biotinilado. Como primera aproximación se propone utilizar un modelo lineal para ajustar los resultados obtenidos mediante un diseño factorial a dos niveles (alto, +1 y bajo, -1) para los tres factores, al que se añade un punto central, es decir, un tercer nivel que toma un valor intermedio entre el valor alto y el bajo, por lo que se codifica con el valor 0. La adición de este punto central, del que se realizarán 5 réplicas, permite estimar el error experimental y comprobar la adecuación del ajuste al modelo de primer orden.

El punto central, punto inicial de la etapa de optimización, se escoge a partir del diseño factorial descrito en el apartado anterior mediante la utilización del test de Duncan. De esta forma se seleccionó como punto inicial la combinación (212), que descodificando las variables se corresponde con [ATA]=1 μM; [BATA]=0,05μM y $tiempo_{BATA}$=6 minutos. A continuación, se realizó un diseño factorial de dos niveles en el que se varían los tres factores involucrados (Tabla 5.6), seleccionándose las siguientes magnitudes de variación para cada uno de los factores: ΔA=0,5 μM; ΔB=0,01 μM y Δt=1 minuto.

El ajuste por mínimos cuadrados de los resultados de los ensayos realizados según se resume en la Tabla 5.6, permitió obtener un modelo en el que se incluye un término para cada uno de los factores e interacciones de segundo y tercer orden. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.7, donde además se indican los valores de p asignados a cada uno de los coeficientes. Como puede observarse, los términos más significativos del modelo son A, t y A*t ya que llevan asociado los valores p más bajos., aunque todos están por encima de 0,05 y 0,1.

El modelo de ajuste resumido en la Tabla 5.7 (modelo 1) es una expresión compleja, que se trató de simplificar mediante la construcción de un nuevo modelo en el que solamente se incluyeron los tres términos que se consideraron más significativos (modelo 2). Las características de este nuevo modelo de ajuste se resume en la Tabla 5.8.Como puede observarse, el modelo 2ajusta mejor los datos registrados para el diseño factorial de dos niveles, el p-valor del ajuste es menor que el del modelo 1 y los tres coeficientes son significativos. Por tanto, se consideró que la ecuación que describe la respuesta del proceso en el estadio inicial del proceso de optimización es:

$$y=(1,4\pm0,2)+(0,5\pm0,3)\cdot A-(0,5\pm0,3)\cdot t-(0,5\pm0,3)\cdot At \quad \text{ec. (5.1)}$$

La superficie de respuesta descrita por la ecuación 5.1 da lugar a la representación gráfica de las curvas de nivel (Figura 5.7). Teniendo en cuenta el código de colores de esta representación, donde los colores cálidos hacen referencia a una mayor *y* registrada, se observa que la optimización debe realizarse de modo que se disminuya el nivel de t y aumente el de A.

Tabla 5.6. Diseño factorial a dos niveles que incluye un punto central.

Experimento	Variables			Variables Codificadas			Respuesta, y
	[ATA] (μM)	**[BATA] (μM)**	**tiempo$_{BATA}$(min)**	**A**	**B**	**t**	
1	1,5	0,04	7	1	-1	1	0,808
2	0,5	0,06	7	-1	1	1	0,940
3	1,5	0,06	7	1	1	1	1,067
4	0,5	0,04	5	-1	-1	-1	1,376
5	0,5	0,06	5	-1	1	-1	0,775
6	1,5	0,06	5	1	1	-1	2,697
7	1,5	0,04	5	1	-1	-1	3,490
8	0,5	0,04	7	-1	-1	1	1,154
9	1	0,05	6	0	0	0	0,826
10	1	0,05	6	0	0	0	2,314
11	1	0,05	6	0	0	0	1,032
12	1	0,05	6	0	0	0	1,009
13	1	0,05	6	0	0	0	0,653

Tabla 5.7. Modelo de ajuste lineal para el diseño factorial de dos niveles con puntos centrales.

Coeficientes	**Valor estimado**	**Desviación estándar**	**p**
Ordenada en el origen	1,35369	0,21652	0,00153
A	0,47700	0,27601	0,14425
B	-0,16825	0,27601	0,56877
t	-0,54625	0,27601	0,10470
A*B	0,03525	0,27601	0,90335
A*t	-0,53175	0,27601	0,11198
B*t	0,18000	0,27601	0,54309
A*B*t	0,08300	0,27601	0,77573

Tabla 5.8. Modelo de ajuste lineal para el diseño factorial de dos niveles con puntos centrales teniendo en cuenta los términos más significativos (modelo 2).

Coeficientes	**Valor estimado**	**Desviación estándar**	**p**
Ordenada en el origen	1,3537	0,1754	$2{,}95 \cdot 10^{-5}$
A	0,4770	0,2235	0,0616
t	-0,5462	0,2235	0,0371
A*t	-0,5317	0,2235	0,0413

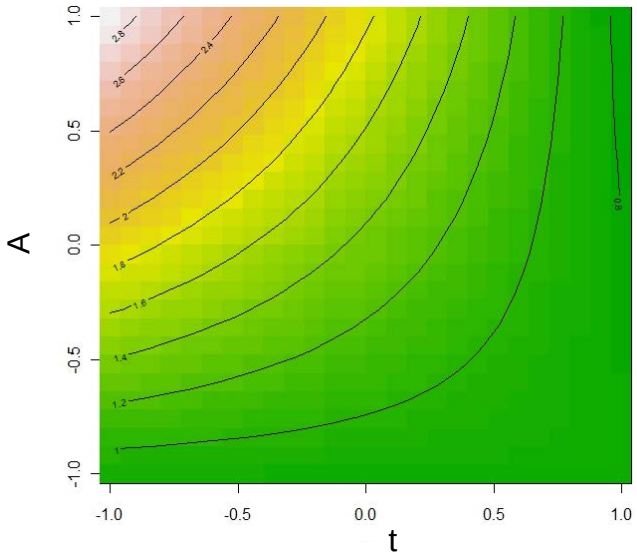

Figura 5.7. Representación gráfica de las curvas de nivel correspondiente a la superficie de respuesta descrita por el modelo 2 de ajuste.

5.4.2. Realización de experimentos a lo largo de la dirección de la máxima pendiente.

El método de la máxima pendiente es un procedimiento que permite moverse secuencialmente sobre la trayectoria del ascenso más pronunciado, es decir, en la dirección del incremento máximo de la respuesta. En este caso y atendiendo a los coeficientes de la expresión 5.1., el ascenso más pronunciado se consigue moviéndose 0,5 unidades codificadas de A por cada -0,5 unidades codificadas de t.

Para llevar a cabo los experimentos a lo largo de esta trayectoria es necesario descodificar las variables, de modo que el tamaño del paso a realizar para uno de los factores lo decide el experimentador, mientras que el valor del paso para el otro factor viene dado por la expresión de ajuste del modelo. En este caso se decidió tomar como paso para la variable t Δt=-1 minuto, que se corresponderá con una variación de ΔA=+0,435 μM en la concentración de ATA. Se realizaron experimentos variando los factores A y t de modo que en cada nuevo experimento se disminuye 1 minuto el tiempo de incubación de BATA y se aumenta en 0,435 μM la concentración ATA, hasta que se deje de observar un incremento en la respuesta registrada, *y*. El punto inicial fue el (212), punto central del diseño factorial. En la figura 5.8 se representa la señal registrada para cada uno de los experimentos realizados siguiendo la trayectoria de la

máxima pendiente a lo largo de la superficie de respuesta. El máximo de la respuesta se observó al llevar a cabo 3 pasos, de modo que se seleccionaron dichas condiciones como las óptimas para desarrollar el ensayo.

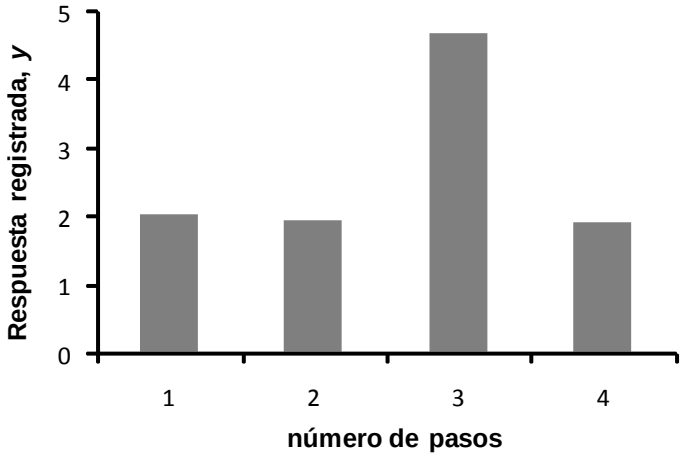

Figura 5.8. Respuesta registrada para cada uno de los pasos llevados a cabo durante el proceso de optimización siguiendo la trayectoria de la máxima pendiente.

La descodificación de las variables proporciona las condiciones seleccionadas como óptimas: [ATA]=2,35 μM; [BATA]=0,05 μM y tiempo$_{BATA}$=3 minutos.

En estas condiciones se llevó a cabo el ensayo para concentraciones crecientes de tobramicina (0-400 μM) y se representó la intensidad de corriente registrada frente a la concentración de tobramicina ensayada (Tabla 5.9). Se observó que el ensayo no responde a la concentración de tobramicina. Se contempló, entonces, la posibilidad de que el ensayo fuese válido en un intervalo superior de concentraciones de tobramicina (0-50 mM). Al igual que en el caso de los ensayos realizados en un intervalo de concentraciones de tobramicina bajas, tampoco en este caso se observó variación de la relación señal/blanco con la concentración de analito (Tabla 5.10).

El valor correspondiente al blanco fue elevado en ambos casos. Esto se puede deber a que el aptámero biotinilado desplaza al aptámero anti-tobramicina sin modificar, de modo que en ausencia de tobramicina la señal registrada es mayor o igual a la registrada en presencia del analito. Este efecto se producirá si el aptámero biotinilado presenta una mayor afinidad por la tobramicina que el aptámero sin marcar, lo que invalidaría el esquema de ensayo propuesto.

Tabla 5.9. Variación de la intensidad de corriente con la concentración de tobramicina.

[tobramicina] (μM)	I (μA)
0	0,69
1	0,54
10	0,34
100	0,69
200	1,13
400	0,39

Tabla 5.10. Variación de la intensidad de corriente con la concentración de tobramicina.

[tobramicina] (mM)	I (μA)
0	0,65
0,2	1,31
0,5	0,78
1	0,65
10	0,41
50	0,46

5.5. EVALUACIÓN DE LA AFINIDAD DEL COMPLEJO APTÁMERO BIOTINILADO (BATA)-TOBRAMICINA

A lo largo del presente capítulo se ha propuesto un esquema de ensayo que permite la obtención de una curva de respuesta creciente para la determinación de la tobramicina. Sin embargo, las condiciones que se localizaron como óptimas no permitieron distinguir entre concentraciones diferentes de tobramicina. La invalidez del ensayo podría radicar en un resultado no esperado: la mayor afinidad del aptámero marcado con biotina por el analito, la tobramicina, que la exhibida por el aptámero anti-tobramicina no marcado (K_D=130±20 nM). Esto implicaría la posibilidad de que BATA desplace a ATA de la superficie y explicaría la obtención de señales elevadas del blanco en comparación con las obtenidas para distintas concentraciones de tobramicina. Con el objetivo de confirmar este supuesto se caracterizó la interacción del aptámero anti-tobramicina biotinilado, BATA, hacia su molécula diana, la tobramicina mediante el cálculo de sus constantes cinéticas y de disociación y los valores obtenidos se compararon con los correspondientes al aptámero anti-tobramicina, ATA, calculadas previamente en este trabajo.

La fase sensora empleada para llevar a cabo las medidas de SPR es idéntica a la diseñada para la caracterización de los tres aptámeros anti-tobramicina con distinto grado de metilación descrita en el capítulo 3 del presente trabajo. Ésta consistió en la inmovilización covalente de la tobramicina sobre una monocapa autoensamblada SAM de ácido mercaptopropanoico formada sobre una superficie de oro a través de su reacción con carbodiimida. El equipo empleado posee dos canales, de modo que en el segundo canal, que actúa como canal de referencia, se inmovilizó solamente etanolamina (ver protocolo detallado en el apartado 3.5.2).

5.5.1. Medidas de SPR.

La fase sensora construida se empleó para llevar a cabo las medidas de SPR mediante el registro de sucesivos ciclos de análisis para distintas concentraciones de aptámero anti-tobramicina biotinado, BATA (0,05-2 μM) siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3.6. Normalmente, la regeneración completa de la fase sensora requiere varias etapas de adición de una solución ácida (HCl 0,05 M). Sin embargo, cuando el sensor se pone en contacto por primera vez con una disolución de BATA, las sucesivas etapas de regeneración no permiten eliminar por completo el material enlazado sobre la

superficie, de modo que se produce un aumento irreversible de la señal registrada de 20-40 m^0. Teniendo en cuenta las especificaciones del equipo (una variación de 120 m^0 se corresponde con 1 $ng \cdot mm^{-2}$ de proteína) y el incremento en el índice de refracción (IIR) entre la proteína y el oligonucleótido (0,81 $ng \cdot mm^{-2}$)[137] se calculó que la cantidad de BATA que no se elimina de la superficies e encuentra entre 135-270 $pg \cdot mm^{-2}$. Por el contrario, tras sucesivas etapas de interacción con disoluciones de distinta concentración de BATA, sí es posible la completa regeneración de la fase sensora hasta el valor residual dejado por la primera adición. Esto sugirió que la molécula de biotina introducida como marca en la secuencia del aptámero anti-tobramicina actúa como bloqueante de las posibles imperfecciones de la SAM formada sobre la superficie del oro, ya que es capaz de quimisorberse sobre ella por medio del átomo de azufre que posee en su estructura. Con el objetivo de evitar este efecto, tras la formación de la fase sensora, y antes de que tenga lugar la interacción con BATA, se llevaron a cabo sucesivas inyecciones de una disolución de biotina 500 μM preparada en la disolución de afinidad (50 μL) hasta que se registró una señal constante. Esta etapa de bloqueo de las imperfecciones o “pinholes” de la SAM supuso un aumento de la señal de 5-10 m°. Este incremento de la señal es menor que el registrado tras el bloqueo de la SAM con BATA ya que su menor peso molecular da lugar a un cambio de señal menor. La correspondencia en masa de la cantidad de biotina introducida fue de 47-94 $pg \cdot mm^{-2}$. Tras esta etapa de bloqueo, se inyectaron disoluciones de concentración creciente de BATA para llevar a cabo la evaluación de su afinidad. La introducción de BATA en la cubeta de medida da lugar a un aumento de la señal en el canal 1, donde se ha inmovilizado tobramicina (Figura 5.9. línea continua), debido a la formación del complejo de afinidad BATA-tobramicina, mientras que en el canal de referencia, canal 2, la adición de BATA no provoca cambio alguno en la señal (Figura 5.9 línea discontinua) debido a la nula afinidad del aptámero por la fase sensora carente del antibiótico.

También en este caso se observa un aumento tanto de la pendiente del aumento del ángulo de resonancia (R_t) como de la señal registrada en el equilibrio (R_{eq}) al aumentar la concentración de la disolución de aptámero ensayada (Figura 5.10.). Esto indica que la cantidad de complejo aptámero-tobramicina inmovilizada que se ha formado es también mayor.

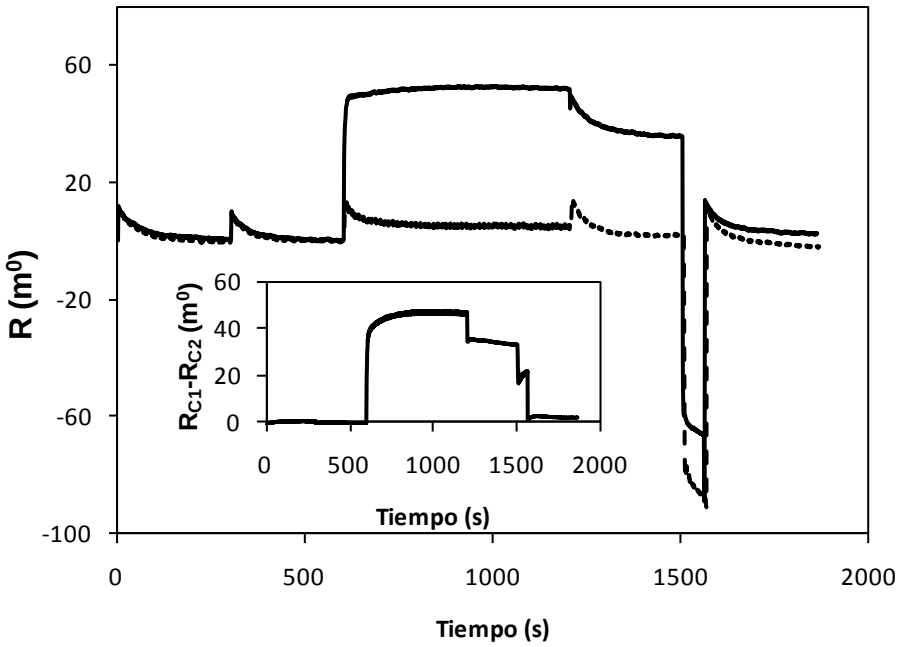

Figura 5.9. Sensorgramas que muestran un ciclo de análisis completo correspondiente a la interacción entre una superficie modificada con tobramicina (canal 1, línea sólida) o una superficie modificada con etanolamina (canal 2, línea de puntos) con BATA 0,75 µM. En el recuadro se muestra la diferencial, obtenida restando a la señal del canal 1 la del canal 2.

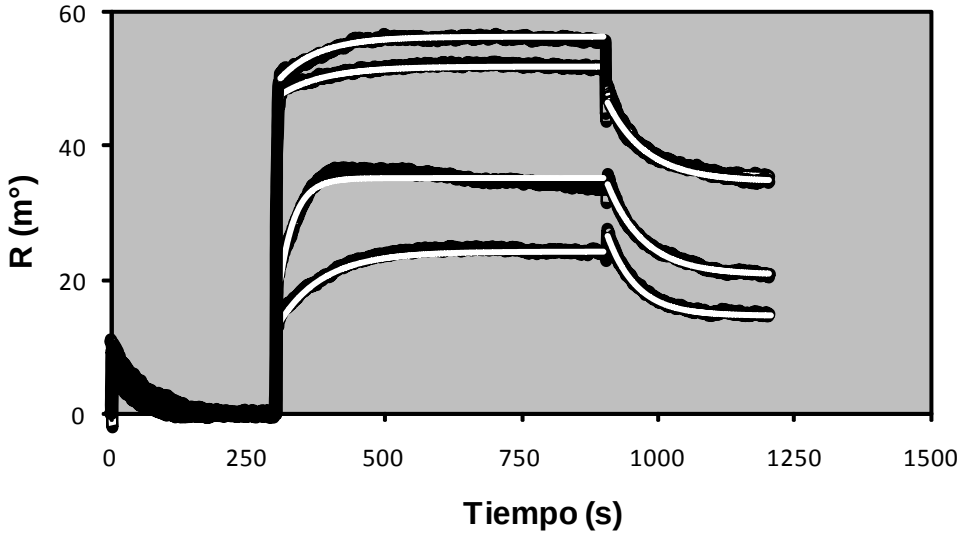

Figura 5.10. Superposición de sensorgramas de SPR correspondientes a la adición de BATA (a) 0,075; (b) 0,15; (c) 0,75 y (d) 1 µM; (líneas negras) en la disolución de afinidad. Ajuste no-lineal a la fase de asociación (líneas blancas).

5.5.2. Interpretación de los datos SPR obtenidos: Cálculo de las constantes cinéticas y de disociación.

Los datos de SPR registrados se emplearon para calcular las constantes cinéticas y de equilibrio. La interpretación de estos datos requiere llevar a cabo un ajuste no-lineal de la fase de asociación suponiendo una reacción bimolecular de estequiometría 1:1 (Figura 5.1). A partir de este ajuste se obtienen los parámetros necesarios para llevar a cabo tanto un análisis de equilibrio que permita el cálculo de la constante de disociación como un análisis cinético que permite evaluar las constantes cinéticas. Adicionalmente, el análisis cinético permitirá realizar una estimación de la constante de disociación que se deberá comparar con la constante calculada por el método de equilibrio, con el objetivo de comparar la validez del método.

5.5.2.A. Análisis de equilibrio.

El ajuste no lineal de la fase de asociación a la ecuación (3.6) permite la estimación del valor de la señal en el equilibrio (R_{eq}) para cada una de las concentraciones de BATA ensayadas. Al representar R_{eq} frente a la concentración de aptámero libre, $[BATA]_{libre}$, y ajustar dicha representación a la expresión de la isoterma de enlace de Langmuir (ec. 3.10; Figura 5.11) se obtiene un valor de K_D de 80±30 nM.

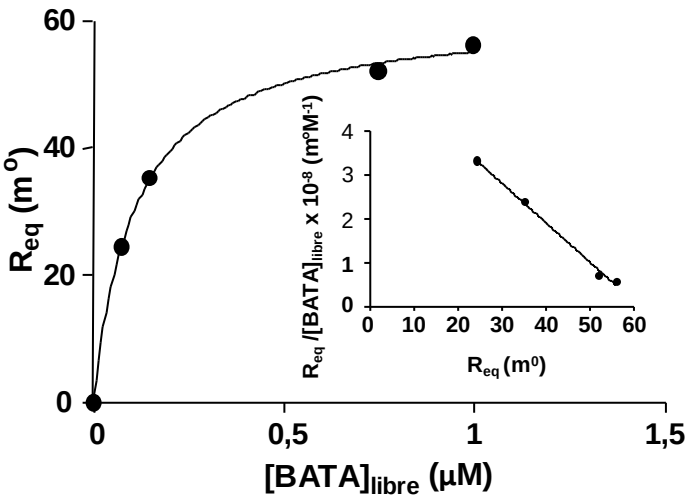

Figura 5.11. Isoterma de enlace de Langmuir obtenida incubando la fase sensora modificada con tobramicina con concentraciones crecientes de BATA en disolución de afinidad durante 10 min.

Otro modo habitual de calcular la constante de disociación, K_D, es la linealización de la ecuación (3.10) (recuadro de la figura 5.11), con lo que se obtiene la ecuación de Scatchard descrita por la expresión: $R_{eq}/[BATA]_{libre}$ $(m°M^{-1})=-(90\pm5)\cdot10^5(M^{-1})$ + $(55\pm3)\cdot10^7$ $(m°M^{-1})$; r=0,997. El valor de K_D calculado como el valor inverso de la pendiente de la ecuación, K_A; fue 80±30 nM, el cual coincide con el valor estimado mediante la representación de Langmuir.

5.5.2.B. Análisis cinético.

Los datos de SPR fueron también interpretados desde un punto de vista cinético. Del mismo ajuste de la fase de asociación se halló el valor de k_s para cada una de las concentraciones ensayadas.

La pendiente de la representación de k_s frente a la concentración de aptámero libre, $[BATA]_{libre}$ en el equilibrio corresponde al valor de k_a. El valor de k_d se obtuvo a partir de un ajuste no lineal a la fase de disociación de cada uno de los sensorgramas según el modelo expresado mediante la ecuación (3.13), tal y como se explicó en el apartado 3.7.2

Otro método de calcular la k_d es la utilización de la expresión $k_d=K_D\cdot k_a$, donde K_D es la constante de disociación calculada mediante el análisis de equilibrio Una vez estimadas las constantes cinéticas, se evaluó la constante de disociación K_D mediante la expresión $K_D=k_d/k_a$, donde k_d es la constante de cinética de disociación obtenida del ajuste no lineal a la fase de disociación y k_a es la constante cinética de asociación obtenida del ajuste no lineal a la fase de asociación. En la Tabla 5.11 se resumen los diferentes valores de las constantes obtenidos.

Tabla 5.11. Valores calculados para los parámetros cinéticos y la constante de disociación correspondiente para el aptámero BATA mediante el análisis cinético.

ANÁLISIS CINÉTICO BATA			
k_a $(Ms)^{-1}$	k_d $(s^{-1})^a$	k_d $(s^{-1})^b$	K_D (nM)
$(41\pm5)\cdot10^4$	0,0161±0,0003	0,03±0,02	40±5

[a] k_d calculada a partir del ajuste a la fase de disociación.

[b] k_d calculada a partir de la expresión $k_d=K_D\cdot k_a$.

Para comprender de qué modo se ve afectada la afinidad del aptámero anti-tobramicina, ATA, como consecuencia de la introducción de una molécula de biotina en su extremo 5´ se compararon las constantes cinéticas y de disociación calculadas para el aptámero biotinilado, con las evaluadas en el capítulo 3 del presente trabajo para aptámeros anti-tobramicina que presentan diferentes grados de metilación (Tablas 3.2 y 3.3).

La afinidad del aptámero anti-tobramicina modificado en todas sus bases excepto en la base U12 presentó una constante de disociación de 116 nM y 130 nM calculada mediante el método de Scatchard y la isoterma de Langmuir, respectivamente. La adición de una molécula de biotina en su extremo 5´ provocó una disminución del valor de K_D cuyo valor calculado mediante ambos métodos de equilibrio fue 80 nM, lo que se traduce como un aumento de la afinidad. De hecho, esta K_D es del orden de la calculada previamente para el aptámero anti-tobramicina natural sin modificar ATATM. El mismo efecto se observa atendiendo a los datos del análisis cinético. La constante cinética de asociación aumenta de $1{,}2\times 10^5$ $(Ms)^{-1}$ a $4{,}1\times 10^5$ $(Ms)^{-1}$ tras la incorporación de la molécula de biotina, lo que indica una mayor afinidad del aptámero marcado por su molécula diana en comparación con su análogo sin marcar.

Se puede concluir que la introducción de una molécula de biotina en la secuencia del aptámero parcialmente metilado ATA, aumenta ligeramente su afinidad por la tobramicina. A pesar de no ser muy pronunciado, de hecho es menor de un orden de magnitud, este aumento de la afinidad podría ser la causa de la invalidez del ensayo propuesto a lo largo del presente capítulo.

6. APTAENSAYOS DE INHIBICIÓN PARA TOBRAMICINA

En el capítulo anterior se discutió la posibilidad de realizar un ensayo competitivo de señal creciente para la determinación de tobramicina. Dicho ensayo requería el empleo de un aptámero anti-tobramicina marcada con biotina, que resultó tener más afinidad por el antibiótico que el propio aptámero ATA con el que debía competir, por lo que esta estrategia tuvo que descartarse. En este capítulo se propone un esquema de ensayo alternativo usando también el aptámero biotinilado y amplificación enzimática, pero con un formato de inhibición, que proporciona una señal analítica decreciente con la concentración ("signal-off"). Como fase sensora se empleó la diseñada en el capítulo 5, consistente en la inmovilización covalente de tobramicina sobre micropartículas magnéticas, aprovechando su facilidad de manejo, con la salvedad de que no se recubrieron con aptámero previamente a la realización del ensayo.

6.1. INTRODUCCIÓN.

A pesar de la elevada afinidad que aportan los aptámeros como receptores moleculares, en muchos casos ésta no es suficiente para alcanzar la detección de los niveles de concentraciones requeridos en la detección de numerosos analitos, especialmente los de menor tamaño. Con el objetivo de mejorar las características analíticas de dichos ensayos se han desarrollado diversas estrategias de amplificación de la señal.

Dentro de los ensayos que emplean una detección electroquímica, cabe destacar las estrategias de amplificación basadas en el empleo de nanopartículas metálicas[75,102] (Pt[82], Au[108]) o, semiconductoras[99,115], en las cuales la nanopartícula puede aumentar el número de moléculas de aptámero inmovilizadas o actuar como catalizador de una reacción que involucre una especie electroactiva. Sin embargo, las marcas más ampliamente utilizadas en la literatura tanto en la amplificación de immuno y genoensayos como aquellos que emplean aptámeros como elementos de reconocimiento son sin duda, las enzimas. Las marcas enzimáticas permiten la transformación de un sustrato no electroactivo en un producto capaz de ser detectado electroquímicamente. La amplificación de la señal se debe a que una sola marca enzimática es capaz de transformar gran cantidad de sustrato en su correspondiente producto, aumentándose de este modo la cantidad de especie electroquímicamente detectable. Aunque los enzimas pueden enlazarse directamente al oligonucleótido[175], lo

más conveniente suele ser la unión indirecta a través de reacciones de afinidad, para dar mayor estabilidad al aducto aptámero-enzima y para obtener resultados reproducibles.

Una de las reacciones de afinidad más ampliamente empleadas es el enlace estreptavidina-biotina, debido a su elevada constante de afinidad (K_a~$10^{15}M^{-1}$), lo que proporciona una unión estable de la marca enzimática. Habitualmente, la molécula en la que se quiere introducir la marca, por ejemplo el aptámero, se modifica con biotina, mientras que la enzima que interesa introducir se conjuga con estreptavidina, formando el denominado conjugado enzimático. Este sistema se caracteriza por la multivalencia que aporta la estructura tetramérica de la estreptavidina, ya que una sola molécula de estreptavidina puede unirse, potencialmente, a cuatro unidades de biotina. Numerosos trabajos en los que se emplean aptámeros como receptores de afinidad hacen uso de este sistema de marcaje para introducir una marca enzimática[46,116,176].

Además del sistema estreptavidina-biotina, existen otras estrategias alternativas que permiten la introducción de marcas enzimática basándose en la reacción antígeno-anticuerpo. Un ejemplo de estos sistemas es el formado por la molécula isotiocianato de fluoresceína (FITC) y el fragmento Fab correspondiente al anticuerpo anti-FITC. El fragmento Fab comprende uno de los dos sitios de unión que componen un anticuerpo completo, por lo que dicho fragmento solamente es capaz de unirse a una molécula de su correspondiente antígeno, FITC con la elevada afinidad característica de los anticuerpos. Otra posibilidad consiste en usar como antígeno la digoxigenina que es reconocida por el correspondiente fragmento Fab anti-digoxigenina[177]. En este capítulo se propone estudiar diferentes estrategias de introducción de marca enzimática, concretamente la estreptavidina-biotina y la que emplea la molécula de FITC con el propósito de seleccionar aquella que proporcione las mejores características analíticas en asociación a un formato de ensayo de inhibición electroquímico que permita la detección de tobramicina en muestras de suero.

6.2. FORMATO DE ENSAYO DE INHIBICIÓN SOBRE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS.

El uso de las partículas magnéticas en el desarrollo del aptasensor de señal creciente resultó altamente satisfactorio por su facilidad de manejo y separación de disoluciones involucradas en las sucesivas etapas de interacción y lavado. Por ello,

parece razonable partir de la misma fase sensora diseñada en el capítulo 5, para diseñar un ensayo de inhibición para la determinación de tobramicina.

Un ensayo de inhibición para moléculas pequeñas es un ensayo competitivo en el que la presencia de analito inhibe la formación del complejo de afinidad en superficie (sobre la fase sensora), donde está inmovilizado el propio analito. En el caso que nos ocupa, el ensayo se llevaría a cabo utilizando una fase sensora consistente en la inmovilización covalente de la tobramicina sobre partículas magnéticas y posterior incubación con una disolución compuesta por el aptámero, en concentración limitante y fija, y concentraciones variables de tobramicina. Cuanto mayor sea la concentración de ésta última, menor será la cantidad de aptámero que quede libre para enlazarse a la tobramicina inmovilizada, es decir, mayor será la inhibición de la formación del complejo de afinidad. Consecuentemente se obtiene una respuesta decreciente con la concentración de antibiótico o ensayo “signal-off”.

Como elemento de reconocimiento molecular se seleccionó el aptámero anti-tobramicina parcialmente metilado (ATA). Como el evento de reconocimiento molecular no genera ninguna señal electroquímica medible, se hace necesario incorporar al ensayo algún tipo de marca, que en este caso será enzimática. Entre la variedad de marcajes existentes comercialmente para los ácidos nucleicos no se encuentran los enzimáticos directos, por lo que se decidió explorar varios sistemas indirectos, que proporcionen una unión estable: el basado en la unión estreptavidina-biotina, ya empleado en el capítulo 5 y el sistema isotiocianato de fluoresceína (FITC)–fragmento Fab anti-FITC. En ambos casos el esquema de ensayo empleado fue idéntico, diferenciándose únicamente en la marca introducida en el aptámero ATA. En el primer caso, ATA se modificó con una molécula de biotina en su extremo 5´ (BATA), siendo la estreptavidina-enzima el conjugado enzimático. En el segundo caso, ATA se modificó en su extremo 5´con una molécula de FITC (FITC-ATA), siendo el conjugado enzimático el fragmento-Fab anti-FITC-enzima.

En la figura 6.1 se representan esquemáticamente las etapas del ensayo propuesto.

Etapa de competición entre la tobramicina inmovilizada sobre las partículas magnéticas y concentraciones crecientes de tobramicina en disolución por el sitio de

unión del aptámero anti-tobramicina modificado en su extremo 5´ con biotina o FITC (etapa 1 en Figuras 6.1 A y B).

Etapa de marcaje enzimático o incubación con el conjugado correspondiente según el sistema de marcaje empleado (etapa 2 en Figuras 6.1.A. y B)

Etapa de detección de la actividad enzimática enlazada mediante voltametría de pulso diferencial (DPV), tras adición del sustrato enzimático sobre SPCEs en ambos casos (etapa 3 en Figuras 6.1.A y B).

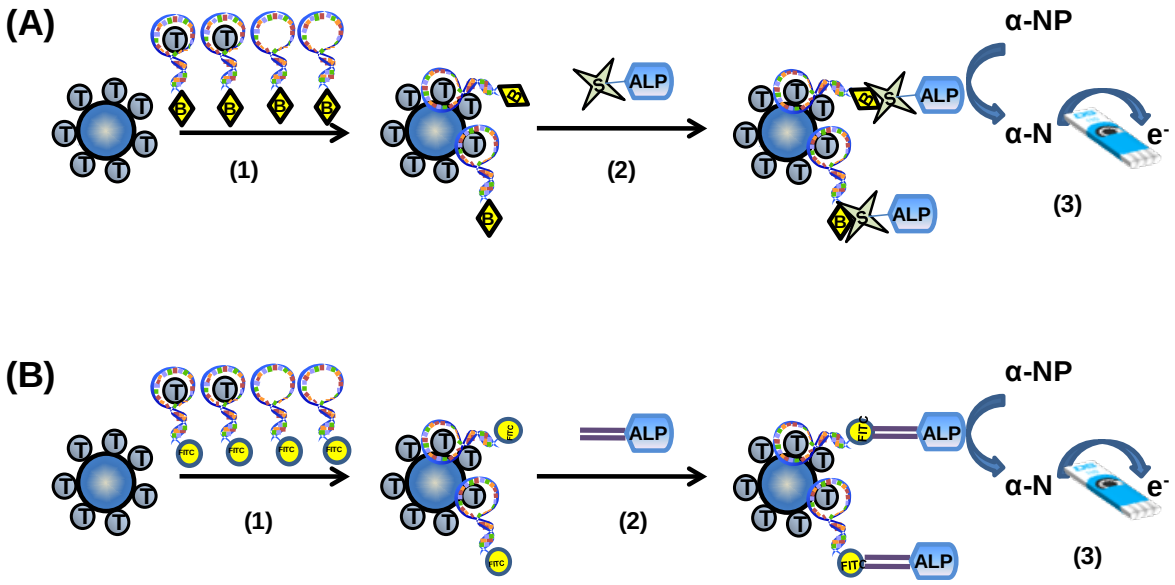

Figura 6.1. Representación esquemática del ensayo propuesto empleando el sistema de marcaje (A) estreptavidina-biotina y (B) FITC-anti-FITC fragmento-Fab.

6.3. APTAENSAYO DE INHIBICIÓN EMPLEANDO EL SISTEMA DE MARCAJE ESTREPTAVIDINA-BIOTINA.

Inicialmente se intentó trasladar el ensayo de desplazamiento descrito en el capítulo 4 del presente trabajo sobre electrodos de oro a la nueva fase sensora, que en este caso, estaría formada por las partículas magnéticas modificadas con tobramicina, y recubiertas de aptámero biotinilado en una etapa previa al ensayo propiamente dicho. Se espera que la reacción receptor-analito provoque un desplazamiento del aptámero en superficie hacia la disolución inversamente proporcional a la concentración de tobramicina en la muestra. Al igual que en el capítulo anterior, la enzima empleada fue

la fosfatasa alcalina, por lo que el conjugado fue $Strep_2$-ALP y el sustrato el α.NP. Sin embargo, al contrario de lo que se observó para el ensayo impedimétrico, no se observó desplazamiento del aptámero BATA por parte del antibiótico presente en disolución, lo que imposibilitó la aplicación de este formato de ensayo, ya que las intensidades de corriente medidas en ausencia y en presencia de tobramicina en concentración variable fueron virtualmente idénticas dentro del error experimental. Este hecho podría explicarse con los datos obtenidos en la caracterización de la interacción BATA-tobramicina realizada en el capítulo 5, donde se encontró que la introducción de una molécula de biotina en la secuencia del aptámero ATA, aumenta ligeramente su afinidad por la tobramicina. Según estos resultados, el complejo de afinidad en superficie sería más estable que el complejo en disolución, lo que impediría el desplazamiento esperado e inhabilita este formato de ensayo para la detección de tobramicina.

Por tanto, se decidió llevar a cabo el formato de inhibición tal y como se describió anteriormente. El protocolo seguido fue el siguiente:

Las partículas se modificaron siguiendo el protocolo detallado en el apartado 5.3.

Lavado: una alícuota de 10 μL de las partículas modificadas con tobramicina (0,1 mg/mL) se sometieron a dos etapas de lavado con 1 mL de disolución de afinidad que contiene Tween 20® 0,01% durante 2 min y bajo agitación.

Inhibición: las partículas se incubaron con 1 mL de una disolución que contiene BATA en ausencia (blanco) o en presencia de tobramicina preparada en la disolución de afinidad que contiene BSA 0,1% durante 15 minutos, bajo agitación.

Lavado: se realizaron 2 lavados con 1 mL de la disolución de detección que contiene Tween 20® 0,01% y BSA 1% durante 2 min.

Marcaje enzimático: se incubaron las partículas con 1 mL de $Strep_2$-ALP $4{,}3 \cdot 10^{-3}$ g/mL preparada en la disolución de detección que contiene Tween 20® 0,01% y BSA 1% durante 10 minutos, bajo agitación.

Lavado y reconstitución: Se realizaron dos lavados con 1 mL de disolución de detección durante 2 minutos, bajo agitación y, finalmente, se resuspendieron en 100 μL de la disolución de detección, siendo 0,1 mg/mL la concentración final de las partículas.

Detección: Una vez realizado el ensayo, se llevó a cabo la reacción enzimática que permitió la detección electroquímica sobre SPCEs. Para ello se tomó una alícuota de 15 μL de las partículas reconstituidas, que se depositaron y fijaron sobre el electrodo de trabajo gracias a la colocación de un imán bajo éste. A continuación se cubrieron los 3 electrodos de la celda electroquímica con 25 μL del sustrato enzimático α-NP preparado en la disolución de detección, siendo la concentración final de sustrato de 4 mM en los 40 μL totales. Tras un tiempo de reacción enzimática se determinó el producto generado enzimáticamente, α-naftol (α-N), mediante DPV.

6.3.1. Optimización del tiempo de reacción enzimática.

En primer lugar, se llevó a cabo la optimización de sendas variables que afectan a la señal analítica registrada. Para estudiar el efecto que ejerce la duración de la reacción enzimática sobre la intensidad de corriente registrada, se varió el tiempo de reacción dentro del intervalo 5 a 30 minutos siguiendo el protocolo descrito. Para cada tiempo ensayado se registraron las señales voltamétricas del blanco (en presencia de BATA 0,5 μM y ausencia de tobramicina) y la correspondiente a una concentración elevada de tobramicina, 100 μM, empleando la misma concentración de BATA (Figura 6.2).

El aumento del tiempo de reacción enzimática dio lugar a un aumento de la corriente registrada tanto para el blanco como para tobramicina 100 μM (Figura 6.2). Este aumento no lineal fue ligeramente más pronunciado en el caso de la muestra que para el blanco, ya que, tras 30 minutos de reacción enzimática la corriente registrada para el blanco se vio incrementada en un 65%, mientras que en la muestra de tobramicina 100 μM este incremento fue del 70%. Se tomó como valor óptimo un tiempo de reacción enzimática de 10 minutos, ya que es el valor que proporciona una mayor diferencia entre ambas señales (blanco y muestra). Los voltagramas DPV se muestran en la figura 6.3.

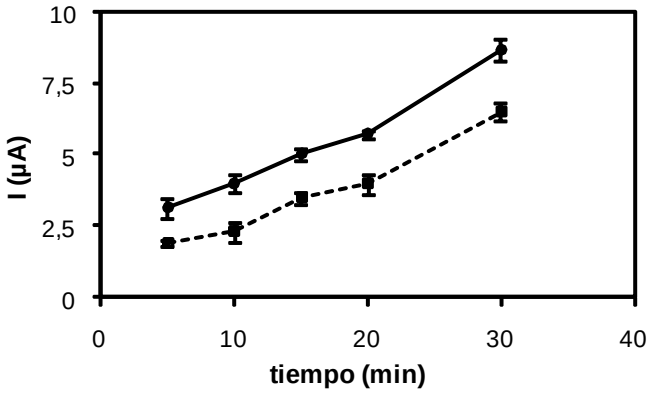

Figura 6.2. Variación de la intensidad de corriente registrada mediante DPV con el tiempo de reacción enzimática para una disolución que contiene BATA 0,5 µM (a) en ausencia (línea continua) y (b) en presencia de tobramicina 100 µM.

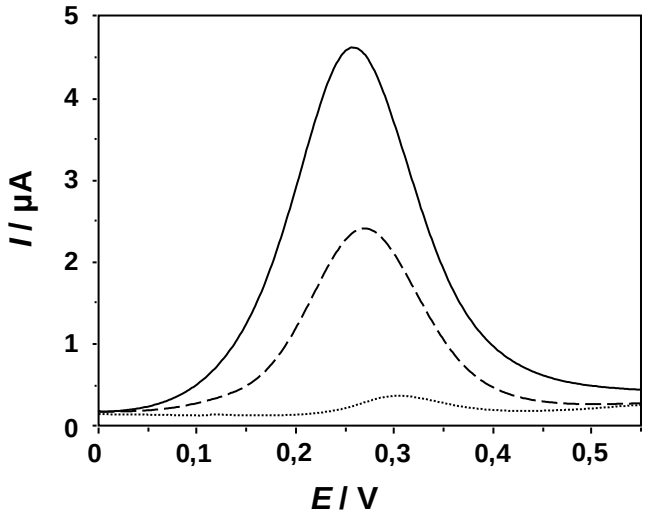

Figura 6.3. Voltagramas DPV obtenidos tras 10 minutos de reacción enzimática empleando BATA 0,5 µM sin tobramicina (línea continua); con tobramicina 100 µM (línea discontinua) y en ausencia de BATA y tobramicina (línea de puntos).

También se evaluó la adsorción no específica del conjugado enzimático sobre las partículas modificadas con tobramicina (Figura 6.3 línea de puntos) Para ello, en la etapa de inhibición no se adicionaron ni aptámero ni tobramicina. La señal no específica registrada fue muy pequeña.

6.3.2. Optimización de la concentración de BATA.

En todo ensayo de inhibición, la selección de la concentración óptima del reactivo limitante, BATA en este caso, es clave para que tenga lugar la competición entre la tobramicina presente en la muestra y la que se encuentra inmovilizada sobre las partículas magnéticas por los sitios de reconocimiento del aptámero, BATA. Aunque no existe una norma general, se acepta en este tipo de ensayos, que la concentración óptima es aquella que da lugar a la ocupación de aproximadamente la mitad de los sitios de enlace, lo que se corresponde con el 50% de la máxima señal[178].

Por tanto, la optimización de este parámetro requiere la obtención de la curva de enlace correspondiente a la unión del aptámero a la fase sensora. Para ello, se llevaron a cabo una serie de experimentos consistentes en la incubación de una cantidad constante de partículas magnéticas modificadas con tobramicina (10 μL, 0,1 mg/mL) con concentraciones crecientes del aptámero. La posterior adición del conjugado enzimático y el sustrato permitió cuantificar la cantidad de moléculas de BATA que se enlazaron en cada caso.

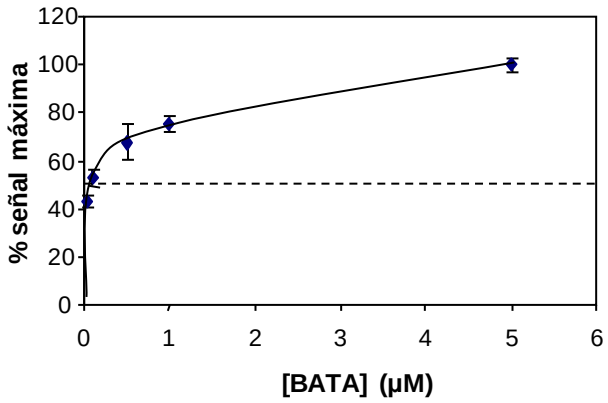

Figura 6.4. Variación de la intensidad de corriente registrada mediante medidas de DPV (expresada en tanto por ciento de la máxima señal) como función de la concentración de BATA.

El protocolo seguido fue idéntico al utilizado para optimizar el tiempo de reacción enzimática, salvo que se varío la concentración de BATA entre 0,05 y5 μM, y se fijó la duración de la reacción enzimática en 10 min para todos los casos. La intensidad de corriente medida para cada concentración de BATA ensayada, expresada en porcentaje de la máxima señal registrada según la expresión $S(\%)=I_{apt.,i}/I_{apt.,max}$ x 100

donde $I_{apt.i}$ y $I_{apt.max.}$ se refieren a las corrientes registradas para una concentración i y la máxima concentración de aptámero ensayada, respectivamente, se representó frente a la concentración de aptámero, dando lugar a la curva de enlace (Figura 6.4).

Las concentraciones de aptámero más bajas, menores de 0,5 μM, producen un aumento notable en la señal analítica registrada, mientras que para concentraciones superiores el incremento en la señal es menor. Un ajuste no lineal de los datos que aparecen en la Figura 6.4 permite la estimación de la concentración óptima de aptámero, sin más que calcular la concentración de BATA que genera un 50% de la señal máxima. La concentración óptima resultó ser de 0,1 μM.

6.3.3. Características analíticas del aptaensayo voltamétrico.

Una vez optimizadas las condiciones experimentales se procedió a comprobar la existencia de una dependencia entre la concentración de tobramicina ensayada y la señal analítica medida. Para ello, se ensayaron concentraciones variables de tobramicina dentro del intervalo 0-500 μM usando el protocolo descrito previamente con los parámetros optimizados. Tal y como se observa en la Figura 6.5 (línea continua), la intensidad de corriente registrada (expresada en tanto por ciento de la máxima señal, S%) disminuyó con la concentración de tobramicina presente en la muestra como cabe esperar en un ensayo de inhibición, y además lo hizo linealmente. La ecuación que describe esta linealidad es: S%=(-0,111±0,004) [tobramicina (μM)] + (84±1). El intervalo lineal y el límite de detección son 5-500 μM, y 5 μM, respectivamente. La reproducibilidad, calculada para una concentración de tobramicina de 300 μM, es del 5,7% (n=4).

En estas condiciones óptimas, se evaluó la contribución de la adsorción inespecífica del conjugado enzimático sobre la fase sensora realizando una incubación de misma con una disolución que no contenía ni aptámero ni tobramicina, según el protocolo detallado en este apartado. La magnitud de la señal correspondiente a esta señal inespecífica resultó ser el 10% de la máxima señal registrada.

Finalmente, se evaluó la selectividad de la fase sensora respecto a dos antibióticos aminoglicósidos: kanamicina y estreptomicina (Figura 3.1). Para ello se llevó a cabo el ensayo de inhibición empleando el mismo protocolo que con tobramicina, para concentraciones de cada antibiótico comprendidas en el intervalo 1-

400 μM. Las curvas dosis-respuesta registradas en cada caso se muestran en la Figura 6.5, obtenidas mediante la representación del porcentaje de la señal máxima registrada frente a la concentración de antibiótico. Como se deduce de la propia figura, la fase sensora es completamente selectiva hacia la estreptomicina (línea de puntos), ya quela presencia de este antibiótico dio lugar a un gran aumento de la señal registrada, siendo la máxima señal registrada un 90% superior a la señal registrada para el blanco, en ausencia de antibiótico. Se llevaron a cabo una serie de experimentos con el objetivo de clarificar si el aumento de la señal se debe a una adsorción inespecífica del conjugado enzimático inducida por la previa exposición de la fase sensora a la estreptomicina

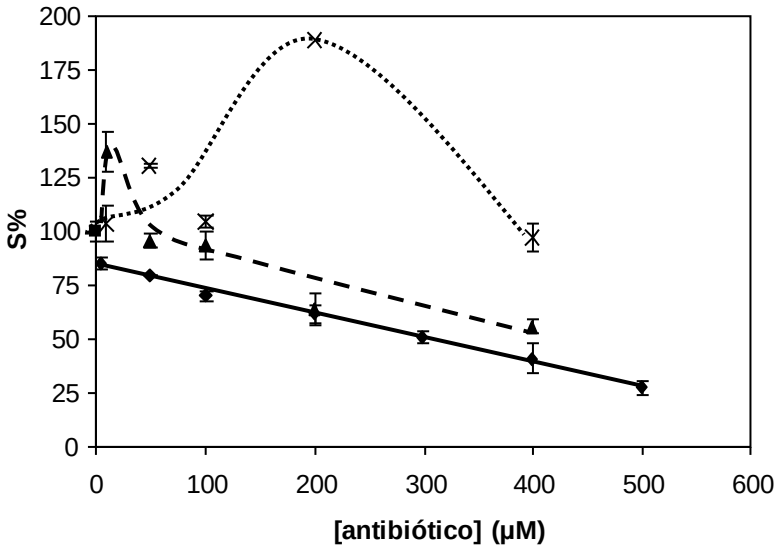

Figura 6.5. Curvas dosis-respuesta obtenidas para distintos antibióticos aminoglicósidos: tobramicina (línea continua); kanamicina (línea discontinua); estreptomicina (línea de puntos).

En el capítulo 5 se vio como la señal registrada asociada a la adsorción inespecífica del conjugado enzimático sobre las partículas modificadas con tobramicina es muy pequeña (Figura 5.3), sin embargo la presencia de estreptomicina en el medio podría inducir dicha adsorción dando lugar al gran aumento de la señal registrada. Para comprobarlo, se diseñó un experimento en el que 10 μL de partículas modificadas con tobramicina (0,1 mg/mL) se incuban con una disolución que contiene estreptomicina en una concentración 200 μM preparada en la disolución de afinidad con BSA 0,1% en ausencia de aptámero. Paralelamente se lleva a cabo un ensayo similar en el que la

misma cantidad de partículas magnéticas modificadas se incuban únicamente con la disolución de afinidad conteniendo BSA 0,1%, en ausencia tanto de estreptomicina como de aptámero anti-tobramicina. El protocolo seguido para el ensayo y la posterior detección fue el mismo que se detalló con anterioridad en el presente capítulo. El valor de la señal registrada para la adsorción inespecífica del conjugado enzimático en presencia (0,27±0,08 μA) y ausencia (0,38±0,09 μA) de estreptomicina fue la misma dentro del error experimental, lo que descarta la hipótesis de que ésta sea la causa del la respuesta observada al incubar la fase sensora con concentraciones crecientes de estreptomicina.

Por el contrario, la fase sensora no proporcionó una elevada selectividad con respecto a la kanamicina (Figura 6.5 línea discontinua). Para concentraciones menores de 50 μM, la señal registrada para la kanamicina es claramente superior a la obtenida para las mismas concentraciones de tobramicina, lo que indica que el ensayo permite su discriminación. Sin embargo, para concentraciones superiores de kanamicina la señal registrada disminuyó notablemente, de forma casi paralela a la de tobramicina. Aunque el valor de la señal registrada para la kanamicina es aproximadamente un 20% superior a la registrada para la tobramicina en todo el intervalo ensayado, es indudable que la presencia de kanamicina en la muestra puede dar lugar a la aparición de falsos positivos. En la práctica esto no supone un problema real, ya que los antibióticos kanamicina y tobramicina no se emplean de forma combinada en terapia, aunque sí resulta llamativo si se compara este resultado con la excelente selectividad mostrada por el esquema impedimétrico descrito en el capítulo 4. La única diferencia entre ambos esquemas es la introducción de biotina en el aptámero parcialmente metilado. Este resultado indicaría que la introducción de la biotina en el extremo 5' de la secuencia ATA no solamente da lugar a un aumento de la afinidad hacia la tobramicina sino que también aumenta su afinidad hacia compuestos con estructuras tan similares que se diferencian en un solo grupo funcional.

El ensayo desarrollado se caracteriza por una buena reproducibilidad y por una mayor rapidez de preparación de la fase sensora comparado con el método impedimétrico descrito en el capítulo 4. En concreto, el tiempo de preparación se reduce de 2 días a unas 3 horas. Sin embargo, el límite de detección obtenido en disolución acuosa (5 μM) no permite la determinación de tobramicina dentro del intervalo analítico útil en suero.

6.4. APTAENSAYO DE INHIBICIÓN EMPLEANDO EL SISTEMA DE MARCAJE FITC:FRAGMENTO-Fab anti-FITC

El sistema de marcaje basado en la unión estreptavidina-biotina como herramienta para la introducción de la marca enzimática, se caracteriza por ser multivalente. Este hecho implica que, dada la estructura tetramérica de la estreptavidina y considerando la estequiometría del conjugado enzimático comercial empleado, $Strep_2$-ALP, éste conjugado se podría enlazar a hasta ocho moléculas de aptámero biotinado simultáneamente sobre la superficie de las partículas magnéticas. De esta forma, la actividad enzimática inmovilizada sobre la fase sensora es menor de la que cabría esperar si cada conjugado se uniese a un solo aptámero BATA. Por ello, se pensó en buscar un sistema de marcaje monovalente y se escogió el sistema FITC:fragmento–Fab anti-FITC, ya que cada molécula de FITC es reconocida únicamente por una unidad del conjugado enzimático. Se espera, que, de esta manera, mejore el límite de detección y se pueda determinar tobramicina en muestras séricas.

Para ello se diseñó un ensayo de inhibición enteramente similar al descrito en el apartado 6.3 empleando como receptor molecular el aptámero anti-tobramicina parciamente metilado modificado en su extremo 5´con una molécula de FITC (FITC-ATA), y la misma fase sensora.

6.4.1. Selección de la marca enzimática y la concentración óptima de FITC-ATA.

En este punto, y dado que lo que se busca es una mayor sensibilidad, se pensó en explorar otras enzimas como la peroxidasa (POD), cuyo número de intercambio es sustancialmente mayor. Por tanto, se llevó a cabo un estudio comparativo entre ambas enzimas conjugadas a un fragmento Fab contra FITC.

En primer lugar, se hizo necesario seleccionar la concentración óptima del aptámero FITC-ATA para llevar a cabo la etapa de competición entre la tobramicina presente en la muestra y la tobramicina inmovilizada sobre las partículas magnéticas, ya que no tiene por qué ser la misma que para el aptámero BATA. Para ello se registró la curva de enlace correspondiente a la unión de FITC-ATA sobre la fase sensora. El protocolo empleado se adaptó del utilizado con el sistema de marcaje tetravalente, sin más que cambiar el aptámero BATA por FITC-ATA y modificar las etapas de marcaje y detección como se indica a continuación.

Lavado. Tras la incubación con concentraciones variables de FITC-BATA (0,05-5 μM) se realizaron dos etapas de lavado empleando 1 mL de la disolución de marcaje enzimático (PBS 1X que contiene caseína 0,5% y Tween 20® 0,025%) durante 2 min.

Marcaje enzimático: se incubaron las partículas con 1 mL del conjugado enzimático preparado por dilución del stock comercial con la disolución de marcaje enzimático durante 30 minutos. En el caso del conjugado fragmento-Fab-anti-FITC-ALP la dilución fue de 1:500, mientras que para el conjugado fragmento-Fab-anti-FITC-POD fue de 1:300.

Lavado y reconstitución: Las partículas se sometieron a dos etapas de lavado con 1 mL de la disolución de detección que contiene Tween 20® 0,01% y finalmente se resuspendieron en 100 μL de la disolución de detección siendo 0,1 mg/mL la concentración final de las partículas.

Detección: En el caso del conjugado enzimático basado en la enzima ALP, la detección electroquímica se llevó a cabo según lo detallado en el apartado 6.3. En el caso de la peroxidasa, se depositaron 15 μL de las partículas sobre el electrodo de trabajo bajo el que se situó un imán, y se añadieron 25 μL de un preparado comercial del sustrato tetrametilbencidina que contiene el cosustrato H_2O_2, de modo que se cubran los 3 electrodos que conforman la celda electroquímica. Finalmente, tras 1 minuto de reacción enzimática se determinó la cantidad del producto generado enzimáticamente, TMB oxidada, mediante cronoamperometría a un potencial de 0 V durante 60 s. La señal analítica correspondió a la intensidad de corriente media registrada durante los últimos 10 s de la cronoamperometría.

En la figura 6.6 se muestran los resultados expresados como porcentaje de la máxima intensidad de corriente registrada en cada caso. Un ajuste no lineal de los datos permitió estimar la concentración óptima de FITC-ATA, que se corresponde con la concentración de aptámero que da lugar al 50% de la máxima señal registrada. Las expresiones obtenidas para dichos ajustes empleando la enzima ALP y la enzima POD fueron $S(\%)=(100\pm3)[\text{FITC-ATA}(\mu M)]/(0{,}27\pm0{,}04)+[\text{FITC-ATA}(\mu M)]$ y $S(\%)=(100\pm2)[\text{FITC-ATA}(\mu M)]/(0{,}0687\pm0{,}006)+[\text{FITC-ATA}(\mu M)]$, respectivamente. Este valor debería ser independiente del sistema de detección empleado. Sin embargo, se comprobó que la concentración óptima de FITC dependió del conjugado enzimático empleado. Así, en el caso de la enzima ALP la concentración óptima de FITC-ATA

resultó ser 0,3 μM, mientras que en el caso del conjugado basado en la peroxidasa este valor fue de 0,1 μM. Observando la figura 6.6 se puede concluir que, para una concentración dada de aptámero FITC-ATA ensayada, la señal registrada (expresada en porcentaje de la máxima señal registrada) empleando el conjugado enzimático fragmento-Fab-anti-FITC-POD es mayor que la correspondiente señal registrada empleando el conjugado enzimático fragmento-Fab-anti-FITC-ALP.

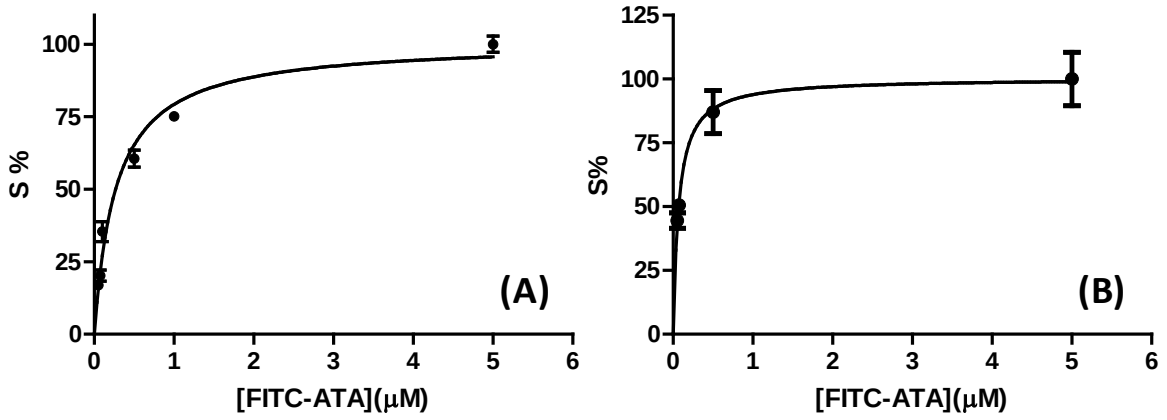

Figura 6.6. Variación de la intensidad de corriente registrada con la concentraciones de FITC-ATA (expresadas en tanto por ciento de la máxima señal) empleando como sistema de detección el conjugado enzimático (A) fragmento-Fab-anti-FITC-ALP (B) fragmento-Fab-anti-FITC-POD.

Con el objetivo de comprender la naturaleza de este resultado inesperado se llevaron a cabo experimentos adicionales. Concretamente, se evaluó la actividad de la enzima peroxidasa en presencia y ausencia de tobramicina. Se prepararon tres disoluciones del conjugado enzimático fragmento-Fab-anti-FITC-POD que contenían la misma cantidad de enzima y concentraciones de tobramicina crecientes: 0, 500 y 5000 μM. La adición del sustrato enzimático (TMB+H_2O_2) provocó la aparición del producto enzimático en disolución, TMB_{ox}, de color azul, el cual se detectó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 653 nm. Se registró la absorbancia en función del tiempo durante 36 segundos, observándose una. variación lineal con el tiempo. Se realizó un ajuste lineal para cada conjunto de datos y la pendiente se relacionó con la velocidad a la que la enzima convierte el sustrato en su correspondiente producto. El valor más bajo de la pendiente (0,293±0,005 s^{-1}), y por lo tanto, la velocidad de conversión más lenta correspondió a la disolución del conjugado

enzimático que no contenía tobramicina. Además, la velocidad de reacción enzimática no fue independiente de la concentración de tobramicina, como cabría esperar. Al contrario, se observó un crecimiento con la concentración pasando de 0,3542±0.0003 s^{-1}para tobramicina 500 μM a 0,467±0,003 s^{-1} para tobramicina 5000 μM. Estos resultados sugieren que la tobramicina actúa como activador de la enzima peroxidasa, lo que explicaría la divergencia de resultados registrados con la enzima ALP. No existen antecedentes bibliográficos en los que se informe de una interacción entre este antibiótico y la POD. Sin embargo, este hallazgo imposibilita el empleo de dicha enzima como marca para la determinación de tobramicina.

Se desestimó, por lo tanto, el ensayo con POD y, en adelante, se utilizó la enzima ALP como marca enzimática y una concentración de FITC-ATA de 0,3 μM.

6.4.2. Características analíticas del aptaensayo voltamétrico en medio acuoso.

Siguiendo el protocolo detallado en el apartado anterior se ensayaron distintas concentraciones de tobramicina (0,1-1000 μM) preparadas en la disolución de afinidad empleando una concentración constante de FITC-ATA de 0,3 μM. Asimismo se registró la señal en ausencia de tobramicina (máxima señal) y la correspondiente a la adsorción inespecífica del conjugado enzimático sobre la fase sensora (en ausencia tanto de aptámero como de tobramicina). Los voltagramas DPV obtenidos para cada caso se muestran en la Figura 6.7.

La intensidad de corriente registrada para cada una de las concentraciones de tobramicina se expresó como un porcentaje de disminución de la señal según la expresión: $S\%=(I_i-I_{tob=0})/(I_{apt=0}-I_{tob=0})$ x 100, donde $I_{tob=0}$ es la corriente registrada para una concentración de tobramicina i (máxima señal) (Figura 6.7.(a)) y $I_{apt=0}$ es la corriente registrada para una disolución que no contiene ni aptámero ni tobramicina (mínima señal) (Figura 6.7.(h)) .

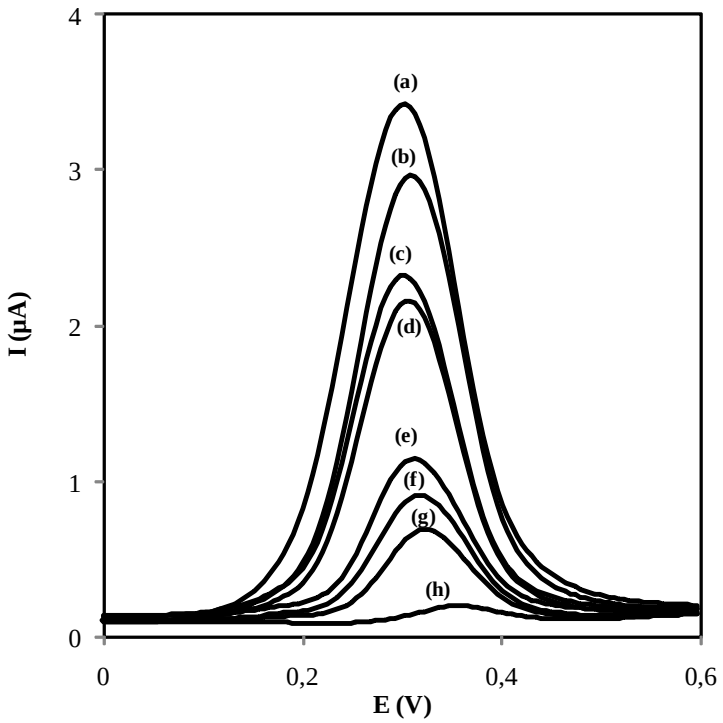

Figura 6.7. Voltagramas DPV obtenidos tras incubación de una cantidad constante de partículas magnéticas modificadas con tobramicina con [FITC-ATA]=0,3µM (a) en ausencia de tobramicina (señal máxima) o en presencia de tobramicina (b) 0,1; (c) 0,5; (d) 5; (e) 100; (f) 500; (g) 1000 µM; (h) en ausencia de aptámero ni tobramicina (adsorción inespecífica del conjugado enzimático).

La señal, S%, registrada para cada una de las concentraciones de tobramicina disminuyó de forma lineal con el logaritmo de la concentración de tobramicina presente en la disolución (Figura 6.8, línea continua). La expresión que define el intervalo lineales S%=(-19±1)log[tobramicina(µM)] + (71±2), r=0,991. El intervalo lineal, tal y como se definió en el capítulo 4, está comprendido entre 0,1-1000 µM siendo el límite de detección de 0,1 µM. La reproducibilidad se evaluó para una concentración de tobramicina de 5 µM y fue de 4,4% (n=4). La contribución de la adsorción inespecífica del conjugado enzimático sobre la fase sensora fue de un 4% en relación a la máxima señal registrada.

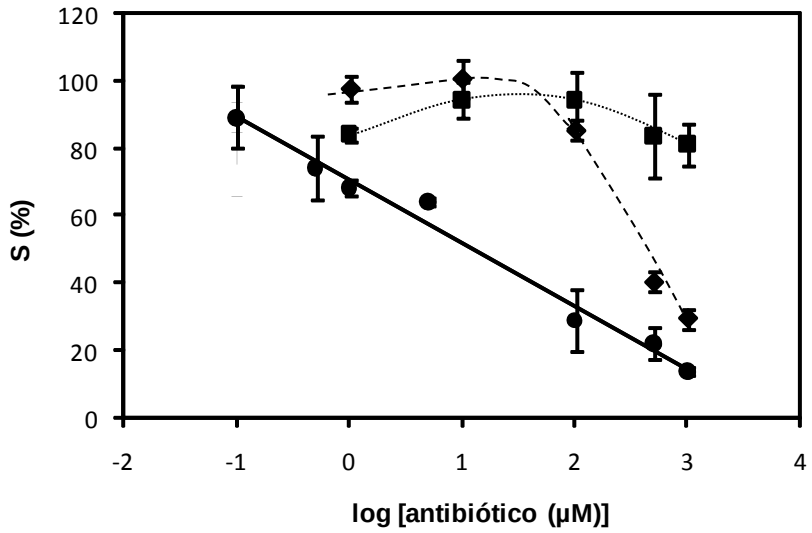

Figura 6.8. Curvas dosis-respuesta obtenidas llevando a cabo el ensayo de inhibición propuesto empleando el aptámero FITC-ATA como receptor molecular y fragmento-Fab-anti-FITC-ALP como conjugado enzimático para tobramicina (línea continua); kanamicina (línea discontinua); estreptomicina (línea de puntos) en disolución acuosa.

Se evaluó la selectividad de la fase sensora respecto a kanamicina y estreptomicina. Se registró la señal analítica correspondiente a la incubación de cada uno de los antibióticos en el intervalo de concentraciones1-1000 µM, expresada como tanto por ciento, tal y como se detalló para el caso de la tobramicina, y se representó como función del logaritmo de la concentración de antibiótico empleado en la figura 6.8. A la vista de las curvas dosis-respuesta de dicha figura, se puede concluir que la fase sensora se caracteriza por una elevada selectividad hacia la estreptomicina (línea de puntos), ya que la señal registrada resultó prácticamente constante en el intervalo de 75-95% en todo el intervalo de concentraciones ensayadas.

Por el contrario, el ensayo fue menos selectivo frente a la kanamicina (línea discontinua). Este resultado es similar al encontrado en el estudio de selectividad empleando el aptámero BATA como receptor molecular en el apartado 6.3. Varía, sin embargo, el intervalo de concentraciones. Para concentraciones de kanamicina menores de 10 µM no se registró cambio alguno en la señal, manteniéndose en el valor correspondiente a ausencia de antibiótico, por lo que no se observa interacción entre el aptámero y la kanamicina. Sin embargo, para concentraciones superiores se produjo una brusca disminución de la señal registrada, con una pendiente claramente superior a la de la tobramicina. Por tanto, esa fase sensora únicamente sería selectiva en

presencia de concentraciones de kanamicina inferiores a 10 µM, lo que no es desdeñable, teniendo en cuenta los niveles en muestras reales.

6.5. SISTEMA DE MARCAJE MULTIVALENTE FRENTE A SISTEMA DE MARCAJE MONOVALENTE.

Para facilitar la comparación entre los métodos desarrollados, las características analíticas empleando ambos sistemas se recogen en la tabla 6.1.

Según estos datos queda patente que el sistema monovalente de marcaje se caracteriza por un intervalo lineal más amplio, con un límite de detección menor, que posibilitaría la detección de tobramicina en suero. Además la reproducibilidad y la adsorción inespecífica son también mejores.

Tabla 6.1. Características analíticas de los ensayos de inhibición desarrollados.

Sistema de marcaje	Intervalo lineal (µM)	L.D. (µM)	CV (%)	Adsorción inespecífica del conjugado enzimático, S%
estreptavidina-biotina	5-500	5	5,7% (n=4)	10%
FITC:Fragmento-Fab-anti-FITC	0,1-1000	0,1	4,4 (n=4)	4%

La comparación de ambas estrategias de marcaje pone de manifiesto la importancia que la elección de ésta tiene en el desarrollo de un ensayo que conlleva una etapa de marcaje, ya que es posible reducir el límite de detección más de un orden de magnitud empleando una misma marca enzimática, la ALP y el sistema monovalente de marcaje.

Este hecho se puede explicar teniendo en cuenta la tetravalencia de la estreptavidina y la estequiometría del conjugado enzimático $Strep_2$-ALP. Cada molécula de $Strep_2$-ALP es capaz de unirse, potencialmente, a 8 moléculas de aptámero biotinilado, BATA, aunque el número de moléculas de BATA que realmente se pueden unir a una sola molécula de $Strep_2$-ALP es mucho menor debido a efectos estéricos. Por el contrario, en el caso del sistema monovalente, solamente una molécula de FITC-ATA será reconocida por una molécula de fragmento-Fab-anti-FITC.

Para las concentraciones más bajas de tobramicina ensayadas, la cantidad de aptámero marcado unido a las partículas magnéticas modificadas con tobramicina es elevado (curva de respuesta decreciente). Por ello, es más probable que el conjugado $Strep_2$-ALP se una a más de una molécula de aptámero marcado, impidiendo la discriminación entre dos concentraciones bajas de analito, lo que implica necesariamente un límite de detección superior (5 μM) al obtenido con un sistema de marcaje monovalente.

Adicionalmente el efecto de la multivalencia confiere irreproducibilidad al ensayo, la cual fue del 5,7% para el sistema multivalente y de un 4,4% para el monovalente. Esto puede estar asociado a la unión aleatoria del aptámero BATA sobre la tobramicina inmovilizada, que determinará el grado de multivalencia efectiva del conjugado.

6.6. APLICACIÓN DEL APTAENSAYO A MUESTRAS DE SUERO HUMANO

Dado que se ha conseguido diseñar un formato de ensayo cuya detectabilidad en medio acuoso permite albergar esperanzas de que se pueda aplicar en suero humano, se decidió comprobar la capacidad del aptaensayo de inhibición propuesto para la determinación de tobramicina en este tipo de muestras.

En primer lugar se evaluó la adsorción inespecífica de las proteínas séricas, llevando a cabo una incubación de las partículas modificadas con tobramicina con una disolución de suero humano sin diluir (100%) durante 15 min, siguiendo el protocolo detallado con anterioridad para el fragmento-Fab-anti-FITC-ALP. La intensidad de corriente registrada, expresada como tanto por ciento del valor máximo registrado en medio acuoso fue del 88%. Este valor confirma la adsorción inespecífica de las proteínas del suero sobre la fase sensora que inducen la posterior adsorción del conjugado enzimático, dando lugar a una señal analítica elevada. En todos los casos se corrige la concentración salina tras la dilución de modo que es siempre igual a la concentración salida de la disolución de afinidad.

Tabla 6.2. Efecto de la dilución del suero sobre la adsorción inespecífica

Dilución suero humano: disolución reguladora	Señal analítica (S%)
1:0 (100% suero humano)	88%
1:0,5	84%
1:1	76%
1:2	64%
0:1 (100% disolución reguladora)	4%

Por ello, se decidió diluir el suero en distintas proporciones (Tabla 6.2). A partir de los resultados expuestos en dicha tabla se puede concluir que la contribución de la adsorción inespecífica del conjugado enzimático a la señal analítica es mayor cuanto menor es la dilución del suero. Sin embargo, la máxima dilución ensayada proporcionó una señal asociada a la adsorción inespecífica del conjugado todavía del 64%, lo que no es suficiente para el desarrollo del ensayo de inhibición sin otro tipo de pretratamiento.

Asimismo se llevó a cabo una reoptimización de los tiempos de incubación con la muestra y con el conjugado enzimático tratando de minimizar la contribución de la adsorción inespecífica. Para ello se llevaron a cabo una serie de experimentos en los que se siguió el protocolo detallado con anterioridad pero variando los tiempos de incubación con la muestra y con el conjugado enzimático. Esta optimización se llevó a cabo empleando una muestra de suero diluida en un factor 1:2, registrándose la señal tanto en ausencia de aptámero y tobramicina ($I_{apt=0}$, adsorción inespecífica del conjugado enzimático) como para la máxima señal ($I_{apt=0,3\ \mu M}$). En un primer experimento se varió el tiempo de incubación con la muestra (2-15 min) manteniéndose constante el tiempo de incubación con el conjugado enzimático (30 min) Los valores de la señal registrada se representaron como el cociente de ambos valores ($I_{apt=0}/I_{apt=0,3\ \mu M}$), lo que hace referencia a la relación señal/ruido, que se pretende sea máxima. Como se puede observar en la Figura 6.9.(A) la relación señal/ruido fue máxima para un tiempo de incubación con la muestra de 5 min. A continuación se varió el tiempo de incubación con el conjugado enzimático (5-30 min). Para ello se siguió el protocolo detallado con anterioridad tomando 5 min como tiempo de incubación con la muestra. La señal registrada se expresó, como ya se ha comentado, como cociente de ambas

intensidades de corriente registradas. Como se observa en la Figura 6.9.(B), la representación de dicho cociente en función del tiempo presenta un máximo para un tiempo de incubación con el conjugado enzimático de 10 minutos. Por lo tanto, los experimentos que se detallarán a continuación se llevarán a cabo empleando 5 y 10 minutos como tiempos de incubación con la muestra y con el conjugado enzimático, respectivamente.

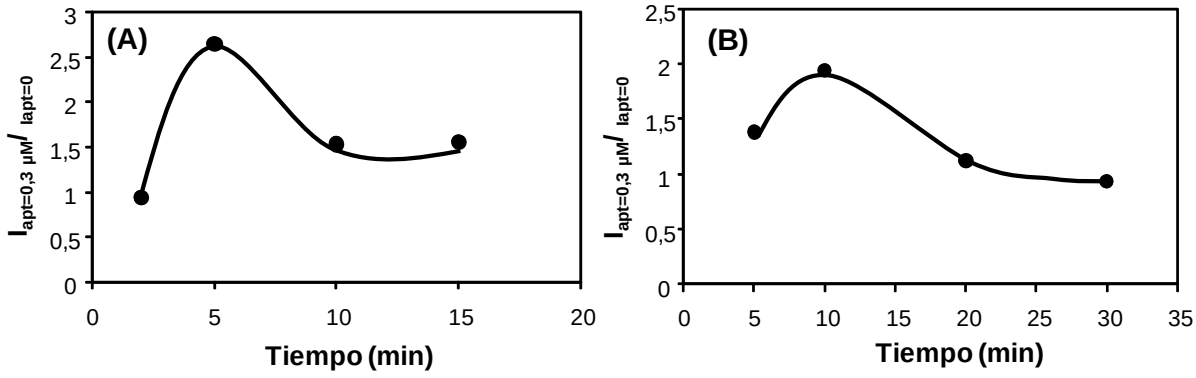

Figura 6.9. Variación del cociente de la señal registrada para [FITC-ATA]=0,3 µM y [FITC-ATA]=0 en función de (A) el tiempo de incubación con la muestras y (B) el tiempo de incubación con el conjugado enzimático.

Sin embargo, esto no fue suficiente. Por ello, se decidió eliminar las proteínas presentes en la matriz mediante un pretratamiento de la muestra consistente en su ultracentrifugación a través de un filtro de corte 10 KDa. La baja masa molecular de la tobramicina le permite atravesar la membrana, mientras que las proteínas quedan retenidas en ella. Se prepararon muestras de suero diluido en distintas proporciones (1:0,5; 1:1; 1:4 y 1:9) con disolución reguladora de afinidad a la que se le añadieron concentraciones crecientes de tobramicina (0-1000 µM). Las muestras se sometieron al proceso de ultracentrifugación (protocolo en Anexo II). Es importante diluir las muestras en reguladora de afinidad antes de proceder al ultracentrifugado puesto que la elevada fuerza iónica previene o disgrega la asociación proteína sérica-antibiótico (efecto caotrópico), que provoca que el antibiótico se retenga junto con las proteínas en la membrana. A continuación se llevó a cabo el ensayo y se registraron las curvas dosis-respuesta correspondientes al suero diluido en diferentes proporciones.Se debe

destacar que la dilución del suero se llevó a cabo en cada caso con una disolución reguladora que contiene las sales necesarias para que, tras la dilución, la concentración final de sales sea igual a la de la disolución de afinidad empleada para llevar a cabo la selección del aptámero anti-tobramicina.

Las características analíticas de este método para cada dilución ensayada se recogen en la tabla 6.3. En efecto, el grado de dilución del suero humano previo a la filtración tiene una influencia decisiva sobre la bondad de los resultados obtenidos. En el caso de las menores diluciones no se observó dependencia entre la concentración de tobramicina y la señal analítica. La dilución 1:4 permite obtener dicha dependencia, pero el límite de detección es elevado. Finalmente, la dilución 1:9 permitió la determinación de tobramicina en suero, dado que su límite de detección es de 1 µM y el intervalo terapéutico varía entre 4,3 y 25,7 µM.

Tabla 6.3. Características analíticas de los ensayos de inhibición en muestras de suero diluidas en distinta proporciones

Dilución suero humano: disolución reguladora	LD en el suero (µM)	Intervalo lineal (µM)	Calibrado
1:0,5	--	--	--
1:1	200	--	--
1:4	20	20-1000	S%=(-16±2)log[tobramicina (µM)]+(83±3); r=0,996
1:9	1	1-200	S%=(-24±3)log[tobramicina (µM)]+(64±3); r=0,994

7. ADN ESTRUCTURADO COMO BASE PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS

7.1. INTRODUCCIÓN.

Una de las ventajas que ofrece el diseño de biosensores electroquímicos es la posibilidad de desarrollar dispositivos que permiten la determinación de analitos de interés en el punto de necesidad del análisis, lo que en inglés se conoce como dispositivos "*point-of-care*". Los conocidos como "*scaffold sensors*" cumplen los requisitos necesarios para permitir determinar una gran cantidad de analitos sin la necesidad de emplear ningún otro reactivo añadido, además de abrir la posibilidad de desarrollar fases sensoras basadas en ácidos nucleicos para la determinación de analitos para los que no se haya descrito previamente una secuencia aptamérica específica. Consisten en la inmovilización de un dúplex de ADN sobre un soporte electródico, que actúa como una estructura sobre la que tiene lugar tanto el reconocimiento molecular como la generación de la señal electroquímica, ya que una hebra contiene el receptor y la otra la marca electroactiva. La presencia del analito modifica la velocidad de colisión de la marca sobre el electrodo, por lo que varía la intensidad de corriente debida a la misma. El desarrollo de este tipo de dispositivos ofrece la posibilidad de detectar de forma rápida, sencilla y fiable macromoléculas asociadas a enfermedades infecciosas como son anticuerpos u otro tipo de proteínas, siendo el objetivo final su determinación en muestras reales sin tratamiento previo.

La aplicación de cualquier biosensor a la determinación del analito para el que ha sido diseñado en muestras reales supone siempre un gran reto debido a los problemas derivados de la adsorción inespecífica de los componentes que forman parte de estas matrices complejas (orina, saliva, sangre, suero, etc.). En la literatura se describen estrategias que permiten mejorar el comportamiento de los biosensores electroquímicos cuyo elemento de reconocimiento son los ácidos nucleicos. Una de estas estrategias consiste en la formación sobre una superficie electródica de oro de una monocapa autoensamblada mixta, compuesta por el ADN y por uno o varios componentes cuya finalidad es minimizar la adsorción inespecífica. Las monocapas binarias en las que el segundo componente es el mercaptohexanol son quizás, las más ampliamente utilizadas. La función de esta molécula es doble: por una parte rellena los huecos dejados por la monocapa de ADN tiolado, que no puede ser muy compacta debido a las repulsiones electrostáticas del esqueleto de fosfatos y, por otra parte, mantiene en posición vertical la hebra de ADN evitando su adsorción longitudinal sobre el oro, favoreciendo su hibridación con la hebra complementaria. Sin embargo, aunque

la adsorción inespecífica se reduce no se elimina por completo. Recientemente, se ha propuesto el empleo de monocapas ternarias en las que se introduce un alcanoditiol como tercer componente. El estudio comparativo de alcanoditioles de diferente longitud sugiere que éste adquiere una disposición paralela a la superficie electródica, recubriendo las rugosidades del oro que constituyen puntos de adsorción muy activos y, por tanto, dando lugar a monocapas más resistentes a la adsorción inespecífica de proteínas en medios biológicos. Esta estrategia fue aplicada con éxito al desarrollo de genosensores, obteniendo una relación señal/ruido 80 veces superior a la registrada con la monocapa binaria en suero humano sin diluir[179].

Los trabajos descritos hasta la fecha en la literatura consistentes en el empleo de sondas de ADN de doble hebra como estructura sensora para la detección de macromoléculas, están basados en la formación de monocapas autoensambladas SAM binarias sobre superficies electródicas de oro[117-119]. La SAM se forma mediante la adsorción sobre la superficie de oro de dos componentes de modo secuencial: la hebra de anclaje (Figura 7.1.(A), hebra de color azul) y el mercaptohexanol, que ejerce las funciones reseñadas anteriormente. La formación de la fase sensora finaliza con la unión de la hebra de reconocimiento (Figura 7.1.(A)) mediante la reacción e hibridación con la hebra de anclaje.

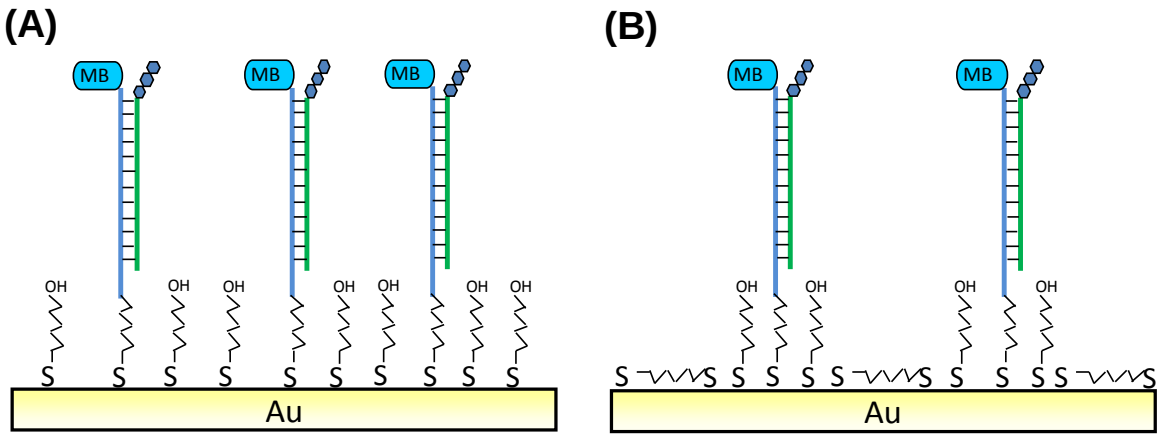

Figura 7.1. Esquema de una fase sensora consistente en una SAM(A) binaria: hebra de anclaje (de color azul) + mercaptohexanol, y (B) ternaria: hebra de anclaje (de color azul)/hexanoditiol + mercaptohexanol. La formación de la fase sensora se completa, en ambos casos, con la hibridación de la hebra de reconocimiento (de color verde).

Este tipo de fase sensora se ha empleado para la determinación de distintos anticuerpos del VIH en disolución acuosa obteniéndose un límite de detección subnanomolar, y una buena selectividad respecto a otros anticuerpos[118]. Además la fase sensora diseñada es capaz de detectar concentraciones saturantes del anticuerpo en una muestra real de suero humano sin diluir. La optimización y evaluación de las características analíticas del sistema se llevaron a cabo empleando el sistema modelo formado por el péptido FLAG y el anticuerpo anti-FLAG, empleado en procesos de separación de proteínas. Una vez puesto a punto, se comprobó su aplicabilidad general mediante su utilización en la determinación de 5 anticuerpos capaces de reconocer distintos epítopos del virus VIH. A pesar del buen comportamiento del sensor andamio en disolución acuosa no se ha llevado a cabo un calibrado completo en suero, para lo que resulta imprescindible que la fase sensora muestre una elevada resistencia a la adsorción inespecífica de las proteínas presentes en la muestra.

La excepcional mejora de las características analíticas derivadas de la introducción de un tercer componente en la formación de la SAM se tomó como punto de partida en el diseño de una fase sensora ternaria con el objetivo de explorar los potenciales beneficios que puede aportar al desarrollo de los sensores andamio contra diversos anticuerpos.

7.2. DISEÑO DE UNA FASE SENSORA TERNARIA PARA LA DETERMINACIÓN DEL ANTICUERPO anti-FLAG EN DISOLUCIÓN ACUOSA.

Con el objetivo de mejorar el comportamiento del sensor antes citado, se decidió diseñar una nueva fase sensora para la construcción de este tipo de estrategias basada en la formación de una monocapa ternaria, incluyendo el hexanoditiol (HDT) como tercer componente que se co-adsorbe junto con la hebra de anclaje. La formación de la fase sensora finaliza con una incubación con mercaptohexanol y la hibridación con la hebra de reconocimiento (Figura 7.1.(B)). El sistema péptido FLAG y anticuerpo anti-FLAG se escogió como sistema modelo para el diseño y puesta a punto de la fase sensora. La primera etapa en la construcción de la fase sensora fue la preparación de la superficie electródica de oro para llevar a cabo su modificación. Para ello, los electrodos fueron pulidos con alúmina de tamaño de partícula 0,05 μM durante 1 minuto y, tras un lavado con agua, se introdujeron en una pequeña cantidad de agua

que se sometió a ultrasonidos durante 5 minutos. Tras un nuevo lavado con agua, los electrodos se sometieron a una exhaustiva limpieza electroquímica que se detalla en el Anexo II.

Tras el acondicionamiento de la superficie electródica, se llevó a cabo una incubación de la misma en una disolución que contenía 25 nM de la hebra de anclaje que contiene la marca electroactiva, azul de metileno (MB) (27-mer: 5´-SH-GCAGTAACAAGAATAAAACGCCACTGC-3´-MB) y hexanoditiol (150 μM ó 300 μM) preparadas en la disolución de Dulbecco 1× de pH 7,4, durante toda la noche a temperatura ambiente y en ausencia de luz. La hebra de anclaje fue previamente tratada con una disolución acuosa de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 10 mM durante 1 hora, para que se reduzcan los puentes disulfuro. La concentración exacta de la hebra de anclaje se halló espectrofotométricamente a 260 nm. La disolución de Dulbecco se preparó mediante dilución de una disolución comercial concentrada 10× cuya composición se detalla en el Anexo II. Una vez coadsorbidos la hebra de anclaje y el ditiol, se lavó el electrodo con agua y se introdujo en una disolución de mercaptohexanol 1 mM preparada en la disolución de Dulbecco durante 1 hora. Tras el lavado de la superficie electródica con agua, ésta se introdujo en una disolución de la hebra de reconocimiento (secuencia de 25-mer de PNA modificada con el epítopo FLAG en su extremo 5´: DYKDDDDKGG-CAGTGGCGTTTTATTCTTGTTACTG-3´) 100 nM preparada en la disolución de Dulbecco durante 1 hora. Tras lavar el electrodo con la disolución de Dulbecco, la fase sensora está preparada para llevar a cabo la detección del anticuerpo.

El ensayo se realizó incubando la fase sensora en concentraciones crecientes del anticuerpo preparadas en la disolución de Dulbecco durante 1 hora (a no ser que se especifique lo contrario en el texto). Tras cada incubación se registró la señal electroquímica debida a la reducción de la marca azul de metileno inmovilizada en la hebra de anclaje mediante voltametría de onda cuadrada, SWV en sus siglas en inglés. La medida electroquímica se realizó en la misma disolución en la que se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo. Los parámetros de medida fueron los siguientes: El potencial se varió desde 0 hasta -0,5 V con un salto de potencial de 1 mV, una amplitud de 25 mV a una frecuencia de 60 Hz. La intensidad de corriente registrada para cada una de las concentraciones se expresó en tanto por ciento de disminución de la señal

con respecto a la registrada tras la hibridación con la hebra de reconocimiento (intensidad de corriente máxima).

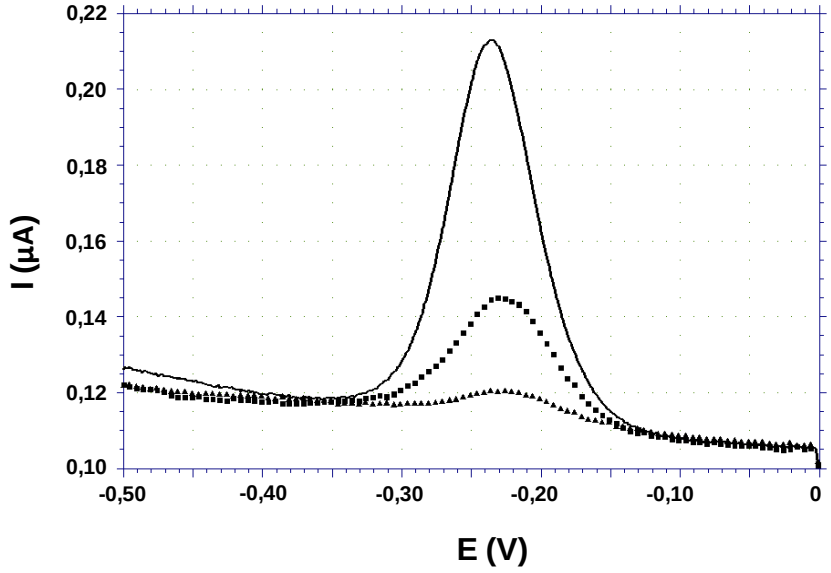

Figura 7.2. Voltagrama SWV obtenido en la disolución de Dulbecco para una superficie electródica de oro tras su modificación secuencial con (A) hebra de anclaje 25 nM/ HDT 150 µM + MCH 1 mM (1 h) (línea continua); (B) + hebra de reconocimiento modificada con el epítopo FLAG 100 nM (1h) (línea cuadros) y (C) + anticuerpo anti-FLAG 25 nM (1 h) (línea de triángulos).

La correcta formación de la fase sensora se evaluó mediante el registro de la intensidad de corriente medida mediante SWV. Se realizaron dos medidas, la primera tras la inmovilización de la hebra de captura junto al ditiol seguida del bloqueo con MCH (Figura 7.2, línea continua), y la segunda tras la unión de la hebra de reconocimiento mediante la reacción de hibridación (Figura 7.2, línea de cuadros). La hibridación de la sonda de reconocimiento da lugar a una disminución en la intensidad de corriente registrada derivada de la mayor rigidez de la doble hebra con respecto a la hebra sencilla que dificulta la colisión de la marca electroactiva con la superficie electródica, disminuyendo, por tanto, la eficiencia de la transferencia electrónica. Esta disminución resultó ser de un 70-80% respecto a la señal inicial correspondiente a la hebra de anclaje. A pesar de la gran disminución de la señal como consecuencia de la formación de la doble hebra, que constituye la fase sensora, ésta posee aún la suficiente flexibilidad para permitir una transferencia electrónica entre la marca

electroactiva y la superficie de oro, de modo que la posterior adición del anticuerpo anti-FLAG puede originar una supresión adicional de la intensidad de corriente registrada.

Se evaluó el efecto de la concentración de hexanoditiol sobre las prestaciones del sensor. Para ello, se mantuvo constante la concentración de hebra de anclaje (25 nM) y se emplearon dos concentraciones de HDT (150 y 300 μM). Se registró el perfil de variación de la señal analítica en función del tiempo durante una hora, tras la introducción de ambas fases sensoras en una disolución de anticuerpo anti-FLAG 25 nM preparada en la disolución de Dulbecco (Figura 7.3).

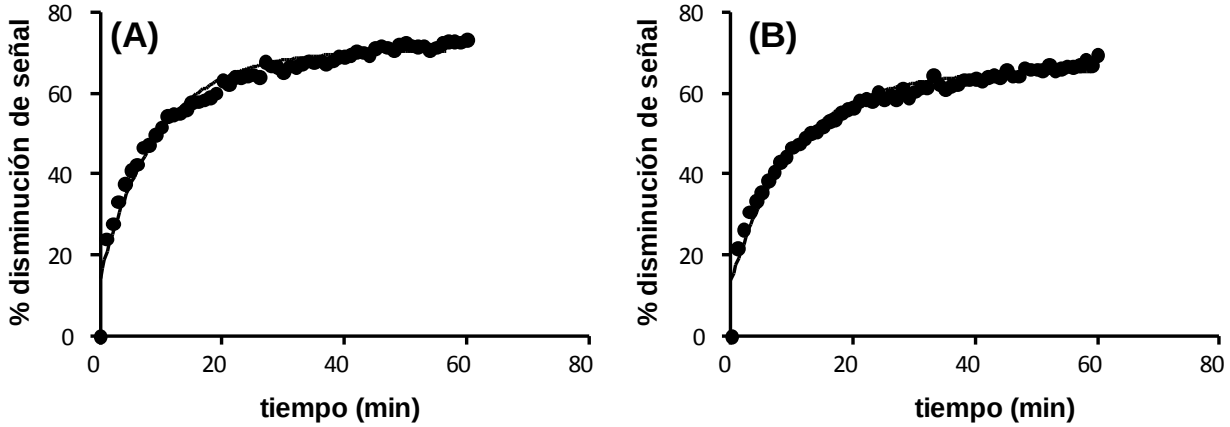

Figura 7.3. Variación de la señal analítica en función del tiempo tras la introducción de una fase sensora preparada a partir de hebra de anclaje 25 nM (A) +HDT 150 μM o (B) +HDT 300 μM en una disolución de anticuerpo anti-FLAG 25 nM.

Como se observa en la figura 7.3, según aumenta el tiempo de incubación la cantidad de anticuerpo anti-FLAG que se une a la fase sensora aumenta, hasta estabilizarse en un valor constante al cabo de 40 minutos de incubación para ambos relaciones de concentración [hebra de anclaje]/[HDT]. La señal registrada para la misma concentración del anticuerpo anti-FLAG con la fase sensora binaria se estabilizó a partir de 15 minutos[118], lo que significa que el empleo de una monocapa ternaria ralentiza la interacción. Este efecto puede deberse al aumento de la hidrofobicidad derivada de la introducción del HDT como tercer componente de la monocapa en comparación con su homóloga binaria. Dada la naturaleza hidrofílica de gran cantidad de proteínas, el empleo de esta nueva fase sensora podría conllevar un aumento del

tiempo de incubación necesario para que se alcance una señal estable. El tiempo escogido para llevar a cabo el resto de interacciones fue de 1 hora.

La señal máxima registrada para dicha interacción empleando las dos fases sensoras ternarias es similar y se situó alrededor del 70% de disminución de la señal (Figura 7.3). Este variación resultó ser notablemente superior a la registrada para la misma interacción empleando la fase sensora construida con una monocapa binaria, donde la máxima señal supuso una disminución del 40% de la señal[118]. Este efecto se puede explicar si se tiene en cuenta que la monocapa ternaria contribuye a la disminución de la adsorción inespecífica de la marca electroactiva (azul de metileno) sobre la fase sensora, ya que el bloqueo es mucho más efectivo. Así, en ausencia del anticuerpo, el número de doble hebras susceptibles de sufrir un cambio en su flexibilidad como consecuencia del reconocimiento específico del anticuerpo por parte del epítopo inmovilizado sobre la hebra de reconocimiento es mayor si se utiliza una monocapa ternaria, lo que deriva en una mayor respuesta para la misma concentración de anticuerpo ensayada cuando se emplea la fase sensora construida con una monocapa ternaria.

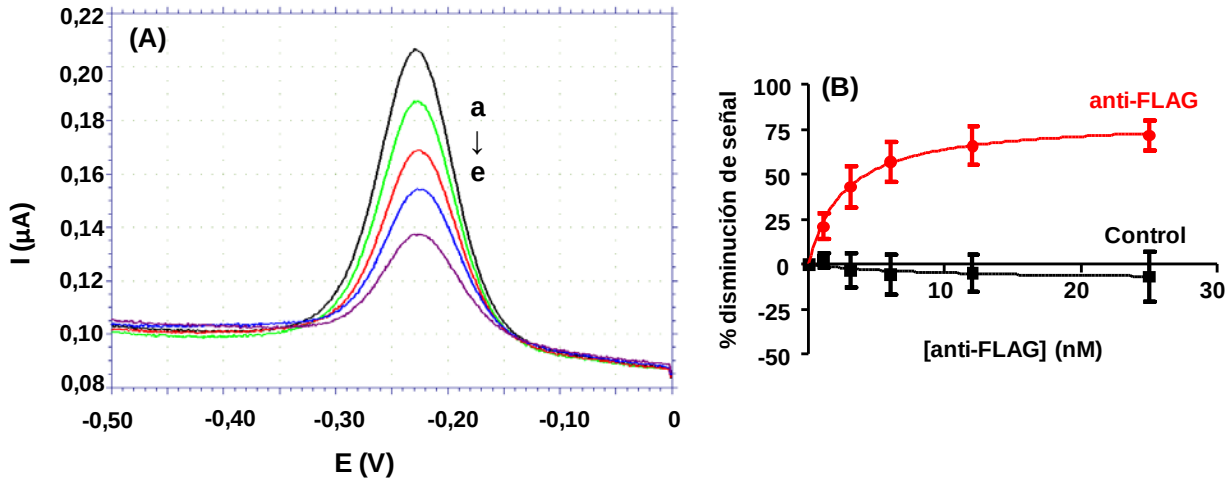

Figura 7.4. (A) Voltagramas SWV obtenidos con una fase sensora construida con una monocapa ternaria ([hebra de anclaje]=25 nM/[HDT]=150 µM tras incubaciones de 1 hora con (a) línea negra: 0 nM; (b) línea verde: 1 nM; (c) línea roja: 3 nM; (d) línea azul: 6 nM y (e) línea morada: 25 nM. (B) Variación de la señal registrada en tanto por ciento de disminución, en función de [anti-FLAG] (línea roja) y control negativo (línea negra). Ver texto para más detalles.

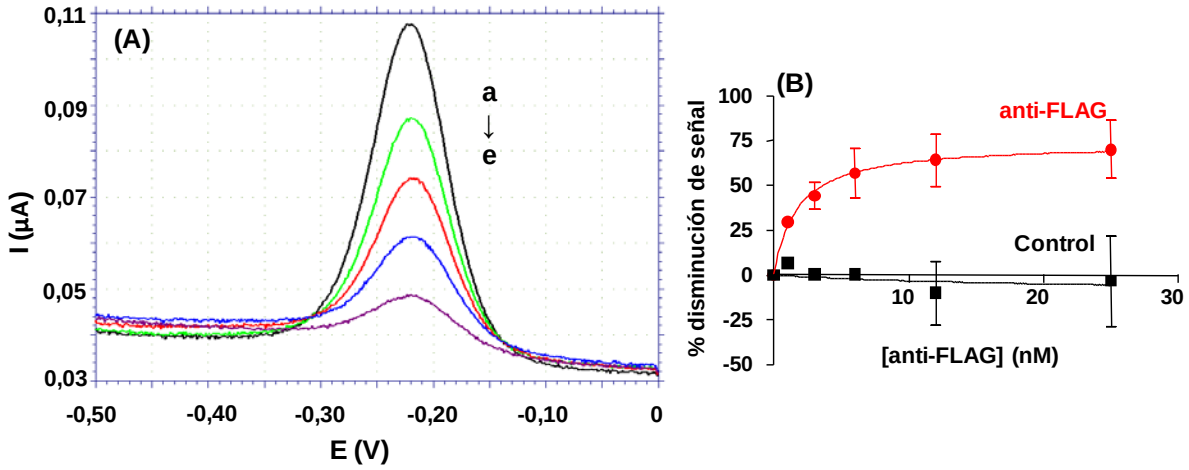

Figura 7.5. (A) Voltagramas SWV obtenidos con una fase sensora construida con una monocapa ternaria ([hebra de anclaje]=25 nM/[HDT]=300 µM tras incubaciones de 1 hora con (a) línea negra: 0 nM; (b) línea verde: 1 nM; (c) línea roja: 3 nM; (d) línea azul: 6 nM y (e) línea morada: 25 nM. (B) Variación de la señal registrada en tanto por ciento de disminución, en función de [anti-FLAG] (línea roja) y control negativo (línea negra). Ver texto para más detalles

A continuación se comprobó si la señal analítica depende de la concentración de anticuerpo presente en la disolución. Para ello se llevaron a cabo incubaciones sucesivas de la misma fase sensora en disoluciones que contenían concentraciones crecientes del anticuerpo preparadas en la disolución de Dulbecco. Las medidas se llevaron a cabo por triplicado empleando tres electrodos distintos.

Tras 1 hora de incubación se llevó a cabo el registro de la señal electroquímica mediante SWV (Figuras 7.4.(A) y 7.5.(A)). La representación del tanto por ciento de disminución de la señal en función de la concentración de anticuerpo empleada para cada concentración (Figuras 7.4.(B) y 7.5.(B); líneas de color rojo) muestra como ambas fases sensoras proporcionan una mayor disminución de la señal cuanto mayor es la concentración de anticuerpo en la disolución de incubación. Ambas fases sensoras se saturan con una concentración de anticuerpo anti-FLAG de 12 nM y la señal máxima registrada se correspondió con un 70% de disminución de la señal. Asimismo, la mínima concentración de anticuerpo ensayada, 1 nM, proporcionó una disminución de la señal del 21% cuando se usó la concentración de HDT de 150 µM y 29% para la de 300 µM, valores superiores al porcentaje de disminución registrado para la fase sensora construida con la monocapa binaria para la misma concentración de anticuerpo, ~12%[118]. Esto indica que el sensor propuesto permitiría disminuir el límite de detección del anticuerpo anti-FLAG.

Al mismo tiempo que se registró la señal para concentraciones crecientes de anticuerpo anti-FLAG, se llevó a cabo un control negativo (en ausencia de anticuerpo) consistente en la incubación de la fase sensora en la disolución de Dulbecco durante 1 hora, y la posterior medida de la señal electroquímica de forma simultánea a cada concentración de anticuerpo. Se comprobó que la fase sensora no se deteriora a lo largo de las 5 horas de duración del experimento, ya que la señal registrada expresada en tanto por ciento es del 0%, dentro del error experimental (Figuras 7.4.(B) y 7.4.(B); líneas de color negro), es decir, no varía con respecto a la señal obtenida en ausencia de anticuerpo.

7.3. EMPLEO DE UNA FASE SENSORA TERNARIA PARA LA DETERMINACIÓN DEL ANTICUERPO anti-4B3 EN DISOLUCIÓN ACUOSA.

En principio, la fase sensora diseñada junto al esquema de medida propuesto debería ser de aplicabilidad general a cualquier epítopo (péptido) para el que exista un anticuerpo, sin más que cambiar la secuencia peptídica, que determina la reacción de afinidad, en la hebra de reconocimiento. Por ello, se decidió aplicar la misma estrategia de diseño a la determinación de otro anticuerpo. Con este objetivo se construyó una fase sensora similar para la determinación del anticuerpo 4B3 (anti-4B3) dirigido contra un epítopo de la proteína de membrana gp41 del virus VIH. Esta proteína es altamente inmunogénica, ya que es capaz de inducir la producción de anticuerpos en la etapa inicial de la infección, los cuales persisten hasta los estadios finales de la enfermedad[180]. Para ello se diseñó una hebra de reconocimiento de PNA de 25 bases nitrogenadas en la que se inmovilizó en su extremo 5´ el péptido que conforma el epítopo del anticuerpo 4B3: LWGCSGKLVCTT-5´-CAGTGGCGTTTTATTCTTGTTACTG-3´). Al igual que en el estudio realizado para la detección del anticuerpo anti-FLAG se construyeron dos fases sensoras, cuya única diferencia radicó en la diferente concentración de HDT, 150 μM y 300 μM, manteniendo la concentración de hebra de anclaje. Ambas fases sensoras se incubaron con concentraciones crecientes de anti-4B3 preparadas en la disolución de Dulbecco durante 1 hora. Tras cada incubación se registró la intensidad de corriente obtenida mediante medidas de SWV. La disminución de la señal, expresada en tanto por ciento, en función de la concentración de anticuerpo se representa en la Figura 7.6 (líneas de color rojo).

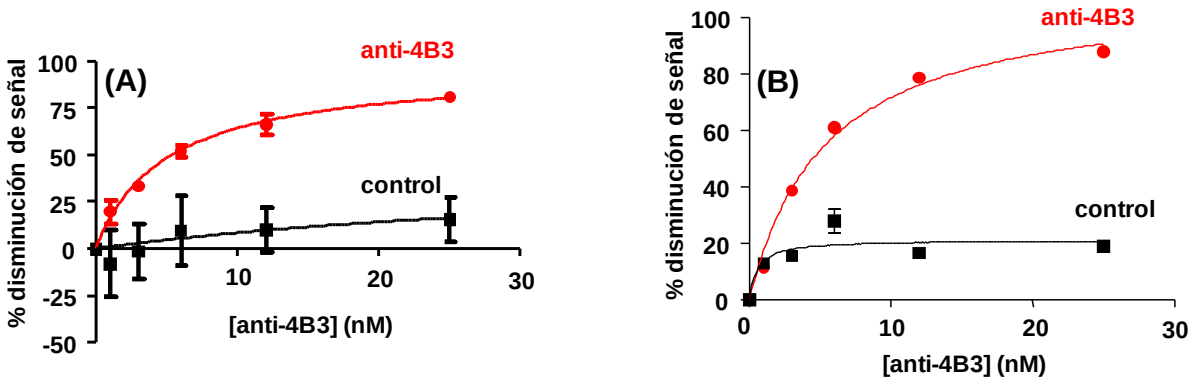

Figura 7.6. Variación de la señal registrada en tanto por ciento de disminución en función de la concentración de anti-4B3 (línea roja) y control negativo (línea negra) para una fase sensora cuyo relación [hebra de reconocimiento]/[HDT] es (A) 25 nM/150 μM y (B) 25 nM/300 μM.

Como se observa en la figura 7.6 cuanto mayor es la concentración de anticuerpo ensayada, mayor es la disminución de la señal registrada en tanto por ciento. La saturación de la fase sensora se alcanza para una concentración de anti-4B3 de 25 nM, el doble de la concentración de saturación registrada para la fase sensora que reconoce al anticuerpo anti-FLAG. La máxima señal registrada se correspondió con una disminución de la señal de 75-80%, similar a la registrada para el anticuerpo anti-FLAG empleando las fases sensoras construidas con la monocapa ternaria, y notablemente superior a la máxima señal registrada con la fase sensora construida con la monocapa binaria, ~45%[118].

Se llevó a cabo un control negativo con el objetivo de comprobar la estabilidad de la fase sensora mediante la incubación de ésta en la disolución reguladora durante una hora (Figura 7.6, líneas de color negro). Se comprobó que la fase sensora construida con la relación [hebra de anclaje]=25 nM/[HDT]=150 μM es estable durante las primeras 4 horas de ensayo, ya que la señal se mantiene en un valor similar al obtenido en ausencia de anticuerpo, mientras que se registró un ligero aumento de la misma tras la quinta incubación de 1 hora. Su magnitud es comparable a la señal obtenida para la menor concentración de anticuerpo ensayada. Por tanto, no sería recomendable el uso de esta fase sensora más de 4 incubaciones seguidas sin deterioro de la detectabilidad. En el caso de la fase sensora construida a partir de la disolución que contenía una relación [hebra de anclaje]=25 nM/[HDT]=300 μM, se

registró un aumento de la señal (~20%) tras 1 hora de incubación de la fase sensora con la disolución reguladora, que no se vio incrementada con el número de incubaciones.

7.4. APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DEL ANTICUERPO anti-FLAG EN SUERO HUMANO.

Dada la mayor estabilidad de la fase sensora para el anticuerpo anti-FLAG, se decidió aplicarla a la determinación del mismo en muestras de suero humano. De las dos fases sensoras caracterizadas en el apartado 7.3 se escogió la correspondiente a la relación [hebra de anclaje]=25 nM/[HDT]=300 μM, atendiendo al mayor contenido de HDT en la monocapa, que podría mejorar el comportamiento del sensor en muestras reales, al proporcionar un bloqueo más efectivo que impediría las adsorciones inespecíficas.

En primer lugar, se evaluó el comportamiento de la fase sensora en suero humano diluido. Para ello se llevaron a cabo incubaciones de la superficie electródica modificada en disoluciones de suero diluido a razón 1:9 con la disolución de Dulbecco en ausencia de anticuerpo. Se registró la señal electroquímica mediante SWV en la misma disolución de incubación y se expresó en tanto por ciento de disminución de la señal frente al tiempo de incubación (Figura 7.7).

Como se observa en la figura, las proteínas presentes en el suero humano se unen inespecíficamente a la fase sensora, lo que se traduce en un bloqueo de la superficie electródica que conlleva la disminución de la transferencia electrónica entre la marca y la superficie de oro, y por lo tanto, la disminución de la señal registrada. La interacción inespecífica de los componentes del suero con la fase sensora es rápida, de modo que la máxima señal se obtiene tras solamente 5 minutos de interacción.

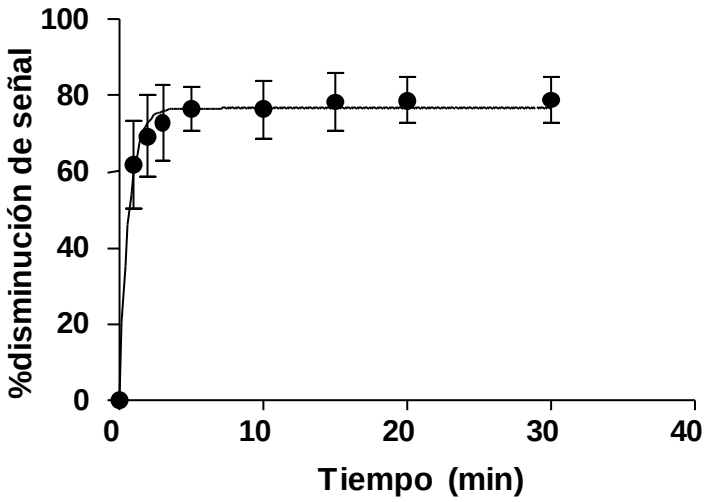

Figura 7.7. Variación de la señal medida mediante SWV correspondiente a la exposición de la fase sensora específica para el anticuerpo anti-FLAG durante distintos periodos de tiempo en suero humano diluido 1:9 con la disolución de Dulbecco.

A continuación se decidió comprobar si, a pesar de la adsorción inespecífica, la fase sensora conserva la capacidad de reconocimiento del anticuerpo anti-FLAG en la misma muestra real diluida. Para ello se introdujo la fase sensora en el suero diluido 1:9 con la disolución de Dulbecco durante 10 minutos registrándose la intensidad de corriente mediante SWV. De este modo se asegura la saturación de la fase sensora con los componentes del suero. La misma fase sensora se introdujo, posteriormente, en una disolución de suero diluido que contenía el anticuerpo anti-FLAG en una concentración de 25 nM durante 1 hora, registrándose la intensidad de corriente cada 10 minutos, con el objetivo de evaluar la evolución de la interacción (Figura 7.8).

A partir de la figura 7.8 (línea azul) se puede concluir que la adsorción inespecífica de los componentes del suero sobre la fase sensora no impide que tenga lugar el reconocimiento molecular del anticuerpo anti-FLAG por parte del epítopo FLAG inmovilizado sobre la superficie electródica a través de la doble hebra ADN/PNA, ya que tras 1 hora de incubación se registró una significativa disminución de la señal. No obstante la magnitud de dicha disminución (40%) es menor que la registrada en disolución acuosa (70-75%).

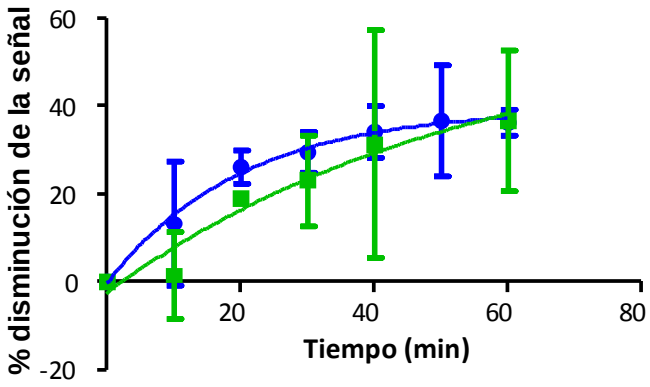

Figura 7.8. Variación de la señal analítica en función del tiempo tras la introducción de una fase sensora preparada a partir de una disolución que contenía [hebra de anclaje]=25 nM/[HDT]=300 µM, en una disolución de suero humano diluido 1:9 con la disolución de Dulbecco que contiene [anti-FLAG]=12 nM (línea verde) y [anti-FLAG]=25 nM (línea azul).

Dado que el sensor parece responder a la presencia de anticuerpo en suero diluido, se trató de verificar la existencia de una dependencia de la disminución de señal con la concentración de anticuerpo en dicha matriz. Para ello, la fase sensora empleada para la detección de anticuerpo anti-FLAG 12 nM, se introdujo en una disolución que contenía 25 nM de anticuerpo también en suero diluido 1:9 con la disolución de Dulbecco durante 1 hora, registrándose la intensidad de corriente mediante SWV cada 10 minutos. Como se observa en la Figura 7.8 línea verde, la señal registrada también aumenta con el tiempo, aunque tras una hora de incubación la señal registrada es la misma para ambas concentraciones, no siendo posible la distinción entre ambas, al menos si se efectúa la medida tras 60 min de incubación. En este punto hay que considerar que las concentraciones ensayadas corresponden a concentraciones saturantes en medio acuoso, por lo que podría esperarse un comportamiento distinto con concentraciones menores. Sin embargo, la disminución de la señal no es tan elevada como en medio acuoso, lo que podría limitar la detectabilidad en este tipo de matriz.

Por tanto, con los experimentos realizados durante 4 meses en los laboratorios del Prof. K.W. Plaxco, cabe concluir que el uso de monocapas ternarias en “scaffold sensors” mejora las prestaciones analíticas de las monocapas binarias en medio

acuoso, pero, en el estado actual de las investigaciones, no aportan una solución definitiva a la detección de anticuerpos en suero.

8. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

A continuación se exponen las conclusiones que se extraen del presente trabajo:

1. Se ha demostrado que cuando se introduce una modificación *post*-SELEX en un aptámero de ARN anti-tobramicina para aumentar su estabilidad frente a nucleasas, este sigue conservando sus propiedades de reconocimiento del antibiótico. La modificación escogida consiste en la sustitución de los grupos 2´-OH de las ribosas por grupos 2´-OMe.

2. Se utilizaron medidas SPR para caracterizar el evento de reconocimiento molecular entre dos aptámeros modificados, que se diferencian en el grado de metilación, y su molécula diana. La comparación de la constante de disociación (K_D) y las constantes cinéticas (k_a, k_d) obtenidas para los aptámeros modificados con los valores correspondientes a la interacción aptámero natural -tobramicina, permite concluir que la modificación *post*-SELEX causa una ligera disminución en la afinidad del aptámero hacia la tobramicina. La completa metilación de la secuencia de ARN se traduce en una disminución de la K_D de 4 veces en comparación con la secuencia natural de ARN. Además, se puede afirmar que el grupo 2´-OH de la base U12 de la secuencia aptamérica seleccionada está implicado en el reconocimiento molecular de la tobramicina, ya que la modificación de dicha base supone una disminución de la afinidad en 1,5 veces, una vez se han modificado el resto de nucleobases.

3. Se ha diseñado un aptasensor basado en un ensayo de desplazamiento para la determinación de tobramicina que no necesita el empleo de marcas para la obtención de una señal analítica. Este concepto de diseño permite determinar tobramicina en disolución acuosa empleando como receptores de afinidad los dos aptámeros anti-tobramicina modificados caracterizados. En ambos casos se obtienen límites de detección e intervalos lineales adecuados para la detección de concentraciones de tobramicina que cubren por completo su intervalo terapéutico. La fase sensora diseñada presenta una elevada selectividad respecto a todos los antibióticos aminoglicósidos estudiados (kanamicina, paramomicina, estreptomicina) excepto para la neomicina B, cuyo aptámero específico muestra una estructura en horquilla muy similar al aptámero anti-tobramicina empleado en el presente trabajo y es capaz de reconocer a la tobramicina en la misma extensión que la neomicina B. Esto hace pensar que el reconocimiento molecular no se debe exclusivamente a la secuencia del

aptámero sino que la estructura secundaria que adopta en disolución también desempeña un papel importante.

4. Se ha demostrado la utilidad del aptasensor impedimétrico propuesto para la determinación de tobramicina en muestras de suero humano empleando como receptor de afinidad el aptámero anti-tobramicina totalmente metilado. El límite de detección e intervalo lineal característicos del sensor en esta matriz son 1,8 μM y 3-70 μM respectivamente, cubriéndose por completo el intervalo clínicamente relevante, realizando una dilución mínima de la muestra (1 a 1,5).

5. Se ha demostrado que las micropartículas magnéticas modificadas con grupos carboxilo de superficie son un soporte adecuado para la construcción de una fase sensora para la determinación voltamétrica de tobramicina. Los grupos COOH permiten enlazar covalentemente tobramicina a través de un enlace amida y a esta se une, mediante interacción de afinidad, el aptámero que actúa como receptor.

6. Se ha evaluado la viabilidad de un ensayo competitivo en dos etapas sobre esta plataforma sensora. En este ensayo se utiliza aptámero no modificado en la etapa de reconocimiento molecular y posteriormente, aptámero modificado con biotina para el rellenado de los sitios de la superficie de las micropartículas magnéticas no ocupados por el primero. Se demostró que este ensayo, que teóricamente debía dar lugar a una curva de respuesta creciente, no responde a la concentración de tobramicina.

7. Se evaluó la afinidad del aptámero marcado con biotina (BATA) hacia la tobramicina mediante experimentos de SPR, comparándose con la correspondiente al aptámero sin marcar. La introducción de una molécula de biotina aumenta la afinidad aptámero-tobramicina hasta el punto de ser similar a la del aptámero natural, lo que explica la inviabilidad del ensayo anteriormente propuesto.

8. Se ha descrito por primera vez que la tobramicina presenta un efecto activador en la reacción de oxidación de la tetrametilbencidina catalizada por la peroxidasa. Esto impide que esta enzima pueda ser utilizada como marca en el desarrollo de un ensayo voltamétrico para la medida de tobramicina.

9. Se ha desarrollado un ensayo de inhibición sobre micropartículas magnéticas con detección voltamétrica que emplea la enzima ALP como marca. La comparación de dos sistemas distintos para la incorporación de la citada marca sobre las partículas, uno multivalente (biotina-estreptavidina) y otro monovalente (fluoresceína-antifluoresceína fragmento Fab), permite concluir que el sistema monovalente proporciona un intervalo lineal más amplio y un menor límite de detección además de una mayor reproducibilidad.

10. El ensayo de inhibición que utiliza el sistema monovalente de marcaje es válido para la determinación de tobramicina en muestras de suero humano obteniéndose un límite de detección y un intervalo lineal de 1 μM y 1-200 μM respectivamente, que cubre por completo el intervalo clínicamente relevante en suero. En este caso es necesario eliminar las proteínas séricas mediante dilución 1:9 en disolución de afinidad y posterior ultracentrifugación, para evitar la asociación del antibiótico a dichas proteínas.

11. Se ha utilizado el concepto de “scaffold sensor” para desarrollar un sensor que permita determinar macromoléculas para las que no se hayan desarrollado aptámeros, seleccionando como modelo los anticuerpos anti-FLAG y anti-VIH. Este concepto había sido utilizado previamente empleando monocapas binarias (ADN tiolado + mercaptohexanol) en la construcción de la fase sensora. El empleo de una monocapa autoensamblada ternaria (ADN tiolado + hexanoditiol + mercaptohexanol) como base para la construcción de sensores que emplean un dúplex de ADN como estructura sensora, permite obtener mayores cambios en la señal que los obtenidos con la fase sensora construida con una monocapa autoensamblada binaria, así como una mejor estabilidad. Aunque la nueva fase sensora responde a la concentración de ambos anticuerpos cuando estos se encuentran en disolución acuosa, esta no puede utilizarse para determinar los anticuerpos en muestras complejas como el suero humano.

Herein are summarized the conclusions that can be extracted from the present work:

1. It has been proved that a post-SELEX modification introduced into an anti-tobramycin RNA aptamer in order to increase its resistance to endonucleases, maintains its recognition ability towards the antibiotic. The selected modification consists of the introduction of an OMe group into the 2´-OH position of the ribose moiety.

2. The molecular recognition event between the modified aptamers that differ in the level of methylation, and its target molecule, tobramycin, was characterized by SPR measurements. The comparison of the dissociation constant (K_D) and kinetic constants (k_a, k_d) obtained for the modified aptamers with those corresponding to the interaction between the natural aptamer and tobramycin, allows to conclude that the post-SELEX modification leads to a slightly decrease in the aptamer affinity towards tobramycin. The fully modified aptamer shows a 4-fold lower K_D compared to the natural RNA. In addition to this, it can be stated that the 2´-OH group of the U12 base of the aptamer sequence is involved in the molecular recognition of tobramycin, because of the modification of this base leads to a 1.5-fold decrease in the affinity compared to the aptamer with all other modified bases.

3. A label-free displacement aptasensor for tobramycin detection has been designed. This concept of design allows determining tobramycin in aqueous solutions using both modified aptamers as affinity receptors. In both cases, a limit of detection and a lineal range suitable for the detection of the entire clinically relevant concentrations of tobramycin are obtained. The sensing phase designed shows a high selectivity towards other related antibiotics (kanamycin, paromomycin and streptomycin) but not for neomycin B, whose specific aptamer sequence has a hairpin structure, similar to the anti-tobramycin aptamer used throughout this work and is able to detect tobramycin to the same extent that neomycin B. This fact indicates that the molecular recognition event is not exclusively related to the aptamer sequence but also to the secondary structure adopted in the presence of the antibiotic.

4. The usefulness of the proposed impedimetric aptasensor for tobramycin detection was tested in human serum samples using the fully modified aptamer as an affinity receptor. The limit of detection and linear range found are 1.8 μM and 3-70 μM, respectively, which covers the entire therapeutic range in serum using a minimum dilution of the sample (1 to 1.5).

5. It has been proved that magnetic microparticles modified with surface carboxylic group constitute a suitable support for the construction of a sensing phase for the voltammetric determination of tobramycin. The COOH groups allow the covalent linking of tobramycin through an amide bond. This antibiotic is further bound to the aptamer that acts as a receptor by an affinity interaction.

6. The feasibility of the development of a two-step competitive assay based on this sensing platform has been evaluated. In this format assay, an unmodified aptamer is used in the molecular recognition step and a biotinylated aptamer is used for refilling the unoccupied tobramycin surface sites by the unmodified aptamer. Although, theoretically, this assay should give rise to a signal on response curve, it has been proved that it does not respond to tobramycin concentration.

7. The affinity of the biotinylated aptamer (BATA) was evaluated by SPR and compared with the corresponded to the unlabeled aptamers. The introduction of a biotin molecule increases the affinity of the aptamer-tobramycin interaction, which rivals the affinity of the natural aptamer, which explains the unfeasibility of the proposed competitive assay.

8. The activator effect of tobramycin on the peroxidase-catalyzed oxidation of tetramethylbenzidine is described for the first time. This prevents the use of this enzyme as a label for the development of a voltammetric assay for tobramycin.

9. An inhibition assay on magnetic microparticles with voltammetric detection on screen-printed electrodes that uses ALP as an enzyme label has been developed. From the comparison between two different systems to introduce that label on the beads, a

multivalent one (biotin-streptavidin) and a monovalent one (fluorescein-antifluorescein Fab fragment), it can be inferred that the monovalent system provides a wider linear range and a lower limit of detection as well as a more reproducible assay.

10. The inhibition assay with the monovalent labeling system is valid for the determination of tobramycin in human serum samples providing a limit of detection and a linear range of 1 μM and 1-200 μM, respectively, which covers the entire therapeutic range of the antibiotic in serum. In this case, the removal of serum proteins is needed by means of a 1:9 dilution in affinity buffer and further ultracentrifugation, to avoid the association of antibiotic to those proteins.

11. The scaffold sensor concept is used to develop a sensor to determine macromolecules for which no aptamers have been raised so far, selecting anti-FLAG and anti-HIV antibodies as models. This concept has been previously reported using binary self-assembled monolayers (thiolated-DNA + mercaptohexanol) in the construction of the sensing phase. The use of a ternary self-assembled monolayer (thiolated DNA + hexanodithiol + mercaptohexanol) as a foundation for the construction of sensors that employ a DNA duplex as a sensing structure, allows to obtain larger shifts in the analytical signal and a better stability when compared with the scaffold sensors based on the binary monolayer. Although the novel sensing phase responds to the concentration of antibodies in aqueous solution, it can not be used to determine antibodies in complex samples such as human blood serum.

ANEXO I. ORIENTACIÓN PARA TRABAJOS FUTUROS

No cabe duda de que el desarrollo de biosensores electroquímicos que emplean ácidos nucleicos estructurados como elementos de reconocimiento molecular es uno de los campos más prometedores dentro de la química analítica actual.

El desarrollo de este tipo de sensores no se limita únicamente a la detección de secuencias nucleicas específicas (reacción de hibridación), sino que permite la detección de una gran variedad de analitos no nucleicos incluyendo proteínas, iones, moléculas orgánicas pequeñas, etc.

El diseño de biosensores capaces de determinar con una elevada afinidad y especificidad una molécula de baja masa molecular basados en la integración de ácidos nucleicos como receptores de afinidad y transductores electroquímicos se presenta como un reto, que en el presente trabajo ha sido satisfactoriamente alcanzado para la molécula tobramicina, mediante el diseño de distintas estrategias de detección que pueden ser de aplicación general para la determinación de este tipo de moléculas. No obstante, el objetivo de diseño de un formato de ensayo que genere una señal creciente con la concentración de tobramicina no ha sido alcanzado.

La versatilidad de los ácidos nucleicos como reactivos de afinidad abre la posibilidad de diseñar un ensayo tipo sándwich para la determinación de moléculas pequeñas basado en el resensamblaje de las secuencias aptaméricas previamente fragmentadas. Uno de los fragmentos actuaría como reactivo de captura, mientras que el segundo (al que se le podría incorporar una marca -enzima, nanopartícula de oro, etc- con el objetivo de amplificar la señal) sería el reactivo de marcaje.

La adaptación de esta estrategia para la determinación de tobramicina empleando los aptámeros modificados descritos a lo largo del presente trabajo proporcionaría un ensayo cuya señal sería creciente con la concentración de tobramicina y que permitiría su aplicación a muestras biológicas reales. No obstante, los aptámeros anti-tobramicina descritos presentan una fuerte estructura en horquilla aún en ausencia de su molécula diana, lo que se presenta como un obstáculo a superar en el diseño de este formato de ensayo. Una posible solución sería el rediseño de cada uno de los fragmentos de modo que se evite su unión en ausencia de tobramicina, y que ésta se favorezca en presencia del antibiótico.

ANEXO II. REACTIVOS, INSTRUMENTACIÓN Y PROCEDIMIENTOS

1. REACTIVOS

Todos los compuestos fueron obtenidos comercialmente y usados sin tratamiento previo. Las disoluciones se prepararon con agua libre de ARNasas purificada mediante un sistema Direct-Q de Millipore que utiliza un cartucho BioPack de Millipore para eliminar las endonucleasas.

Todo el material de vidrio en contacto directo con el aptámero fue lavado previamente con un reactivo específico encargado de eliminar las endonucleasas, (RNAseZAP™ de Sigma). Adicionalmente todos los reactivos empleados para la preparación de las disoluciones que estén en contacto con los aptámeros se adquirieron también libres de endonucleasas.

Se utilizaron tres aptámeros anti-tobramicina diferentes a lo largo del presente trabajo. Todas ellas son secuencias de 27 bases de ARN que se diferencian en el número de bases que han sido modificadas con los grupos 2´-OMe en la posición 2´-OH de sus ribosas. Todas ellas fueron sintetizadas por Sigma Genosys (Francia) y purificadas por HPLC. Las secuencias son las siguientes:

- ATA: 5´[mG] [mG] [mC] [mA] [mC] [mG] [mA] [mG] [mG] [mU] [mU] U [mA] [mG] [mC] [mU] [mA] [mC] [mA] [mC] [mU] [mC] [mG] [mU] [mG] [mC] [mC] 3´
- ATATM:5´[mG] [mG] [mC] [mA] [mC] [mG] [mA] [mG] [mG] [mU] [mU] [mU] [mA] [mG] [mC] [mU] [mA] [mC] [mA] [mC] [mU] [mC] [mG] [mU] [mG] [mC] [mC] 3´
- ATANM: 5´G G C A C G A G G U U U A G C U A C A C U C G U G C C 3´

Además de las secuencias aptaméricas descritas también se han empleando secuencias que incluyen marcas tales como biotina, isotiocianato de fluoresceína o tiol. Al igual que las secuencias anteriores todas ellas fueron sintetizadas por Sigma Genosys (Francia) y purificadas por HPLC. Las secuencias son las siguientes:

- SHATA: SH-(C_6)-5´-[mG] [mG] [mC] [mA] [mC] [mG] [mA] [mG] [mG] [mU] [mU] U [mA] [mG] [mC] [mU] [mA] [mC] [mA] [mC] [mU] [mC] [mG] [mU] [mG] [mC] [mC] 3´

También se empleó una secuencia aptamérica correspondiente al antibiótico neomicina B. Se trató de una secuencia de ARN totalmente metilada y sintetizada por Sigma Genosys (Francia) con una grado de purificación HPLC. La secuencia se detalla

a continuación: 5´ [mG] [mG] [mC] [mC] [mU] [mG] [mG] [mG] [mC] [mG] [mA] [mG] [mA] [mA] [mG] [mU] [mU] [mU] [mA] [mG] [mG] [mC] [mC] 3´

Las secuencias empleadas a lo largo del capítulo 7 se detallan a continuación:

- Hebra de anclaje (27-mer) 5´-SH-GCAGTAACAAGAATAAAACGCCACTGC-3´-MB, sintetizada por Biosearch Technologies, Inc.
- Hebra de reconocimiento (25-mer) para el epítopo FLAG (las bases nucleotídicas son de PNA): DYKDDDDKGG-5´-CAGTGGCGTTTTATTCTTGTTACTG-3´, sintetizadas por PNAbio Inc.
- Hebra de reconocimiento (25-mer) para el anticuerpo 4B3 (las bases nucleotídicas son de PNA): LWGCSGKLVCTT-5´-CAGTGGCGTTTTATTCTTGTTACTG-3´)

El resto de los reactivos empleados a lo largo del trabajo se detallan a continuación.

Tabla 1. Reactivos empleados a lo largo del trabajo.

Reactivo	Pureza	Marca comercial
Sulfato de tobramicina		Sigma
Sulfato de estreptomicina		Sigma
Sulfato de kanamicina		Sigma
Sulfato de neomicina B		Sigma
Sulfato de paromomicina		Sigma
Ácido mercaptopropanoico	99%	Fluka
Cloruro de N-(3-Dimetilaminopropil)-N´-etilcarbodiimida (EDC)	Grado comercial	Sigma
N-hidroxisuccinimida (NHS)	97%	Fluka
Etanolamina	99%	Sigma
Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-etanosulfónico (HEPES)	99,5%	Fluka
Tris (hidroximetil)aminometano	99,8%	Sigma
Cloruro de sodio		Sigma
Cloruro de potasio	99%	Sigma
Cloruro de magnesio hexahidratado	99	Fluka
Cloruro de magnesio		Merck
Hexacianoferrato (II) de potasio trihidratado	99,5%	Fluka
Hexacianoferrato (III) de potasio	99	Fluka
Peróxido de hidrógeno	33%	Probus
Ácido sulfúrico	95%	Merck
Ácido nítrico	65%	Merck
Hidróxido de potasio	85%	Riedel-de-Haën
Etanol absoluto	99,8%	Prolabo
Acetona	99,5%	Prolabo
Disolución de Dulbecco 10X		Sigma
Disolución de PBS 10X	Libre de ARNasas	Sigma

Tabla 1 (Continuación). Reactivos empleados a lo largo del trabajo.

Reactivo	Pureza	Casa comercial
$Strep_2$-ALP		Sigma
Fragmento Fab anti-fluoresceína-ALP		Roche Diagnostics
Fragmento Fab anti-fluoresceína-POD		Roche Diagnostics
α-naftilfosfato		Sigma
TMB sustrato líquido para ELISA		Sigma
BSA	Libre de ARNasas	Sigma
Tween 20	Libre de ARNasas	Sigma
Disolución de bloqueo: PBS 1X, caseína 1%		Sigma
6-Mercapto-1-hexanol	97%	Sigma
1,6-Hexanoditiol	96%	Sigma
Anticuerpo anti-FLAG		Sigma
Anticuerpo 4B3		Polymun Scientific
Suero humano		Sigma
tris(2-carboxietil)fosfina		Sigma
Ditiotreitol		Sigma

1.1. Disoluciones reguladoras empleadas a lo largo del trabajo.

I. Medidas de resonancia de plasmón superficial (SPR).

Las disoluciones empleadas a lo largo de todos los experimentos de SPR fueron las siguientes:

- ✓ Disolución de inmovilización: HEPES 0,1 M, pH 8,64.
- ✓ Disolución de afinidad: TRIS/HCl 20 mM de pH 7,4, que contiene 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$.
- ✓ Disolución de regeneración: HCl 0,05 M

II. Medidas de espectroscopia de impedancia faradaica (FIS).

Las disoluciones empleadas a lo largo de todos los experimentos de impedancia son las siguientes:

- ✓ Disolución de medida: TRIS/HCl 10 mM de pH 7,4, que contiene 100 mM KCl y 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$.
- ✓ Disolución de inmovilización: HEPES 0,1 M pH 8,64.
- ✓ Disolución de afinidad: TRIS/HCl 20 mM de pH 7,4, que contiene 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$.

- ✓ Disolución de lavado: TRIS/HCl 20 mM de pH 7,4, que contiene 2 M NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ y 1 mM $CaCl_2$.
- ✓ Disolución de regeneración: TRIS/HCl 20 mM de pH 7,4, que contiene 10 mM de tobramicina, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$.

III. Medidas voltamétricas empleando el sistema de marcaje biotina-estreptavidina

Las disoluciones empleadas a lo largo de todos los experimentos con partículas magnéticas y detección voltamétrica empleando el sistema de marcaje tetravalente (biotina-estreptavidina) se detallan a continuación:

- ✓ Disolución de inmovilización: HEPES 0,1 M, pH 8,64.
- ✓ Disolución de afinidad: TRIS/HCl 20 mM de pH 7,4, que contiene 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$.
- ✓ Disolución de detección: Tris/HCl 0,5 M de pH 9,8, que contiene $MgCl_2$ 1 mM.

IV: Medidas voltamétricas empleando el sistema de marcaje fluoreceína-antifluoresceína fragmento Fab.

Las disoluciones empleadas a lo largo de todos los experimentos con partículas magnéticas y detección voltamétrica empleando el sistema de marcaje monovalente (fluoresceína-antifluoresceína fragmento Fab) se detallan a continuación:

- ✓ Disolución de inmovilización: HEPES 0,1 M, pH 8,64.
- ✓ Disolución de afinidad: TRIS/HCl 20 mM de pH 7,4, que contiene 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$.
- ✓ Disolución de marcaje enzimático: PBS 1X de pH 7,4 que contiene caseína 0,5% y Tween 20 0,025%.
- ✓ Disolución de detección: Tris/HCl 0,5 M de pH 9,8, que contiene $MgCl_2$ 1 mM.

V. Medidas llevadas a cabo con el *"scaffold sensor"* para la determinación de anticuerpos.

Las disoluciones empleadas a lo largo de todos los experimentos descritos en el capítulo 7 se detallan a continuación:

- ✓ Disolución de Dulbecco 10X: KH_2PO_4 2 g/L; Na_2HPO_4 11,5 g/L; $CaCl_2$ 1,33 g/L; $MgCl_2$ 1 g/L; KCl 2 g/L; NaCl 80 g/L.

2. INSTRUMENTACIÓN.

I. Medidas de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR).

Las medidas de SPR fueron realizadas con un equipo Autolab-ESPRIT (Ecochemie, Holanda), formado por una celda tipo cubeta de doble canal donde tienen lugar las medidas y equipado con un robot para realizar todas las medidas de forma automática. El instrumento está controlado por ordenador mediante el programa Data Acquisition Software (ESPRIT, versión 4.4). El tratamiento de los datos (superposición y alineamiento de los sensorgramas y las correcciones de base) se realizan por medio del programa Kinetic Evaluation Software (ESPRIT, versión 5.2.).Otros ajustes no lineales necesario para la interpretación de los datos fueron realizados con el programa Origin 7.5. (Northampton, MA). Todas las medidas se llevaron a cabo sobre discos BK7 comerciales provistos de un recubrimiento de oro de 50 nm aprox. de espesor (Ecochemie, Holanda) y bajo unas condiciones de temperatura controladas, 25±1 ºC, utilizando un termostato Haake D1 (Alemania).

II. Medidas electroquímicas.

Todas las medidas electroquímicas referentes al capítulo 4 se realizaron en una celda convencional de tres electrodos controlada mediante ordenador por un potenciostato Autolab PGstat-12 provisto del software GPES y FRA 4.9 (Ecochemie). Como electrodo de trabajo se utilizó un electrodo de oro de 1,6 mm de diámetro (Bioanalytical Systems, Inc). El electrodo auxiliar empleado fue un alambre de platino de 15 mm de longitud y 1 mm de diámetro. Todos los potenciales se refieren a un electrodo de referencia $Ag/AgCl/KCl_{sat}$. Las medidas electroquímicas correspondientes

a los capítulos 5 y 6 se llevaron a cabo empleando electrodos serigrafiados de carbono (DROP-110) cuyos electrodos de trabajo y contraelectrodo son de carbono, mientras que el electrodo de referencia es de plata.

Las medidas electroquímicas correspondientes al capítulo 7 se llevan a cabo empleando una celda convencional de 3 electrodos similar a la anterior controlada mediante ordenador por un potenciostato CH instruments (Austin, TX) provisto del software CH Instruments Electrochemical Software 12.02

3. PROCEDIMIENTOS

I. Desprotección del aptámero tiolado.

La secuencia aptamérica tiolada (empleada en los capítulos 3 y 4) se obtiene comercialmente en su forma de disulfito, por lo que se requiere ser desprotegido previamente a su utilización. Con el objetivo de reducir los enlaces S-S y obtener el grupo –SH, el oligonucleótido comercial fue tratado con 100 µL de una disolución de dtitiotreitol (DTT) 0,1 M durante 16 h a temperatura ambiente. Tras añadir 900 µL de H_2O para obtener una muestra cuyo volumen final es 1 mL, ésta se hace pasar por una columna de exclusión por tamaños Sephadex G25 (NAP-10, Pharmacia Biotech) con el objetivo de separar la secuencia nucleotídica del resto de reactivos. Tras la elución del oligo con agua Milli-Q la concentración del aptámero tiolado se comprobó espectofotométricamente a una longitud de onda de 260 nm. Se almacenó a -20 ºC.

II. Limpieza y pre-tratamiento de los electrodos de oro.

-Inmersión del electrodo en una disolución piraña, 3 H_2SO_4: 1 H_2O_2 durante 10 minutos. ¡Cuidado, la piraña posee un alto poder oxidante por lo que debe ser manejada con precaución!

-Pulido del electrodo sobre suspensiones de alúmina con distinto tamaño de partícula: 1, 0,3 y 0,05 µm (Buehler, Alemania).

-Introducción en un baño de ultrasonidos (Selecta) durante 5 minutos.

-Inmersión del electrodo en una disolución de KOH 2 M durante 1 hora a 60 ºC en un termobloc (Selecta).

-Inmersión sucesiva del electrodo en H_2SO_4 concentrado y en HNO_3 concentrado a temperatura ambiente durante 10 minutos en cada caso.

-Realización de varios ciclos de potencial con el electrodo introducido en una disolución de H_2SO_4 0,1 M, entre 0 y 1,6 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s hasta la obtención de un voltamograma cíclico estable.

III. Protocolo empleado para la limpieza electroquímica de los electrodos de oro en el capítulo 7.

Tras su pulido sobre una suspensión de alúmina de 0,05 µM (Buehler, Alemania), los electrodos de oro fueron sometidos a un protocolo de limpieza electroquímica compuesto de 5 pasos:

1. Voltametría cíclica en una disolución de NaOH 0,5 M hasta que no se observe cambio alguno en el perfil del voltagrama registrado. Los parámetros empleados para llevar a cabo la medida son los especificados en la tabla 2 de este anexo. Llevar a cabo varios ciclos en condiciones básicas permite la eliminación de cualquier molécula unida a la superficie del oro mediante el enlace Au-S, mediante su desorción reductiva.

Tabla 2. Parámetros electroquímicos para llevar a cabo la primera etapa de la limpieza electroquímica a la que son sometidos los electrodos de oro.

Potencial inicial (V)	-0,4
Potencial final (V)	-1,35
Polaridad inicial	N
Velocidad de barrido (V/s)	2
Nº segmentos	1000
Tiempo inicial (s)	0
Sensibilidad (A)	$1 \cdot 10^{-4}$

2. Oxidación /reducción en un medio de H_2SO_4 0,5 M. Los electrodos se someten a una etapa de oxidación a un potencial de 2 V durante 5 segundos y a una etapa de reducción a -0,35 V durante 10 segundos. Durante la primera etapa se oxida cualquier

contaminante orgánico que pudiera encontrarse sobre la superficie electródica a la vez que se forma una capa de óxidos de oro (atención: durante esta etapa se producen burbujas de O_2 fruto de la oxidación del H_2O que deben ser eliminadas para continuar con el proceso de limpieza). En la segunda etapa se reducen los óxidos de oro formados en la etapa de oxidación.

3. Voltametría cíclica en un medio de H_2SO_4 0,5 M. Se llevan a cabo dos etapas de barrido para cada uno de los electrodos. Los parámetros empleados se especifican en la tabla 3 de este anexo. Ambas etapas provocan la oxidación y reducción de contaminantes que pudieran permanecer sobre la superficie del electrodo al mismo tiempo que se continua formando y reduciendo la capa de óxidos de oro.

Tabla 3. Parámetros electroquímicos para llevar a cabo el tercer paso de la limpieza electroquímica a la que son sometidos los electrodos de oro.

	Etapa I	**Etapa II**
Potencial inicial (V)	-0,35	-0,35
Potencial final (V)	1,5	1,5
Polaridad inicial	P	P
Nº segmentos	20	4
Velocidad de barrido (V/s)	4	0,1
Tiempo inicial (s)	0	0
Sensibilidad (A)	$5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-5}$

4. Voltametría cíclica en un medio de H_2SO_4 0,1 M que contiene KCl 0,01 M. Se llevan a cabo cuatro barridos siguiendo los parámetros especificados en la tabla 4 de este anexo. Los cloruros presentes en el medio forman complejos estables con el oro, de modo que parte del oro presente en la capa más superficial es eliminada, contribuyendo a una mayor limpieza de la superficie de oro.

Tabla 4. Parámetros electroquímicos para llevar a cabo la cuarta etapa de la limpieza electroquímica a la que son sometidos los electrodos de oro.

	Etapa I	**Etapa II**	**Etapa III**	**Etapa IV**
Potencial inicial (V)	0,2	0,2	0,2	0,2
Potencial final (V)	1,75	1	1,25	1,5
Polaridad inicial	P	P	P	P
Nº segmentos	10	10	10	10
Velocidad de barrido (V/s)	0,1	0,1	0,1	0,1
Tiempo inicial (s)	0	0	0	0
Sensibilidad (A)	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-5}$

IV. Obtención de las medidas de impedancia faradaica y voltametría cíclica (capítulo 4).

El registro del espectro de impedancias se llevó a cabo introduciendo el electrodo en la disolución de medida (que contiene 5 mM de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$), bajo las siguientes condiciones: potencial +0,225 V, intervalo de frecuencias desde 10 KHz hasta 100 mHz y amplitud de tensión alterna superpuesta de 5 mV. Todas las medidas fueron realizadas a temperatura ambiente.

El registro de los voltagramas cíclicos se llevó a cabo en la misma disolución de medida, entre los valores de potencial 0 y +0,5 V a una velocidad de barrido de potencial de 50 mV/s.

V. Condiciones para la obtención de las medidas de voltametría diferencial de pulso (DPV) (capítulos 5 y 6)

El registro de las medidas de voltametría diferecial de pulso (DPV) se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: potencial inicial: 0 V; potencial final: 0,55 V; amplitud: 0,05 V; escalón de potencial: 0,0015 V; intervalo de tiempo 0,15 s y tiempo de modulación: 0,05 s.

VI. Condiciones para la obtención de las medidas de cronoamperometría (capítulo 6).

En el apartado 6.4.1 las medidas de cronoamperometría se llevaron a cabo aplicando un potencial de 0 V durante 60 s. La señal analítica correspondió a la intensidad de corriente media registrada durante los últimos 10 s de la cronoamperometría.

VII. Condiciones para la obtención de las medidas de voltametría de onda cuadrada (SWV) (capítulo 7).

Los parámetros de medida fueron los siguientes: El potencial se varió desde 0 hasta -0,5 V con un salto de potencial de 1 mV, una amplitud de 25 mV a una frecuencia de 60 Hz.

ANEXO III. TABLAS

Tabla 1. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 3.17 (A). Variación del R_{eq} en función de la $[ATANM]_{libre}$.

Isoterma de Langmuir	
$[ATANM]_{libre}$ (µM)	R_{eq} (m°)
0,00	0,00
0,097	54,23
0,246	64,23
0,495	81,58
0,995	83,92
1,995	90,51

Tabla 2. Datos experimentales correspondientes al recuadro de la representación de la figura 3.17 (A). Variación de $R_{eq}/[ATANM]_{libre}$ en función de R_{eq}.

Representación de Scatchard (recuadro)	
R_{eq} (m°)	$R_{eq}/[ATANM]_{libre}$ x 10^{-8} ($m°M^{-1}$)
51,34	5,3
74,94	3,1
84,23	1,7
99,81	1,0

Tabla 3. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 3.17 (B). Variación del R_{eq} en función de la $[ATA]_{libre}$.

Isoterma de Langmuir	
$[ATA]_{libre}$ (µM)	R_{eq} (m°)
0,00	0,00
0,059	17,26
0,099	24,34
0,148	29,95
0,198	32,84
0,298	37,51

Tabla 4. Datos experimentales correspondientes al recuadro de la representación de la figura 3.17 (B). Variación de Req/$[ATA]_{libre}$ x 10^{-8} en función de R_{eq}.

Representación de Scatchard (recuadro)	
R_{eq} (m°)	$R_{eq}/[ATANM]_{libre}$ x 10^{-8} ($m°M^{-1}$)
17,26	2,93
24,34	2,47
29,95	2,02
32,84	1,66
37,51	1,26

Tabla 5. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 3.17 (C). Variación del R_{eq} (m°) en función de la $[ATATM]_{libre}$ (µM).

Isoterma de Langmuir	
$[ATA]_{libre}$ (µM)	R_{eq} (m°)
0,000	0,00
0,198	26,25
0,298	33,84
0,398	40,63
0,498	40,55
0,748	46,30
0,997	49,92

Tabla 6. Datos experimentales correspondientes al recuadro de la representación de la figura 3.17 (C). Variación de $R_{eq}/[ATATM]_{libre}$ en función de R_{eq}.

Representación de Scatchard (recuadro)	
R_{eq} (m°)	$R_{eq}/[ATANM]_{libre}$ x 10^{-8} (m°M^{-1})
26,25	1,32
33,84	1,14
40,63	0,82
46,30	0,46
49,92	0,33

Tabla 7. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 4.4 (A). Variación de R_{et} en función de [aptámero].

[aptámero] (µM)	R_{et} (Ω)
0,1	517
0,3	494
0,5	696
3,0	475
5,0	539

Tabla 8. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 4.4 (B). Variación de R_{et} en función del tiempo.

tiempo (min)	R_{et} (Ω)
0,5	411
1,5	466
5,0	548
10,0	509
15,0	520
20,0	559
25,0	582
30,0	576

Tabla 9. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 4.6. Variación de S (%) en función del log[tobramicina].

log[tobramicina (μM)]	S(%)
-1,000	100,00
-0,301	94,06
-0,125	89,71
0,699	61,22
1,699	23,50
2,301	4,69
2,699	2,68
3,000	2,73
3,301	0,00

Tabla 10. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 4.7. Valor de Ret correspondientes a la mínima señal (tobramicina) y a la máxima señal (saturación con aptámero) para 4 regeneraciones sucesivas de una misma fase sensora.

Etapa	R_{et} (Ω)
Tobramicina (1)	221,7
Aptámero (1)	356,3
Tobramicina (2)	198,8
Aptámero (2)	389,8
Tobramicina (3)	245,0
Aptámero (3)	357,8
Tobramicina (4)	198,8
Aptámero (4)	355,7

Tabla 11. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 4.8. (A). Variación de S(%) en función del log[antibiótico].

log[antibiótico(μM)]	S(%) tobramicina	S(%) kanamicina	S(%) neomicina	S(%) paromomicina	S(%) estreptomicina
-1,000	100,00	91,29	100	79,98	100
-0,301	94,06	108,89	91,31	86,82	114,26
-0,125	89,71	110,33			
0,000		116,17	83,53	92,73	126,67
0,699	61,22	87,31	55,36	100,39	139,40
1,699	23,50	96,38	18,35	96,11	157,30
2,301	4,69	75,19	8,58	88,06	163,41
2,699	2,68	68,21	4,96	99,86	166,53
3,000	2,73	73,69	2,16	88,68	175,15
3,301	0,00	70,28	1,92	83,65	172,41

Tabla 12. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 4.8. (B). Variación de S (%) en función del log[antibiótico].

log[antibiótico(μM)	S(%) tobramicina	S(%) neomicina
-1,301	90,70	90,59
-0,297	84,87	85,76
0,699	79,13	70,19
1,699	50,09	23,53
2,699	23,14	10,10
3,699	23,00	8,59

Tabla 13. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 4.9 (A). Variación de R_{et} en función del tiempo.

Tiempo (min)	R_{et} (Ω)
1	376
2	426
5	264
8	465
10	471

Tabla 14. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 4.9 (B). Variación de R_{et} en función del tiempo.

Tiempo (min)	R_{et} (Ω)
0	359
1	280
2	249
5	265
8	225
10	273

Tabla 15. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 4.10. Variación de S(%) en función del log[tobramicina].

log[tobramicina (μM)]	S(%)
-1,000	100,00
-0,301	87,15
-0,125	82,13
0,000	76,54
0,301	68,34
0,699	52,61
1,000	35,41
1,699	13,90
2,000	3,41
2,699	-0,61

Tabla 16. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 4.11. Variación de R_{et} en función del tiempo.

Tiempo (min)	R_{et} (Ω)
0	444
1	339
2	346
3	345
5	351
8	353
10	350
15	347

Tabla 17. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 4.12. Variación de S (%) en función de log[tobramicina].

log [tobramicina (µM)]	S(%)
-1,000	100
-0,301	53
0,000	82
0,176	39
0,301	80
0,477	43
0,699	76
1,000	36
1,176	60
1,301	65
1,699	40

Tabla 18. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 4.13. Variación de S (%) en función de log[tobramicina].

log[tobramicina (µM)	S(%) A	S (%) B	S (%) C	S (%) D
-0,301		91,97		
-0,155				97,52
-1,301	100			
0,176				96,77
0,000		95,7		
0,301	78,17		87,25	
0,477				96,69
0,699			85,63	
0,875		87,66	83,32	
1,000	53,85		74,98	69,58
1,301	35,27		58,59	49,65
1,477		64,4		
1,602			48,84	
1,699	19,34	47,23	42,95	30,43
1,845			36,55	
2,000		35,26	28,88	23,55
2,079	1,73			21,14
2,176		25,08	30,02	
2,301		26.1		
2,477		22,4		

Tabla 19. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 5.3. Corriente registrada I en función de [tobramicina] para [BATA]=0,5 µM y [BATA]=0 y [tobramicina]=0 (adsorción inespecífica).

[tobramicina] (mM)	$I_{[BATA]=0,5\ \mu M}$(µA)	$I_{[BATA]=0\mu M;\ [tobramicina]=0}$ (µA)
20	1,54	0,55
40	6,88	0,28
80	6,26	0,09

Tabla 20. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 5.4. Efectos principales de los factores A ([ATA]), B ([BATA]) y t (tiempo$_{BATA}$). Variación de la y_{media} en función del nivel del factor bajo estudio.

Niveles	y_{media}, A (µA)	y_{media}, B (µA)	y_{media}, C (µA)
1	1,03	1,34	1,27
2	1,32	1,18	1,21,
3	--	1,05	1,05

Tabla 21. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 5.5. Interacciones entre los factores estudiados. Variación de la y_{media} en función del nivel del factor bajo estudio.

Nivel de A/Nivel de B	1	2	3
1	1,09	1,01	0,98
2	1,59	1,34	1,05

Tabla 22. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 5.5. Interacciones entre los factores estudiados. Variación de la y_{media} en función del nivel del factor bajo estudio.

Nivel de A/Nivel de t	1	2	3
1	0,99	1,11	0,98
2	1,54	1,31	1,12

Tabla 23. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 5.5. Interacciones entre los factores estudiados. Variación de la y_{media} en función del nivel del factor bajo estudio.

Nivel de B/Nivel de t	1	2	3
1	1,14	1,48	1,40
2	1,71	1,03	0,79
3	0,95	1,12	0,96

Tabla 24. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 5.8. Respuesta registrada para cada uno de los pasos llevados a cabo durante el proceso de optimización siguiendo la trayectoria de la máxima pendiente.

Nº pasos	y (µA)
1	2,02
2	1,93
3	4,67
4	1,89

Tabla 25. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 5.11. Variación del R_{eq} en función de la $[BATA]_{libre}$.

Isoterma de Langmuir	
R_{eq} (m°)	$[BATA]_{libre}$ (µM)
0,00	0,000
24,39	0,074
35,28	0,148
52,03	0,747
56,24	0,997

Tabla 26. Datos experimentales correspondientes al recuadro de la representación de la figura 5.11. Variación de Req/$[BATA]_{libre}$ en función de R_{eq}.

Representación de Scatchard (recuadro)	
$R_{eq}/[BATA]_{libre}$ x 10^{-8} (m°M^{-1})	R_{eq} (m°)
3,31	24,39
2,38	35,28
0,69	52,03
0,56	56,24

Tabla 27. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 6.2. Variación de intensidad de corriente registrada, I con el tiempo de reacción enzimática, tiempo para una disolución que contiene BATA 0,5 µM (a) en ausencia y (b) en presencia de tobramicina 100 µM.

Tiempo (min)	$I_{[BATA]=0,5\ \mu M,[tobramicina]=0}$ (µA)	$I_{[BATA]=0,5\ \mu M,[tobramicina]=100\ \mu M}$ (µA)
5	3,2	1,9
10	3,9	2,3
15	4,9	3,5
20	5,7	3,9
30	8,7	6,5

Tabla 28. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 6.4. Variación de la intensidad de corriente registrada (expresada en tanto por ciento de la máxima señal) como función de [BATA].

[BATA] (µM)	S (%)
0,05	43,37
0,1	52,60
0,5	67,69
1	75,41
5	100

Tabla 29. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 6.5.Variación de la intensidad de corriente registrada (expresada en tanto por ciento de la máxima señal) como función de [antibiótico].

[antibiótico] (µM)	S (%) $_{tobramicina}$	S (%) $_{kanamicina}$	S (%) $_{estreptomicina}$
5	84,95	100,37	141,18
10		137,22	103,62
50	79,26	95,49	130,32
100	70,17	93,61	104,52
200	61,77	64,10	188,69
300	51,06		
400	41,02	55,79	97,29
500	27,64		

Tabla 30. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 6.6.Variación de la intensidad de corriente registrada con la concentraciones de FITC-ATA (expresadas en tanto por ciento de la máxima señal) empleando como sistema de detección el conjugado enzimático (A) fragmento-Fab-anti-FITC-ALP (B) fragmento-Fab-anti-FITC-POD.

[FITC-ATA] (µM)	S (%)fragmento-Fab-anti-FITC-ALP	S (%)fragmento-Fab-anti-FITC-POD
0,050	16,90	44,54
0,075	20,20	50,62
0,100	35,42	
0,500	60,56	87,02
1,000	75,13	
5,000	100,00	100,00

Tabla 31. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 6.8.Variación de la intensidad de corriente registrada con la concentraciones (expresadas en tanto por ciento S(%)) en función del logaritmo de distintos antibióticos.

log [antibiótico (µM)	S(%)tobramicina	S(%)kanamicina	S(%)estreptomicina
-1.000	89.29		
-0.301	74.32		
0.000	68.51	97.66	84.19
0.698	64.13		
1.000		100.83	94.32
2.000	28.95	85.66	94.06
2.698	22.15	40.31	83.55
3.000	13.61	29.53	81.27

Tabla 32. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 6.9.(A). Variación del cociente de señal/blanco en función del tiempo de incubación con la muestras.

tiempo (min)	I apt=0,3 µM / Iapt=0
2	0.94
5	2.64
10	1.53
15	1.56

Tabla 33. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 6.9.(B) Variación del cociente de señal/blanco en función del tiempo de incubación con el conjugado enzimático.

Tiempo (min)	I apt=0,3 µM / Iapt=0
5	1.39
10	1.95
20	1.13
30	0.95

Tabla 34. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 7.4.(B) Variación de la señal registrada en tanto por ciento de disminución, en función de [anti-FLAG] y control negativo.

[anti-FLAG] (nM)	% disminución señal (anti-FLAG)	% disminución señal (control)
0	0,00	0,00
1	21,36	2,59
3	43,26	-2,79
6	57,43	-5,15
12	66,05	-4,30
25	71,90	-6,59

Tabla 35. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 7.5.(B) Variación de la señal registrada en tanto por ciento de disminución, en función de [anti-FLAG] y control negativo.

[anti-FLAG] (nM)	% disminución señal (anti-FLAG)	% disminución señal (control)
0	0,00	0,00
1	29,42	6,60
3	44,20	0,55
6	56,93	0,27
12	64,15	-9,91
25	70,10	-3,33

Tabla 36. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 7.6.(A) Variación de la señal registrada en tanto por ciento de disminución en función de la concentración de anti-4B3 y control negativo para una fase sensora cuyo relación [hebra de reconocimiento]/[HDT] es 25 nM/150 µM.

[anti-4B3] (nM)	% disminución señal (anti-4B3)	% disminución señal (control)
0	0,00	0,00
1	20,09	-7,69
3	33,77	-1,32
6	52,33	9,78
12	66,65	10,28
25	81,32	15,86

Tabla 37. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 7.6.(B) Variación de la señal registrada en tanto por ciento de disminución en función de la concentración de anti-4B3 y control negativo para una fase sensora cuyo relación [hebra de reconocimiento]/[HDT] es 25 nM/300 μM.

[anti-4B3] (nM)	% disminución señal (anti-4B3)	% disminución señal (control)
0	0,00	0,00
1	11,77	13,08
3	38,79	15,51
6	60,97	27,99
12	78,77	16,66
25	88,02	19,02

Tabla 38. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 7.7. Variación de la señal disminución de la señal expresado en tanto por ciento en función del tiempo tras la introducción de una fase sensora preparada a partir de una disolución que contenía [hebra de anclaje]=25 nM/[HDT]=300 μM, en una disolución de suero humano diluido 1:9.

Tiempo (min)	S% disminución señal
0	0,00
1	61,95
2	69,23
3	72,88
5	76,44
10	76,35
15	78,26
20	78,73
30	78,88

Tabla 39. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 7.8. Variación de la señal analítica en función del tiempo tras la introducción de una fase sensora preparada a partir de una disolución que contenía [hebra de anclaje]=25 nM/[HDT]=300 μM, en una disolución de suero humano diluido 1:9 con la disolución de Dulbecco que contiene [anti-FLAG]=12 nM y [anti-FLAG]=25 mM.

Tiempo (min)	[anti-FLAG]=12 nM	[anti-FLAG]=25 nM
0	0,00	0,00
10	1,66	13,49
20	19,03	26,28
30	23,21	29,56
40	31,42	34,37
50		36,80
60	36,84	36,46

ANEXO IV. REFERENCIAS

(1) Kruger, K.; Grabowski, P. J.; Zaug, A. J.; Sands, J.; Gottschling, D. E.; Cech, T. R. *Cell* **1982**, *31*, 147-157.

(2) Guerrier-Takada, C.; Gardiner, K.; Marsh, T.; Pace, N.; Altman, S. *Cell* **1983**, *35*, 849-857.

(3) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, *346*, 818-822.

(4) Robertson, D. L.; Joyce, G. F. *Nature* **1990**, *344*, 467-468.

(5) Tuerk, C.; Gold, L. *Science* **1990**, *249*, 505-510.

(6) Tucker, B. J.; Breaker, R. R. *Current Opinion in Structural Biology* **2005**, *15*, 342-348.

(7) Gelfand, M. S.; Mironov, A. A.; Jomantas, J.; Kozlov, Y. I.; Perumov, D. A. *Trends in Genetics* **1999**, *15*, 439-442.

(8) Miranda-Ríos, J. *Structure* **2007**, *15*, 259-265.

(9) Ciesiolka, J.; Gorski, J.; Yarus, M. *RNA* **1995**, *1*, 538-550.

(10) Sassanfar, M.; Szostak, J. W. *Nature* **1993**, *364*, 550-553.

(11) Jenison, R. D.; Gill, S. C.; Pardi, A.; Polisky, B. *Science* **1994**, *263*, 1425-1429.

(12) Stojanovic, M. N.; Prada, P.; Landry, D. W. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 11547-11548.

(13) Wang, Y.; Rando, R. R. *Chemistry & Biology* **1995**, *2*, 281-290.

(14) Wallis, M. G.; Ashen, U.; Schroeder, R.; Famulok, M. *Chemistry & Biology* **1995**, *2*, 543-552.

(15) Green, L. S.; Jellinek, D.; Jenison, R.; Ostman, A.; Heldin, C. H.; Janjic, N. *Biochemistry* **1996**, *35*, 14413-14424.

(16) Bock, L. C.; Griffin, L. C.; Latham, J. A.; Vermaas, E. H.; Toole, J. J. *Nature* **1992**, *355*, 564-566.

(17) Yamamoto, R.; Katahira, M.; Nishikawa, S.; Baba, T.; Taira, K.; Kumar, P. K. *Gene to Cells* **2000**, *5*, 371-388.

(18) Lee, Y. J.; Lee, S.-W. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **2006**, *16*, 1154-1157.

(19) Lee, Y. J.; Han, S. R.; Maeng, J.-S.; Cho, Y.-J.; Lee, S.-W. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2012**, *417*, 414-420.

(20) Hyeon, J.-Y.; Chon, J.-W.; Choi, I.-S.; Park, C.; Kim, D.-E.; Seo, K.-H. *Journal of Microbiological Methods* **2012**, *89*, 79-82.

(21) Joshi, R.; Janagama, H.; Dwivedi, H. P.; Kumar, T. M. A. S.; Jaykus, L.-A.; Schefers, J.; Sreevatsan, S. *Molecular and Cellular Probes* **2009**, *23*, 20-28.

(22) Patel, D. J.; Suri, A. K. *Reviews in Molecular Biotechnology* **2000**, *74*, 39-60.

(23) Patel, D. J.; Suri, A. K.; Jiang, F.; Jiang, L.; Fan, P.; Kumar, R. A.; Nonin, S. *Journal of Molecular Biology* **1997**, *272*, 645-664.

(24) Hermann, T.; Patel, D. J. *Science* **2000**, *287*, 820-825.

(25) Yamamoto, R.; Murakami, K.; Taira, K.; Kumar, P. K. R. *Gene Therapy and Molecular Biology* **1998**, *1*, 451-466.

(26) Jensen, K. B.; Atkinson, B. L.; Willis, M. C.; Koch, T. H.; Gold, L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, *92*, 12220-12224.

(27) Liu, J.; Stormo, G. D. *Nucleic Acid Research* **2005**, *33*, e141.

(28) Mendosa, S. D.; Bowser, M. T. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 5387-5392.

(29) Tang, J. J.; Xie, J. W.; Shao, N. S.; Yan, Y. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 1303-1311.

(30) Misono, T. S.; Kumar, P. K. R. *Analytical Biochemistry* **2005**, *342*, 312-317.

(31) Yang, X. B.; Li, X.; Prow, T. W.; Reece, L. M.; Bassett, S. E.; Luxon, B. A.; Herzog, N. K.; Aronson, J.; Shope, R. E.; Leary, J. F.; Gorenstein, D. G. *Nucleic Acid Research* **2003**, *31*, e54.

(32) Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, *383*, 83-91.

(33) Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. *Biomolecular Engineering* **2007**, *24*, 381-403.

(34) Gopinath, S. C. B. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *387*, 171-182.

(35) Hamula, C. L. A.; Guthrie, J. W.; Zhang, H.; Li, X.-F.; Le, X. C. *Trends in Analytical Chemistry* **2006**, *25*, 681-691.

(36) Shamah, S. M.; Healy, J. M.; Cload, S. T. *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41*, 130-138.

(37) Jayasena, S. D. *Clinical Chemistry* **1999**, *45*, 1628-1650.

(38) Hesselberth, J.; Robertson, M. P.; Jhaveri, S.; Ellington, A. D. *Reviews in Molecular Biotechnology* **2000**, *74*, 15-25.

(39) Geiger, A.; Burgstaller, P.; Eltz, H.; Roeder, A.; Famulok, M. *Nucleic Acid Research* **1996**, *24*, 1029-1036.

(40) Michaud, M.; Jourdan, E.; Villet, A.; Ravel, A.; Grosset, C.; Peyrin, E. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 8672-8679.

(41) *http//aptamer.icmb.utexas.edu*.

(42) Green, L. S.; Jellinek, D.; Bell, C.; Beebe, L. A.; Feistner, B. D.; Gill, S. C.; Jucker, F. M.; Janjic, N. *Chemistry & Biology* **1995**, *2*, 683-695.

(43) Schmidt, K. S.; Borkowski, S.; Kurreck, J.; Stephens, A. W.; Bald, R.; Hecht, M.; Friebe, M.; Dinkelborg, L.; Erdmann, V. A. *Nucleic Acid Research* **2004**, *32*, 5757-5765.

(44) Balamurugan, S.; Obubuafo, A.; Soper, S. A.; Spivak, D. A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *390*, 1009-1021.

(45) Xiao, Y.; Lubin, A. A.; Heeger, A. J.; Plaxco, K. W. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 5456-5459.

(46) Centi, S.; Tombelli, S.; Minunni, M.; Mascini, M. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 1466-1473.

(47) Lubin, A. A.; Plaxco, K. W. *Accounts of Chemical Research* **2010**, *43*, 496-505.

(48) Phillips, J. A.; López-Colon, D.; Zhu, Z.; Xu, Y.; Tan, W. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *621*, 101-108.

(49) Famulok, M.; Hartig, J. S.; Mayer, G. *Chemical Reviews* **2007**, *107*, 3715-3743.

(50) Lee, J. H.; Yigit, M. V.; Mazumdar, D.; Lu, Y. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62*, 592-605.

(51) Brody, E. N.; Gold, L. *Reviews in Molecular Biotechnology* **2000**, *74*, 5-13.

(52) Keefe, A. D.; Pai, S.; Ellington, A. *Nature Reviews Drug Discovery* **2010**, *9*, 537-550.

(53) Jellinek, D.; Green, L. S.; Bell, C.; Janjic, N. *Biochemistry* **1994**, *33*, 10450-10456.

(54) Ng, E. W. M.; Shima, D. T.; Calias, P.; Jr., E. T. C.; Guyer, D. R.; Adamis, A. P. *Nature Reviews Drug Discovery* **2006**, *5*, 123-132.

(55) Drolet, D. W.; Moon-McDermott, L.; Roming, T. S. *Nature Biotechnology* **1996**, *14*, 1021-1027.

(56) Mairal, T.; Ozalp, V. C.; Sanchez, P. L.; Mir, M.; Katakis, I.; O'Sullivan, C. K. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *390*, 989-1007.

(57) Iliuk, A. B.; Hu, L.; Tao, W. A. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 4440-4452.

(58) *Aptamers in bioanalysis*; Mascini, M., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, 2009.

(59) Mascini, M.; Palchetti, I.; Tombelli, S. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 1316-1332.

(60) Tombelli, S.; M. Minunni; Mascini, M. *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, *20*, 2424-2434.

(61) de-los-Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tuñón-Blanco, P. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2008**, *27*, 437-446.

(62) Miranda-Castro, R.; de-los-Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tuñón-Blanco, P. *Electroanalysis* **2009**, *21*, 2077-2090.

(63) Liu, J.; Cao, Z.; Lu, Y. *Chemical Reviews* **2009**, *109*, 1948-1998.

(64) Yin, X.-B. *Trends in Analytical Chemistry* **2012**, *33*, 81-94.

(65) Famulok, M.; Mayer, G. *Accounts of Chemical Research* **2011**, *44*, 1349-1358.

(66) Mok, W.; Li, Y. *Sensors* **2008**, *8*, 7050-7084.

(67) Willner, I.; Zayats, M. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 6408-6418.

(68) Luzi, E.; Minunni, M.; Tombelli, S.; Mascini, M. *Trends in Analytical Chemistry* **2003**, *22*, 810-818.

(69) Li, D.; Song, S.; Fan, C. *Accounts of Chemical Research* **2010**, *43*, 631-641.

(70) Song, S.; Wang, L.; Li, J.; Zhao, J.; Fan, C. *Trends in Analytical Chemistry* **2008**, *27*, 108-117.

(71) Sassolas, A.; Blum, L.; Leca-Bouvier, B. D. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, *26*, 3725-3736.

(72) Tombelli, S.; Minunni, M.; Luzi, E.; Mascini, M. *Bioelectrochemistry* **2005**, *67*, 135-141.

(73) Hamaguchi, N.; Ellington, A.; Stanton, M. *Analytical Biochemistry* **2001**, *294*, 126-131.

(74) Wang, J.; Wang, L.; Liu, X.; Liang, Z.; Song, S.; Boey, F. Y. C.; Zhang, H.; Fan, C. *Advanced Materials* **2007**, *19*, 3943-3946.

(75) Palchetti, I.; Mascini, M. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, *402*, 3103-3114.

(76) Ikebukuro, K.; Kiyohara, C.; Sode, K. *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, *20*, 2168-2172.

(77) Radi, A.-E.; Acero-Sánchez, J. L.; Baldrich, E.; O'Sullivan, C. K. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 6320-6323.

(78) Rodriguez, M. C.; Kawde, A.-N.; Wang, J. *Chemical Communications* **2005**, *34*, 4267-4269.

(79) Degefa, T. H.; Kwak, J. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *613*, 163-168.

(80) Mir, M.; Vreeke, M.; Katakis, I. *Electrochemistry Communications* **2006**, *8*, 505-511.

(81) Tasset, D. M.; Kubik, M. F.; Steiner, W. *Journal of Molecular Biology* **1997**, *272*, 688-698.

(82) Polsky, R.; Gill, R.; Kaganovsky, L.; Willner, I. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 2268-2271.

(83) Centi, S.; Bonel-Sanmartín, L.; Tombelli, S.; Palchetti, I.; Mascini, M. *Electroanalysis* **2009**, *21*, 1309-1315.

(84) Zhou, L.; Ou, L.-J.; Chu, X.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 7492-7500.

(85) Baldrich, E.; Acero, J. L.; Reekmans, G.; Laureyn, W.; O´Sullivan, C. K. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 4774-4784.

(86) Hansen, J. A.; Wang, J.; Kawde, A.-N.; Xiang, Y.; Gothelf, K. V.; Collins, G. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 2228-2229.

(87) Centi, S.; Messina, G.; Tombelli, S.; Palchetti, I.; Mascini, M. *Biosensors & Bioelectronics* **2008**, *23*, 1602-1609.

(88) Radi, A.-E.; Acero-Sánchez, J. L.; Baldrich, E.; O´Sullivan, C. K. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 117-124.

(89) Lai, R.; Plaxco, K. W.; Heeger, A. J. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 229-233.

(90) Baker, B. R.; Lai, R. Y.; Wood, M. S.; Doctor, E. H.; Heeger, A. J.; Plaxco, K. W. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 3138-3139.

(91) Ferapontova, E. E.; Olsen, E. M.; Gothelf, K. V. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 4256-4258.

(92) White, R. J.; Rowe, A. A.; Plaxco, K. W. *The Analyst* **2010**, *135*, 589-594.

(93) Kim, Y.-J.; Kim, Y. S.; Niazi, J. H.; Gu, M. B. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **2010**, *33*, 31-37.

(94) Swensen, J. S.; Xiao, Y.; Ferguson, B. S.; Lubin, A. A.; Lai, R. Y.; Heeger, A. J.; Plaxco, K. W.; Soh, H. T. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 4262-4266.

(95) Sun, B.; Qi, H.; Ma, F.; Gao, Q.; Zhang, C.; Miao, W. *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 5046-5052.

(96) Zhang, S.; Hu, R.; Hu, P.; Wu, Z.-S.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q. *Nucleic Acids Research* **2010**, *38*, e185.

(97) Huizenga, D. E.; Szostak, J. W. *Biochemistry* **1995**, *34*, 656-665.

(98) Zuo, X.; Xiao, Y.; Plaxco, K. W. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 6944-6045.

(99) Zhang, H.; Jiang, B.; Xiang, Y.; Zhang, Y.; Chai, Y.; Yuan, R. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *688*, 99-103.

(100) Du, Y.; Chen, C.; Zhou, M.; Dong, S.; Wang, E. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 1523-1529.

(101) Zhao, G.-C.; Yang, X. *Electrochemistry Communications* **2010**, *12*, 300-302.

(102) Golub, E.; Pelossof, G.; Freeman, R.; Zhang, H.; Willner, I. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 9291-9298.

(103) Yamamoto, R.; Kumar, P. K. R. *Gene to Cells* **2000**, *5*, 389-396.

(104) Zuo, X.; Song, S.; Zhang, J.; Pan, D.; Wang, L.; Fan, C. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 1042-1043.

(105) Zayats, M.; Huang, Y.; Gill, R.; Ma, C.-A.; Willner, I. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 13666-13667.

(106) Deng, C.; Chen, J.; Nie, L.; Nie, Z.; Yao, S. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 9972-9978.

(107) Zhang, X.; Zhao, Y.; Li, S.; Zhang, S. *Chemical Communications* **2010**, *46*, 9173-9175.

(108) Li, W.; Nie, Z.; Xu, X.; Shen, Q.; Deng, C.; Chen, J.; Yao, S. *Talanta* **2009**, *78*, 954-958.

(109) Zhou, J.; Huang, H.; Xuan, J.; Zhang, J.; Zhu, J.-J. *Biosensors & Bioelectronics* **2010**, *26*, 834-840.

(110) Wu, Z.-S.; Guo, M.-M.; Zhang, S.-B.; Chen, C.-R.; Jiang, J.-H.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 2933-2939.

(111) Kuang, H.; Chen, W.; Xu, D.; Xu, L.; Zhu, Y.; Liu, L.; Chu, H.; Peng, C.; Xu, C.; Zhu, S. *Biosensors & Bioelectronics* **2010**, *26*, 710-716.

(112) Lu, Y.; Li, X.; Zhang, L.; Yu, P.; Su, L.; Mao, L. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 1883-1890.

(113) Han, K.; Chen, L.; Lin, Z.; Li, G. *Electrochemistry Communications* **2009**, *11*, 157-160.

(114) Xiang, Y.; Qian, X.; Jiang, B.; Chai, Y.; Yuan, R. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 4733-4735.

(115) Qian, X.; Xiang, Y.; Zhang, H.; Chen, Y.; Chai, Y.; Yuan, R. *Chemistry A European Journal* **2010**, *16*, 14261-14265.

(116) Bonel, L.; Vidal, J. C.; Duato, P.; Castillo, J. R. *Biosensors & Bioelectronics* **2011**, *26*, 3254-3259.

(117) Cash, K. J.; Ricci, F.; Plaxco, K. W. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 6955-6957.

(118) White, R. J.; Kallewaard, H. M.; Hsieh, W.; Patterson, A. S.; Kasehagen, J. B.; Cash, K. J.; Uzawa, T.; Soh, H. T.; Plaxco, K. W. *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 1098-1103.

(119) Cash, K. J.; Ricci, F.; Plaxco, K. W. *Chemical Communications* **2009**, *41*, 6222-6224.

(120) King, D. J.; Bassett, S. E.; Li, X.; Fennewald, S. A.; Herzog, N. K.; Luxon, B. A.; Shope, R.; Gorenstein, D. G. *Biochemistry* **2002**, *41*, 9696-9706.

(121) Shaw, B. R.; Dobrikov, M.; Wang, X.; Wan, J.; He, K.; Lin, J. L.; Li, P.; Rait, V.; Sergueeva, Z. A.; Sergueev, D. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2003**, *1002*, 12-29.

(122) Keefe, A. D.; Cload, S. T. *Current Opinion in Chemical Biology* **2008**, *12*, 448-456.

(123) Burmeister, P. E.; Lewis, S. D.; Silva, R. F.; Preiss, J. R.; Horwitz, L. R.; Pendergrast, P. S.; McCauley, T. G.; Kurz, J. C.; Epstein, D. M.; Wilson, C.; Keefe, A. D. *Chemistry & Biology* **2005**, *12*, 25-33.

(124) Darfeuille, F.; Arzumanov, A.; Gait, M. J.; Primo, C. D.; Toulme, J.-J. *Biochemistry* **2002**, *41*, 12186-12192.

(125) Eulberg, D.; Klussmann, S. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 979-983.

(126) Goertz, P. W.; Cox, J. C.; Ellington, A. D. *Journal of the Association for Laboratory Automation* **2004**, *9*, 150-154.

(127) Morse, D. P. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2007**, *359*, 94-101.

(128) Song, K.-M.; Cho, M.; Jo, H.; Min, K.; Jeon, S. H.; Kim, T.; Han, M. S.; Ku, J. K.; Ban, C. *Analytical Biochemistry* **2011**, *415*, 175-181.

(129) Jiang, L. C.; Patel, D. J. *Nature Structural Biology* **1998**, *5*, 769-774.

(130) Jiang, L. C.; Suri, A. K.; Fiala, R.; Patel, D. J. *Chemistry & Biology* **1997**, *4*, 35-50.

(131) de-los-Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tuñón-Blanco, P. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 3808-3809.

(132) R. W. Wood *Philosophical Magazine* **1902**, *4*, 396-402.

(133) Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundstroem, I. *Sensors and Actuators B* **1983**, *4*, 299-304.

(134) Mikkelsen, S. L.; Cortón, E. *Bioanalytical Chemistry*; Wiley-Interscience: New Jersey, 2004.

(135) Stigter, M.; de-Groot, K.; Layrolle, P. *Biomaterials* **2002**, *23*, 4149-4153.

(136) O´Shannessy, D. J.; Winzor, D. J. *Analytical Biochemistry* **1996**, *236*, 275-283.

(137) Davis, T. M.; Wilson, D. *Biophysical Approaches* **2001**, *340*, 22-51.

(138) Davis, T. M.; Wilson, W. D. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2000**, *284*, 348-353.

(139) Edwards, P. R.; Maule, C. H.; Leatherbarrow, R. J.; Winzor, D. J. *Analytical Biochemistry* **1998**, *263*, 1-12.

(140) de-Mol, N. J.; Plomp, E.; Fischer, M. J. E.; Ruijtenbeek, R. *Analytical Biochemistry* **2000**, *279*, 61-70.

(141) Schuck, P.; Minton, A. P. *Trends Biochemistry Science* **1996**, *21*, 458-460.

(142) Verhelst, S. H. L.; Michiels, P. J. A.; Marel, G.; Boeckel, C. A. A.; Boom, J. H. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 937-942.

(143) Florez, J. *Farmacología Humana*; 4ª ed.; Masson: Barcelona, 2005.

(144) Hammett-Stabler, C. A.; Johns, T. *Clinical Chemistry* **1998**, *44*, 1129-1140.

(145) *European Pharmacopoeia*; European Department for the Quality of Medicines: Strasbourg, France, 1997.

(146) Hanko, V. P.; Rohrer, J. S. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2006**, *40*, 1006-1012.

(147) Megoulas, N. C.; Koupparis, M. A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, *382*, 290-296.

(148) Keevil, B. G.; Lockhart, S.; Cooper, D. P. *Journal of Chromatography B* **2003**, *794*, 329-335.

(149) Jonge, M. E. A. D.; Bekkers, J. M.; Straaten, H. M. O. V.; Sparidans, R. W.; Franssen, E. J. F. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2008**, *862*, 257-262.

(150) Ghinami, C.; Giuliani, V.; Menarini, A.; Abballe, F.; Travaini, S.; Ladisa, T. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1139*, 53-56.

(151) Mashat, M.; Chrystyn, H.; Clark, B. J.; Assi, K. H. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2008**, *869*, 59-66.

(152) Darwish, I. A.; Mahmoud, A. M.; Al-Majed, A. R. A. *Talanta* **2007**, *72*, 1322-1328.

(153) Darwish, I. A. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2003**, *30*, 1539-1548.

(154) Lin, Y. F.; Wang, Y. C.; Chang, S. Y. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1188*, 331-333.

(155) Fonge, H.; Kaale, E.; Govaerts, C.; Desmet, K.; Shepdael, A. V.; Hoogmartens, J. *Journal of Chromatography B* **2004**, *810*, 313-318.

(156) Jolley, M. E.; Stroupe, S. D.; Wang, C. H. J.; Panas, H. N.; Keegan, C. L.; Schmidt, R. L.; Schwenzer, K. S. *Clinical Chemistry* **1981**, *27*, 1190-1197.

(157) Lin, Y. F.; Wang, Y. C.; Chang, S. Y. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1188*, 331-333.

(158) Fonge, H.; Kaale, E.; Govaerts, C.; Desmet, K.; Van Schepdael, A.; Hoogmartens, J. *J. Chromatogr. B* **2004**, *810*, 313-318.

(159) Koeda, T.; Umemura, M. Y. *Aminoglycoside Antibiotics*; Springer-Verlag: Berlin, 1982.

(160) Banerjee, S. K.; Wells, A.; Dasgupta, A. *Therapeutic Drug Monitoring* **1999**, *21*, 540-543.

(161) Sachetelli, S.; Beaulac, C.; Lagace, J. *Biochimica et Biophysica Acta* **1998**, *1379*, 35-41.

(162) Isoherranen, N.; Soback, S. *Clinical Chemistry* **2000**, *46*, 837-842.

(163) Pei, R.; Stojanovic, M. N. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *390*, 1093-1099.

(164) Rowe, A. A.; Miller, E. A.; Plaxco, K. W. *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 7090-7095.

(165) Rodríguez, M. C.; Kawde, A.-N.; Wang, J. *Chemical Communications* **2005**, *34*, 4267-4269.

(166) Jiang, L.; Majumdar, A.; Hu, W.; Jaishree, T.; Xu, W.; Patel, D. J. *Structure* **1999**, *7*, 817-827.

(167) Stanciu, L.; Won, Y.-H.; Ganesana, M.; Andreescu, S. *Sensors* **2009**, *9*, 2976-2999.

(168) Jaffrezic-Renault, N.; Martelet, C.; Chevolot, Y.; Cloarec, J.-P. *Sensors* **2007**, *7*, 589-614.

(169) Laschi, S.; Palchetti, I.; Marrazza, G.; Mascini, M. *Bioelectrochemistry* **2009**, *76*, 214-220.

(170) Berti, F.; Laschi, S.; Palchetti, I.; Rossier, J. S.; Reymond, F.; Mascini, M.; Marrazza, G. *Talanta* **2009**, *77*, 971-978.

(171) Laschi, S.; Miranda-Castro, R.; González-Fernández, E.; Palchetti, I.; Rossier, J. S.; Reymond, F.; Marrazza, G. *Electrophoresis* **2010**, *31*, 3727-3736.

(172) Centi, S.; Laschi, S.; Mascini, M. *Talanta* **2007**, *73*, 394-499.

(173) Mendes, R. K.; Laschi, S.; Stach-Machado, D. R.; Kubota, L. T.; Marrazz, G. *Sensors and Actuators B* **2012**, *166-167*, 135-140.

(174) Miranda-Castro, R.; de-los-Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tuñón-Blanco, P. *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, *24*, 2390-2396.

(175) Zhang, Y.; Kim, H.-H.; Heller, A. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 3267-3269.

(176) Barthelmebs, L.; Hayat, A.; Limiadi, A. W.; Marty, J.-L.; Noguer, T. *Sensors and Actuators B* **2011**, *156*, 932-937.

(177) Yan, X.; Cao, Z.; Lau, C.; Lu, J. *The Analyst* **2010**, *135*, 2400-2407.

(178) *Principles and Practice of Immunoassay*; Price, C. P.; Newman, D. J., Eds.; Stockton Press: New York, 1991.

(179) Campuzano, S.; Kuralay, F.; Lobo-Castañón, M. J.; Bartošík, M.; Vyavahare, K.; Paleček, E.; Haake, D. A.; Wang, J. *Biosensors & Bioelectronics* **2011**, *26*, 3577-3583.

(180) Nie, J.; Song, A.; Xu, S.; Li, X.; Wang, Y. *Archives of Virology* **2010**, *155*, 1813-1822.

ANEXO V. PUBLICACIONES

SPR EVALUATION OF BINDING KINETICS AND AFFINITY STUDY OF MODIFIED RNA APTAMERS TOWARDS SMALL MOLECULES

Talanta 99 (2012) 767–773

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

SPR evaluation of binding kinetics and affinity study of modified RNA aptamers towards small molecules

Eva González-Fernández, Noemí de-los-Santos-Álvarez, Arturo José Miranda-Ordieres, María Jesús Lobo-Castañón *

Universidad de Oviedo, Departamento de Química Física y Analítica, Av. Julian Claveria 8, 33006 Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 May 2012
Received in revised form
25 June 2012
Accepted 5 July 2012
Available online 16 July 2012

This work is dedicated to Professor Paulino Tuñón Blanco in honor of his retirement and in recognition of his career at Universidad de Oviedo.

Keywords:
Affinity constant
Endonuclease resistance
Kinetics
RNA aptamer
Surface plasmon resonance
Tobramycin

ABSTRACT

Establishing an efficient method for evaluating the affinity changes after post-SELEX modification of aptamers is essential for broadening the application of these oligonucleotides in biosensing. This is especially challenging when the ligand is a small molecule. Changes in affinity upon partial or total replacement of 2′–OH with 2′-OMe groups in the ribose moieties of a tobramycin binding RNA aptamer are described. The kinetic profile and binding properties of the different anti-tobramycin aptamers were measured by surface plasmon resonance (SPR) experiments through a real-time binding assay with the antibiotic covalently coupled to the gold sensor. This configuration maximizes the changes associated to the recognition event, which is otherwise undetectable. The results indicated that the modification slightly affects the binding characteristics of the parent RNA, while conferring biological stability to the aptamers against nucleases.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The use of RNA or DNA aptamers as receptors for the development of biosensors and bioassays presents clear advantages derived from their superior thermal and chemical stability over antibodies and similar affinity. As synthetic single-stranded oligonucleotide sequences, their production is much simpler, faster, reproducible (chemical, no animal need) and it is not restricted to immunogenic or non-toxic targets. Since its discovery in 1990 [1,2], dozens of aptamers have been described mainly for therapeutic applications, and only a few have been used for sensing against targets to be analyzed in biological fluids. Although most aptamers known are RNA sequences, the vast majority of those used in analysis are DNA sequences because of their higher stability to hydrolytic digestion by nucleases.

Nucleases are enzymes able to catalyze the degradation of nucleic acids (DNA or RNA) by means of hydrolysis of phosphodiester bonds. They play a vital role in metabolism and are ubiquitous. In biological fluids, RNA sequences have life times of a few minutes [3] so, they are much more difficult to handle than DNA sequences. Fortunately, nucleic acids are very easy to modify in order to limit the degradation without affecting their affinity in sensing or activity in therapeutics. With this aim, several strategies focused on phosphate–sugar backbone modifications have been proposed.

Typical modifications of the phosphate backbone consist in replacing the non-binding oxygen in the phosphodiester linkage by sulfur (phosphorothioate) [4], phosphoramidate linkage and morpholino modifications [5,6]. Sugar modification is another widespread solution based on the replacement of the 2′-OH ribose position for *O*-Methyl, -F^-, -*O*-Methoxyethyl, -NH_2 groups using modified nucleotides during SELEX because their compatibility with polymerases. It has been demonstrated that changing 2′-OH group of ribose for 2′-NH_2 or 2′-F on pyrimidine nucleotides the nuclease resistance of the entire oligonucleotide is increased [7]. In 2005, the first fully 2′-*O* Me aptamer was raised by SELEX [8].

Additionally these sugar modifications can be introduced after SELEX at all or only selected nucleosides positions not directly involved in the molecular recognition event. This precludes performing a new SELEX for a given target. Toulmé et al. reported

Abbreviations: SELEX, Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment; VEGF, vascular endothelial growth factor; SPR, Surface Plasmon Resonance; MPA, 3-mercaptopropionic acid; EDC, N-(3-dimethylaminopropyl)-N′-ethyl-carbodiimide hydrochloride; NHS, N-hydroxysuccinimide; ATA, Anti-tobramycin aptamer; FATA, Fully 2′-*O*-methylated anti-tobramycin aptamer; NMATA, Non-*O*-methylated anti-tobramycin aptamer; SAM, self assembled monolayer; MTL, mass transport limitation; RII, refractive index increment

* Corresponding author. Tel.: +34 985106235; fax: +34 985103125.
E-mail address: mjlc@uniovi.es (M.J. Lobo-Castañón).

0039-9140/$ - see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.019

a higher stability after fully 2′-*O*-methylation retaining the binding ability [9]. Nevertheless, rational selection of the modified positions can lead to significant improvement in affinity. It has been reported that fully modification of purines of an anti-VEGF aptamer led to a reduction in affinity whereas the selective modification of 10 out of 14 purines led to a 17-fold increase [10]. So, in order to use a modified aptamer for sensing it is of crucial importance reevaluating the affinity to verify the ability of these modified aptamers to recognize their target molecule.

Our group pioneered the use of 2′-*O*Me RNA aptamers for sensing in biological fluids. It was shown that a native RNA raised against neomycin B can be fully *O* methylated retaining enough affinity and selectivity to be used as receptor for the detection of the antibiotic in milk by impedance [11] or surface plasmon spectroscopy [12]. Recently, the aminoglycoside tobramycin was successfully detected in serum using a fully *O*-methylated aptamer [13], although the 2′–OH position of U12 was previously described to be involved in the molecular recognition event [14]. Preliminary estimations of the affinity constant by faradaic impedance spectroscopy resulted in similar values for both the fully *O*-methylated and the fully-but-one (U12) *O*-methylated aptamer. No comparison with the native one was carried out [13]. Although the fully 2′-*O*Me aptamer performance was satisfactory, an in-depth study about the affinity and binding kinetics between tobramycin and aptamer derivatives is lacking.

Herein, the affinity of the previously described natural RNA anti-tobramycin aptamer [15] was compared with aptamers with different 2′-*O*Me level at 2′-OH positions in order to understand its influence on affinity towards its target molecule, tobramycin. Surface plasmon resonance (SPR), a technique well suited for the characterization of affinity events that allows real-time monitoring of binding kinetics was used. The rate and equilibrium constants for the natural and the modified anti-tobramycin aptamers are given.

2. Materials and methods

2.1. Instrumentation

A double-channel cuvette-based SPR instrument equipped with an autosampler (Autolab-ESPRIT, Ecochemie, The Netherlands) was used for all SPR experiments. The instrument was controlled by Data Adquisition Software (ESPRIT version 4.4). Data treatment (overlapping and alignment of sensorgrams, zeroing and baseline corrections) and non-linear fitting of the resulting sensorgrams were done with the software provided with the instrument (ESPRIT kinetic evaluation version 5.2). Other non-linear fitting needed for data processing were carried out using OriginPro 7.5 (Northampton, MA). 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 $25 \pm 1^{\circ}$ C obtained with a thermostat, Haake D1 (Germany).

2.2. Reagents

Three different types of 27-mer anti-tobramycin RNA aptamer were used throughout this work, which differ in the number of bases modified with *O*-methyl group at 2′-OH position of their ribose. All of them were synthesized by Sigma-Genosys (France) and purified by HPLC. Their sequences are the following:

Anti-tobramycin aptamer (ATA): 5′ [mG] [mG] [mC] [mA] [mC] [mG] [mA] [mG] [mG] [mU] [mU] U [mA] [mG] [mC] [mU] [mA] [mC] [mA] [mC] [mU] [mC] [mG] [mU] [mG] [mC] [mC] 3′

Fully 2′-*O*-methylated anti-tobramycin aptamer (FATA): 5′ [mG] [mG] [mC] [mA] [mC] [mG] [mA] [mG] [mG] [mU] [mU] [mU] [mA] [mG] [mC] [mU] [mA] [mC] [mA] [mC] [mU] [mC] [mG] [mU] [mG] [mC] [mC] 3′

Non-*O*-methylated anti-tobramycinaptamer (NMATA): 5′G G C A C G A G G U U U A G C U A C A C U C G U G C C 3′

Tobramycin sulfate, 3-mercaptopropionic acid (MPA), N-(3-dimethylaminopropyl)-N′-ethyl-carbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS) were purchased from Sigma-Aldrich (Spain). 4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), ethanolamine, salts for buffer solutions (KCl, NaCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$), 1 M Tris/HCl pH 7.4 solution and HCl (all RNAse free) were also obtained from Sigma-Aldrich (Spain). All other reagents were of analytical grade.

All glassware in direct contact with aptamer was previously cleaned with RNAseZAP^{TM} (Sigma-Aldrich, Spain) and all aqueous solutions were prepared with RNAse free water purified by a Direct-Q system with a BioPack cartridge (Millipore).

The compositions of the buffers used for the experiments are as follows:

Immobilization solution: 0.1 M HEPES pH 8.64.

Affinity solution: 20 mM Tris–HCl pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$.

Regeneration solution: 0.05 M HCl.

2.3. Tobramycin immobilization protocol

Initially the bare gold-coated glass sensor was cleaned by immersion in piranha solution (3 H_2SO_4 (95%):1 H_2O_2 (33%)) (CAUTION: piranha solution is strongly oxidizing and should be handled with care!) for 10 min, thoroughly rinsed with water and ethanol, and dried with a stream of N_2. Then the sensor was positioned onto the clean hemi-cylinder lens previously coated with a drop of immersion oil (Autolab, Methrom, The Netherlands), which possesses a constant refractive index ($n_D^{25^{\circ}C} = 1.518 \pm 0.002$). Afterwards, water was injected in both channels and the surface was equilibrated until a constant response was obtained.

The sensing phase preparation entails the covalent immobilization of tobramycin onto a self-assembled monolayer of MPA on gold, following a protocol similar to that previously described [12]. Briefly, the SAM was formed overnight after manually injection of 40 mM MPA prepared in an ethanol:water solution (75:25). After washing with ethanol and water, the sensor surface was equilibrated with water and the covalent attachment of tobramycin (channel 1) and ethanolamine (channel 2, reference) was carried out. The ESPRIT autosampler and sequencer allowed the simultaneous modification of both channels. The procedure consisted in a three-step sequence: (1) Surface activation: three consecutive injections of a mixture of 0.2 M EDC and 0.05 M NHS in water for 5 min each one, followed by a brief washing step with water. (2) Binding step: three consecutive injections of 10 mM tobramycin (channel 1) and 1 M ethanolamine (channel 2) prepared in immobilization solution for 20 min each one, followed by a brief washing step with water. (3) Blocking step: one injection of 1 M ethanolamine prepared in immobilization solution in both channels for 30 min.

Finally the modified surface was equilibrated with affinity solution.

2.4. SPR measurements

All binding experiments were carried out in affinity buffer, the same used in the anti-tobramycin SELEX selection [15]. Due to the cuvette-based design of the ESPRIT instrument, constant stirring conditions are required for controlling hydrodynamic properties of the system. The whole data collection process is automated and consisted in recording successive cycles of measurement. Each independent analysis cycle 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 affinity buffer (35 μL) were simultaneously injected in both channels by means of the ESPRIT autosampler and the association phase was recorded for 10 min. After draining the cuvette, 50 μL of affinity buffer was injected and the dissociation phase was monitored for 5 min resulting in the decrease of the signal 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.

2.5. Fitting models

For both kinetics and equilibrium analysis, non-linear fitting of the association phase was used for interpreting data. In the basis of a bimolecular interaction model (1:1 stoichiometry), the R_t is described by the integrated Eq. (1).

$$R_t = \frac{R_{\max}[aptamer]k_{on}}{k_{on}[aptamer]+k_{off}}(1-\exp^{-(k_{on}[aptamer]+k_{off})t})+R_0 \quad (1)$$

where, R_{max} is the maximum angle shift in m°, a measure of the maximum binding capacity when all binding sites on the sensor surface are occupied; R_0 is the angle shift at $t=0$; [*aptamer*] is the concentration of the analyte; k_{on} and k_{off} are the association and dissociation rate constants of the complex tobramycin–aptamer, respectively. This equation can be simplified to Eq. (2):

$$R_t = R_0+E(1-\exp^{-k_s t}) \quad (2)$$

where, $R_0+E=R_{eq}$ for each aptamer concentration and $k_s=k_{on}[aptamer]+k_{off}$

2.5.1. Equilibrium model

R_{eq} values were estimated from the non-linear fitting to Eq. (2). Plotting R_{eq} against free aptamer concentration, a Langmuir binding isotherm is obtained (Eq. (3)).

$$R_{eq} = R_{max}\left(\frac{[aptamer]_{free}}{[aptamer]_{free}+K_D}\right) \quad (3)$$

A frequent way of estimating K_D is linearizing Eq. (3), which leads to a Scatchard plot, described by Eq. (4).

$$\frac{R_{eq}}{[aptamer]_{free}} = K_A R_{\max} - K_A R_{eq} \quad (4)$$

where K_A is the equilibrium association constant. This way, K_D is estimated as the reverse value of the slope (K_A) of Eq. (4).

2.5.2. Kinetic model

Fitting the association phase for all sensorgrams to Eq. (2) provide an apparent rate constant, k_s value for each aptamer concentration. The plot of k_s versus $[aptamer]_{free}$ should give a linear function. k_{on} is obtained from the slope of the plot and k_{off} from the intercept. Although k_{on} is accurately estimated, in practice, large errors are associated to k_{off} estimation for this method [21]. A more precise method is to obtain k_{off} from non-linear fitting of the dissociation phase of the sensorgrams, which is a first-order exponential decay with an offset, R_∞ that indicates the angle shift after decay is finished (Eq. (5)), that accounts for the incomplete dissociation characteristic of cuvette-based SPR instruments.

$$R_t = R_0 e^{-kdt} + R_\infty \quad (5)$$

3. Results and discussion

Different aptamers have been described in literature to specifically recognize the antibiotic tobramycin [15–18]. The most recent one was a DNA aptamer raised against kanamycin, a closely structurally related antibiotic, which showed cross-reactivity with tobramycin as similar K_D values about 100 nM for both of them unambiguously indicate [18]. The rest of them are RNA aptamers. A beacon aptamer evolved against tobramycin showed a very high K_D of 16 μM, although the need for further optimization of the SELEX process is recognized [16]. Using automated SELEX three aptamers were found for tobramycin with K_D ranged between 10 and 100 nM [17]. Finally, Wang and Rando [15] have found two different consensus sequences with affinity for tobramycin, and some degree of homology with K_D of 12 nM and 9 nM. The last one was chosen to carry out this work based on its high affinity. As mentioned above, in order to preclude the enzymatic hydrolysis caused by nucleases towards RNA an internal modification on sugars was performed. Thus, the hydroxyl group at the 2′-position of the ribose ring in the bases was replaced by an *O*-methyl group. In this context two different modified aptamers were designed. The first one included the sugar modification in all its 27 bases, and it was referred as fully modified anti-tobramycin aptamer (FATA). The 2′-OH of the U base at 12 position was reported to be involved in the formation of a hydrogen bond with N7 of G14, which has a relevant contribution in the definition of the hairpin 3D conformation for proper tobramycin recognition. So, a second modified anti-tobramycin aptamer was designed where the U-12 conserved its native unmodified ribose. This aptamer was referred as anti-tobramycin aptamer (ATA). The native, non-*O*-methylated anti-tobramycin aptamer (NMATA) was also used for comparison in terms of its equilibrium (K_D) and rate constants (k_{on}, k_{off}).

A typical SPR assay involves the immobilization of one of the interacting partners onto the sensor surface, which is exposed to a solution containing the other component. To decide which compound will be immobilized on the surface, size, stability, solubility and functional groups available should be taken into consideration. In our particular case, the critical parameter was the size because the SPR response is highly dependent on the mass of the interacting molecule. Molecules smaller than 1000 Da do not provide a significant change in the refractive index on a surface with limited binding sites, so, they are difficult to detect with sufficient accuracy. Although in some cases this lack of sensitivity can be overcome by increasing the molecule density on the surface, very high densities are not convenient for kinetic studies as explained below.

Consequently, immobilization of the smaller partner (tobramycin, the ligand) was preferable to maximize the SPR response (Fig. 1). However, this configuration can be a source of mass transport limitation (MTL) because the aptamer, a molecule of relatively high mass, is added to the cuvette and has to diffuse towards the sensor surface. MTL appears when the binding rate is faster than the diffusion rate from the bulk to the surface and affects to the same extent both association and dissociation phases. The higher binding sites concentration the higher consumption of aptamer at the surface, making more evident the MTL contribution. This effect is minimized by constructing low capacity binding surfaces. When working with interactions with k_{on} (association rate constant) $\geq 10^6\ M^{-1}\ s^{-1}$ [19], MTL has to be incorporated into the model of the binding kinetics for an adequate evaluation. Nevertheless, a self-consistency test is always a healthy behavior when interpreting kinetic data.

In this study, low amounts of bound tobramycin led to adequate sensing surfaces for kinetic analysis considering first-order kinetics. The angle shifts obtained for different sensing surfaces after tobramycin immobilization (R_{tob}) were in the range of 15–30 m°, which corresponds to 141–282 pg mm^{-2} of antibiotic. This value was calculated taking into account that 120 m° corresponds to 1 ng mm^{-2} of bound protein or 1.13 ng mm^{-2} of

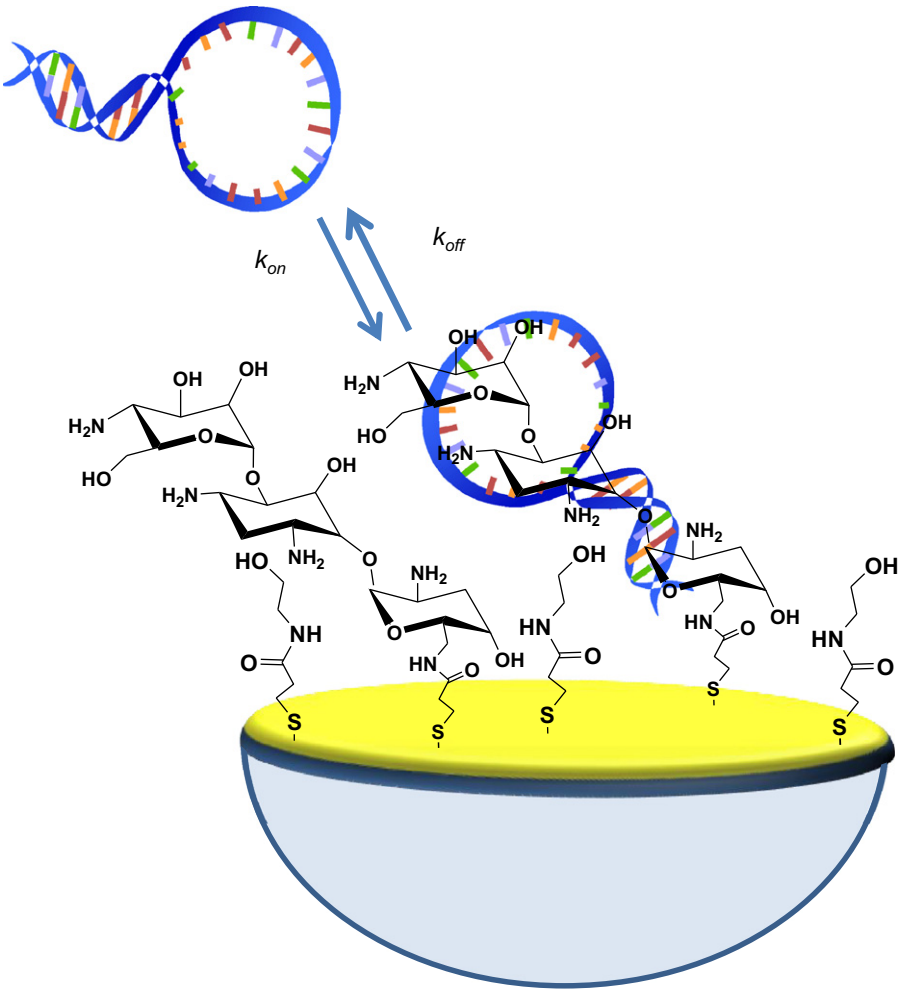

Fig. 1. Scheme of the sensing phase employed for SPR binding assays.

bound tobramycin considering the refractive index increment (RII) between proteins and aminoglycoside antibiotics [20].

The interaction of immobilized tobramycin with different concentrations of aptamer in solution was monitored, and subsequently processed and analyzed for obtaining both kinetics and equilibrium information. Binding curves were performed for each aptamer ATA, FATA and NMATA, recording an analysis cycle for each concentration assayed, in the range of 0.05–3 μM, ensuring the equilibrium is reached in all the experiments.

When injecting the aptamer solution the amount of the aptamer–tobramycin complex formed was monitored as variation of the resonance angle (angle shift, R_t) with time (sensorgram) as that depicted in Fig. 2 for each aptamer. After each injection a rapid signal increase was observed due to bulk effects related to the change in composition of the solutions injected. It is worth noting that only in channel 1, a progressive increase in the angle shift is observed whereas a constant and almost negligible angle shift is recorded in channel 2. This is a clear indication that aptamer effectively binds to tobramycin on the surface of channel 1 that contains the antibiotic, and the amount of unspecific binding to ethanolamine-blocked mercaptopropionic acid SAM (channel 2) is negligible because there are not tobramycin. After flushing out the aptamer solution and filling the cuvette with affinity solution, the angle shift did not return to the baseline level in channel 1 indicating that the aptamer is specifically bound to the sensor surface. The decrease is related to the dissociation of the complex that occurs in a certain extent. In contrast, in channel 2, the angle shift remains at the baseline level confirming that there is no aptamer unspecifically bound in the absence of immobilized tobramycin. Finally, regeneration of the surface under mild acidic conditions removed the entire surface complex without affecting the SAM stability significantly, and a new cycle can be performed.

When the concentration of aptamer increased (Fig. 3), both the slope of the angle shift (R_t) and the signal at equilibrium (R_{eq}) were higher indicating that higher amounts of aptamer are retained by the modified surface. The sensing phase can be regenerated several times and an entire binding experiment can be carried out with the same surface (see Fig. S1 in Supporting Information).

This set of SPR data contains both kinetics and equilibrium information about the biomolecular interaction under study. The kinetic rate constants (k_{on} and k_{off}) and equilibrium constants provide valuable information about the affinity of the interaction. The equilibrium constant can be estimated from both kinetic and equilibrium data being necessary a convergence value as a self-consistency test.

The association phases of sensorgrams obtained for each aptamer at different concentrations were fitted to Eq. (2) (Fig. 3, white lines). In cuvette-based instruments as used in this work, a depletion of the aptamer concentration can occur due to the loss of material derived from the binding event in contrast to flow systems where a continuous supply of compound exists. This effect was quantified and corrected by calculating the free analyte concentration employing Eq (6) [21].

$$[aptamer]_{free} = [aptamer]_0 - \frac{R_{eq}\, S\, 10^{-3}}{f\ MW\, V} \tag{6}$$

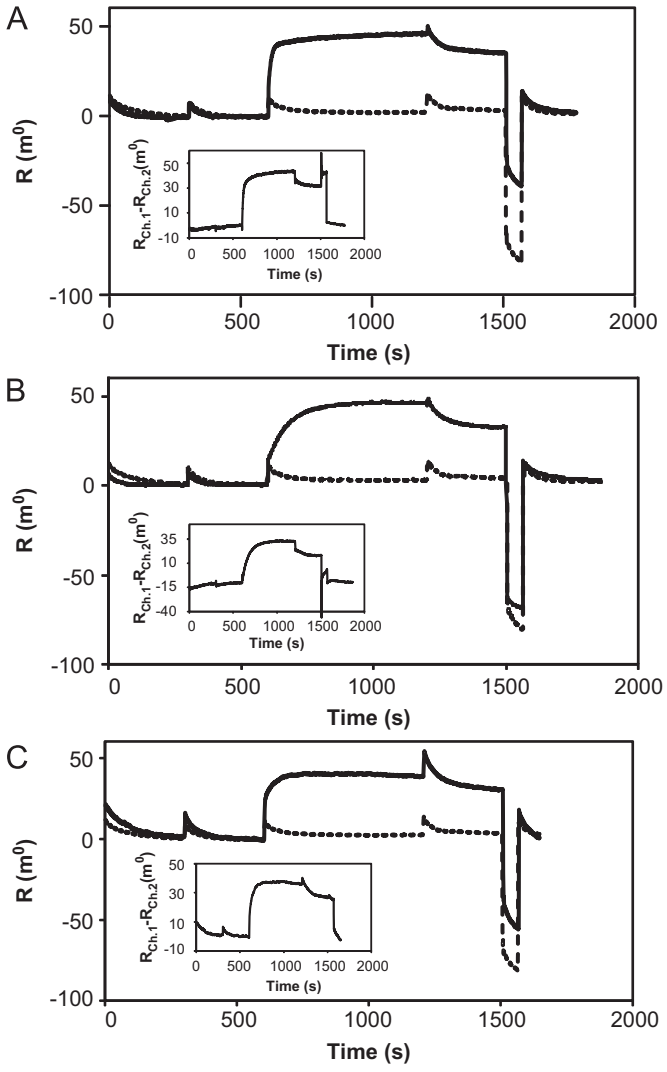

Fig. 2. Sensorgrams showing a full analysis cycle including two baselines, association, dissociation, regeneration and back to baseline steps for a tobramycin-modified surface (channel 1, solid line) and for an ethanolamine-modified surface (channel 2, reference, dashed line) using (A) 0.5 μM NMATA, (B) 0.3 μM ATA and (C) 0.75 μM FATA. See text for details about the buffers used. Inset: Substracted sensorgram (channel 1 minus channel 2) for each cycle.

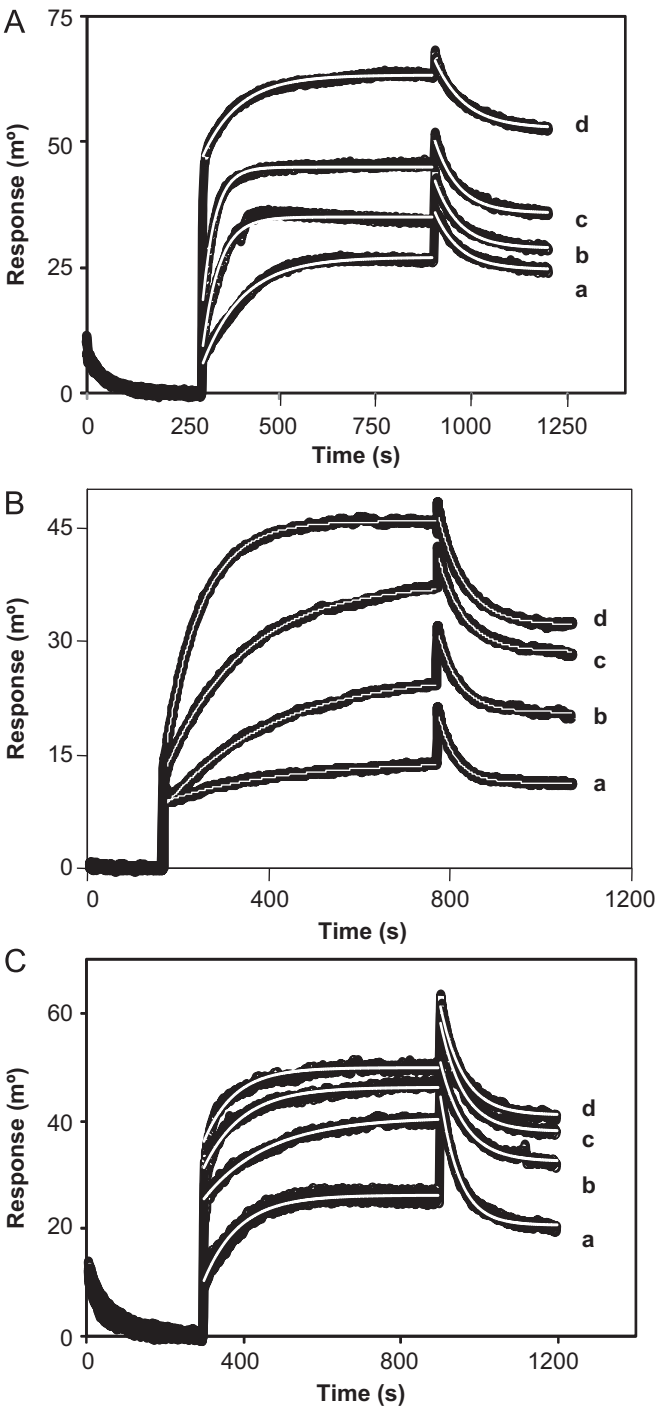

Fig. 3. Overlays of SPR sensorgrams registered for the addition of (A) NMATA at (a) 0.05; (b) 0.1; (c) 0.25 and (d) 1 μM; (B) ATA at (a) 0.08; (b) 0.1; (c) 0.15 and (d) 0.3 μM; (C) FATA at (a) 0.2; (b) 0.5; (c) 1 and (d) 1.5 μM (black lines) in affinity buffer (see text for details). Non-linear curve fitting to association and dissociation phases (white lines).

where, $[aptamer]_0$ is the added aptamer concentration in molar; $[aptamer]_{free}$ is the corrected aptamer concentration also in molar; S is the surface of the sensor in contact with bulk solution (2.8 mm^2); f=120 m°/0.8 ng mm^{-2} is the conversion factor between the measured angle shift in m° and the mass density of bound aptamer in ng mm^{-2}, MW is the molecular weight of the aptamer and V is the sample volume injected (35 μL in all cases). This correction was taken into account in all subsequent calculations.

For depletion values larger than 10% of the initial analyte concentration, the amount of free analyte decreases considerably during association phase and second-order equations better describe the binding event [22]. Depletion values were below 5% of the initial aptamer concentration in all experiments being more important for the lower concentrations tested. So, first-order equations were used for calculations.

3.1. Equilibrium analysis

Langmuir binding isotherms were obtained for each aptamer using the R_{eq} values estimated from the non-linear fitting to Eq. (2) (Fig. 4). Values of K_D were calculated from the corresponding Scatchard plots (inset Fig. 4) and displayed in Table 1.

It is well-known that Scatchard plot can lead to important errors in K_D evaluation [21] thus, in this study K_D values were also estimated directly by non-linear fitting of Eq. (3) and compared (Langmuir isotherm).

From them, it is clear that all K_D values corresponding to different *O*-methylated aptamers (ATA, FATA and NMATA) are in the subμM range. Likewise, both Scatchard plot and non-linear

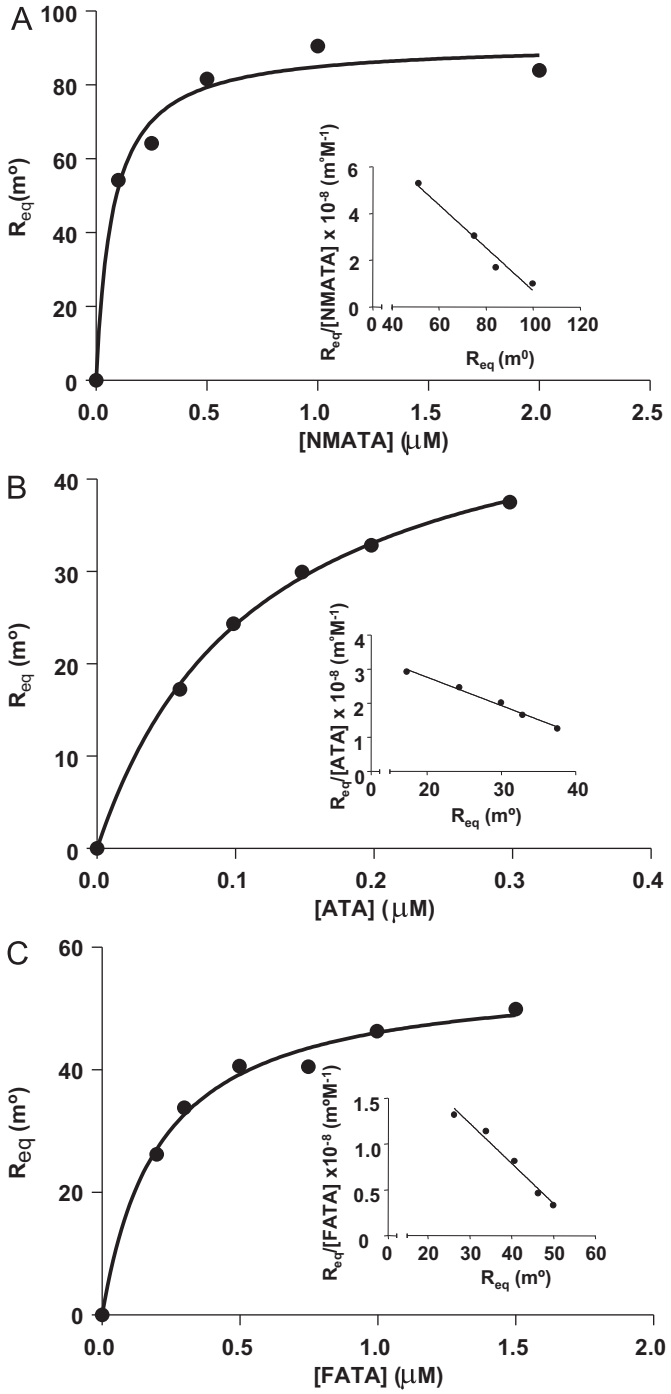

Fig. 4. Binding isotherms obtained with a tobramycin modified sensor after incubation with increasing concentrations of (A) NMATA (B) ATA and (C) FATA in affinity buffer for 10 min. Inset: Scatchard plot for each set of experiments.

fitting to Langmuir binding isotherm have led to similar K_D values for each individual aptamer. The lowest K_D value (below 100 nM) corresponded to the original, non-*O*-methylated anti-tobramycin aptamer, NMATA. The modified aptamers tested showed K_D values above 100 nM. ATA exhibits a slightly lower K_D (stronger binding) compared with FATA. From these results it can be stated that the affinity tends to diminish when the level of *O*-methylation increases. However, this trend is not very large, about 4-fold decrease for total substitution. As mentioned above, NMR measurements and computed structures of the tobramycin–NMATA complex suggest the stabilizing role of a hydrogen bond between 2′-OH of U12 and N7 of G14. Although useful, this information does not provide quantitative information about the magnitude of the destabilization when this hydrogen bond is blocked. In this study, this effect was quantified in terms of K_D values, to be about 1.5-fold decrease in addition to the reduction observed after modifying the other 26 nucleosides (ATA). This is a modest effect in affinity that can be overcome by the gain in nuclease resistance, which is in good agreement with the feasibility of using FATA for tobramycin detection in human serum [13].

3.2. Kinetic analysis

SPR data were also used to determine the kinetic parameters for tobramycin binding to all three aptamers under study. The dissociation constant was evaluated from these kinetic parameters and compared with the previously obtained by means of equilibrium data.

Table 2 compiles all rate constants obtained for each aptamer. For all three aptamers tested k_{on} values are below $10^6\ M^{-1}\ s^{-1}$, which confirmed the applicability of the initial assumption of a simple bimolecular model with no MTL [19]. Both k_{on} and k_{off} change slightly with the degree of *O*-methylation, favoring NMATA over ATA and FATA (k_{on} larger and k_{off} smaller in a similar amount). According to expression $K_D = k_{off}/k_{on}$, the dissociation constant was estimated.

It has been argued that k_{off} values obtained under conditions that the dissociation is not complete (such as in this case) could deviate from the real value. Such an incomplete dissociation can be due to two causes: MTL, which was discarded from the k_{on} value or rebinding, which is always present in cuvette-based instruments even under conditions that MTL does not apply. Another alternative to calculate k_{off} is to use the k_{on} value and the K_D obtained from equilibrium. Values obtained that way are very similar to those obtained from fitting to first-order decay with an offset (third and fourth columns in Table 2). This result supports the reliability of the values obtained from fitting.

Additionally, a simple but efficient self-consistency test of SPR data consists in comparing K_D constants obtained from different approaches: equilibrium and kinetic analysis [23]. From Tables 1 and 2 it is apparent that all K_D estimated by equilibrium analysis employing Langmuir or Scatchard plots were identical

Table 1
Equilibrium analysis for the three aptamers under study employing two approaches: Scatchard plot and Langmuir binding isotherm.

Equilibrium analysis					
Aptamer	**Equation**	K_D **(nM)**[a]	R_{max} **(m°)**[a]	K_D **(nM)**[b]	R_{max} **(m°)**[b]
ATA	$R_{eq}/[ATA]_{free}(m^\circ\ M^{-1}) = -(83\pm6)\times10^5\ (M^{-1})R_{eq}(m^\circ)+(44\pm2)\times10^7\ (m^\circ\ M^{-1})$; $r=0.994$	116 ± 8	51 ± 6	130 ± 20	52 ± 5
FATA	$R_{eq}/[FATA]_{free}(m^\circ\ M^{-1}) = -(44\pm5)\times10^5\ (M^{-1})\ R_{eq}(m^\circ)+(25\pm2)\times10^7\ (m^\circ\ M^{-1})$; $r=0.99$	210 ± 30	58 ± 6	170 ± 50	46 ± 9
NMATA	$R_{eq}/[NMATA]_{free}(m^\circ\ M^{-1}) = -(19\pm1)\times10^6\ (M^{-1})\ R_{eq}(m^\circ)+(104\pm4)\times10^7\ (m^\circ\ M^{-1})$; $r=0.995$	50 ± 20	60 ± 10	60 ± 40	60 ± 10

[a] Scatchard plot.
[b] Langmuir Binding Isotherm.

Table 2
Kinetic rate constants and dissociation constants calculated from kinetic analysis for the three aptamers under study.

Kinetic analysis				
Aptamer	k_{on} $(Ms)^{-1}$	k_{off} (s^{-1})[a]	k_{off} (s^{-1})[b]	K_D (nM)
ATA	$(12\pm2)\times10^4$	0.017 ± 0.001	0.014 ± 0.003	140 ± 30
FATA	$(93\pm3)\times10^3$	0.018 ± 0.002	0.020 ± 0.003	190 ± 30
NMATA	$(14\pm4)\times10^4$	0.013 ± 0.003	0.007 ± 0.004	90 ± 40

[a] k_{off} from dissociation fitting including offset.
[b] k_{off} from the expression $k_{off}=K_D k_{on}$.

taking into account the experimental error and also equal to that obtained by the kinetics analysis. This simple test is a proof that helps to estimate the rightness of the data obtained.

In general, mean values from kinetic data make differences in affinity less distinct than from equilibrium values, but kinetic measurements have a larger associated error. Despite this, the same unambiguous trend is also observed within the experimental error. The lowest value corresponded to NMATA (below 100 nM) confirming the superior affinity of the native aptamer and the highest value corresponded to the FATA.

The affinity constant of the complex tobramycin and the unmodified anti-tobramycin aptamer, NMATA, was previously estimated [15]. Pyrene-labeled tobramycin was employed for performing quenching experiments under conditions where a 1:2 stoichiometry was found. Values of $K_{D1}=9$ nM and $K_{D2}=2.7$ μM were reported. K_{D1} is among the lowest values reported for an interaction between an aptamer and a small molecule rivaling with those of larger molecules such as proteins, which possesses a larger number of binding sites [24]. Typical K_D values for small molecules are in the subμM to μM range. The K_D value for NMATA reported in this work is more than one order of magnitude higher than the previously reported but still low for a small molecule. The difference can be attributed to the fact that the quenching experiments were carried out in solution. On the other hand, a much higher affinity constant value of $K_D=1.1$ μM was reported for NMATA–tobramycin complex carrying out SPR measurements [25]. In that study the aptamer was immobilized on the SPR sensor through biotin–streptavidin linkage. The use of a labeled aptamer on the surface as well as the use of an affinity buffer different from that it was used in the original aptamer selection can account for the significant differences in affinity. In addition to this, a very quick dissociation was observed indicating that the complex formed is not as stable as that generated with the configuration assayed in our work.

It was reported that ATA is also able to bind neomycin B, another aminoglycoside antibiotic and the anti-neomycin aptamer also recognize tobramycin [13]. This finding was attributed to the similar 3D structure of both aptamers and the way of encapsulating the antibiotic for binding. As a consequence the molecular recognition would be more related to the structure than to the sequence. If this holds true, similar K_D would be expected. However, both K_D values evaluated from SPR measurements differ in one order of magnitude. Neomycin B binds to its aptamer with a K_D of 1.24 ± 0.03 μM [12], suggesting that sequence also plays a role in the recognition event.

4. Conclusions

With the aim of taking advantage of the unique features of RNA aptamers as molecular recognition elements when dealing with real complex samples, modified aptamers can be used to avoid its degradation caused by nucleases. However, the extent of the affinity change after modification has to be quantified to ensure the proper performance of the tailored aptamer because the final activity is difficult to predict. In fact, both enhancement and loss in affinity has been reported. Herein the system tobramycin anti-tobramycin aptamer was taken as a model. The 27-mer RNA natural anti-tobramycin aptamer was chemically modified by introducing a 2′-*O*Me group instead of 2′-OH in the ribose moiety of the RNA structure.

SPR was employed for evaluating the affinity of three different RNA anti-tobramycin aptamers: the natural RNA sequence and two modified RNA aptamers, which differ in the modification of only a single base. A reverse configuration to what is often used was adopted to maximize SPR signal (immobilization of the small molecule maintaining the large one in solution) and hence, the accuracy of the kinetic and binding parameters evaluated.

In our case, the introduction of the selected internal modification altered the affinity of the aptamer towards its target molecule, tobramycin. A slight loss in the affinity is observed for both modified aptamers, which do not preclude the application of such modified aptamers as molecular recognition tools.

Acknowledgments

E.G.F. and N.S.A, thank to Spanish Government for a predoctoral grant and a Ramón y Cajal contract, respectively. This work has been financed by Project CTQ2008-02429 granted to "Grupos Consolidados" and the European Regional Development Fund.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.019.

References

[1] C. Tuerk, L. Gold, Science 249 (1990) 505–510.
[2] A.D. Ellington, J.W. Szostak, Nature 346 (1990) 818–822.
[3] E. Luzi, M. Minunni, S. Tombelli, M. Mascini, Trends. Anal. Chem. 22 (2003) 810–818.
[4] D.J. King, S.E. Bassett, X. Li, S.A. Fennewald, N.K. Herzog, B.A. Luxon, R. Shope, D.G. Gorenstein, Biochemistry 41 (2002) 9696–9706.
[5] C. Wilson, A.D. Keefe, Curr. Opin. Chem. Biol. 10 (2006) 607–614.
[6] W. Kusser, Rev. Mol. Biotechnol. 74 (2000) 27–38.
[7] S.D. Jayasena, Clin. Chem. 45 (1999) 1628–1650.
[8] 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, A.D. Keefe, Chem. Biol. 12 (2005) 25–33.
[9] F. Darfeuille, A. Arzumanov, M.J. Gait, C.D. Primo, J.J. Toulme, Biochemistry 41 (2002) 12186–12192.
[10] L.S. Green, D. Jellinek, C. Bell, L.A. Beebe, B.D. Feistner, S.C. Gill, F.M. Jucker, N. Janjic, Chem. Biol. 2 (1995) 683–695.
[11] N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 3808–3809.
[12] N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, Biosens. Bioelectron. 24 (2009) 2547–2553.
[13] E. González-Fernández, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, Biosens. Bioelectron. 26 (2011) 2354–2360.
[14] L.C. Jiang, A.K. Suri, R. Fiala, D.J. Patel, Chem. Biol. 4 (1997) 35–50.
[15] Y. Wang, R.R. Rando, Chem. Biol. 2 (1995) 281–290.
[16] D.P. Morse, Biochem. Biophys. Res. Commun. 359 (2007) 94–101.
[17] P.W. Goertz, J.C. Cox, A.D. Ellington, J. Assoc. Lab. Autom. 9 (2004) 150–154.
[18] K.M. Song, M. Cho, H. Jo, K. Min, S.H. Jeon, T. Kim, M.S. Han, J.K. Ku, C. Ban, Anal. Biochem. 415 (2011) 175–181.
[19] D.J. O'Shannessy, D.J. Winzor, Anal. Biochem. 236 (1996) 275–283.
[20] T.M. Davis, W.D. Wilson, Methods Enzymol. 340 (2001) 22–51.
[21] N.J. de Mol, E. Plomp, M.J.E. Fischer, R. Ruijtenbeek, Anal. Biochem. 279 (2000) 61–70.
[22] P.R. Edwards, C.H. Maule, R.J. Leatherbarrow, D.J. Winzor, Anal. Biochem. 263 (1998) 1–12.
[23] P. Schuck, A.P. Minton, Trends Biochem. Sci. 21 (1996) 458–460.
[24] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, Biomol. Eng. 24 (2007) 381–403.
[25] S.H.L. Verhelst, P.J.A. Michiels, G.A. van der Marel, C.A.A. van Boeckel, J.H. van Boom, ChemBioChem 5 (2004) 937–942.

IMPEDIMETRIC APTASENSOR FOR TOBRAMYCIN DETECTION IN HUMAN SERUM

Biosensors and Bioelectronics 26 (2011) 2354–2360

Contents lists available at ScienceDirect

Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bios

Impedimetric aptasensor for tobramycin detection in human serum

Eva González-Fernández, Noemí de-los-Santos-Álvarez, María Jesús Lobo-Castañón, Arturo José Miranda-Ordieres, Paulino Tuñón-Blanco*

Dpto. Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, C/ Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 July 2010
Received in revised form
15 September 2010
Accepted 6 October 2010
Available online 14 October 2010

Dedicated to the memory of Prof. Dr. Lucas Hernández.

Keywords:
Aptamer
Modified-RNA
Faradaic impedance spectroscopy
Antibiotic
Biosensor

ABSTRACT

An RNA aptamer is proposed as a recognition element for the detection of tobramycin in human serum. A displacement assay was developed using faradaic-electrochemical impedance spectroscopy (F-EIS) as a detection technique. Two modified aptamers, a partially (ATA) and a fully O-methylated aptamer (FATA) were evaluated and compared. The affinity constant, K_D, for both aptamers was estimated by F-EIS resulting virtually identical within the experimental error. The selectivity towards other aminoglycosides was also studied. The analytical characteristics were evaluated in aqueous solution using both aptamers and FATA was selected for human serum experiments. Using a 1:0.5 dilution of the serum, a linear range between 3 μM and 72.1 μM was obtained, which included the therapeutic range of the antibiotic.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Tobramycin is a broad-spectrum aminoglycoside antibiotic produced by *Streptomyces tenebrarius*. Aminoglycoside antibiotics are composed of a hexose ring, typically 2-deoxystreptamine or streptidine for the streptomycin molecule, and various glycosidically linked amino sugars. Aminoglycosides exhibit bactericidal activity against some Gram-positive and many Gram-negative organisms. This activity derives from their ability to interfere with bacterial protein synthesis by irreversibly binding to ribosome, thus causing damage to cell membranes and cell death.

Similarly to other aminoglycosides, tobramycin exhibits a narrow therapeutic range (2–12 μg/mL (4.3–25.7 μM) in serum) (Hammett-Stabler and Johns, 1998) owing to side adverse effects such as oto- and nephro-toxicity. For these reasons, the monitoring of serum levels during therapy is of crucial importance.

Due to its chemical structure (Fig. 1), tobramycin lacks analytically useful spectroscopic or electrochemical properties, which makes the developing of analytical methods without any derivatization step or sample pre-treatment challenging.

Several methods for tobramycin analysis in biological complex matrices such as plasma, serum or urine, are reported in literature (Maitra et al., 1979; Stead, 2000). They include microbiological assays (Shanson et al., 1976; Stobberingh et al., 1972), which are time-consuming, non-specific and show poor sensitivity; immunoassays (Darwish, 2003; Darwish et al., 2007; Stobberingh et al., 1972), which are appropriate for the determination of a wide range of analytes in biological matrices but sometimes a certain degree of cross-reactivity between structurally related compounds can be observed. High performance liquid chromatography (HPLC) (Feng et al., 2002; Keevil et al., 2003; Mashata et al., 2008; Megoulas and Koupparis, 2005; Oertel et al., 2004) and capillary electrophoresis (CE) methods (Fonge et al., 2004; Law et al., 2006; Lin et al., 2008) have also been developed for tobramycin detection. Commonly these methods require a derivatization step (pre- or post-column) due to the lack of chemical unsaturation of the tobramycin molecule. Thus, these methods are complex, time-consuming and expensive.

In this work, an alternative method for tobramycin determination in complex biological matrices (such as serum) is proposed. It relies on the employment of an aptamer as a molecular biorecognition element in a label-free assay format, using F-EIS as a detection technique.

Aptamers are synthetic RNA or DNA single-stranded oligonucleotide sequences folding into different three-dimensional shapes (hairpin, G-quartet, T-junction, etc.) that exhibit high specificity and affinity for a target molecule. Aptamers are obtained by an *in vitro* process called SELEX (Systematic Evolution of Ligands by

* Corresponding author. Tel.: +34 985103487; fax: +34 985103125.
E-mail address: ptb@uniovi.es (P. Tuñón-Blanco).

0956-5663/$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bios.2010.10.011

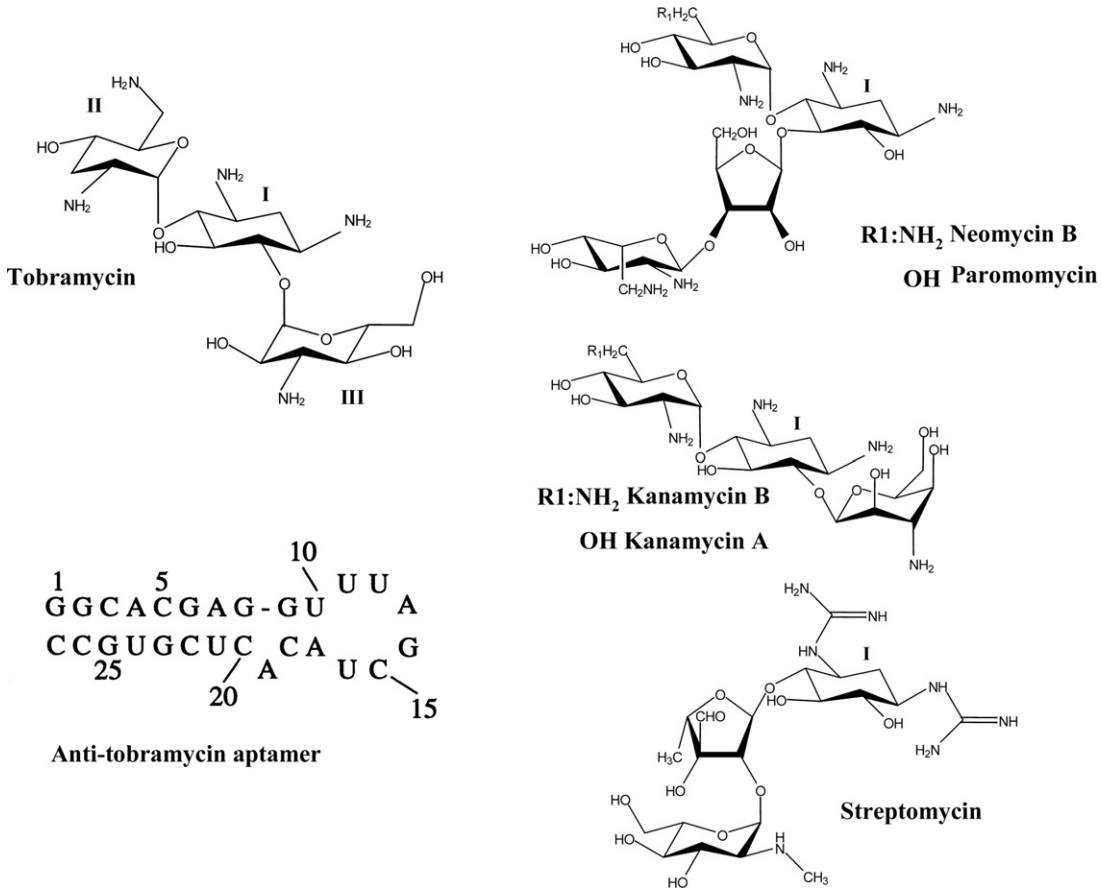

Fig. 1. Chemical structures of aminoglycoside antibiotics and RNA sequence of the anti-tobramycin aptamer.

EXponential enrichment) (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990) that, in principle, allows the selection of an aptamer against any kind of target molecule, ranging from ions to whole cells or bacteria.

The use of aptamers for the detection of small molecules still represents a challenge because of the lower affinity interaction when compared with large molecules (K_D in the μM range for the former and in the pM–nM for the latter) (de-los-Santos-Álvarez et al., 2008). Additionally the transduction of the recognition event often relies on taking advantage of the conformational change experienced by the aptamer in the presence of the analyte. For small molecules, this induced fit can be very small leading to minute changes in the analytical signal.

This is the case of the anti-tobramycin aptamer, a 27-mer RNA sequence (Wang and Rando, 1995) with a hairpin structure containing a hexanucleotide loop and a bulged adenine base (Jiang et al., 1997). As a result of the recognition event tobramycin is encapsulated within the aptamer loop and capped by a looped-out base.

The use of RNA aptamers in biological fluids presents a limitation associated to their high susceptibility to hydrolytic digestion by nucleases resulting in short lifetimes of RNA aptamers in biological media (Luzi et al., 2003). With the aim of avoiding this drawback several strategies have been developed: modification of the 2′-OH position of the ribose ring either to perform SELEX with the modified nucleotides (Keefe and Cload, 2008; Kusser, 2000) or after the SELEX process (Pieken et al., 1991). Another described strategy consists in the use of synthetic mirror-image oligonucleotides called *spiegelmers* (Eulberg and Klussmann, 2003).

Herein, it was decided to modify the previously described native RNA anti-tobramycin aptamer (Wang and Rando, 1995) by adding a methoxy group to the 2′-OH position of the ribose moiety of the nucleotides. This modification was successfully used for the first time in biosensing for the detection of neomycin B in milk samples (de-los-Santos-Álvarez et al., 2007). Two aptamers with different levels of modification were compared in terms of affinity and analytical characteristics for the detection of tobramycin in human serum samples.

2. Materials and methods

2.1. Instrumentation

Electrochemical measurements were performed with a conventional three-electrode electrochemical cell driven by a computer-controlled AutoLab PGstat-12 potentiostat with GPES and FRA 4.9 software (EcoChemie, The Netherlands). A platinum wire and a 1.6 mm diameter polycrystalline gold electrode (Bioanalytical Systems, Inc., IN) acted as auxiliary and working electrode, respectively. All the potentials are referred to Ag|AgCl|KCl 3 M reference electrode.

2.2. Reagents

Two different types of 27-mer anti-tobramycin RNA aptamer were used, which differ in the number of bases modified with O-methyl group at 2′-OH position of their ribose. Both were synthesized by Sigma–Genosys (France) and purified by HPLC. Their sequences are the following:

- Anti-tobramycin aptamer (ATA): 5′[mG] [mG] [mC] [mA] [mC] [mG] [mA] [mG] [mG] [mU] [mU] **U** [mA] [mG] [mC] [mU] [mA] [mC] [mA] [mC] [mU] [mC] [mG] [mU] [mG] [mC] [mC] 3′.
- Fully 2′-methylated anti-tobramycin aptamer (FATA): 5′[mG] [mG] [mC] [mA] [mC] [mG] [mA] [mG] [mG] [mU] [mU] [mU] [mA] [mG] [mC] [mU] [mA] [mC] [mA] [mC] [mU] [mC] [mG] [mU] [mG] [mC] [mC] 3′.

Tobramycin sulfate, streptomycin sulfate, neomycin B sulfate, kanamycin sulfate, paromomycin sulfate, human serum, 3-mercaptopropionic acid, N-(3-dimethylaminopropyl)-N′-ethyl-carbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), potassium ferricyanide and ferrocyanide were purchased from Sigma–Aldrich (Spain). 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanosulfonic acid (HEPES), ethanolamine, salts for buffer solutions (KCl, NaCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$) and 1 M Tris/HCl pH 7.4 solution (all RNAse free) were also obtained from Sigma–Aldrich (Spain). All other reagents were of analytical grade.

All glassware in direct contact with aptamer was previously cleaned with RNAseZAP™ (Sigma–Aldrich, Spain) and all aqueous solutions were prepared with RNAse free water purified by a Direct-Q system with a BioPack cartridge (Millipore).

The compositions of the buffers used for the experiments are as follows:

Measurement solution: 10 mM Tris–HCl pH 7.4, 100 mM KCl, 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$.
Affinity solution: 20 mM Tris–HCl pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$.
Washing solution: 20 mM Tris–HCl pH 7.4, 2 M NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$.
Regeneration solution: 20 mM Tris–HCl pH 7.4, 10 mM tobramycin, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$.

2.3. Experimental methods

2.3.1. Electrode cleaning and pre-treatment

After immersing in piranha solution (3 H_2SO_4 (95%):1 H_2O_2 (33%)) (CAUTION: piranha solution is strongly oxidizing and should be handled with care!) for 10 min in order to eliminate any organic matter from the gold surface, the electrode was rinsed with water and successively polished on a cloth using alumina slurries of 1, 0.3 and 0.05 μm particle size (Buehler, Germany). After sonicating for 5 min, the electrode was immersed in 2 M KOH for 1 h at 60 °C and successively in H_2SO_4 (95%) and HNO_3 (65%) at room temperature for 10 min, respectively. Finally, the electrode was subjected to several potential cycles between 0 and 1.6 V in 0.1 M H_2SO_4 at 100 mV s^{-1} until a reproducible ideal voltammogram of polycrystalline gold was obtained (Woods, 1976).

2.3.2. Electrode modification protocol

The immobilization procedure employed was based on the previously published protocol (de-los-Santos-Álvarez et al., 2007). Firstly, a mercaptopropionic acid (MPA) self-assembled monolayer (SAM) was formed overnight by immersing the freshly cleaned gold electrode in an ethanol:water mixture (75:25, v/v) containing 40 mM MPA under stirring conditions. After washing with ethanol and water, the modified electrode was immersed in an aqueous solution containing 2 mM EDC and 5 mM NHS for 1 h with the aim of activating the carboxylic groups introduced by the MPA-SAM. Then, the electrode was washed with water and placed in a 5 mM tobramycin solution prepared in 0.1 M HEPES pH 8.64 overnight. Once the antibiotic was covalently attached to the SAM, the electrode was incubated in a 1 M ethanolamine solution prepared in 0.1 M HEPES pH 8.64 in order to inactivate the remaining carboxylic groups that have not reacted with tobramycin. Finally, the electrode was immersed in a 0.5 μM anti-tobramycin aptamer for 5 min (unless otherwise stated). This allowed the molecular recognition between immobilized tobramycin and aptamer in solution.

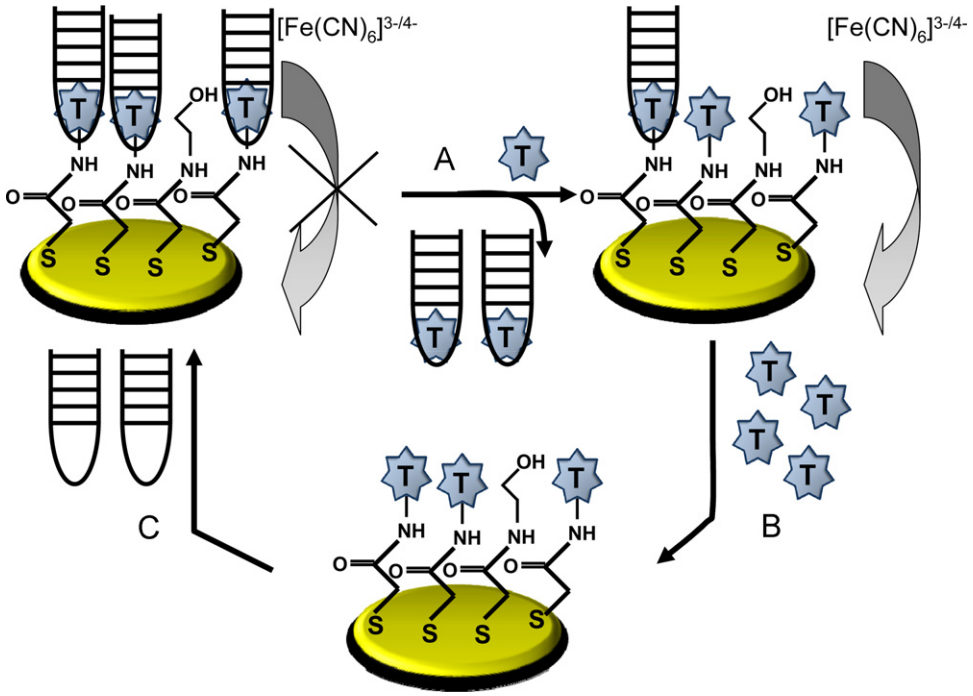

Fig. 2. Scheme of the proposed displacement assay. (A) Incubation of MPA-tobramycin-aptamer modified electrode with different tobramycin concentrations in solution; (B) sensing phase regeneration with an excess of tobramycin in solution; (C) saturation of the sensing phase with the aptamer.

2.3.3. Displacement assay

The MPA-tobramycin-aptamer modified electrode was incubated with several concentrations of tobramycin in the affinity solution for a certain period of time (see Section 3). Then, the electrode was placed in the measurement solution (containing the electroactive species, ferrocyanide/ferricyanide) for acquiring the impedance spectrum, which was recorded at a bias potential of +0.225 V (formal potential of the redox couple to ensure a small current) using a frequency range from 10 kHz to 100 mHz and an alternating current amplitude of 5 mV. After measurement, the electrode was washed with the washing solution for removing the remaining salts from the measurement solution and transferred to the regeneration solution for 1 h. Then, the aptamer was re-bound to the surface as described above. The assay scheme is depicted in Fig. 2.

3. Results and discussion

Several aptamers for tobramycin have been reported (Goertz et al., 2004; Morse, 2007; Wang and Rando, 1995). Herein, one of those evolved by Wang and Rando were selected because of its stronger affinity for its target (K_D = 9 nM) when compared with that exhibited by the other aptamers described so far (K_D = 2.7 μM; 30–100 nM). However, its RNA nature precludes its direct use in biological samples. In order to reduce the RNA nuclease degradation, the hydroxyl group at the 2′-position of the ribose ring in the bases was replaced by an O-methyl group. Nevertheless it was decided not to modify all the 27 aptamer bases because the 2′-OH group of the U base in position 12 seems to play an important role in the molecular recognition event between the aptamer and its target. This group is involved in the formation of a hydrogen bond with N7 of G14, which has a relevant contribution in the definition of the hairpin loop 3D conformation for proper tobramycin recognition (Jiang et al., 1997).

3.1. Sensing phase preparation and evaluation

The sensing phase preparation of a biosensor entails the immobilization of one of the partners involved in the affinity reaction (anti-tobramycin or tobramycin, in this particular case). It represents an important point in biosensor development because it will condition the analytical features of the sensor.

Preliminary attempts to immobilize aptamer on the Au electrode led to random or unspecific analytical signals; so this strategy was abandoned. On the contrary, immobilization of tobramycin led to a suitable sensing phase for tobramycin detection using a displacement assay format.

The proper construction of the sensing phase was followed by F-EIS measurements. This technique is reported as a suitable tool to study biorecognition events at electrodes by following the changes in electron-transfer resistance (R_{et}) that resulted from biosensing events between a redox probe (in this case $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$) and the modified electrode. The R_{et} values for each single F-EIS measurement were obtained by fitting the experimental impedance data to a proper model circuit. In this work, the Randles circuit (inset Fig. 3) was found to fit adequately all data obtained.

For this purpose the electrode was placed in the measurement solution after each sensing phase preparation step and a F-EIS spectrum was recorded (Fig. 3).

The freshly cleaned gold electrode exhibited low R_{et} values (220 Ω) (Fig. 3A). After MPA-SAM formation a great enhancement of the R_{et} was observed (~2000 Ω) (Fig. 3B). This was associated to the negatively charges introduced by the MPA-SAM at the measurement pH, which involved the introduction of an electrostatic barrier for the redox probe resulting in a R_{et} increase.

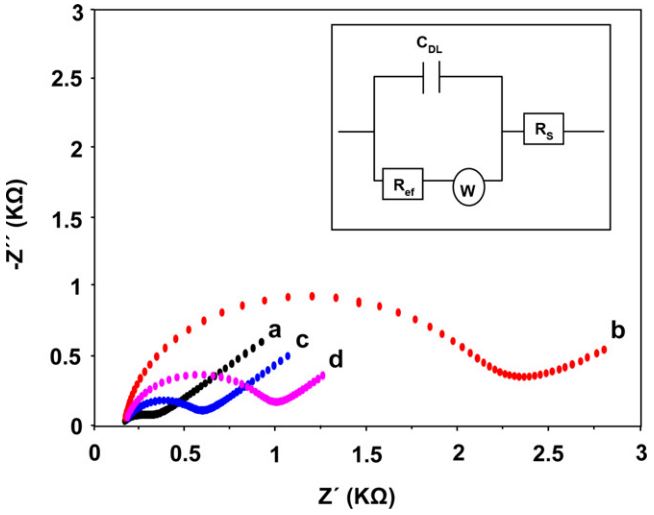

Fig. 3. Nyquist plot of the gold electrode surface in different stages of the sensing phase preparation: (A) unmodified gold electrode; (B) MPA-SAM modified electrode; (C) MPA-SAM-tobramycin modified electrode and (D) MPA-SAM-tobramycin-anti-tobramycin aptamer modified electrode. The inset shows the equivalent circuit applied to fit the F-EIS data obtained experimentally.

The covalent attachment of tobramycin caused a great decrease (430 Ω) associated to the positively charged amino groups of the antibiotic at the measurement pH (Fig. 3C).

Finally, the affinity binding of the aptamer to the immobilized antibiotic generated a negatively charged interface (because of its anionic nature). Therefore, the anionic redox probe was electrostatically repelled, and a R_{et} increase was observed (827 Ω) (Fig. 3D).

To carry out the displacement assay, a saturated layer of aptamer had to be obtained. Therefore, the experimental conditions to achieve an ATA saturated surface were studied. Firstly, tobramycin-modified electrodes were immersed in ATA solutions of different concentration (0.1–5 μM) prepared in the affinity solution and incubated for 30 min. Then, the electrodes were transferred to the measurement solution and F-EIS spectra were recorded. The maximum increase in R_{et} was found at an ATA concentration of 0.5 μM, which was chosen as the optimum value. At higher aptamer concentrations the R_{et} recorded suffered a slight diminution. Then, the ATA incubation time was optimized employing the selected ATA concentration and varying the incubation time from 30 s to 30 min, finding an optimum value of 5 min. It must be highlighted that 70% of the maximum value was obtained in only 30 s of incubation. This result indicated that the aptamer–antibiotic interaction was very fast even on the electrode surface.

3.2. Displacement assay using ATA

The response of the MPA-tobramycin-ATA modified electrode to tobramycin was evaluated using a displacement assay format. For this purpose, the sensing phase was immersed in solutions containing varying tobramycin concentrations (0.1–2000 μM) for 5 min.

This incubation allowed the molecular recognition between the antibiotic in solution and the ATA immobilized on the electrode surface. This way, ATA was displaced from its complex with the antibiotic-modified surface to form a complex with free tobramycin in solution, which resulted in a reduction of the negatively charged surface leading to a decrease in the R_{et} measured. This change in R_{et} was found to be dependent on the tobramycin concentration in solution, which enabled the quan-

titative analysis of tobramycin. The signals obtained for different tobramycin concentration solutions were expressed as a percentage of R_{et} diminution according to the following expression: $S\ (\%) = (R_i - R_g)/(R_a - R_g) \times 100$ where R_i was the R_{et} after incubation with an i concentration of tobramycin; R_a the R_{et} measured after the aptamer incubation (the highest value), and R_g corresponded to the R_{et} value of the tobramycin-modified electrode (without aptamer) (the lowest value). As anticipated for an affinity interaction, the S (%) vs. log[tobramycin (μM)] plot showed a sigmoidal form. A linear range was found between 0.5 μM and 200 μM ($S\ (\%) = (-35 \pm 0.7)\log[\text{tobramycin}\ (\mu M)] + (84.6 \pm 0.9)$); $r = 0.9995$. The analytically useful linear range was defined as the analyte concentration corresponding to 20–80% of the analytical signal and the limit of detection (L.D.) as the concentration corresponding to 90% of the maximum measured signal value. Therefore, a linear range between 1.4 μM and 70 μM was found, which totally covered the tobramycin therapeutic range in serum (4.3–25.7 μM) (Hammett-Stabler and Johns, 1998). The L.D. was 0.7 μM. The sensing phase can be regenerated by a simple step consisting of its incubation in a concentrated solution of tobramycin (regeneration solution) for 1 h, removing all aptamer molecules from the electrode surface. Subsequently, the tobramycin-modified surface was (re)saturated with the aptamer as explained above. A reproducibility of 6% ($n = 3$) was found using a single sensing phase, which confirmed the reusability of the sensor.

The sensing phase developed can be used for a week stored in the regeneration solution at 4 °C when not in use.

The selectivity of the sensing phase with respect to different aminoglycoside antibiotics was evaluated. Kanamycin (which exhibits a similar structure to tobramycin, 4,6-disubstituted deoxystreptamine), neomycin B, paromomycin (4,5-disubstituted deoxystreptamine) and streptomycin (with a streptidine base (Fig. 1)) were tested. The sensing phase was immersed in solutions of these compounds for 5 min and the cross-reactivity was evaluated. The corresponding dose–response curves were plotted for each antibiotic, and depicted in Fig. 4A. From this figure it was apparent that the proposed displacement assay was highly selective for tobramycin, differentiating this antibiotic from paromomycin, streptomycin and kanamycin. The latter case is remarkable because kanamycin only differs from tobramycin in a single hydroxyl group. These results were more satisfactory than those reported for a similar SPR system, in which the aptamer was immobilized on the sensor surface. At this case, the sensing phase showed similar binding to different aminoglycosides, including kanamycin (Verhelst et al., 2004). However, the dose–response curve for neomycin B was virtually identical to that of tobramycin, indicating a high cross-reactivity. This unexpected result was further investigated using a sensing phase with neomycin B immobilized on the electrode surface. Fig. 4B shows the dose–response curves obtained employing this neomycin B sensing phase for both tobramycin and neomycin B. From Fig. 4B it was clear that anti-neomycin B aptamer also exhibited high affinity towards tobramycin. This finding can be explained by the structural similarity of both aptamers joined to their similar small rearrangement when recognition event takes place. Both aptamers encapsulate its related antibiotic between the floor and walls of the widened major groove and the 2′-deoxystreptamine ring is capped by a looped-out base in order to reach the correct binding pocket structure (Jiang et al., 1999). Taking all these facts into account it can be concluded that the molecular recognition event mainly depends on the 3D oligonucleotide structure rather than on the base sequence. Due to the fact that both antibiotics are rarely used in combined therapies, this interference is not clinically relevant.

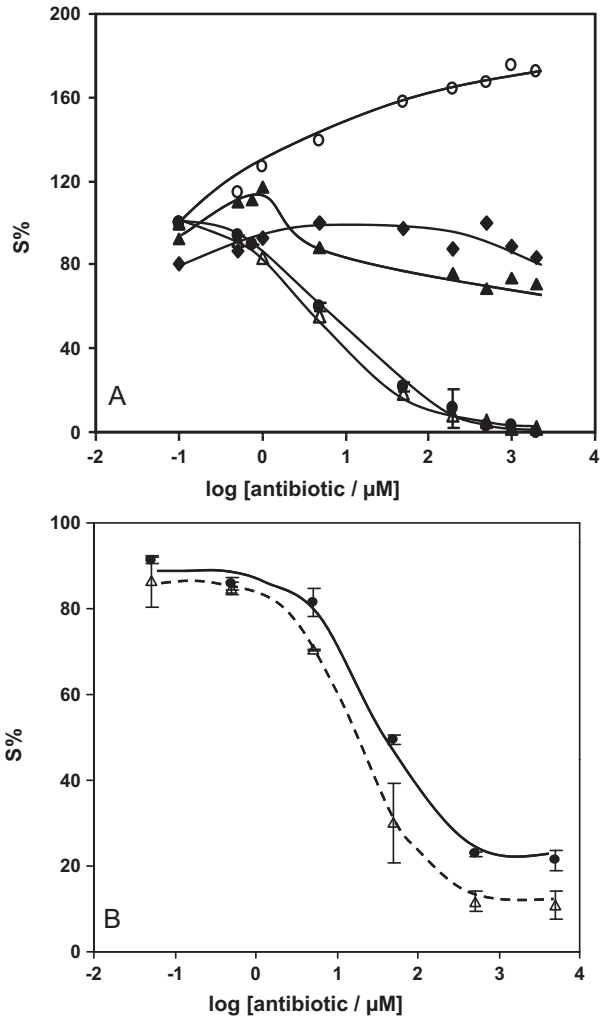

Fig. 4. Dose–response curves obtained for different aminoglycosides antibiotics (●) tobramycin; (▲) kanamycin; (△) neomycin B; (♦) paromomycin; (○) streptomycin employing (A) tobramycin-modified sensing phase; (B) neomycin B-modified sensing phase.

3.3. Displacement assay using FATA

In the studies above explained, a 2′-O-methylated anti-tobramycin aptamer with all bases modified except the U12 was used. This base was not modified because it was described in literature as an important point in the molecular recognition event (Jiang et al., 1997). However, this unmodified nucleobase might weaken the nuclease resistance of the ATA and preclude the use of this aptamer as a sensing phase for tobramycin determination in biological matrices. For this reason, it was decided to study the feasibility of using FATA (fully methylated) instead of ATA in order to improve the endonuclease resistance of the RNA oligonucleotide in biological matrices.

First of all, F-EIS measurements were carried out to estimate the affinity of FATA towards tobramycin. This way, the dissociation constant was calculated and compared with the one obtained for ATA.

The tobramycin-modified electrode was immersed in a solution containing 0.5 μM of the corresponding aptamer and the R_{et} value was plotted as a function of time. The R_{et} increased until a stable value was reached (saturation of the surface). Subsequently, the electrode was placed in a 2.5 μM tobramycin solution and the R_{et} value recorded was plotted vs. time leading to the dissociation

phase. As expected, R_{et} values decreased with time owing to the loss of aptamer from the surface. All R_{et} values were expressed as a percentage according to the expression previously shown in Section 3.2.

Both association and dissociation phases were fitted to a first-order exponential growth, $S\,(\%) = A_0(1 - \exp(-k_s t))$ and to a first-order exponential decay, $S(\%) = B_0 \exp(-k_d t) + y_0$, respectively. From these equations k_d (dissociation rate constant) and k_s were obtained, being $k_s = k_a\,[\text{aptamer}] + k_d$. From this equation k_a (association rate constant) can be estimated. Once the rate constants were known, the affinity constant (K_D) was calculated by the expression $K_D(\text{M}) = k_d/k_a$. K_D values of 0.6 and 0.4 μM were obtained for the interaction of immobilized tobramycin with ATA and FATA, respectively. Both values were of the same order of magnitude, so the affinity of both aptamers for tobramycin was not significantly different. This result suggested that the role played by the 2′-OH of the U12 in the molecular recognition event of the tobramycin was not as important as reported in literature. The value of the affinity constant of the complex between tobramycin and the unmodified natural anti-tobramycin aptamer was previously estimated. Values of K_{D1} = 9 nM and K_{D2} = 2.7 μM were reported under conditions where a 1:2 stoichiometry was found. Both values were obtained by quenching experiments with pyrene-labeled tobramycin (PYT) (Wang and Rando, 1995). The K_{D1} value was outstandingly lower than both reported in this work, which can be due to the fact that our experiments were not carried out in solution but after tobramycin immobilization. Likewise, a higher affinity constant value (K_D = 1.1 μM) was reported carrying out SPR measurements being the aptamer the immobilized partner (Verhelst et al., 2004). This way, taking into account that both aptamers showed the same affinity for their target, FATA instead of ATA was selected for further experiments.

The analytical features of a sensing phase using FATA were studied in aqueous solution and compared with those found using ATA. With this aim a sensing phase with FATA was prepared following the same procedure described for ATA in Section 3.1. Optimization of the incubation time needed to reach the aptamer saturation of tobramycin-modified electrodes was carried out, concluding that saturation was quickly reached in 5 min, as in the case of ATA. Likewise, an optimization of the incubation time with tobramycin in solution was also done, finding an optimum value of 2 min. Using these experimental conditions the MPA-tobramycin-FATA modified electrode was immersed in several tobramycin solutions containing different antibiotic concentrations prepared in the affinity solution, and then transferred to the measurement solution for recording the F-EIS spectra.

The dose–response curve showed a linear plot [$S\,(\%) = (-37 \pm 2)\log[\text{tobramycin}\ (\mu\text{M})] + (77 \pm 2)$ (r = 0.997)], which presented a similar sensitivity as the one obtained for ATA. The limit of detection and the useful analytical range were calculated as 0.4 μM and 0.8–34.9 μM, respectively. This result was in good agreement with the result obtained above, suggesting that both aptamers exhibit similar affinities for its target. The reproducibility was equally similar, 5.5% (n = 5). All these results drawn to the conclusion that there was no difference in developing the proposed displacement assay employing both aptamers, ATA and FATA in aqueous solution.

3.4. Aptasensor assay of serum samples

The ability of the proposed impedimetric aptasensor to detect tobramycin in a complex biological matrix such as serum was evaluated. For this purpose, FATA was selected as a starting-point, because of the higher endonuclease resistance expected due to its fully 2′-O-methylation compared to the ATA one.

The chemical composition of human serum is quite complex, including proteins (except coagulation proteins that are removed during the coagulation process), ions, nutrients and other substances. Some of these compounds could interact with the sensing phase by electrostatic interactions causing an unspecific R_{et} change. Thus the immersion of the sensing phase in a serum solution led to an initial R_{et} increase. Typically this effect implied an enhancement of about 400–500 Ω in R_{et} values.

With the aim of taking this effect into account all experiments were started by carrying out several 5 min incubations in serum solution, diluted in a certain degree, until a constant R_{et} value was recorded. After this, a F-EIS measurement was performed in all cases. This value was taken as the R_a value in the signal percentage calculation.

After this conditioning step, the displacement assay was carried out using different tobramycin concentrations prepared in human serum. The concentration range tested was identical to the range used in aqueous solution. In this matrix the optimum incubation time with tobramycin was found to be 1 min. A slightly increase in the R_{et} recorded was observed when longer incubation time with tobramycin was carried out, probably due to unspecific adsorption of the matrix. However, it was proved that the initial R_{et} enhancement, because of the immersion of the modified electrode in a serum solution, did not preclude the adequate performance of the aptasensor.

When the spiked serum was not diluted, an unspecific and random R_{et} change was observed. Therefore, several dilutions with the affinity solution were assayed taking great care to maintain constant the ionic strength of the final solution in order to be identical to the affinity solution. A dose–response curve was obtained for 1:0.5; 1:1; 1:2 and 1:5 dilutions. The analytical characteristics are shown on Table 1.

From the table it was apparent that all human serum dilutions tested provided a suitable dose–response curve confirming that the affinity binding requires a defined salt concentration to take place. It was also checked that the displacement event did not take place when the assay was carried out without the salt correction (data not shown).

It must be emphasized that the calibration plots presented a very similar slope even in the case of the lowest dilution. These results suggested that the ionic strength is a critical experimental condition for the recognition event. The dilution degree only modified the limit of detection. The higher the dilution the worst the limit of detection.

In order to be able to determine tobramycin in serum the lowest dilution was selected because the linear range covered the entire physiological range. Under these conditions, this aptasensor could be used for therapy control.

Table 1
Analytical features relative to the displacement assay developed in different human serum dilution degrees.

Dilution (serum:buffer)	Linear plot	Linear range (μM)	L.D.(μM)
1:0.5	$S\,(\%) = (-44 \pm 3)\log[\text{tobramycin}\ (\mu\text{M})] + (93 \pm 3)$; r = 0.997	3–72.1	1.8
1:1	$S\,(\%) = (-48 \pm 3)\log[\text{tobramycin}\ (\mu\text{M})] + (132 \pm 6)$; r = 0.994	23.3–406.6	14.5
1:2	$S\,(\%) = (-45 \pm 3)\log[\text{tobramycin}\ (\mu\text{M})] + (119 \pm 3)$; r = 0.995	22.5–496.6	13.5
1:5	$S\,(\%) = (-55 \pm 3)\log[\text{tobramycin}\ (\mu\text{M})] + (123 \pm 3)$; r = 0.999	36.5–451.1	24

4. Conclusions

We have developed a label-free impedimetric biosensor for the determination of tobramycin in human serum using a fully O-methylated RNA aptamer. The sensing phase was easily regenerated and the sensor was selective towards most aminoglycosides. The response was fast and the limited dilution of the sample allowed the detection of tobramycin within the therapeutic range, which opens up the possibility of using this device for the rapid monitoring of tobramycin levels in serum during clinical therapies.

Acknowledgments

E.G.F. and N.S.A., thank to Spanish Government for a predoctoral grant and a Ramón y Cajal contract, respectively. This work was co-financed by Projects CTQ2008-02429 and FICYT IB08-087 and the European Regional Development Fund.

References

Darwish, I.A., 2003. J. Pharm. Biomed. Anal. 30 (5), 1539–1548.
Darwish, I.A., Mahmoud, A.M., Al-Majed, A.R.A., 2007. Talanta 72 (4), 1322–1328.
de-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Tuñón-Blanco, P., 2007. J. Am. Chem. Soc. 129 (13), 3808–3809.
de-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Tuñón-Blanco, P., 2008. Trends Anal. Chem. 27 (5), 437–446.
Ellington, A.D., Szostak, J.W., 1990. Nature 346 (6287), 818–822.
Eulberg, D., Klussmann, S., 2003. ChemBioChem 4 (10), 979–983.
Feng, C.-H., Lin, S.-J., Wu, H.-L., Chen, S.-H., 2002. J. Chromatogr. B 780, 349–354.
Fonge, H., Kaale, E., Govaerts, C., Desmet, K., Van Schepdael, A., Hoogmartens, J., 2004. J. Chromatogr. B 810 (2), 313–318.
Goertz, P.W., Cox, J.C., Ellington, A.D., 2004. JALA 9 (3), 150–154.
Hammett-Stabler, C.A., Johns, T., 1998. Clin. Chem. 44 (5), 1129–1140.
Jiang, L., Majumdar, A., Hu, W., Jaishree, T., Xu, W., Patel, D.J., 1999. Structure 7 (7), 817–827.
Jiang, L.C., Suri, A.K., Fiala, R., Patel, D.J., 1997. Chem. Biol. 4 (1), 35–50.
Keefe, A.D., Cload, S.T., 2008. Curr. Opin. Chem. Biol. 12, 448–456.
Keevil, B.G., Lockhart, S., Cooper, D.P., 2003. J. Chromatogr. B 794, 329–335.
Kusser, W., 2000. Rev. Mol. Biotechnol. 74, 27–38.
Law, W.S., Kubán, P., Yuan, L.L., Zhao, J.H., Li, S.F.Y., Hauser, P.C., 2006. Electrophoresis 27, 1932–1938.
Lin, Y.F., Wang, Y.C., Chang, S.Y., 2008. J. Chromatogr. A 1188 (2), 331–333.
Luzi, E., Minunni, M., Tombelli, S., Mascini, M., 2003. Trends Anal. Chem. 22 (11), 810–818.
Maitra, S.K., Yoshikama, T.T., Guze, L.B., Shotz, M.C., 1979. Clin. Chem. 25, 1361–1367.
Mashata, M., Chrystyn, H., Clark, B.J., Assi, K.H., 2008. J. Chromatogr. B 869 (1–2), 59–66.
Megoulas, N.C., Koupparis, M.A., 2005. Anal. Bioanal. Chem. 382 (2), 290–296.
Morse, D.P., 2007. Biochem. Biophys. Res. Commun. 359 (1), 94–101.
Pieken, W.A., Olsen, D.B., Benseler, F., Aurup, H., Eckstein, H.F., 1991. Science 253, 314–317.
Oertel, R., Neumeister, V., Kirch, W., 2004. J. Chromatogr. A 1058, 197–201.
Shanson, D.C., Hince, C.J., Daniels, J.V., 1976. J. Infect. Dis. 134 (Suppl.), S104–S109.
Stead, D.A., 2000. J. Chromatogr. B 747, 69–93.
Stobberingh, E.E., Houben, A.W., Boven, C.P.A.v., 1972. J. Clin. Microbiol. 1972, 795–801.
Tuerk, C., Gold, L., 1990. Science 249 (4968), 505–510.
Verhelst, S.H.L., Michiels, P.J.A., Marel, G.v.d., Boeckel, C.A.A.v., Boom, J.H.v., 2004. ChemBioChem 5, 937–942.
Wang, Y., Rando, R.R., 1995. Chem. Biol 2 (5), 281–290.
Woods, R., 1976. In: Bard, A.J. (Ed.), Electroanalytical Chemistry, vol. 9. Marcel Dekker, Inc., New York.

APTAMER-BASED INHIBITION ASSAY FOR THE ELECTROCHEMICAL DETECTION OF TOBRAMYCIN USING MAGNETIC MICROPARTICLES

Aptamer-Based Inhibition Assay for the Electrochemical Detection of Tobramycin Using Magnetic Microparticles

*Eva González-Fernández, 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: 34 985103125.
*e-mail: ptb@uniovi.es

Received: September 10, 2010
Accepted: October 21, 2010

Abstract
The detection of small molecules using aptamers is not straightforward when the induced fit triggered by the analyte is also small. Herein a labeling strategy is explored for the voltammetric detection of the antibiotic tobramycin using magnetic microparticles (MPs). A competition between MPs-immobilized tobramycin and free tobramycin for the limited amount of the biotinylated-aptamer was established. The addition of the enzymatic conjugate and the substrate generated a product that was electrochemically oxidized on screen-printed carbon electrodes. The analytical signal was proportional to the antibiotic concentration from 5–500 μM and the reproducibility was 5.7%. The assay selectivity was also studied.

Keywords: Antibiotic tobramycin, Aptamer biosensor, Electrochemical detection, Magnetic microparticles

DOI: 10.1002/elan.201000567

Dedicated to the Memory of Prof. Dr. Lucas Hernández
Presented at the 13th International Conference on Electroanalysis, ESEAC 2010, Gijón, Spain

1 Introduction

Electrochemical aptamer-based sensors are experiencing a rapid development [1,2], since 2005 when the first assay was published [3]. Most of them require the immobilization of the molecular recognition element (the aptamer) on the electrode surface through a variety of strategies previously developed for the immobilization of other biomolecules [4]. In general, immobilization facilitates washing steps to remove the unspecifically bound or unreacted compounds as well as regeneration steps. Besides, it is essential for the construction of array devices for high throughput analysis and integration into portable devices. The use of magnetic microparticles (MPs), also called beads, as a platform for immobilization of a capture molecule before the electrochemical transduction of the recognition event presents many advantages. Since MPs are in suspension, the kinetics of the affinity interaction between ligand and receptor is greatly accelerated and the number of capture biomolecules anchored increases because of the larger surface area of the beads in comparison with conventional electrode surfaces. Additionally, washing and separation steps are very simple because paramagnetic particles, since temporarily magnetized, are attracted by permanent magnets returning to the initial state when these are removed. Therefore, the elimination of unbound species (matrix separation) does not require filtration or centrifugation. Their ease of handling also allows performing several experiments in parallel (high throughput analysis).

MPs are commercialized with a wide variety of surface functional groups, which expands the diversity of molecules that can be attached. In combination with aptamers, MPs have been used for shortening and improving the evolution of aptamers by SELEX procedure [5–8], and for the isolation of pathogens from complex samples. In the latter cases the detection was achieved by means of fluorimetric sandwich assays [9] or RT-PCR after releasing of the target to improve the limit of detection [10].

As synthetic nucleic acid-based receptors, aptamers can be used in a similar manner than antibodies with important advantages such as improved thermal and chemical stability and tolerance to denaturation. Mascini group has explored several ELISA format assays for the detection of thrombin [11,12] and C reactive protein [13] by transferring the MPs, where the recognition event takes place, to a screen-printed electrode with a magnetic block in the bottom and further electrochemical detection of an enzymatic product.

Taking advantage of the intrinsic characteristics of nucleic acids such as hybridization, displacement assays have also been reported on magnetic beads using Au nanoparticles as electrochemical labels [14]. Recently, an

 © 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

on-off switching electrochemical aptamer molecular beacon was used for the detection of thrombin. A hairpin aptamer carrying carminic acid at both ends was immobilized on MPs through hybridization with a short DNA probe. It exhibited a reduced electrochemical activity in comparison with its opened structure after interaction with the target. The magnetic enrichment greatly improved the detectability [15].

All these methods were developed for the detection of large molecules. However, the detection of small molecules using aptamers is a challenge because of the lower affinity interaction when compared with large molecules (dissociation constants in the μM range for the former and in the pM-nM for the latter [16]). Additionally, the transduction of the recognition event often relies on the induced fit experienced by the aptamer in the presence of the analyte, which may be very small for this kind of molecules leading to minute changes in the analytical signal. This is the case of the anti-tobramycin aptamer, a 27-mer RNA with a hairpin structure containing a hexanucleotide loop and a bulged adenine base [17], which widens when encapsulating the antibiotic [18]. Tobramycin is a broad-spectrum antibiotic belonging to the group of aminoglycosides, which exhibit bactericidal activity against some *Gram-positive* and many *Gram-negative* organisms. Similarly to other aminoglycosides, the use of tobramycin is limited by a narrow therapeutic range (2–12 μg/mL (4.3–25.7 μM) in serum)) [19] owing to potential side adverse effects such as oto- and nephrotoxicity that can appear. Therefore, careful monitoring of the drug levels in patients serum is required. Label-free detection is an attractive solution to address this weakness, as it was recently shown using faradaic impedance spectroscopy [20]. Nevertheless, labeling strategies deserve further investigations. Herein the use of a labeled aptamer for the detection of tobramycin, using MPs as a solid support for carrying out an inhibition assay is proposed. The voltammetric signal associated to the enzymatically generated product is measured at disposable screen-printed electrodes.

2 Experimental

2.1 Apparatus and Reagents

Electrochemical measurements were performed on disposable screen-printed carbon electrochemical cells (SPCE) (Dropsens, Oviedo, Spain) composed of a 4 mm diameter carbon working electrode, a carbon counter electrode and a Ag pseudo-reference electrode, driven by a computer-controlled μ-AutoLab type II PGstat-12 potentiostat with GPES 4.9 software (EcoChemie, The Netherlands).

The 12-tube mixing wheel (Dynal MX1) used for sample mixing in vials and the magnet (DynaMag-2) for magnetic separation were purchased from Invitrogen (Barcelona, Spain).

A 5′-biotinylated 27-mer anti-tobramycin RNA aptamer (BATA) was used throughout this work. It was modified with a methoxy group at 2′-OH position of the ribose moieties in all nucleobases except at U12 position. The BATA, with the following sequence, 5′ [Biotin] [mG] [mG] [mC] [mA] [mC] [mG] [mA] [mG] [mG] [mU] [mU] U [mA] [mG] [mC] [mU] [mA] [mC] [mA] [mC] [mU] [mC] [mG] [mU] [mG] [mC] [mC] 3′, was synthesized by Sigma-Genosys (Madrid, Spain) and purified by HPLC.

Carboxylated magnetic microparticles (MPs) Dynabeads MyOne Carboxylic Acid (1.05 μm in diameter) were from Invitrogen (Barcelona, Spain).

Tobramycin sulfate, streptomycin sulfate, kanamycin sulfate, *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*′-ethyl-carbodiimide hydrochloride (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), streptavidin-alkaline phosphatase conjugate ($Strep_2$-ALP) and 1-naphthyl phosphate (α-NP) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), ethanolamine, Tween 20, bovine serum albumin (BSA), salts for buffer solutions (KCl, NaCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$) and 1 M Tris/HCl pH 7.4 solution (all RNAse free) were also obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). All other reagents were of analytical grade.

All glassware in direct contact with aptamer was previously cleaned with RNAseZAP (Sigma-Aldrich, Spain) and all aqueous solutions were prepared with RNAse free water purified by a Direct-Q system with a BioPack cartridge (Millipore).

The compositions of the buffers used for the experiments are as follows:

Immobilization solution: 0.1 M HEPES pH 8.64. (Buffer A)

Affinity solution: 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$. (Buffer B)

Washing solution: Buffer B + 0.01 % Tween 20. (Buffer C)

Detection solution: 0.5 M Tris-HCl pH 9.8, 1 mM $MgCl_2$. (Buffer D)

2.2 Procedures

2.2.1 Modification of MPs

For the preparation of the sensing phase tobramycin was covalently immobilized through the amino groups to the surface of the carboxylated MPs using the carbodiimide chemistry.

For this purpose, a suspension of 50 μL of the MPs stock solution (10 mg/mL) was washed twice with 500 μL of 0.01 % Tween 20 aqueous solution for 2 min. During each washing or incubation step the vials were positioned in the mixing wheel to allow a proper contact between the solution and the MPs. After incubation, the vials were placed in a magnet holder where MPs were trapped to the vial wall making the removal of the supernatant easy. MPs were re-suspended in 500 μL of a mixture of 0.2 M EDC and 0.05 M NHS for 30 min to activate the functional groups available on the MPs surface. After two wash-

 © 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ing steps with 500 μL of buffer A containing 0.01 % Tween 20, the MPs were re-suspended in a 40 mM tobramycin solution prepared in buffer A for 1 h (unless otherwise stated). Once the antibiotic was covalently attached to the surface of the MPs, and after washing twice with 500 μL of buffer A containing 0.01 % Tween 20, a 1 h incubation was carried out in 500 μL of a 1 M ethanolamine solution prepared in buffer A. The latter step allowed the inactivation of the remaining carboxylic groups that had not reacted with tobramycin. Finally, two washing steps were carried out with 500 μL of buffer C and the tobramycin-modified MPs (TMPs) were re-suspended in 500 μL of buffer B (final TMPs concentration, 1 mg/mL). This suspension must be stored at 4 °C and used within the following 24 h to guarantee the proper condition of the immobilized tobramycin.

2.2.2 Inhibition Assay Protocol

The TMPs were used for developing an aptamer-based inhibition assay for tobramycin detection in aqueous solution.

With this aim, several 10 μL aliquots of the TMPs stock solution were washed twice adding 990 μL of buffer C for 2 min each. After discarding the supernatant, the TMPs were re-suspended in 1 mL of a solution containing a constant concentration of BATA and different concentrations of tobramycin ranging from 0 to 500 μM prepared in buffer B containing 0.1 % BSA and incubated for 15 min. Then, two washing steps were carried out employing 1 mL of buffer D containing 1 % BSA and 0.01 % Tween 20 for 2 min each. After that, the MPs were re-suspended in 1 mL of 4.3×10^{-3} g/L $Strep_2$-ALP conjugate prepared in buffer D containing 1 % BSA and 0.01 % Tween 20. After 10 min of incubation time, the MPs were washed twice with 1 mL of buffer D and finally re-suspended in 100 μL of buffer B (final MPs concentration, 0.1 mg/mL).

Once the enzymatic conjugate was attached to the MPs, both the enzymatic reaction and the electrochemical measurements were carried out on SPCEs. For this purpose 15 μL of the modified MPs were deposited and trapped onto the working electrode by means of a magnet placed under it. Subsequently, the electrochemical cell was fully covered adding 25 μL of the enzymatic substrate (α-NP) prepared in buffer D to a final concentration of 4 mM. After 10 min of enzymatic reaction (unless otherwise stated), the product, α-naphthol (α-N) was detected by differential pulse voltammetry (DPV) measurements from 0 V to 0.55 V with the following parameters: modulation amplitude 0.05 V; step potential 0.0015 V; interval time: 0.15 s; modulation time 0.05 s.

3 Results and Discussion

Preliminary attempts of developing a voltammetric aptasensor for tobramycin detection taking advantage of the employment of MPs as solid support were based on a two-step impedimetric aptasensor previously reported by our group [20]. This assay relied on the displacement of the anti-tobramycin aptamer from its complex with an antibiotic-modified surface by free tobramycin in solution. It was carried out by first saturating the tobramycin-modified electrode surface with aptamer, and subsequent exposure of the sensing phase to a tobramycin solution (with no aptamer). Experimental results indicated that the displacement of the previously bound BATA to the TMPs towards free tobramycin in solution did not take place in a sufficient extent. An alteration in the affinity of the biotinylated aptamer with respect to the unlabeled counterpart is speculated to be the cause of this behavior. Ongoing work is currently under development to elucidate this finding.

A one-step format (inhibition assay) was then designed, and it is depicted in Figure 1. In this case, the TMPs were exposed to a mixture of a fixed concentration of BATA and varying concentrations of tobramycin (Figure 1A). This way, the free aptamer will bind to the tobramycin linked to the magnetic particles. Thus, the higher the tobramycin concentration in the sample, the lower the amount of BATA available for binding to TMPs. Then, the $Strep_2$-ALP conjugate was added (Figure 1B) and finally, both the enzymatic reaction and the voltammetric measurements were carried out on SPCEs (Figure 1C). For this purpose a small magnet was placed under the working electrode in order to assure that the MPs were placed only on the working electrode, which greatly increased the reproducibility of the measurement. The addition of the electrochemically inactive substrate α-NP, covering all three electrodes, allowed the electrochemical detection of the product enzymatically generated, α-N by DPV at 260 mV. The voltammetric signal constituted a measurement of the amount of $Strep_2$-ALP anchored to the modified MPs and, therefore, it was related to the tobramycin concentration in the sample. With this design a signal-off approach was expected because the decrease of the amount of BATA available for surface interaction when increasing the tobramycin concentration in the sample necessarily leads to a smaller amount of enzymatic conjugate linked to the MPs and, thus, to a smaller voltammetric current.

It is well-known that the short shelf life of RNA in solution complicates its use in biosensors. Fortunately, chemical modification of its phosphate-sugar backbone can successfully avoid its degradation by endonucleases. Recently, methoxylation of 2′ position of riboses has been probed to be effective to allow the use of RNA aptamers as recognition elements in biological fluids [21]. After this pioneered work, it was decided to modify the native antitobramycin aptamer with methoxy groups at all its 2′ positions of its ribose moieties except the corresponding to the base U12 because it was described that the 2′-OH group of the U12 plays some role in the molecular recognition event of tobramycin [18]. A biotin molecule was added to the 5′-end for conjugation with $Strep_2$-ALP. The

 © 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

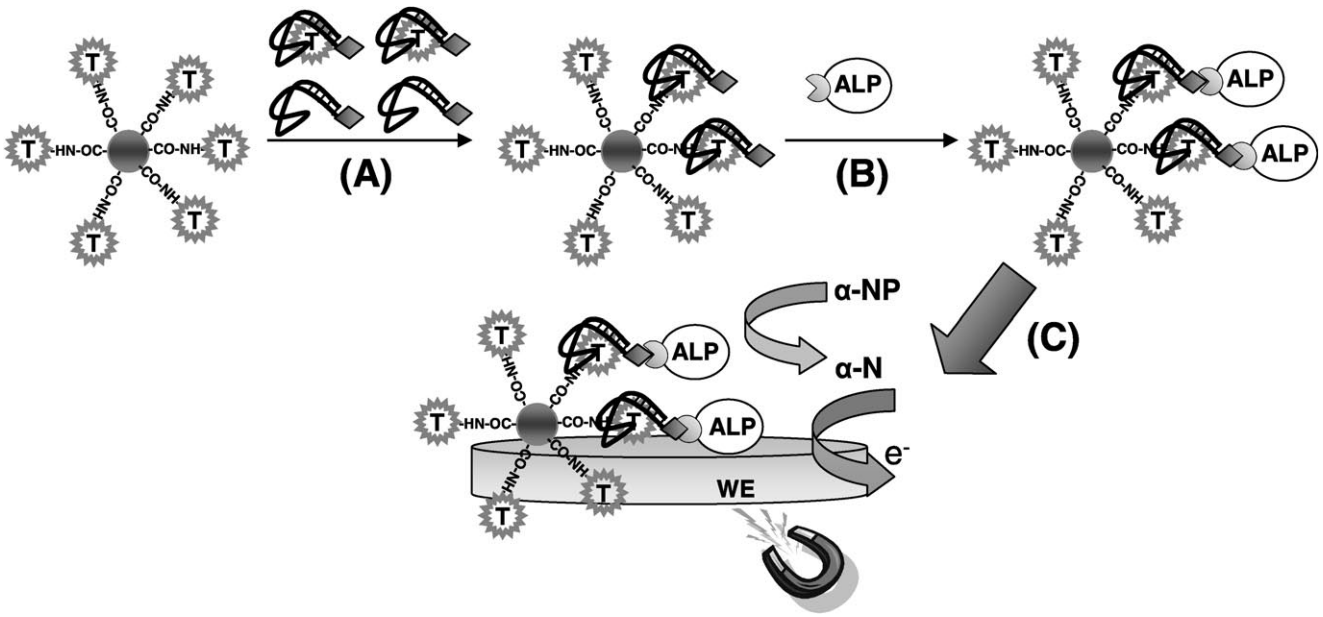

Fig. 1. Scheme of the proposed inhibition assay. (A) Incubation of TMPs with a fixed concentration of BATA and varying concentrations of tobramycin, (B) $Strep_2$-ALP labeling, (C) Enzymatic reaction and electrochemical measurement on SPCEs.

nonbiotinylated form of this modified aptamer was successfully applied to serum samples [20].

3.1 Optimization of the MPs Modification

The great enhancement in the effective surface area for molecular recognition when using MPs as a solid support compared with the typical area of solid electrodes requires a special control of the conditions during the MPs modification in order to ensure a maximum coverage of MPs surface and to minimize the unspecific binding.

Optimization of the tobramycin concentration used for its covalent attachment was carried out in order to obtain saturated tobramycin-modified MPs (TMPs). Following the protocol described above, MPs were modified with three concentrations of tobramycin (20, 40 and 80 mM) and the inhibition assay was carried out using 0.5 μM BATA in the absence of tobramycin (blank experiment) followed by the electrochemical measurements. This way, in the absence of tobramycin in solution, all BATA was allowed to recognize the immobilized antibiotic and this blank experiment represented the maximum signal achievable with the inhibition assay. The difference between the analytical signal measured for the blank and the corresponding nonspecific signal obtained after incubation without aptamer and tobramycin in solution was evaluated at each tobramycin coverage. This nonspecific signal was associated to the adsorption of the enzymatic conjugate to the sensing phase. It is worth noting that the nonspecific signal decreased when increasing the tobramycin concentration. In the highly covered MPs the nonspecific adsorption sites or/and the access of the bulky conjugate to the specific anchoring sites on the particle surface is more difficult. As a consequence, a decrease in the nonspecific signal which quantifies the nonspecific adsorption of the enzymatic conjugate ($Strep_2$-ALP) to the sensing phase was observed.

Figure 2 shows the blank current (grey columns) and nonspecific (white columns) values obtained at different tobramycin coverages. It is clear from the figure that the increase in tobramycin concentration from 20 to 40 mM led to a great enhancement in the measured signal while, at higher concentrations of tobramycin, the signal magnitude remained constant within the experimental error.

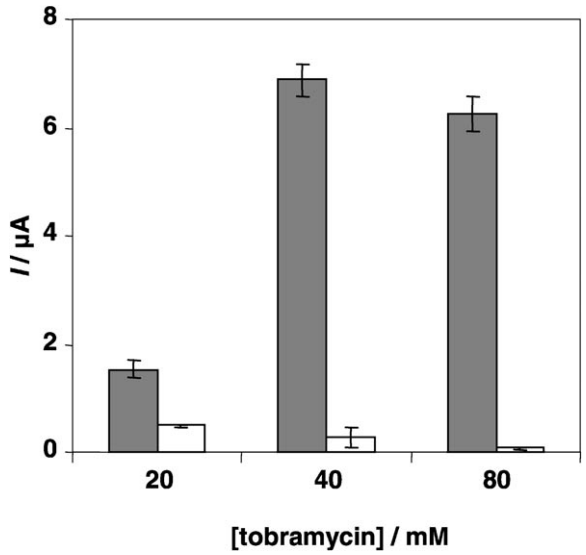

Fig. 2. Effect of the tobramycin coverage in terms of concentration of tobramycin used during the immobilization on the analytical signal. Grey columns correspond to the specific signal; white columns refer to the nonspecific signal (see text for details).

 © 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

This result indicated that at the lowest concentration there was not sufficient tobramycin to react with all the surface active carboxylic groups that were subsequently deactivated by ethanolamine, which lacks specificity towards BATA. However, at concentrations above 40 mM of tobramycin a saturation of the active groups was reached. It is worth noting that the nonspecific adsorption of the enzymatic conjugate (white columns) decreased when increasing the tobramycin coverage and it was almost negligible when the MPs were saturated with tobramycin. Considering both specific and nonspecific signals, 40 mM of tobramycin was found to be the optimum antibiotic concentration for the MPs modification and was used in further experiments.

It is worth noting that the preparation of the sensing phase was much simpler and rapid using MPs as a solid support than in the case of polycrystalline Au electrode modification through SAMs [20]. The total modification time was reduced from two days to 3 hours.

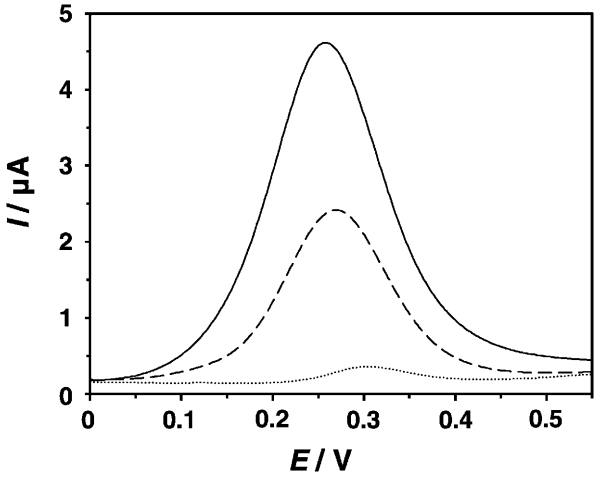

Fig. 3. DPV measurements recorded after an enzymatic reaction time of 10 min using: solid line: 0.5 µM BATA with no tobramycin (blank experiment); dashed line: 0.5 µM BATA +100 µM tobramycin solution and dotted line: in the absence of either BATA and tobramycin (nonspecific signal).

3.2 Inhibition Assay Development

The effect of the length of the enzymatic reaction was studied incubating the $Strep_2$-ALP conjugated TMPs with the substrate from 5 to 30 min. The analytical signals obtained with 0.5 µM BATA in the absence of analyte (blank) and in the presence of 100 µM of tobramycin were evaluated at each incubation time. The nonspecific signal was also checked (aqueous solution without analyte and aptamer). When the enzymatic time increased, the analytical signal measured also increased for both blank and sample solutions. However, this enhancement was not linear and less pronounced in the case of sample measurements. This way, after 30 min of enzymatic reaction the increase of the blank and 100 µM tobramycin solution current was 65% and 70%, respectively. Since a maximum difference between both signals was desirable, the optimum incubation time was found to be 10 min. At this time a decrease of 57% from the maximum current intensity (blank) was obtained for a tobramycin concentration of 100 µM. The corresponding DPV signals are depicted in figure 3. The nonspecific signal (Figure 3, dotted line) was found to be very low.

Selection of the optimum value of BATA is of paramount importance for a proper development of an inhibition assay. It is accepted that the limited reagent in reagent-limited assays (BATA in this particular case) corresponds to the reagent concentration providing about half of the binding sites occupied (50% of the maximum signal) [22]. For this purpose, several experiments were carried out entailing the incubation of different BATA concentration solutions (0.05–5 µM) with a constant amount of TMPs. The results are depicted in figure 4 and expressed as a percentage of the maximum current intensity measured. As expected, the analytical signal rapidly increased when increasing the concentration of BATA up to 0.5 µM. At higher concentrations the increase was less pronounced. A nonlinear data fitting allowed the estimation of the optimum BATA concentration, 0.1 µM, corresponding to the concentration that led to 50% of the maximum signal.

Once the experimental conditions were optimized, the inhibition assay was performed as explained above, testing tobramycin solutions ranging from 1 µM to 500 µM and employing the previously optimized BATA concentration of 0.1 µM. From Figure 5 it is apparent that the analytical signal (S % expressed as percentage of the maximum signal corresponding to the blank) decreased with a linear pattern with the tobramycin concentration because of the smaller amount of BATA available for interaction with TMPs. The calibration plot, $S\ \% = (-0.111 \pm 0.004)$ [tobramycin (µM)] $+ (84 \pm 1)$, covered a linear range from 5 µM to 500 µM of tobramycin. The proposed assay allowed the detection of 5 µM of tobramycin in aqueous solution. The reproducibility was found to be 5.7% ($n = 4$) for a tobramycin concentration of 300 µM.

It is worth noting that the analytical signal varied linearly with the concentration of the analyte instead of the logarithm of the concentration as it was found when using FIS measurements [20]. This behavior is probably related to the enzymatic amplification introduced in this inhibition assay.

The nonspecific adsorption to the sensing phase was evaluated by carrying out an incubation of the TMPs without any aptamer or sample (only buffer) and further labeling with the enzymatic conjugate. This contribution was found to be 10% of the maximum signal.

3.3 Selectivity of the Sensing Phase

The selectivity of the assay was also evaluated with respect to two different aminoglycoside antibiotics: kanamycin (which only differs from tobramycin in a single hy-

 © 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

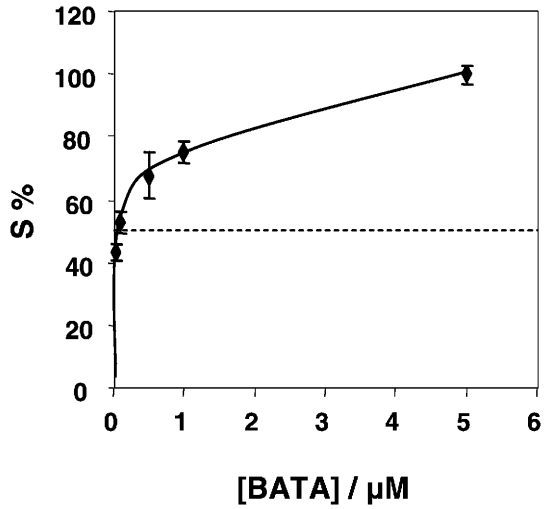

Fig. 4. Variation of the percentage of the maximum current intensity obtained by DPV as a function of the aptamer concentration.

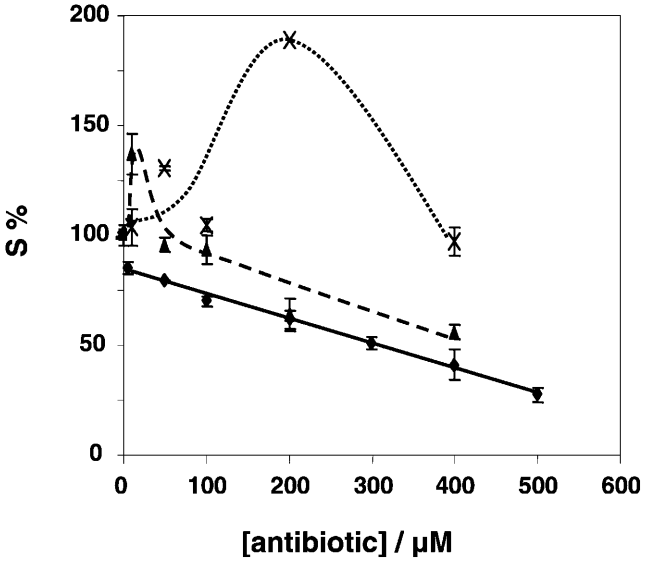

Fig. 5. Dose-response curves obtained for different aminoglycosides antibiotics after carrying out the inhibition assay; solid line: tobramycin; dashed line: kanamycin; and dotted line: streptomycin.

droxyl group) and streptomycin (whose hexose ring is streptidine instead of streptamine). Several concentrations of each antibiotic ranging from 1 to 400 µM were assayed employing the previously optimized BATA concentration of 0.1 µM and the protocol described for the tobramycin measurements. Both dose-response curves are depicted in Figure 5 obtained by plotting the percentage of the maximum signal (corresponding to the blank) vs. the antibiotic concentration. As it is clear from Figure 5, the sensing phase was completely selective to streptomycin according to the dose-response profile shown. The presence of this antibiotic drew to a great enhancement of the percentage of the maximum signal, being the highest value registered 90% higher than the value related to the blank, which corresponds to a streptomycin concentration of 200 µM.

On the other hand, selectivity towards kanamycin was not so distinct. From 5 to 50 µM, it seemed to show a good discrimination between kanamycin and tobramycin. However at concentrations above 50 µM, the dose-response curve showed a decrease associated to the increase in kanamycin concentration similar to that exhibited for tobramycin. It is worth noting that the percentage values of the signals for kanamycin were around 20% higher than those corresponding to tobramycin, but the presence of kanamycin could give rise to false positives when present in high concentrations. This result was surprising taking into account the excellent selectivity exhibited by the previously reported impedimetric aptasensor for tobramycin when tested in kanamycin solutions [20]. The only difference between both assays, in addition to the detection technique, was the use of the biotinylated anti-tobramycin aptamer as a biorecognition element. This result again pointed to an alteration of the affinity of the aptamer after labeling as mentioned above. Thus, the loss in selectivity might be ascribed to a lower affinity of the labeled aptamer for its cognate ligand and an increased affinity for structurally related compounds.

4 Conclusions

An inhibition assay with voltammetric detection for the determination of tobramycin using magnetic microparticles as a solid support was developed. A wide linear range was found with a limit of detection of 5 µM. Although this value was slightly higher than that obtained using FIS measurements, the preparation of the sensing phase was much shorter because of the easy handling of MPs that, additionally, allowed the parallel determination of several samples. A saturated coverage of the MPs with tobramycin as well as an efficient capture of the MPs on the electrode surface using a magnet were critical parameters to achieve a good reproducibility.

Acknowledgements

E.G.F. and N.S.A, thank the *Spanish Government* for a predoctoral grant and a Ramón y Cajal contract, respectively. This work was co-financed by Projects CTQ2008-02429 and FICYT IB08-087 and the European Regional Development Fund.

References

[1] R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 2077.
[2] I. Willner, M. Zayats, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6408.

 © 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

[3] K. Ikebukuro, C. Kiyohara, K. Sode, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2168.
[4] S. Balamurugan, A. Obubuafo, S. A. Soper, D. A. Spivak, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 1009.
[5] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *383*, 83.
[6] M. B. Murphy, S. T. Fuller, P. M. Richardson, S. A. Doyle, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, e110.
[7] X. H. Lou, J. R. Qian, Y. Xiao, L. Viel, A. E. Gerdon, E. T. Lagally, P. Atzberger, T. M. Tarasow, A. J. Heeger, H. T. Soh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 2989.
[8] C. J. Huang, H. I. Lin, S. C. Shiesh, G. B. Lee, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1761.
[9] J. G. Bruno, T. Phillips, M. P. Carrillo, R. Crowell, *J. Fluores.* **2009**, *19*, 427.
[10] R. Joshi, H. Janagama, H. P. Dwivedi, T. M. A. S. Kumar, L. A. Jaykus, J. Schefers, S. Sreevatsan, *Mol. Cell. Probes* **2009**, *23*, 20.
[11] S. Centi, G. Messina, S. Tombelli, I. Palchetti, M. Mascini, *Biosens. Bioelectron.* **2008**.
[12] S. Centi, S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1466.
[13] S. Centi, L. B. Sanmartin, S. Tombelli, I. Palchetti, M. Mascini, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 1309.
[14] J. Zheng, G. F. Cheng, P. G. He, Y. Z. Fang, *Talanta* **2010**, *80*, 1868.
[15] Z. Zhang, W. Yang, J. Wang, Cheng Yang, F. Yang, X. Yang, *Talanta* **2009**, *78*, 1240.
[16] N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, *TRAC* **2008**, *27*, 437.
[17] Y. Wang, R. R. Rando, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 281.
[18] L. C. Jiang, A. K. Suri, R. Fiala, D. J. Patel, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 35.
[19] C. A. Hammett-Stabler, T. Johns, *Clin. Chem.* **1998**, *44*, 1129.
[20] E. González-Fernández, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 1602.
[21] N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3808.
[22] A. Johannsson, *Principles and Practice of Immunoassay* (Eds: C. P. Price, D. J. Newman), Stockton Press, New York **1991**.

 © 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

FLUORESCEIN-TAGGED APTAMER-BASED ASSAY FOR TOBRAMYCIN DETECTION (en preparación)

APTAMER-BASED INHIBITION ASSAY FOR TOBRAMYCIN DETECTION IN HUMAN SERUM

Eva González-Fernández, 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.

* Corresponding author

Phone: +34 985106235

Fax: +34 985103125

e-mail: mjlc@uniovi.es

1. Introduction

Tobramycin is a broad-spectrum aminoglycoside antibiotic produced by *Streptomyces tenebrarius*. Aminoglycosides exhibit bactericidal activity against some Gram-positive and many Gram-negative organisms. This activity derives from their ability to interfere with bacterial protein synthesis by irreversibly binding to ribosome, thus causing damage to cell membranes and cell death.

Similarly to other aminoglycosides, the use of tobramycin is limited by a narrow therapeutic range (2-12 μg/mL (4.3-25.7 μM) in serum) [1]owing to side adverse effects such as oto- and nephro-toxicity. Therefore, careful monitoring of the drug levels in patients serum is required.

Several methods for tobramycin detection are described in literature[2-6], but they are typically complex, time-consuming and need for a derivatization step due to the lack of useful spectroscopic or electrochemical properties derived from the tobramycin structure. Consequently, efforts are put into the development of rapid, simple and sensitive analytical methods for the determination of tobramycin.

Aptamer-based sensors have established as a promising sensing strategy[7-9] since 2005 when the first assay was published[10]. Aptamers are synthetic RNA or DNA single-stranded oligonucleotide sequences folding into different three-dimensional shapes (hairpin, G-quartet, T-junction, etc) that exhibit high specificity and affinity for a target molecule. Aptamers are obtained by an *in vitro* process called SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)[11,12] that potentially allows the selection of an aptamer against any kind of target molecule, ranging from ions to whole cells or bacteria.

The selection of different aptamers that specifically bind aminoglyciosides antibiotics such as tobramycin[13-15] or neomycin B[16,17] had opened the possibility of development new strategies for the determination of these small molecules. All of them are RNA sequences, thus special care has to be taken due the easy hydrolytic digestion caused by nucleases. To avoid this drawback modifications of the phosphate sugar backbone have been designed. Our group firstly proposed the use of a fully 2´-OMe-modified aptamer for the determination of neomycin B in a complex matrix such as milk in a label-free format[18]. The proposed approach was found to be applicable to other small molecules and a similar assay was developed for tobramycin detection in human serum[19].Two aptamers with different level of modification were proposed as molecular recognition elements and the exhibited analytical characteristics were compared. Further surface plasmon resonance studies were performed in order to assess the affinity changes upon partial or total RNA bases modification[20]. The native RNA aptamer affinity was slightly affected by the proposed modifications which do not preclude the use of both modified aptamers as molecular recognition elements for tobramycin detection.

A labeling strategy has also been proposed for tobramycin detection employing a biotinylated 2´-OMe anti-tobramycin aptamer as biorecognition element for tobramycin detection using magnetic microparticles as solid support and voltammetric detection.[21]. Although a rapid inhibition assay was developed which exhibited a wide linear range, the limit of detection of 5 µM found in aqueous solution precluded its application for tobramycin detection in human serum. This was an unexpected result taking into account that the modified anti-tobramycin aptamer used as biorecognition element was the same employed for the label-free impedimetric assay previously published[19]. In this case the unlabeled anti-tobramycin aptamer allowed tobramycin detection with a limit

of detection of 0.7 µM in aqueous solution. Further studies are needed to understand how the biotin tag affects the aptamer affinity and the performance of the aptamer as recognition element.

Herein, the monovalent labeling system fluorescein isothiocyanate anti-fluorecein isothiocyanate Fab fragment is proposed as an alternative for the widespread labeling system streptavidin-biotin, previously used. SPR experiments were performed for evaluating the affinity of both labeled aptamers with fluorescein or biotin towards its target tobramycin. An inhibition assay employing the monovalent labeling system was performed in aqueous solution and applied to tobramycin determination in human serum. The analytical characteristics observed when employing both labeling systems were compared.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

Electrochemical measurements were performed on disposable screen-printed carbon electrochemical cells (SPCE) (Dropsens, Oviedo, Spain) composed of a 4 mm diameter carbon working electrode, a carbon counter electrode and a Ag pseudo-reference electrode, driven by a computer-controlled μ-AutoLab type II PGstat-12 potentiostat with GPES 4.9 software (EcoChemie, The Netherlands).

The 12-tube mixing wheel (Dynal® MX1) used for sample mixing in vials and the magnet (DynaMag-2) for magnetic separation were purchased from Invitrogen (Barcelona, Spain).

A double-channel cuvette-based SPR instrument equipped with an autosampler (Autolab-ESPRIT, Ecochemie, The Netherlands) was used for all SPR experiments. The instrument was controlled by Data Adquisition Software (ESPRIT version 4.4). Data treatment (overlapping and alignment of sensorgrams, zeroing and baseline corrections) and non-linear fitting of the resulting sensorgrams were done with the software provided with the instrument (ESPRIT kinetic evaluation version 5.2). Other non-linear fitting needed for data processing were carried out using OriginPro 7.5 (Northampton, MA). All SPR experiments were carried out using commercial BK7 disks coated with a 50 nm gold film supplied by Autolab (Metrohm, The Netherlands), and under controlled temperature conditions of 25±1 ºC obtained with a thermostat, Haake D1 (Germany).

2.2. Reagents

Two different labeled 27-mer RNA anti-tobramycin aptamers were used throughout this work. A 5´-biotinylated anti-tobramycin aptamer (BATA) and a 5´-fluorescein isothiocynate- anti-tobramycin aptamer (FITC-ATA). Both sequences were modified at 2´-OH position of its ribose moieties with a methoxy group in all nucleobases except at U12 position. Both of them were synthesized by Sigma-Genosys (France) and purified by HPLC. Their sequences are the following:

5´-biotinylated anti-tobramycin aptamer (BATA): 5´[Biotin][mG] [mG] [mC] [mA] [mC] [mG] [mA] [mG] [mG] [mU] [mU] U [mA] [mG] [mC] [mU] [mA] [mC] [mA] [mC] [mU] [mC] [mG] [mU] [mG] [mC] [mC] 3´

5´-fluorescein isothiocyanate anti-tobramycin aptamer (FITC-ATA): 5´[FITC][mG] [mG] [mC] [mA] [mC] [mG] [mA] [mG] [mG] [mU] [mU] U [mA] [mG] [mC] [mU] [mA] [mC] [mA] [mC] [mU] [mC] [mG] [mU] [mG] [mC] [mC] 3´

Carboxylated magnetic microparticles (MPs) Dynabeads® MyOne™ Carboxylic Acid (1.05 μm in diameter) were from Invitrogen (Barcelona, Spain).

Tobramycin sulfate, streptomycin sulfate, kanamycin sulfate, N-(3-dimethylaminopropyl)-N´-ethyl-carbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), 3,3´,5,5´-tetramethylbenzidine (TMB) liquid substrate system for ELISA and 1-naphthyl phosphate (α-NP) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Anti-fluorescein isothiocyante-alkalyne phosphatase Fab fragment (anti-FITC-ALP-Fab) and anti-fluorescein isotthiocyanate–peroxidase Fab fragment (anti-FITC-HRP-Fab) conjugates were acquired from Roche. 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), ethanolamine, Tween 20®, bovine serum albumin (BSA), salts for buffer solutions (KCl, NaCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$),

phosphate buffered saline (PBS) 10X pH 7.4, casein blocking buffer (1% casein, 1% PBS) pH 7.4 and 1 M Tris/HCl pH 7.4 solution (all RNAse free) were also obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). All other reagents were of analytical grade.

All glassware in direct contact with aptamer was previously cleaned with RNAseZAP^{TM} (Sigma-Aldrich, Spain) and all aqueous solutions were prepared with RNAse free water purified by a Direct-Q system with a BioPack cartridge (Millipore).

The compositions of the buffers used for the experiments are as follows:

Immobilization solution: 0.1 M HEPES pH 8.64. (Buffer A)

Affinity solution: 20 mMTris-HCl pH 7.4, 140 mMNaCl, 5 mMKCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$ (Buffer B)

Conjugate solution: 0.5% casein, PBS 1X, 0.025% Tween 20 (Buffer C)

Detection solution: 0.5 M Tris-HCl pH 9.8, 1 mM $MgCl_2$. (Buffer D)

Regeneration solution: 0.05 M HCl

Amicon-ultra 4 mL-10000 Da filters (Millipore) were used for ultracentrifuging the human serum samples.

2.3. Experimental procedures

2.3.1. Protocol for tobramycin immobilization onto gold-coated sensors for SPR measurements

Initially the bare gold-coated glass sensor was cleaned by immersion in piranha solution (3 H_2SO_4 (95%):1 H_2O_2 (33%)) (CAUTION piranha solution is strongly oxidizing and should be handled with care!) for 10 min, thoroughly rinsed with water

and ethanol, and dried with a stream of N_2. Then the sensor was positioned onto the clean hemi-cylinder lens previously coated with a drop of immersion oil (Autolab, Methrom, The Netherlands) which possesses a constant refractive index ($n_D^{25^oC}$=1.518±0.002). Afterwards, water was injected in both channels and the surface was equilibrated until a constant response was obtained.

The sensing phase preparation entails the covalent immobilization of tobramycin onto a self-assembled monolayer of 3-mercaptopropionic acid (MPA) on gold, following a protocol similar to that previously described [22]. Briefly, the SAM was formed overnight after manually injection of 40 mM MPA prepared in an ethanol:water solution (75:25). After washing with ethanol and water, the sensor surface was equilibrated with water and the covalent attachment of tobramycin (channel 1) and ethanolamine (channel 2, reference) was carried out. The ESPRIT autosampler and sequencer allowed the simultaneous modification of both channels. The procedure consisted in a three-step sequence: (1) Surface activation: three consecutive injections of a mixture of 0.2 mM EDC and 0.05 mM NHS in water for 10 min each one, followed by a brief washing step with water. (2) Binding step: three consecutive injections of 10 mM tobramycin (channel 1) and 1 M ethanolamine (channel 2) prepared in immobilization solution for 20 min each one, followed by a brief washing step with water. (3) Blocking step: one injection of 1 M ethanolamine prepared in immobilization solution in both channels for 30 min.

Finally the modified surface was equilibrated with affinity solution

2.3.2. SPR measurements

All binding experiments were carried out in affinity buffer, the same used in the anti-tobramycin SELEX selection [13]. Due to the cuvette-based design of the ESPRIT

instrument, constant stirring conditions are required for controlling hydrodynamic properties of the system. The whole data collection process is automated and consisted in recording successive cycles of measurement. Each independent analysis cycle 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 affinity buffer (35 µL) were simultaneously injected in both channels by means of the ESPRIT autosampler and the association phase was recorded for 10 min. After draining the cuvettes, 50 µL of affinity buffer was injected and the dissociation phase was monitored for 5 min resulting in the decrease of the signal 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.

2.3.3. Modification of carboxylated MPs with tobramycin

For the preparation of the sensing phase, tobramycin was covalently immobilized through the amino groups to the surface of the carboxylated MPs using the carbodiimide chemistry employing a protocol previously described by our group[21].

For this purpose, a suspension of 50 µL of the MPs stock solution (10 mg/mL) was washed twice with 500 µL of 0.01 % Tween 20 aqueous solution for 2 min. During each washing or incubation step the vials were positioned in the mixing wheel to allow a proper contact between the solution and the MPs. After incubation, the vials were placed in a magnet holder where MPs were trapped to the vial wall making the removal of the supernatant easy. MPs were re-suspended in 500 µL of a mixture of 0.2 M EDC and 0.05 M NHS for 30 min to activate the functional groups available on the MPs

surface. After two washing steps with 500 μL of buffer A containing 0.01 % Tween 20, the MPs were re-suspended in a 40 mM tobramycin solution prepared in buffer A for 1 h. Once the antibiotic was covalently attached to the surface of the MPs, and after washing twice with 500 μL of buffer A containing 0.01 % Tween 20, a 1 h incubation was carried out in 500 μL of a 1 M ethanolamine solution prepared in buffer A. The latter step allowed the inactivation of the remaining carboxylic groups that had not reacted with tobramycin. Finally, two washing steps were carried out with 500 μL of buffer C and the tobramycin-modified MPs (TMPs) were re-suspended in 500 μL of buffer B (final TMPs concentration, 1 mg/mL). This suspension must be stored at 4 ºC and used within the following 24 h to guarantee the proper condition of the immobilized tobramycin.

2.3.4. Inhibition assay protocol

The TMPs were used for developing an aptamer-based inhibition assay for tobramycin detection in aqueous solution.

With this aim, several 10 μL aliquots of the TMPs stock solution were washed twice adding 1 mL of buffer B containing 0.01 % Tween 20 for 2 min each. After discarding the supernatant, the TMPs were re-suspended in 1 mL of a solution containing a constant concentration of FITC-ATA and different concentrations of tobramycin ranging from 0 to 1000 μM prepared in buffer B containing 0.1 % BSA and incubated for 15 min. Then, two washing steps were carried out employing 1 mL of buffer C for 2 min each. After that, the MPs were re-suspended in 1 mL ofanti-FITC-ALP-Fabconjugate diluted 1:500 from the stock in buffer C (or in 1 mL of anti-FITC-HRP-Fab diluted 1:300 from the stock with buffer C). After 30 min of incubation time,

the MPs were washed twice with 1 mL of buffer D containing 0.01% Tween 20 and finally re-suspended in 100 μL of buffer D (final MPs concentration, 0.1 mg/mL).

Once the enzymatic conjugate was attached to the MPs, both the enzymatic reaction and the electrochemical measurements were carried out on SPCEs. For this purpose 15 μL of the modified MPs were deposited and trapped onto the working electrode by means of a magnet placed under it. Subsequently, the electrochemical cell was fully covered adding 25 μL of the enzymatic substrate (α-NP) prepared in buffer D to a final concentration of 4 mM. After 10 min of enzymatic reaction, the product, α-naphthol (α-N) is detected by differential pulse voltammetry (DPV) measurements from 0 V to 0.55 V with the following parameters: modulation amplitude 0.05 V; step potential 0.0015 V; interval time: 0.15 s; modulation time 0.05 s.

For the electrochemical detection employing the anti-FITC-HRP-Fab conjugatealso 15 μL of the modified MPs were deposited onto the working electrode . Subsequently, the electrochemical cell was fully covered adding 25 μL on the TMB liquid substrate. After 1 min of enzymatic reaction, the product, the oxidized TMB (TMB_{ox}) was detected by chronoamperometry measurements applying a voltage of 0 V for 60 s. The analytical signal was the mean current measured for the last 10 s of the chronoamperometry.

2.3.5. Real sample assays.

For the measurement of tobramycin in real biological samples as human serum employing the above explained inhibition assay, the following protocol was used.

The human serum samples spiked with the analyte tobramycin were diluted in a certain degree: 1:1.5; 1:2; 1:5 and 1:10. The dilution agent was the affinity solution after a salt concentration correction, in such a way that after each dilution the final salt

concentration equals the one of the affinity solution. The diluted human serum sample was continuously mixed at room temperature for 30 min in order to allow a good contact between the human serum and the added aqueous solution. Then, the diluted samples were ultracentrifugated employing a 10 KDa filter for 45 min at 1000 rpm and 4 ºC. The filtered solution was employed for performing the inhibition assay as previously detailed.

3. Results and discussion

An inhibition assay for tobramycin detection employing magnetic microparticles (MPs) as solid support has been designed and employed for tobramycin detection in serum by adapting a previously reported assay[21]. Herein the fluorescein isothiocianate (FITC)-anti-fluorescein isothiocianate Fab fragment (anti-FITC-Fab) was selected as labeling system for the enzymatic conjugation instead of the biotin-streptavidin system[21]. The analytical features exhibited by the inhibition assay employing the monovalent labeling system were calculated and compared to those obtained when the multivalent labeling system was employed. Additionally, the affinity of both modified aptamers (FITC-ATA and BATA) employed for the inhibition assay performance with both labeling systems was estimated in terms of the dissociation constant. SPR experiments were designed for calculating these constants.

3.1. SPR measurements and dissociation constants calculation.

When designing a new strategy for the detection of a relevant analyte which needs for a labeled molecular recognition element it is of great importance the knowledge of how this tag affects its affinity for the given analyte. Herein, the rate and

equilibrium constants of BATA are evaluated and compared with the corresponding non-labeled anti-tobramycin aptamer[20].

In order to characterize the affinity of the labeled aptamer towards its target molecule, tobramycin, SPR was selected as a suited technique. SPR experiments allowed real-time monitoring of the affinity events under study and both kinetic and equilibrium information are obtained.

The first step when designing SPR experiments is the construction of a proper sensing phase. In this case a previously described protocol for obtaining a suitable sensing phase was followed[20] which entailed the covalent immobilization of tobramycin onto a gold surface (channel 1). The key point of this protocol was to immobilize low amounts of tobramycin. This way, Mass Transport Limitation (MTL) effects were minimized and first-order kinetics could be considered when interpreting the obtained data. Ethanolamine was immobilized onto channel 2 which worked as a reference, where no tobramycin was present.

The interaction of the immobilized tobramycin and different concentrations of both aptamers in the range of 0.05-3 μM were monitored and subsequently processed for obtaining both kinetic and equilibrium information. When the aptamer was injected to the surface a progressive increment in the angle shift, R(m°) was observed only for channel 1 whereas a constant value of angle shift was recorded for the reference channel. The signal was recorded until a constant value was registered which corresponded to the equilibrium. After that the aptamer solution was washed and affinity solution containing no aptamer was injected causing a diminution in the angle shift registered, but the signal did not return to the initial level indicating that the aptamer specifically bound to the immobilized tobramycin. Finally, regeneration of the

surface under mild acidic conditions removed the entire surface complex without affecting the SAM stability significantly, and a new cycle can be performed. This step typically required 1-3 acidic additions to completely remove the bound aptamer. Nevertheless, when evaluating BATA affinity a partially regeneration was observed after the first BATA concentration was injected and an increment of 20-40 m° was registered when comparing the final signal with the baseline Nevertheless good regenerations were observed if successive BATA concentrations were tested after this first incompletely regeneration. This suggested that the biotin tag included in the BATA aptamer under study, which exhibit a sulfur atom in its structure, acted as a backfiller of the pinholes present in the SAM formed onto the gold surface. With the aim of avoiding this effect several injections of 500 µM of biotin were performed until a constant signal was registered before the first BATA concentration was tested. Fulfilling the SAM pinholes with biotin supposed a signal increment of 5-10 m°. This signal change is lower than the one registered when the BATA aptamer played this backfilling role due to its lower molecular weight. After this additional step the SPR experiments for the affinity evaluation of BATA continued as explained above.

The obtained SPR data were employed for the equilibrium and rate constants calculation. For this purpose a non-linear fitting following a 1:1 stoichoimetry bimolecular interaction of the association phase is required, and it can be simplified as equation 1.

$$R_t = R_0 + E(1 - e^{-k_s t}) \;\; eq.1$$

From this non-linear fitting a value for R_{eq} ($R_{eq}=R_0+E$) and k_s was calculated for each aptamer concentration assayed. These obtained values were used for the estimation of the dissociation constants by both equilibrium (calculated employing both Scatchard

and Langmuir isotherm plots) and kinetic methods. The whole calculating procedure is detailed in a previously published work by our research group[20]. The calculated dissociation constants for are shown in table 1.

To understand how the introduction of a tag in the 5´ extreme of the anti-tobramycin aptamer, ATA, the reported results have to be compared to the dissociation constants corresponding to the unlabeled aptamer, previously published[20]. The affinity of ATA towards tobramycin was found to be slightly higher than 0.1 μM for all three calculating methods employed. Taking this value as a reference it can be stated that the introduction of a biotin in the aptamer sequence confers an extra affinity towards its target molecule, which was an unexpected result.

3.1. Inhibition assay in aqueous solution.

The sensing phase constructed by immobilizing the antibiotic tobramycin onto MPs was employed for developing a calibration curve for tobramycin determination in aqueous solution. With this aim the tobramycin-modified magnetic microparticles (MPs) were exposed to a mixture of a fixed concentration of FITC-ATA and varying concentrations of tobramycin (Figure 1A). This way, the free aptamer will bind to the tobramycin linked to the magnetic particles. Thus, the higher the tobramycin concentration in the sample, the lower the amount of FITC-ATA available for binding to TMPs. Then, the anti-FITC-ALP-Fab conjugate was added (Figure 1B) and finally, both the enzymatic reaction and the voltammetric measurements were carried out on SPCEs (Figure 1C). For this purpose a small magnet was placed under the working electrode in order to assure that the MPs were placed only on the working electrode, which greatly increased the reproducibility of the measurement. The addition of the electrochemically inactive substrate α-NP, covering all three electrodes, allowed the

electrochemical detection of the product enzymatically generated, α-N by DPV at 260 mV. The voltammetric signal constituted a measurement of the amount of anti-FITC-ALP-Fabanchored to the modified MPs and, therefore, it is related to the tobramycin concentration in the sample. With this design a signal-off approach was expected because the decrease of the amount of FITC-ATA available for surface interaction when increasing the tobramycin concentration in the sample necessarily leads to a smaller amount of enzymatic conjugate linked to the MPs and, thus, to a smaller voltammetric current.

Selection of the optimum value of FITC-ATA is a key step for a proper development of an inhibition assay. It is accepted that the limited reagent in reagent-limited assays (FITC-ATA in this particular case) corresponds to the reagent concentration providing about half of the binding sites occupied (50% of the maximun signal)[23]. For this purpose, several experiments were carried out entailing the incubation of different FITC-ATA concentration solutions (0.05-5 μM) with a constant amount of TMPs. The results are depicted in Figure 2A and expressed as a percentage of the maximum current intensity measured. A non-linear data fitting allowed the estimation of the optimum FITC-ATA concentration, 0.3μM, corresponding to the concentration that led to 50 % of the maximum signal.

The inhibition assay was performed as explained above, for different tobramycin concentrations in the range of 0.1-1000 μM prepared in aqueous solution and employing the previously optimized 0.3 μM FITC-ATA as fixed aptamer concentration. Both signals for no tobramycin in the sample (maximum signal) (Figure 3a) and non-specific adsorption of the enzymatic conjugate (Figure 3h) onto the TMPs for no tobramycin nor aptamer in the sample solution (minimum signal) were recorded. The analytical signal for each tobramycin concentration tested is expressed as a percentage of signal

diminution according to the following expression: S% ([tobramycin]i)= $(I_i-I_{tob=0})/(I_{tob=0}-I_{apt=0})$ X100, where I_i is the current recorded when i tobramycin concentrarion is assayed (Figure 3b-g), $I_{tob=0}$ is the current registered when no tobramycin is in the sample (maximum signal) (Figure 3a) and $I_{apt=0}$ is the current registered when no tobramycin nor aptamer is in the sample (minimum signal) (Figure 3h). The signal (S%) registered for each tobramycin concentration diminished exhibiting a linear pattern with the logarithm of the tobramycin concentration, Figure 4. The calibration plot, S(%)=(-19±1)log[tobramycin (μM)] + (71±2), r=0.991covered a linear range from 0.1 μM to 1000 μM of tobramycin in aqueous solution with a limit of detection of 0.1 μM. The reproducibility was calculated as 4.4 % (n=3) for a tobramycin concentration of 5 μM.

The contribution of the non-specific adsorption of the enzymatic conjugate onto the sensing phase, TMPs, was evaluated. Incubations of the TMPs without aptamer or tobramycin (only buffer) were carried out and then labeling with anti-FITC-ALP-Fab was performed. The signal obtained, expressed as a percentage was found to be 4%.

The selectivity of the assay with respect to other aminoglycoside antibiotics was also evaluated. With this purpose two different aminoglycosides were selected: kanamycin (which only differs from tobramycin in a single hydroxyl group) and streptomycin (whose hexose group is a streptidine instead of a streptamine). Several concentrations of both antibiotics in the range of 0.1-1000 μM were tested employing the same protocol used for the tobramycin and explained above. The signal for each concentration assayed was calculated as a percentage as explained for tobramycin and both dose-response curves are depicted in figure 4. From figure 4 it can be concluded that the sensing phase was completely selective towards the aminoglycoside antibiotic streptomycin. The dose-response profile showed that the signal registered for the

different streptomycin concentrations tested remains almost constant in the range of 75-95%.

On the other hand, and in concordance with previously reported data[21], the sensing phase selectivity towards kanamycin was not so clear. As shown in figure 4 for kanamycin concentrations lower than 10 µM no signal change was registered. Nevertheless, if higher concentrations were tested a signal diminution appeared which was more relevant for the highest kanamycin concentrations tested. This way, for a kanamycin concentration of 100 µM the registered signal was 86% which differs from the 29% registered for the same concentration of tobramycin but for higher concentrantions this difference became lower. As an example for a kanamycin concentration of 1000 µM a signal of 30% was obtained while for the same concentration of tobramycin the corresponding signal was 14%.

3.2. Monovalent vs. multivalent labeling system.

Herein an inhibition assay which employs the monovalent labeling system fluorescein isothiocianate-anti-fluorescein isothiocianate Fab fragment (FITC-anti-FITC-ALP-Fab) is proposed as an adequate strategy for tobramycin determination.

In order to assess the importance of the labeling system monovalence when performing an enzymatic reported assay the analytical characteristics exhibited by the proposed assay have to be compared to those exhibited by the previously published inhibition assay for tobramycin detection where BATA was employed as molecular recognition element and $Strp_2$-ALP as the reporting enzyme[21].

The first point to be highlighted when working with these two systems is the difference in the dissociation constants calculated in section 3.1. The SPR experiments performed showed that BATA exhibited higher affinity towards tobramycin when

compared to FITC-ATA. This fact is in concordance with the difference found in the concentration calculated as the optimum value to act as the limited reagent for the proposed inhibition assay. From the binding curve showed in figure 2A this value was found to be 0.3 µM for the FITC-ATA and is higher than the correspondent 0.1 µM found to be the optimum aptamer concentration when BATA was employed as the limited reagent.

Secondly, when comparing the reported analytical characteristics for both inhibition assays it can be stated that the employment of the monovalent labeling system resulted in a better performance for tobramycin determination in aqueous solution. When BATA acted as molecular recognition element and $Strp_2$-ALP as enzymatic conjugate, a limit of detection of 5 µM of tobramycin in aqueous solution was obtained. Employing the monovalent labeling system fluorescein isothiocyanate-anti fluorescein isothiocyanate supposed an improvement of one order of magnitude in terms of limit of detection. It is worth noting that the reporting enzyme was alkaline phosphatase in both cases. This fact can be explained taking into account the tetravalence of the streptavidin. Each molecule of $Strp_2$-ALP can potentially bind eight molecules of BATA, although the real number of BATA bound to one $Strp_2$-ALP is lower because the steric hindrance, whereas each molecule of anti-FITC-ALP-Fab can only bind one molecule of FITC-ATA. The valence number of both labeling systems was the responsible for the different performance of both similar inhibition assays. This way, for the lower tobramycin concentrations tested the amount of labeled-ATA bound to the TMPs is high (signal-off scheme) and the multivalence of the $Strep_2$-ALP made more probable that one enzymatic conjugate bound more than one aptamer molecule, this way the discrimination between two different tobramycin concentrations was precluded. On the other hand, for the monovalent labeling system one aptamer molecule is always bound

to one enzymatic conjugate molecule. This fact conferred to this assay the ability of discrimination between different tobramycin concentrations even in the lower tobramycin concentration range tested. Furthermore, the extent of this multivalence effect is not always the same and conferred irreprodubility to the assay. This fact is in concordance with the better performance in terms of reproducibility of the herein reported assay, 4.4% (n=3) for a tobramycin concentration of 5 μM, when compared to the previously reported assay which reproducibility was found to be 5.7%.

Finally also the non-specific adsorption of the anti-FITC-ALP-Fab conjugate onto the sensing phase (4%) was found to be lower than the 10% obtained for the $Strep_2$-ALP conjugate.

3.3. Inhibition assay employing an HRP enzymatic conjugate.

An inhibition assay for tobramycin detection in aqueous solution has been developed and characterized. In order to obtain successful results when applied to tobramycin detection in real complex samples the best analytical characteristiscs are always required. As an attempt of improving the performance of the described assay several experiments were carried out employing the horesadish peroxidase (HRP) as a reporting enzyme of the molecular recognition event. For this purpose anti-FITC-HRP-Fab was selected as enzymatic conjugate which is analogue to the anti-FITC-ALP-Fab employed in this work, with the only difference of the core enzyme.

To understand how the employment of a HRP-based enzymatic conjugate affects to the previously obtained, the first experiment carried out was the acquisition of the binding curve for the FITC-ATA to the sensing phase, TMPs. For this purpose a constant amount of TMPs was incubated with different FITC-ATA concentrations in the

range of 0.05-5 µM. The signal for each aptamer concentration expressed as a percentage of the maximum signal is depicted in figure 2B. A non-linear fitting to the obtained data allowed the estimation of the amount of aptamer which gives the 50% of the maximum signal, being this value 0.1 µM of FITC-ATA. This value was surprisingly slightly lower than the previously obtained for the same system but employing as enzymatic conjugate the anti-FITC-ALP-Fab, which corresponded to 0.3 µM of FITC-ATA. The figure 2 shows that for a given FITC-ATA concentration tested, the signal registered, expressed as a percentage of the maximum signal, employing the anti-FITC-HRP-Fab is higher than the signal registered employing the anti-FITC-ALP-Fab. For example, for a FITC-ATA concentration of 0.5 µM a signal of 60% was registered if anti-FITC-ALP-Fab is used (figure 2A) while the signal registered when anti-FITC-HRP-Fab was 87% (figure 2B). Accordingly to these results it can be concluded that the affinity of the FITC-ATA is different depending on the enzymatic conjugate employed for the detection step, which was a totally unexpected conclusion. Both sensing phase (TMPs) and molecular recognition element (FITC-ATA) were the same for both experiments, thus the aptamer affinity must be independent from the selected detection step.

Given this anomalous evidence further investigations were carried out in order to clarify its nature. For this purpose a kinetic study was designed for evaluating the activity of the HRP enzyme in presence and absence of tobramycin in solution.

Three aliquotas of anti-FITC-HRP-Fab in solution were prepared containing the same amount of the enzyme. One of them was kept with only enzyme, but two different amounts of tobramycin were added to the other two (500 and 5000 µM, respectively). After adding the enzymatic substrate solution (TMB+H_2O_2) the absorbance (measured at λ= 653 nm) of the enzymatically generated product (TMB_{ox}) was registered each 1.6

seconds for a time period of 36 seconds. By plotting the measured absorbance versus time a linear fitting for each data set was obtained (data not shown). The slope of each linear plot indicates the rate of the enzyme conversion resulting different for each experience. The lower slope and thus, the slowest conversion rate was observed for the data set where no tobramycin was added. The intermediate slope was related to the data set where 500 µM of tobramycin was added and finally the highest slope and hence the fastest conversion rate was observed for the data set where 5000 µM of tobramycin was added. Summarizing, the rate of the enzymatic reaction depends on the amount of tobramycin present in solution, in such a way that the higher amount of tobramycin, the higher enzymatic rate measured. From these results it can be concluded that the presence of tobramycin "activates" the HRP enzyme resulting in a higher rate of enzymatic conversion of the substrate. This fact explains the anomalous data obtained when obtaining the binding

3.4. Inhibition assay in human serum.

The ability of the proposed inhibition assay to detect tobramycin in a complex biological matrix such as human serum was evaluated.

Firstly, the interaction of human serum with the sensing phase was evaluated .The chemical composition of human serum is quite complex, including proteins (except coagulation proteins that are removed during coagulation process), ions, nutrients and other substances that can interact with the sensing phase altering the performance of the assay when compared to its performance in aqueous solution. A deep knowledge of these potential interactions allows the proper interpretation of the data obtained. For this purpose both non-specific adsorption (incubation with no aptamer or tobramycin, only

human serum) and the maximum signal (incubation with 0.3 μM of FITC-ATA prepared in human serum) of the inhibition assay were evaluated employing undiluted human serum (Table 2). The same experimental protocol described for the inhibition assay development in aqueous solution was employed. The non-specific adsorption of the enzymatic conjugate onto the sensing phase suffered a great enhancement when compared to the non-specific adsorption registered when aqueous solution was employed. The proteins from the human serum interact non-specifically with the sensing phase which induces the non-specific adsorption of the enzymatic conjugate which is responsible for the high signal registered when no tobramycin and no aptamer are present in solution. As a first attempt for diminishing this non-specific adsorption of the human serum proteins several dilutions were performed to the whole human serum and both non-specific adsorption contribution and maximum signal were obtained. In all cases the dilution was performed taking into account the salt concentration correction in such a way that the final salt concentration after the dilution was always the same as the affinity solution. As it is clear from table 2 the non- specific adsorption of the enzymatic conjugated depends on the human serum dilution degree. This way, the higher the dilution, the lower the non-specific adsorption of the enzymatic conjugate. However the highest dilution assayed is related to a 67% of non-specific adsorption, which still precludes the inhibition assay performance.

As a second attempt to diminishing the non-specific adsorption of the enzymatic conjugate induced by the human serum proteins further optimization of the experimental protocol was carried out. Both the incubation time with the sample solution and the incubation time with the enzymatic conjugate were re-optimized in order to minimize the non-specific adsorption being the new optimized values 5 and 10 min respectively. After this optimization step, the non-specific adsorption of the

enzymatic conjugate was reduced to the 37% of the maximum signal, but not proper calibration curve was obtained employing this new protocol.

From the previous data it has been proved the impossibility of the inhibition assay performance in whole or diluted human serum due to the non-specific adsorption of the enzymatic conjugate induced by the proteins present in human serum. Thus it was decided to remove the proteins from the human serum employing a 10 KDa ultracentrifuge filter. The low molecular weight of tobramycin allows it to not be retained by the filter. Thus, three aliquotas of human serum were filtered: two of them contained no tobramycin and were used for evaluating the non-specific adsorption of the enzymatic conjugate and the maximum signal (solution containing 0.3 µM of FITC-ATA) and the other one contained 5 µM of tobramycin and was used for evaluating the percentage of tobramycin recovery. After filtration the proteins were collected in the filter and the protein-free solution, which has a transparent appearance, was employed for carrying out the inhibition assay. The filtered solution was diluted in a 1:3 degree employing the affinity solution and taking into account the correction of the salt concentration. After the assay performance the non-specific adsorption of the enzymatic conjugate was reduced to the 12%. Nevertheless, despite the great improvement achieved by the human serum filtration in terms of non-specific adsorption a recovery of only 5% was obtained for the 5 µM tobramycin solution assayed which is insufficient for a proper assay performance. This low recovery could be associated to the tobramycin binding to the proteins present in the human serum. This way, if tobramycin is bound to the serum proteins it is also removed from human serum after the filtration and this fact would explain the low recovery registered in the previous experiment. In order to avoid this problem a dilution of the human serum previous to the filtration was performed. This way the tobramycin bound to the human

serum proteins was displaced to the aqueous solution and thus able to go through the filter and be present in the filtered solution. Several dilutions were tested (1:1.5, 1:2; 1:5 and 1:10) in order to understand the way this previous dilution affects the analytical characteristics. This dilution was performed employing the affinity solution as a diluting solution and correcting the salt concentration in such a way that the final salt concentrations are always equal to the affinity solution. After adding the correspondent solution a 30 min incubation under stirring conditions at room temperature was performed to allow the human serum samples containing different tobramycin concentrations (in the range of 0-1000 μM) be in contact to the aqueous solution. Then, the filtration was carried out and the collected solution was employed to performing the inhibition assay. The signal expressed as a percentage was plotted versus the logarithm of the tobramycin concentration assayed and the obtained results for each dilution degree are summarized on table 3.

For the lowest dilution tested, 1:1.5, the signal registered for all tobramycin concentrations assayed were the same and indistinguishable from the maximum signal (which corresponded when no tobramycin was present in solution). The dilution degree was not enough to displace the bound tobramycin from the human serum proteins to the aqueous solution and a great part of the tobramycin was not able to go through the filter. This way, for higher dilution degrees the amount of tobramycin bound to the serum proteins was expected to be lower. In effect as it is clear from the obtained results (Table 3) the higher the dilution the lower the limit of detection registered. The highest dilution, 1:10, was selected as the proper dilution for the detection of tobramycin in human serum because for this dilution the observed limit of detection was 1 μM in human serum and the linear analytical range was found to be 1-200 μM which covers the entire physiological range of tobramycin.

4. Conclusions

The affinity of two labeled anti-tobramycin aptamers with biotin and fluorescein isothiocyanate was evaluated. It was also compared to the affinity exhibited by the non-labeled aptamer.

An inhibition assay with voltammetric detection using the monovalent labeling system fluorecein antifluorescein isothiocyanate for tobramycin detection in human serum was developed. A wide linear range was found with a limit of detection of 1 µM in human serum which totally covers the physiological range. These analytical characteristics clearly improved the obtained when the similar inhibition assay was performed bur using the multivalent labeling system biotin-streptavidin.

5. Acknowledgments

E.G.F. and N.S.A, thank to Spanish Government for a predoctoral grant and a Ramón y Cajal contract respectively. This work was financed by Project CTQ2008-02429 and the European Regional Development Fund.

REFERENCES

(1) Hammett-Stabler, C. A.; Johns, T. *Clin. Chem.* **1998**, *44*, 1129-1140.

(2) He, S.; Chen, Q.; Sun, Y.; Zhu, Y.; Luo, L.; Li, J.; Cao, Y. *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 901-907.

(3) Mashata, M.; Chrystyn, H.; Clark, B. J.; Assi, K. H. *J. Chromatogr. B* **2008**, *869*, 59-66.

(4) Law, W. S.; Kubán, P.; Yuan, L. L.; Zhao, J. H.; Li, S. F. Y.; Hauser, P. C. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 1932-1938.

(5) Ghinami, C.; Giuliani, V.; Menarini, A.; Abballe, F.; Travaini, S.; Ladisa, T. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1139*, 53-56.

(6) Stead, D. A. *J. Chromatogr. B* **2000**, *747*, 69-93.

(7) Miranda-Castro, R.; de-los-Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tuñón-Blanco, P. *Electroanalysis* **2009**, *21*, 2077-2090.

(8) Mascini, M.; Palchetti, I.; Tombelli, S. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 1316-1332.

(9) Mairal, T.; Ozalp, V. C.; Sanchez, P. L.; Mir, M.; Katakis, I.; O'Sullivan, C. K. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 989-1007.

(10) Ikebukuro, K.; Kiyohara, C.; Sode, K. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2168-2172.

(11) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, *346*, 818-822.

(12) Tuerk, C.; Gold, L. *Science* **1990**, *249*, 505-510.

(13) Wang, Y.; Rando, R. R. *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 281-290.

(14) Morse, D. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *359*, 94-101.

(15) Goertz, P. W.; Cox, J. C.; Ellington, A. D. *Journal of the Association for Laboratory Automation* **2004**, *9*, 150-154.

(16) Wallis, M. G.; Ashen, U. v.; Schroeder, R.; FamuIok, M. *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 543-552.

(17) Cowan, J. A.; Ohyama, T.; Wang, D. Q.; Natarajan, K. *Nucleic Acids Research* **2000**, *28*, 2935-2942.

(18) de-los-Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tuñón-Blanco, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3808-3809.

(19) González-Fernández, E.; de-los-Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tuñón-Blanco, P. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 2354-2360.

(20) González-Fernández, E.; de-los-Santos-Álvarez, N.; Miranda-Ordieres, A. J.; Lobo-Castañón, M. J. *Submitted article*.

(21) González-Fernández, E.; de-los-Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tuñón-Blanco, P. *Electroanalysis* **2011**, *23*, 43-49.

(22) de-los-Santos-Alvarez, N.; Lobo-Castanon, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tunon-Blanco, P. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2547-2553.

(23) *Principles and practise of immunoassay*; Johannsson, A., Ed.; Stockton Press: New York, 1991.

Table 1. Dissociation constants for BATA calculated by equilibrium and kinetic analysis.

	EQUILIBRIUM ANALYSIS		KINETIC ANALYSIS		
Aptamer	**K_D[a] (μM)**	**K_D[b] (μM)**	**K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)**	**K_{off} ($^{s-1}$)**	**K_D(μM)**
BATA	0.08±0.03	0.08±0.03	(41±5)x10^4	0.0161±0.0003	0.040±0.005

[a] Scatchard plot [b]Langmuir binding isotherm

Table 2. Non-specific adsorption of the enzymatic conjugate anti-FITC-ALP Fab fragment onto the sensing phase TMPs for the different dilution degrees of the human serum tested.

Dilution degree of the human serum	**Non-specific adsorption of anti-FITC-ALP-Fab onto TMPs**
100% human serum	88%
1:1.5	84%
1:2	76%
1:3	64%
Aqueous solution (no human serum)	4%

Table 3. Analytical characteristics for the inhibition assay performed employing different dilution degrees of the human serum.

Dilution degree of the human serum	**LD diluted solution (µM)**	**LD human serum (µM)**	**Calibration curve**
1:1.5	--	--	--
1:2	100	200	--
1:5	4	20	S%=(-16±2)log[tobramycin] (µM)+(83±3); r=0.996
1:10	0.1	1	S%=(-24±3)log[tobramycin] (µM)+(64±3); r=0.994

FIGURES

FIGURE 1

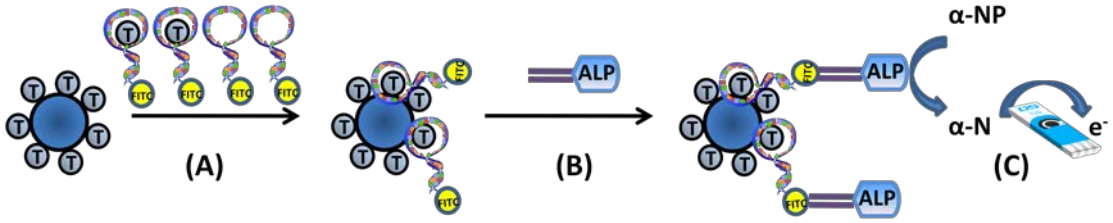

Figure 1. Scheme of the proposed inhibition assay. (A) Incubation of TMPs with a fixed concentration of FITC-ATA and varying concentrations of tobramycin, (B) anti-FITC-ALP-Fab labeling, (C) Enzymatic reaction and electrochemical measurement on SPCEs.

FIGURE 2

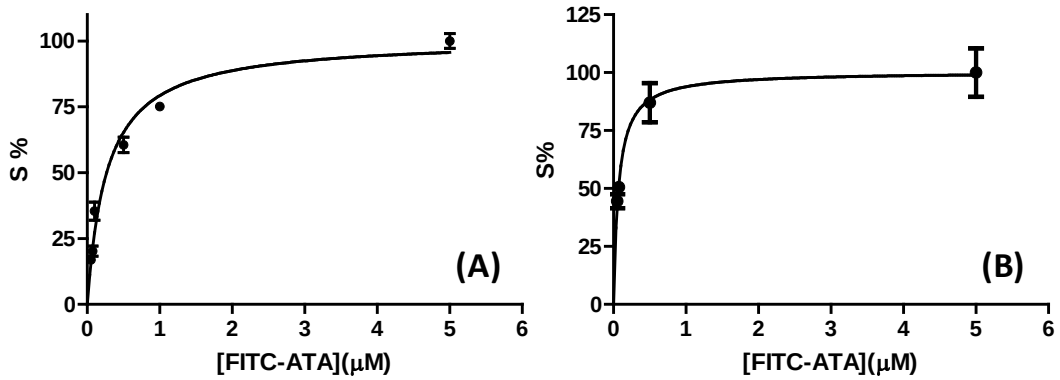

Figure 2. Binding curve for FITC-ATA registered employing (A)anti-FITC-ALP-Fab or (B)anti-FITC-HRP-Fab as enzymatic conjugate. The signal is expressed as percentage of the maximum signal registered.

FIGURE 3

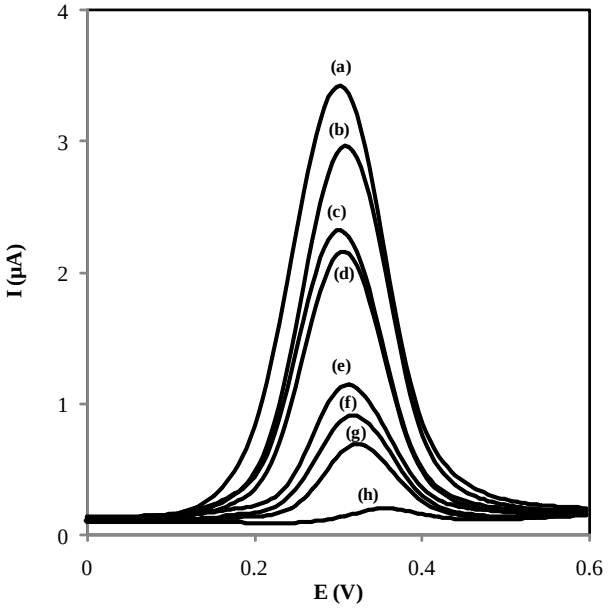

Figure 3. DPV measurements recorded after an enzymatic reaction time of 10 min using: (a) 0.1 µM FITC-ATA with no tobramycin (blank experiment); (b-g) 0.1 µM FITC-ATA +0.1-1000 µM tobramycin solution and (h) in the absence of either FITC-ATA and tobramycin (non-specific signal).

FIGURE 4

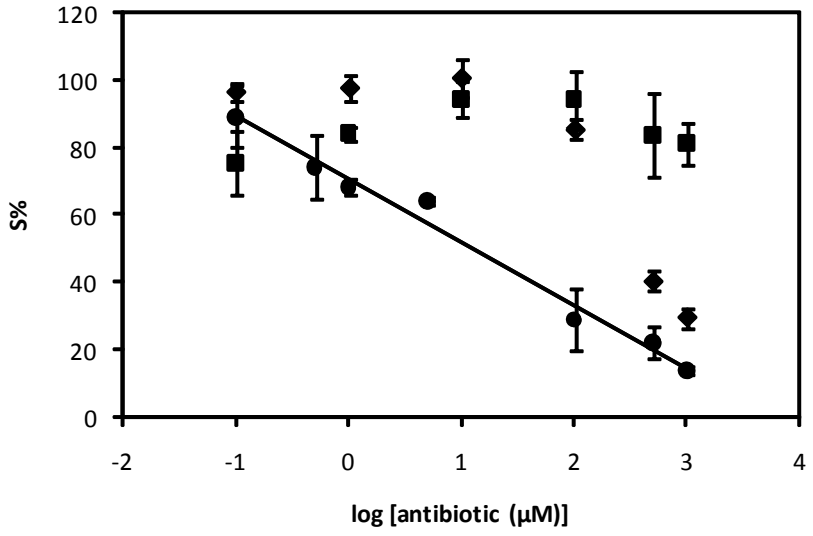

Figure 4. Dose-response curves obtained for different aminoglycosides antibiotics after carrying out the inhibition assay; solid line: tobramycin; dashed line: kanamycin; and dotted line: streptomycin.