



Universidad de Oviedo

## **MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

### **Trabajo Fin de Máster**

**“Aptaensayo con detección espectrofotométrica para  
cuantificación de gluten”**

**Miguel Aller Pellitero**

**Julio 2014, Oviedo**



**Noemí de los Santos Álvarez**, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

**CERTIFICA:**

Que el presente Trabajo, titulado “Aptaensayo con detección espectrofotométrica para cuantificación de gluten”

ha sido realizado por el licenciado Miguel Aller Pellitero, en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo bajo su dirección, constituyendo el Trabajo de Fin de Máster del interesado en el curso académico 2013-14, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 25 de junio de 2014

Fdo: Noemí de los Santos Álvarez

# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>2</b>
1.1. Enfermedad celíaca y gluten . . . . .	3
1.2. Métodos de análisis de gluten . . . . .	5
1.3. Aptámeros . . . . .	9
1.3.1. SELEX . . . . .	10
1.4. Partículas Magnéticas . . . . .	12
<b>2. Objetivos</b>	<b>14</b>
<b>3. Experimental</b>	<b>16</b>
3.1. Materiales y Reactivos . . . . .	17
3.2. Instrumentación . . . . .	17
3.3. Procedimiento experimental . . . . .	19
3.3.1. Modificación de partículas . . . . .	19
3.3.2. Curva de enlace . . . . .	20
3.3.3. Ensayo competitivo . . . . .	21
<b>4. Resultados y discusión</b>	<b>22</b>
4.1. Selección de la concentración de aptámero . . . . .	23
4.1.1. Optimización de la modificación de las partículas magnéticas . . . . .	26
4.2. Ensayo competitivo . . . . .	31
<b>5. Conclusiones</b>	<b>35</b>
<b>Referencias</b>	<b>37</b>
<b>Anexo de tablas</b>	<b>41</b>

# 1. Introducción

## 1.1. Enfermedad celíaca y gluten

La enfermedad celíaca es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por un daño producido en las microvellosidades del intestino delgado como consecuencia de la ingesta de gluten. Al dañarse estas vellosidades los nutrientes no se absorben bien en el intestino delgado, por lo que los celíacos presentan síntomas asociados a una malnutrición.

Esta enfermedad empezó a ser conocida a finales del siglo XIX, aunque no sería hasta mediados del siglo XX cuando se empezaron a conocer las causas que la originaban. Se calcula que la intolerancia al gluten afecta a 1 de cada 100 personas en todo el mundo, aunque solo un 20 % de ellas son diagnosticadas. La enfermedad suele manifestarse en la infancia con síntomas como dolor abdominal, diarrea, pérdida de peso o fatiga. Sin embargo, hay muchos pacientes que no manifiestan estos síntomas, y quedan sin diagnosticar hasta la edad adulta, cuando empiezan a manifestar síntomas derivados del no diagnóstico de la enfermedad como deficiencia de hierro, intolerancia a la lactosa, carencia de vitaminas o problemas óseos, siendo la osteopenia el más importante. La celiacía tiene un componente genético importante ya que las personas con un familiar directo afectado tienen un 10 % más de probabilidades de desarrollar la enfermedad [1].

La enfermedad celíaca es una enfermedad crónica que, por el momento, no tiene cura. Su tratamiento se basa en eliminar por completo el gluten de la dieta para hacer desaparecer los síntomas propios de la intolerancia al gluten y prevenir el desarrollo de futuros problemas derivados de una prolongada exposición al mismo.

El gluten es un conjunto de proteínas que se encuentra presente en cereales como el trigo, el centeno, la cebada o la avena, los cuatro tóxicos para celíacos, y en productos derivados de estos cereales como puede ser la cerveza. Hay mucho debate sobre la toxicidad de la avena ya que muchos pacientes celíacos no presentan intolerancia a este cereal, pero otros sí lo hacen. Además no se sabe si la toxicidad que tiene se debe al propio cereal o si es más bien una cuestión de contaminación cruzada de otros cereales. Cereales como el maíz o el arroz son tolerados por enfermos celíacos, por lo cual sirven como sustitutivos a los cereales tóxicos para enfermos.

Si se entra un poco más en detalle sobre la composición química de los cereales tóxicos se ve que están compuestos en su mayor parte por glúcidos (70 %) y que la parte proteica constituye alrededor del 10 % del total. Dentro de las proteínas que constituyen el grano del cereal se distingue una fracción soluble en agua, alrededor del 15 % del total de las proteínas,

compuesta por proteínas como albúminas o globulinas, y una fracción insoluble, el gluten, que compondría el 85 % restante del total de las proteínas del cereal.

El gluten está formado por proteínas ricas en aminoácidos como la prolina o la glutamina, pero es pobre en aminoácidos iónicos como la lisina, la arginina o la histidina, lo cual explica la alta hidrofobicidad del gluten y su insolubilidad en agua.

Se distinguen dos fracciones de proteínas que componen el gluten en una proporción próxima a 1:1, la fracción de las prolaminas y la fracción de las glutelinas. Según el cereal del que se trate estas fracciones reciben nombres distintos: gliadinas y gluteninas en el caso del trigo, hordeínas y hordeninas para la cebada, secalinas y secalininas para el centeno y aveninas y avenalinas para la avena. Estas fracciones se diferencian por su solubilidad en mezclas EtOH/H<sub>2</sub>O (50 – 70 %). Mientras que las prolaminas son solubles las glutelinas no lo son. Pero las fracciones del gluten pueden subdividirse en grupos más pequeños. Históricamente la fracción de las prolaminas en trigo, gliadinas, se dividía en cuatro tipos atendiendo a su movilidad electroforética a pH ácido obteniéndose así las gliadinas tipo  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$ . Métodos de separación más modernos como son la electroforesis bidimensional o la cromatografía de líquidos en fase inversa permitieron dividir la fracción de las gliadinas en más de 100 componentes distintos los cuales pueden ser agrupados en cuatro grupos dependiendo de sus pesos moleculares, de los aminoácidos presentes o de su secuencia (Figura 1). Las gliadinas de tipo  $\alpha/\beta$  y las de tipo  $\gamma$  son las más abundantes constituyendo alrededor del 60 % del total de las proteínas del gluten [2].

Mientras que las gliadinas son subunidades monoméricas, las gluteninas son subunidades proteicas agregadas que están formando oligómeros y polímeros. Se distinguen por un lado las subunidades de alto peso molecular (HMW por sus siglas en inglés) y las de bajo peso molecular (LMW).

Las gliadinas, salvo las de tipo  $\omega$ , presentan cisteína en su secuencia aminoacídica lo que les permite formar puentes disulfuro intracatenarios. Las gluteninas no solo forman puentes disulfuro intracatenarios, sino que forman puentes intercatenarios, de ahí que se obtengan subunidades de pesos moleculares muy elevados. Estos puentes entre cadenas son muy importantes porque establecen la diferencia de solubilidad en mezclas de H<sub>2</sub>O/EtOH mencionada antes, y además son los responsables de la capacidad de panificación de los cereales con gluten, ya que al someter a altas temperaturas la masa de harina del cereal estos puentes se rompen, y se obtienen cadenas muy largas que confieren la viscosidad y elasticidad característica de las masas de pan.



Para hacer cumplir la legislación vigente y para proteger a todos los enfermos celíacos se hace necesario disponer de métodos de análisis de gluten que permitan cuantificar por debajo de los niveles marcados por la ley. En general, el análisis de gluten puede abordarse mediante tres tipos de técnicas [6]:

- **Métodos inmunoquímicos.** Son los ensayos más extendidos para cuantificar gluten y se pueden encontrar en formato ELISA sandwich o en formato ELISA competitivo. Utilizan anticuerpos desarrollados contra el gluten, en concreto contra las prolaminas, aunque algunos ensayos también usan anticuerpos contra las glutelinas. Estos anticuerpos son principalmente monoclonales, siendo tres de ellos comerciales y cuyo uso está muy extendido: Skerritt, R5 y G12. El primero en desarrollarse fue el Skerritt contra las gliadinas tipo  $\omega$  [7]. Aunque se sigue empleando, su uso se ha ido sustituyendo por otros anticuerpos porque se observó que este anticuerpo no solo se unía a las gliadinas contra las que había sido desarrollado sino que también se unía fuertemente a las glutelinas HMW, lo cual sobrestimaba el contenido en gluten de las muestras. Se introdujo después el anticuerpo R5, desarrollado también contra las prolaminas (hordeínas) [8]. Actualmente este ensayo en su formato sandwich es el recomendado como método de referencia por el Codex Alimentarius para cuantificar gluten presentando un límite de detección en torno a las 3 ppm [9]. El anticuerpo G12 es el más reciente de todos. Ha sido desarrollado contra las gliadinas tipo  $\alpha$ , en concreto contra el péptido 33-mer [10]. Aunque son métodos rápidos y de relativo bajo coste, los ensayos ELISA no permiten distinguir la fuente de la que procede el gluten ya que los anticuerpos que se usan están desarrollados contra secuencias de aminoácidos presentes en el trigo, en el centeno, en la cebada y en algunos casos en la avena.
- **Métodos basados en el uso de ADN.** Secuencias específicas de ADN se pueden utilizar como marcadores de la presencia de gluten en muestras. Se utiliza la *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR) y la PCR a tiempo real para cuantificarlo. El principal problema que aparece al usar ADN para cuantificar gluten es que en alimentos procesados no tiene por qué haber una correlación entre la cantidad de ADN detectado y la cantidad de proteína presente. Las técnicas que usan ADN son más utilizadas bien como técnicas de cribado o bien como técnicas complementarias a las inmunoquímicas.
- **Métodos que usan la espectrometría de masas.** La espectrometría de masas puede usarse para analizar la proteína al completo, pero donde verdaderamente se ve su



potencial es en el análisis de los péptidos producidos por digestión enzimática. Estos péptidos pueden separarse por cromatografía de líquidos y a continuación acoplarse la detección por espectrometría de masas. Lo más habitual para la detección es el uso de Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) o de Electrospray Ionization (ESI) como fuentes de ionización y Time-of-Flight (TOF) o cuadrupolo (Q) como analizador de masas. Además se puede utilizar la detección por espectrometría en tándem (ESI-QqQ) para mejorar la sensibilidad de la detección llegando a obtener límites de detección en torno a las 10 ppb [11]. Sin embargo los equipos para espectrometría de masas tienen un elevado coste y requieren de personal cualificado para su utilización, además las muestras tienen que ser digeridas por enzimas, un proceso que puede llevar varias horas, por lo que los ensayos que usan la espectrometría de masas no son recomendables como ensayos de rutina.

A parte de las limitaciones propias de cada técnica hay que añadir las dificultades que presenta el tratamiento de las muestras.

La extracción de las prolaminas del alimento es complicada. Lo más habitual es realizar una extracción con una disolución H<sub>2</sub>O/EtOH cuyo porcentaje en etanol puede oscilar entre el 40 y el 70 %, pero este método de extracción no es suficiente para muestras que han sido procesadas ya que al someter al alimento a temperaturas elevadas las prolaminas tienden a formar puentes disulfuro entre cadenas formando polímeros, siendo así imposible su extracción en dichas mezclas. Por ello es necesario añadir agentes reductores y desnaturalizantes como el 2-mercaptoetanol y el ditioneol respectivamente [6]. Pero la utilización de estos agentes no resuelve del todo el problema, ya que al usarlos para romper los puentes disulfuro creados también se consigue que se rompan los puentes disulfuro de las glutelinas, por lo que además de extraerse las prolaminas se extraerían las glutelinas, y como se mencionó antes, hay glutelinas que comparten secuencia con las prolaminas, lo cual puede conllevar una sobrestimación del contenido en gluten en la muestra. Según el ensayo utilizado, principalmente Skerritt y R5, esta sobrestimación puede alcanzar el 50 % [3].

Además de las muestras que han sido procesadas térmicamente, las muestras hidrolizadas presentan dificultades a la hora de ser analizadas ya que al haberse fragmentado es posible que la proteína no tenga disponibles los dos epítomos necesarios para la unión de dos anticuerpos en un ensayo en formato sandwich, el cual es en la actualidad el método de referencia para determinar gluten. Para muestras hidrolizadas se hace necesario usar otros formatos de ensayo ELISA como el competitivo o incluso otras técnicas como por ejemplo la espectrometría de

masas.

Una de las mayores complicaciones que ha habido a la hora de desarrollar métodos para cuantificar gluten es la elección de un material de referencia. La selección de este material es complicada porque el gluten contiene muchas proteínas que pueden ser utilizadas como dianas en los métodos de análisis, y estas moléculas no tienen el mismo comportamiento físico-químico. Si además la muestra ha sido procesada, bien térmicamente o bien por hidrólisis, la elección se complica aún más porque las proteínas de la muestra tienen propiedades totalmente distintas a las de los cereales de partida. Existe un material que se utiliza como estándar en los ensayos ELISA, el PWG (Prolamin Working Group). Este material se compone de una mezcla de gliadinas provenientes de 28 cultivos de trigo de Europa. El PWG no alcanza la categoría de material de referencia entre otras razones por la variabilidad genética que existe entre los distintos tipos de trigo no pudiendo ofrecer las garantías necesarias de reproducibilidad exigidas para tal fin, pero es un material de consenso ampliamente utilizado para desarrollar ensayos contra gluten [12].

Otro problema importante se presenta a la hora de convertir las prolaminas cuantificadas en los ensayos ELISA en contenido total en gluten de la muestra [13]. El Codex Alimentarius considera que el contenido de prolaminas en el gluten es del 50 %, por lo que habría que multiplicar por 2 la cantidad de prolaminas cuantificadas para obtener el contenido en gluten. Sin embargo la cantidad de prolaminas no es siempre del 50 %, depende del tipo de cereal, de la zona, de la forma del cultivo, etc.

### 1.3. Aptámeros

Como se ha comentado en la sección anterior, es necesario disponer de métodos más sencillos, rápidos y de bajo coste para el análisis de rutina de gluten en alimentos. En la actualidad los inmunoensayos no permiten alcanzar los niveles de detectabilidad deseables. En nuestro grupo de investigación se ha propuesto como receptor alternativo el uso de aptámeros [14].

Los aptámeros son secuencias de cadena sencilla, artificiales o naturales, de oligonucleótidos de ARN o ADN obtenidos mediante química combinatoria que se pueden utilizar para reconocer selectivamente una molécula diana siguiendo el principio de llave/cerradura propio de las proteínas. El uso de aptámeros como elementos de reconocimiento comenzó en el año 1990 [15], [16]. Desde entonces han ido ganando protagonismo y sus campos de aplicación han ido aumentando. Han adquirido una notable importancia en medicina y farmacología ya que su bajo peso molecular en comparación con el de los anticuerpos les permite penetrar con mayor facilidad en los tejidos y permite que el organismo los elimine de una manera más rápida. Además los aptámeros no tienen apenas inmunogenicidad, no inducen una respuesta del sistema inmunológico, lo que los hace aún más interesantes para su uso en medicina al no presentar efectos secundarios.

Pero los aptámeros también han ido ganando protagonismo en química analítica ya que por su capacidad de enlace a moléculas diana pueden ser usados como herramientas de análisis y de separación. De entre sus múltiples usos puede destacarse su papel como receptores en el desarrollo de sensores, los llamados ‘aptasensores’, los usos que se les puede dar como reactivos de captura en rellenos cromatográficos para realizar separaciones por afinidad o sus posibilidades como matriz de captura en espectrometría de masas MALDI-TOF [17].

La gran capacidad de enlace de los aptámeros a las dianas se debe a la capacidad que tienen estas secuencias de nucleótidos de cadena sencilla para doblarse y adquirir una estructura tridimensional, formada por horquillas, nudos, bucles y otras estructuras en dos y tres dimensiones, que les permite unirse fuertemente a las dianas mediante interacciones hidrofóbicas, electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno o por combinación de todas [18]. La capacidad de enlace entre el aptámero y la molécula diana puede ser comparable o incluso mayor que la de los anticuerpos monoclonales a sus correspondientes antígenos [19].

Las moléculas que pueden ser reconocidas por los aptámeros tienen naturalezas muy distintas: cationes metálicos, moléculas orgánicas pequeñas, nucleótidos y sus derivados, cofac-

tores, aminoácidos, carbohidratos, péptidos, proteínas e incluso estructuras complejas como células y microorganismos. Hay que destacar también que la unión aptámero-diana es tan específica que permite diferenciar entre moléculas quirales o moléculas con gran similitud estructural [20].

### 1.3.1. SELEX

Lo que hace interesante el uso de aptámeros como elementos de reconocimiento es su forma de obtenerlos mediante un proceso conocido como SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment). Este proceso, mostrado en la Figura 2, comienza con una colección de oligonucleótidos compuesta por aproximadamente  $10^{15}$  secuencias de oligonucleótidos distintos de ADN o de ARN. Los aptámeros que componen esta colección están formados por secuencias de entre 20 y 80 nucleótidos, y dichas secuencias están flanqueadas en los extremos por dos secuencias de unos 20 nucleótidos, denominados cebadores, que son los que permiten realizar las amplificaciones por PCR. Estos oligonucleótidos se incuban junto a la molécula diana de tal forma que se produce la interacción de algunos aptámeros con la diana. Es habitual añadir albúmina de suero bovino (BSA), para evitar posibles adsorciones inespecíficas, y una pequeña cantidad de ARN de transferencia (t-RNA) que actúa como competidor con el ADN aumentando así la rigurosidad de las incubaciones. A continuación se separan los oligonucleótidos que se han unido a la diana de los que no se han unido, descartándose estos últimos. Los aptámeros que se han unido son separados de las dianas y mediante PCR son amplificados. Le seguiría una etapa de acondicionamiento en la que la doble hebra que se obtienen de la PCR se separaría para obtener hebras de cadena sencilla. Esta nueva colección de oligonucleótidos, enriquecida en secuencias de mayor afinidad, se vuelve a incubar con las moléculas diana dando así comienzo a un nuevo ciclo. Con cada nuevo ciclo se va aumentando la rigurosidad de las condiciones de selección de aptámeros, por ejemplo disminuyendo el tiempo de interacción con la diana, aumentando las cantidades de t-RNA y de BSA, aumentando el número de lavados, etc. Esto se hace para asegurarse de que el aptámero final seleccionado es el que tiene mayor afinidad por la diana. El número de ciclos requeridos es variable, aunque lo habitual es usar entre 10 y 15 ciclos.

El grado de enriquecimiento se mide en cada ciclo mediante ensayos de enlace. Cuando se considera que el porcentaje de oligonucleótidos con alta afinidad es suficiente se procede a la clonación mediante la cual se separa las distintas secuencias de oligonucleótidos obtenidas. A continuación se secuencian individualmente para conocer la secuencia de bases de los

oligonucleótidos seleccionados. Una vez terminado el proceso SELEX puede haber una etapa de modificaciones químicas sobre los aptámeros seleccionados para variar sus propiedades según interés.

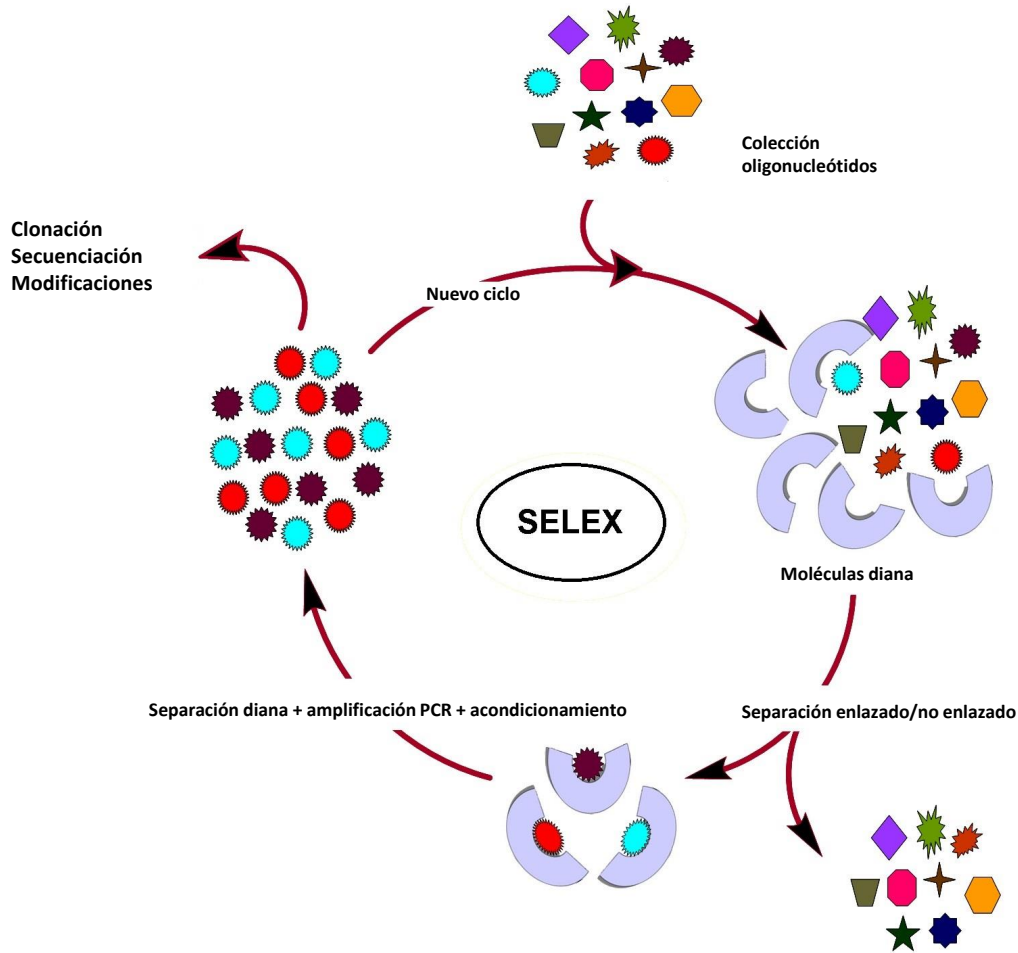


Figura 2: Proceso de selección in vitro de aptámeros mediante el método SELEX.

Este proceso de selección de aptámeros supone una gran ventaja frente al uso de anticuerpos por varias razones. Por un lado el SELEX se realiza con secuencias sintéticas de oligonucleótidos mientras que los anticuerpos deben producirse biológicamente, usando cultivos y animales de laboratorio. Por otro lado, como el proceso de selección de aptámeros no es estándar, puede realizarse en las condiciones del ensayo en las que van a ser utilizados asegurando así que la estructura y la funcionalidad de estos se mantiene a la hora de llevar a cabo dicho ensayo, algo que no se asegura en ciertos anticuerpos [17]. Además los aptámeros

pueden ser modificados químicamente con facilidad para variar su capacidad de enlace, su estabilidad, para que se dirijan a una localización en particular o para inmovilizarlos sobre una superficie, y todo ello sin que pierdan su funcionalidad.

No existe un proceso de selección de aptámeros estándar. Se pueden utilizar diferentes estrategias dependiendo del tipo de molécula diana, por lo que cada selección es única y debe ser optimizada.

Los aptámeros, sobre todo los de ARN, son muy susceptibles de ser degradados por acción de nucleasas por lo que puede hacerse necesario modificarlos químicamente después de haber sido seleccionados para aumentar su estabilidad o utilizar una colección de oligonucleótidos con bases modificadas que aumenten la estabilidad de las secuencias.

Cuando comenzó a usarse el proceso SELEX, cada ciclo podía llegar a requerir unos tres días, haciendo que el tiempo total necesario para la selección de aptámeros fuera de unos tres meses. Este tiempo es más o menos el requerido para obtener anticuerpos policlonales. Si se buscan anticuerpos monoclonales el tiempo total puede aumentar hasta los nueve meses. Pero el método SELEX ha ido evolucionando, y se ha ido automatizando. Si al principio se usaba la cromatografía de afinidad o la inmovilización de las dianas sobre placas de pocillos o sobre partículas magnéticas para realizar las separaciones entre lo enlazado y lo no enlazado, el uso de la electroforesis capilar ha permitido reducir el número de ciclos a apenas 4 – 5 reduciéndose así el tiempo total del proceso a apenas unos días [21].

## 1.4. Partículas Magnéticas

En este trabajo se van a utilizar partículas magnéticas como soporte sólido sobre el que se inmovilizan biomoléculas. Las partículas magnéticas se caracterizan por tener un comportamiento superparamagnético, es decir, cuando se les aplica un campo magnético presentan magnetismo pero al desaparecer este campo también lo hace su magnetismo. Esto permite su fácil separación del sobrenadante por acción de un campo magnético externo.

Estas partículas están compuestas por un núcleo de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) lo que les confiere magnetismo. Este núcleo debe tener un recubrimiento, generalmente polimérico, para evitar que las partículas agreguen. Sobre este recubrimiento pueden unirse, de manera covalente o no covalente, moléculas o biomoléculas para así conferir una funcionalidad determinada a la partícula en su conjunto.

Las partículas tienen un tamaño aproximado de  $1\ \mu\text{m}$  y vienen en una concentración de

10 mg/mL. Están recubiertas covalentemente por una monocapa de estreptavidina y no formando multicapas de estreptavidina, por lo que la capacidad de unión no se ve afectada [22]. Estas partículas van a unirse fuertemente con cualquier biomolécula que contenga biotina.

El uso de partículas magnéticas frente a otros soportes sólidos permite tener una mejor interacción entre las moléculas unidas al soporte y las moléculas en disolución, por lo que la cinética es más rápida. Esto se debe a que las partículas magnéticas, fuera de un campo magnético, están suspendidas, por lo que mediante agitación se ponen en contacto con las moléculas en disolución de una manera más eficiente.

El empleo de estas partículas requiere de ciertas precauciones. Deben conservarse a temperaturas bajas ( $4 - 8^{\circ}\text{C}$ ). Al utilizarlas debe aplicarse una agitación vigorosa ya que, como se verá más adelante, una mala agitación puede hacer que la interacción con las moléculas en disolución no sea efectiva.

## 2. Objetivos



En el laboratorio de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo se han obtenido recientemente aptámeros contra el péptido inmunodominante 33-mer. Con uno de ellos, el denominado ‘Gli 4’, se desarrolló un aptaensayo sobre partículas magnéticas con detección cronoamperométrica sobre electrodos de carbono. Las buenas características analíticas del método en cuanto a sensibilidad y selectividad fueron determinantes para abordar el trabajo que se describe en esta memoria.

El objetivo principal del mismo es el desarrollo de un aptaensayo competitivo para la detección de gluten que permita el procesamiento de múltiples muestras simultáneamente reduciendo el consumo de reactivos, tal y como demanda el análisis de alérgenos en alimentos. El método descrito previamente adolece de una baja velocidad de procesamiento de muestras, lo que limita su aplicabilidad comercial. Por tanto, se propone el escalado del método descrito para adaptarlo a placas de pocillos de PCR que permitan el análisis simultáneo de 96 muestras. Dadas las peculiares características de la proteína diana, la gliadina, y su tendencia a agregarse, esto podría no ser un asunto trivial.

Aunque ya existen en el mercado lectores de placas electroquímicos, su uso no está aún extendido en los laboratorios agroalimentarios. Por ello se propone utilizar la espectrofotometría como técnica alternativa de detección.

# 3. Experimental

### 3.1. Materiales y Reactivos

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

- Partículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina *Dynabeads C1* (Invitrogen).
- Péptido 33-mer biotinilado (Biomedal).
- Biotina (Sigma-Aldrich).
- Conjugado estreptavidina-HRP (Sigma-Aldrich).
- 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma-Aldrich).
- Caseína para bloqueo en buffer Tris-HCl (Sigma-Aldrich).
- Aptámero biotinilado 5'-/5Biosg/CCA GTC TCC CGT TTA CCG CGC CTA CAC ATG TCT GAA TGC C -3' (IDT).
- PWG (R-Biopharm AG Alemania).
- Ácido sulfúrico (Merck).

Las disoluciones reguladoras utilizadas vienen indicadas en la Tabla 1. Estas disoluciones fueron preparadas en agua Milli-Q obtenida mediante un sistema Millipore Direct-Q. Todas tienen un pH de 7.4.

Se emplearon tubos Eppendorf Protein LoBind para la modificación de las partículas magnéticas con el péptido ya que éste tiene mucha tendencia a adherirse a las paredes plásticas de los tubos Eppendorf convencionales.

### 3.2. Instrumentación

Como sistema de agitación se utilizó un termostato *Thermomixer Comfort* al cual se le pueden cambiar los termobloques dependiendo del recipiente que se desea someter a agitación. Con este aparato se puede controlar la temperatura durante las distintas incubaciones del ensayo.

Se utilizó un imán para tubos Eppendorf *DynaMag-2* (Invitrogen) que permite separar las partículas del sobrenadante.

Disolución	Composición
Disolución de modificación	Reguladora de fosfato, PBS 1x (Sigma-Aldrich) 0.01 % Tween-20 (Sigma-Aldrich)
Disolución de selección (BS)	250 mM NaCl (Sigma-Aldrich) 50 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich) 5 mM MgCl <sub>2</sub> (Sigma-Aldrich)
Disolución de lavado (BSL)	250 mM NaCl (Sigma-Aldrich) 50 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich) 5 mM MgCl <sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) 0.01 % Tween-20 (Sigma-Aldrich)

Tabla 1: Disoluciones reguladoras empleadas y su composición.

Para realizar el ensayo se utilizaron como soporte placas de PCR de 96 pocillos, Figura 3(a), con su respectivo imán para poder separar el sobrenadante de las partículas magnéticas, Figura 3(b).

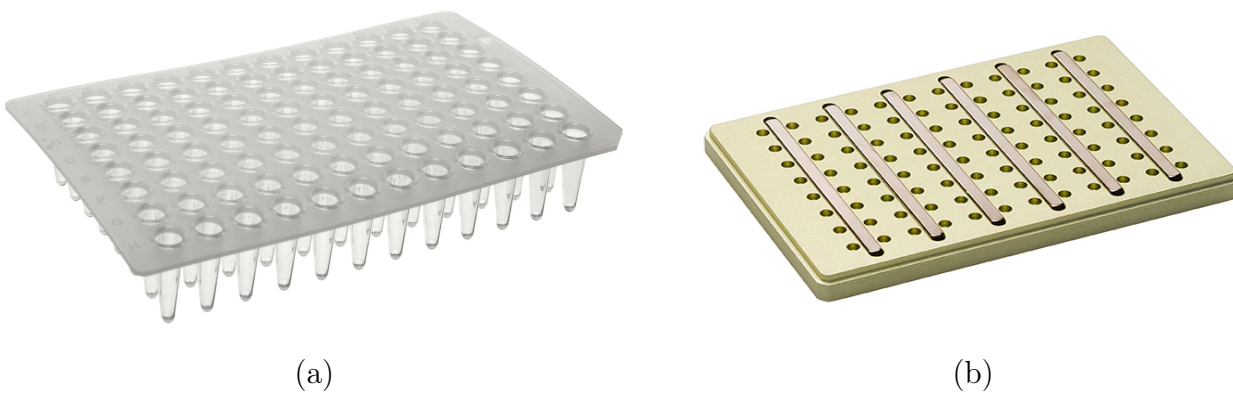


Figura 3: Placa PCR de 96 pocillos e imán.

Se utilizó una placa ELISA de 96 pocillos sobre la que se trasvasan las disoluciones una vez terminada y detenida la reacción enzimática para medir su absorbancia en un lector de placas. Este lector de placas es el modelo Eon (BioTek) cuyo software de control es el Gen5 Data Analysis Software.

### 3.3. Procedimiento experimental

#### 3.3.1. Modificación de partículas

El procedimiento de modificación viene esquematizado en la Figura 4. Se parte de 15  $\mu\text{L}$  de las partículas magnéticas comerciales y se lavan con 1 mL de la disolución de modificación durante 2 minutos bajo fuerte agitación en el Thermomixer a 25 °C. Se dejan reposar las partículas en el imán durante otros 2 minutos y se separa el sobrenadante. Este proceso se repite otra vez.

A continuación se redisuelven las partículas en 1 mL de la disolución de modificación al que se le ha añadido péptido 33-mer biotinilado 0.66  $\mu\text{M}$ . Como las partículas están modificadas con una monocapa de estreptavidina estas se van a unir fuertemente a la biotina del péptido gracias a la elevadísima fuerza de unión biotina-estreptavidina ( $K_d = 10^{-15} \text{ M}$ ).

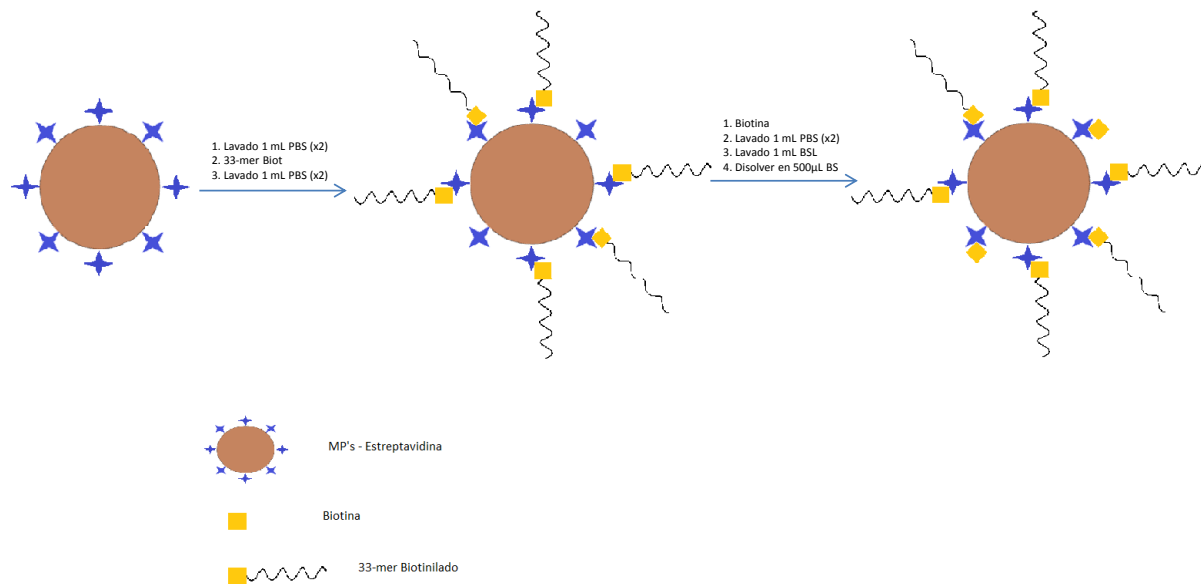


Figura 4: Etapas de la modificación de partículas magnéticas

Se deja que el péptido interactúe con las partículas durante 30 minutos. Pasado ese tiempo se quita el sobrenadante y se lavan las partículas dos veces con la disolución de modificación.

Es posible que queden moléculas de estreptavidina libres sobre la superficie de las partículas, por lo que es necesario bloquear esos sitios de unión con biotina ya que si no al añadir el aptámero biotinilado que se emplea en el ensayo se va a unir a las moléculas de estreptavidina además de unirse al péptido. Para bloquear estos sitios libres se suspenden las partículas en 1 mL de la disolución de modificación al cual se le añade una disolución de biotina 166  $\mu\text{M}$ . Se deja incubar durante 30 minutos. A continuación se lavan las partículas dos veces con 1 mL de la disolución de modificación, una vez con 1 mL de BSL y finalmente se suspenden en 500  $\mu\text{L}$  de BS, quedando así listas para usar en el ensayo.

Tanto los lavados como las incubaciones se realizaron manteniendo una temperatura constante de 25 °C. Es importante que la agitación empleada en el Thermomixer sea la máxima posible ya que sino es posible que las interacciones no sean eficaces.

### 3.3.2. Curva de enlace

La curva de enlace se lleva a cabo haciendo interaccionar en cada pocillo 1.2  $\mu\text{g}$  de las partículas modificadas con 40  $\mu\text{L}$  de disoluciones de concentraciones crecientes de aptámero preparadas en BS. Esta interacción tiene lugar durante 30 minutos en el Thermomixer a 25 °C y empleando la máxima agitación. Una vez finalizada la interacción se coloca la placa en el imán durante 5 minutos para que éste atrape todas la partículas magnéticas y así poder separar el sobrenadante. Las partículas se lavan con 125  $\mu\text{L}$  de BSL durante 2 minutos controlando la temperatura a 25 °C y se separa el sobrenadante después de haber retenido las partículas con el imán durante 5 minutos. Este proceso se repite una vez más.

A continuación se lleva a cabo el marcaje enzimático. Para ello se hacen interaccionar las partículas con 40  $\mu\text{L}$  de una disolución del conjugado estreptavidina-HRP de concentración 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 30 minutos y a también controlando la temperatura a 25 °C. Seguidamente se realizan dos lavados con BSL y uno con BS empleando siempre 125  $\mu\text{L}$  de dichas disolución, dejando los lavados durante un tiempo de 2 minutos y reteniendo las partículas con el imán durante 5 minutos.

Finalmente se lleva a cabo la etapa de detección. Para ello se hacen interaccionar las partículas con 80  $\mu\text{L}$  de una disolución comercial de TMB en  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 10 minutos. Transcurridos los 10 minutos se detiene la reacción con otros 80  $\mu\text{L}$  de una disolución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M. Se trasvasan 150  $\mu\text{L}$  de los 160  $\mu\text{L}$  que hay en cada pocillo, para no arrastrar partículas magnéticas que puedan dar errores a la hora de realizar las medidas, a una placa ELISA convencional. Las absorbancias se miden a una longitud de onda de 450 nm.

### 3.3.3. Ensayo competitivo

Las etapas del ensayo se resumen gráficamente en la Figura 5. En cada pocillo de la placa PCR se mezclan  $1.2 \mu\text{g}$  de las partículas modificadas con  $40 \mu\text{L}$  de una mezcla de PWG y aptámero biotinilado preparada en BS y con un 1.2 % de etanol. La concentración de aptámero utilizada, previa selección mediante curva de enlace, fue de  $2 \mu\text{M}$ .

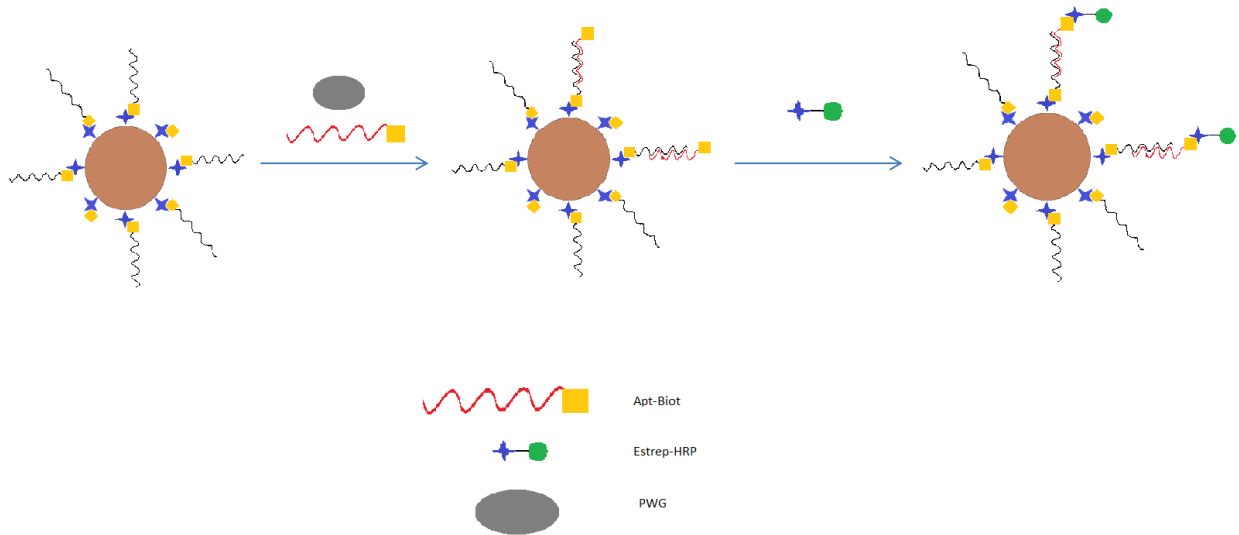


Figura 5: Protocolo ensayo competitivo

La interacción entre las partículas y el aptámero se deja 30 minutos bajo agitación máxima en el Thermomixer a una temperatura constante de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . A continuación se realizan dos lavados de las partículas empleando la disolución BSL de igual manera que se hizo en la curva de enlace.

A continuación se realiza el marcaje enzimático empleando de nuevo  $40 \mu\text{L}$  de una disolución preparada en BSL del conjugado estreptavidina-HRP con una concentración de  $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  durante 30 minutos y controlando la temperatura. Una vez transcurridos los 30 minutos se realizan dos lavados con BSL y uno con BS.

Finalmente se lleva a cabo la etapa de detección de igual manera que para la curva de enlace y midiendo nuevamente las absorbancias de las disoluciones de cada pocillo a  $450 \text{ nm}$ .

## 4. Resultados y discusión



## 4.1. Selección de la concentración de aptámero

La primera etapa para llevar a cabo un ensayo competitivo es la selección de la concentración del reactivo limitante, en este caso el aptámero. Para ello se realizan ensayos de unión del aptámero sobre el péptido 33-mer inmovilizado en la superficie de las partículas magnéticas. En este ensayo no está presente el PWG.

La representación de la absorbancia del producto generado enzimáticamente, que es una medida de la cantidad de aptámero que ha interactuado con el péptido inmovilizado sobre las partículas magnéticas, frente a la concentración de aptámero, denominada ‘curva de enlace’, suele presentar una forma sigmoidea y de ella se puede obtener la cantidad de aptámero que se va a utilizar para el ensayo competitivo. Aunque no hay una norma general, se suele seleccionar la concentración a la que se obtiene una señal igual a la mitad de la señal máxima, lo que se conoce como  $IC_{50}$ . Es habitual escoger esta concentración de aptámero porque es la que se corresponde con la zona de máxima sensibilidad en la curva de enlace, la zona media en la que hay máxima pendiente [23].

Para realizar la curva de enlace se modifican 0.5 mg de partículas magnéticas comerciales con 2.0 pmol de péptido biotinilado y se bloquean con 500.0 pmol de biotina, todo ello utilizando un volumen de 1 mL de disolución de modificación. A continuación se hacen interactuar 10  $\mu$ g de estas partículas ya modificadas con 200  $\mu$ L de disoluciones de aptámero biotinilado de concentraciones crecientes (0.001 – 0.5  $\mu$ M). La interacción se lleva a cabo durante 30 minutos a una temperatura controlada de 25 °C. Terminada la interacción se realizan dos lavados con 350  $\mu$ L de disolución BSL y a continuación se lleva a cabo la etapa de marcaje enzimático haciendo interactuar las partículas con 200  $\mu$ L de una disolución de estreptavidina-HRP de concentración 2.5  $\mu$ g/mL también durante 30 minutos y a la misma temperatura. Después del marcaje se realizan dos lavados con disolución BSL y uno con disolución BS para llevar a cabo a continuación la reacción enzimática utilizando 80  $\mu$ L de TMB y deteniéndola tras 15 minutos con otros 80  $\mu$ L de una disolución de  $H_2SO_4$  1 M. Finalmente se trasvasan las disoluciones de cada pocillo a una placa ELISA convencional y se mide la absorbancia de cada pocillo a 450 nm.

Como se puede observar en la Figura 6, al repetir las curvas de enlace se observó que diferían considerablemente unas de otras aún cuando se realizaban en las mismas condiciones experimentales.

Sin embargo, se observó que estas discrepancias eran mínimas en la medida de los blancos,

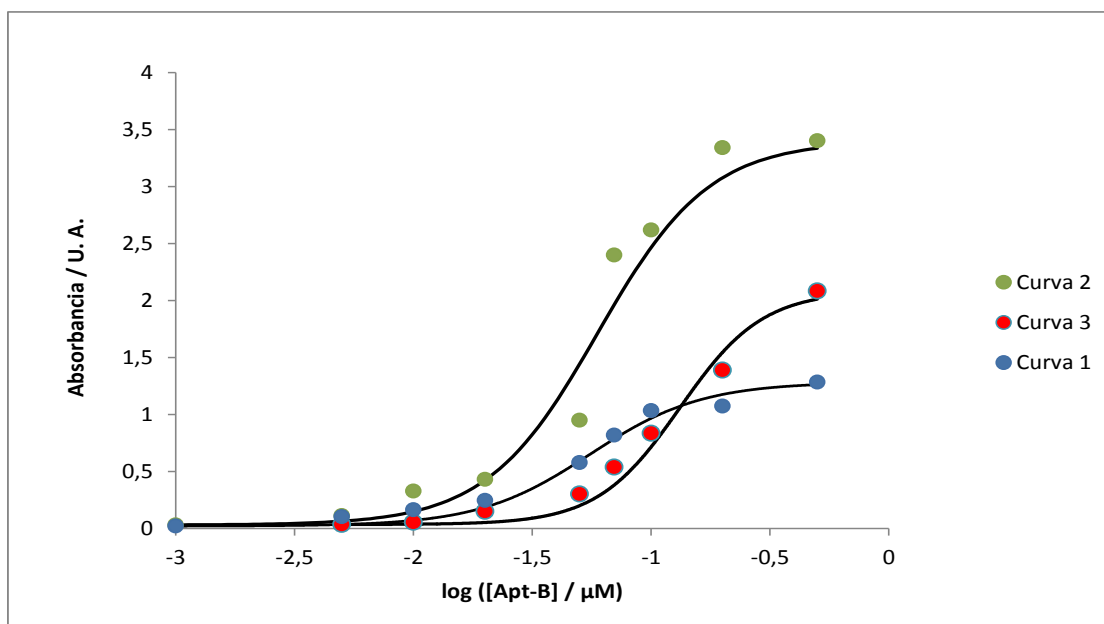


Figura 6: Curvas de enlace realizadas sobre placas de PCR en idénticas condiciones.

donde no está presente el aptámero. Por ello se sospechó de algún tipo de interacción inespecífica del aptámero sobre las placas de PCR. Para comprobar si esto es así, se realizaron ensayos de enlace en ausencia de partículas magnéticas incubando disoluciones de aptámero biotinilado de concentraciones crecientes en los pocillos. Tras las etapas de lavado se procedió a realizar el marcaje enzimático y la reacción enzimática como en el experimento anterior. En la Tabla 2 se observa que existe una afinidad clara del aptámero por las paredes plásticas de las placas PCR ya que la absorbancia crece conforme aumenta la concentración de aptámero.

[Apt-Biot] / μM	Absorbancia / U.A.
0	0.055
0.05	0.492
0.10	0.806
0.50	1.465

Tabla 2: Absorbancias obtenidas tras la incubación de apt-biot en las placas de PCR en función de la concentración de aptámero.

Este efecto ya había sido observado con anterioridad por Gaillard y Belotserkovskii, aun-

que ha sido ignorado por la inmensa mayoría de estudios que emplean ADN. De hecho rara vez se hace mención al uso de materiales de baja adsorción de ADN. Estos investigadores comprobaron que el ADN, y particularmente el de cadena sencilla, tenía tendencia a desnaturalizarse y a formar multímeros a causa de las interacciones que presentaba con el polipropileno de los soportes plásticos [24], [25].

En estudios posteriores se verificó que, a pesar de que el ADN es una molécula con carga y el polipropileno es muy hidrofóbico, el ADN presentaba una clara tendencia a adsorberse sobre las paredes de soportes plásticos. Se observó que la cantidad de ADN que se adsorbía sobre el soporte era muy variable y dependía de factores como la composición de la disolución en la que estuviera el ADN, la temperatura o el tiempo de interacción [26].

Se han descrito métodos complejos que utilizan plasmas de radio frecuencias para que se genere una superficie con carga negativa sobre el soporte plástico y que así, por repulsiones electrostáticas entre el soporte y el ADN, se evite la adsorción del ADN [27]. En este trabajo se utilizó con el mismo fin de prevenir la adsorción de ADN una disolución de bloqueo compuesta por caseína 0.5 % en Tris-HCl (pH=7.4). Para ello se llenaron los pocillos de la placa que se iban a utilizar con esta disolución y se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche. Antes de usar la placa para el ensayo se eliminó esta disolución y los pocillos se lavaron dos veces con disolución BSL. Como se aprecia en la Tabla 3 las adsorciones del ADN sobre el soporte se redujeron y se hicieron independientes de la concentración de aptámero. Por tanto en adelante se utilizarán placas de PCR bloqueadas con caseína.

Es importante resaltar que el efecto de las adsorciones inespecíficas del aptámero sobre el soporte plástico no se observa en el ensayo electroquímico porque la detección se realiza sobre electrodos, está desacoplada del soporte donde tiene lugar el ensayo

[Apt-Biot] / $\mu\text{M}$	Absorbancia / U.A.
0	0.065
0.05	0.199
0.10	0.167
0.50	0.180

Tabla 3: Absorbancias obtenidas tras la incubación de apt-biot en las placas de PCR bloqueadas con caseína en función de la concentración de aptámero.

En la Figura 7 se muestra la curva de enlace en estas condiciones representada como tanto por ciento de la señal máxima ( $\text{Abs}/\text{Abs}_{\text{max}}$ ). Como se puede observar, la señal analítica es

únicamente apreciable a concentraciones altas de aptámero, por encima de  $0.2 \mu\text{M}$ . Esto podría indicar una baja afinidad del aptámero por el péptido inmovilizado. Sin embargo, estudios previos realizados en nuestro laboratorio indican inequívocamente que no es así [14].

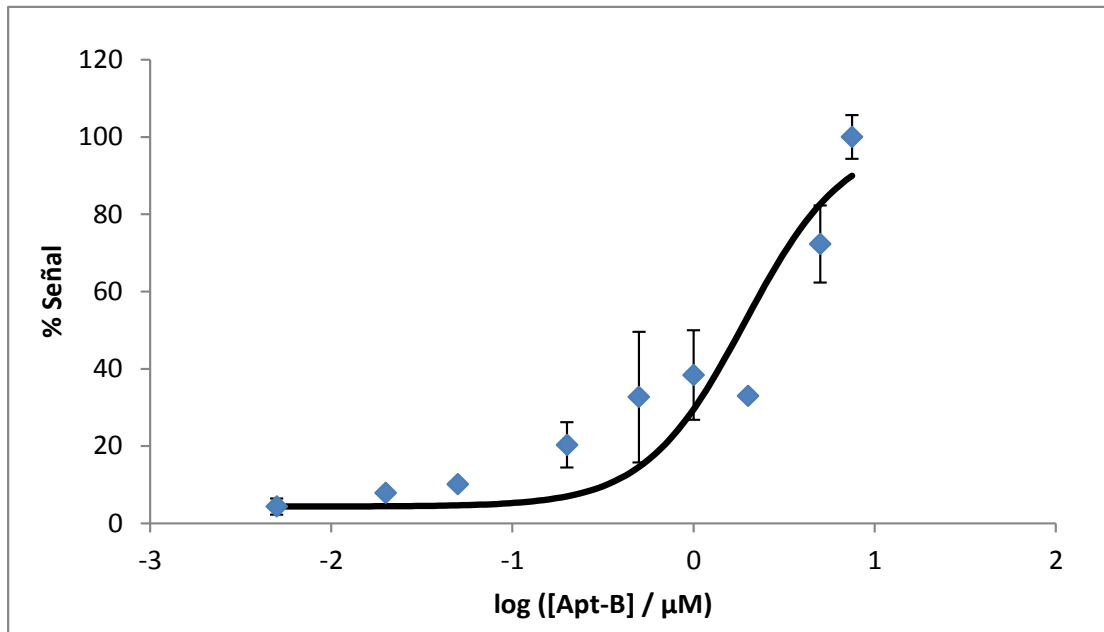


Figura 7: Curva de enlace realizadas sobre placa de PCR bloqueada con caseína.

El hecho de que la interacción no es buena se refleja en el valor del  $IC_{50}$ . De hecho en el ensayo electroquímico se obtiene un valor para el  $IC_{50}$  de  $0.25 \mu\text{M}$  [14], mientras que en el ensayo espectrofotométrico se obtiene un  $IC_{50}$  de  $5.0 \mu\text{M}$ , más de un orden de magnitud superior.

#### 4.1.1. Optimización de la modificación de las partículas magnéticas

En estudios previos se observó que, debido a su naturaleza, el péptido 33-mer tiene tendencia a formar agregados, lo que afecta a la señal analítica. Teniendo esto en cuenta se estudió el efecto que podía tener sobre la señal analítica la forma de modificar las partículas magnéticas así como la cantidad de las mismas que se hace interaccionar con el aptámero. Por ello se optó por preparar lotes de partículas modificadas bajo protocolos distintos, variando la cantidad de partículas magnéticas que se empleaban pero manteniendo la relación entre

la masa de partículas y los moles de péptido biotinilado y de biotina (Tabla 4). Además con cada lote se optó por mantener el volumen empleado en cada pocillo para las incubaciones, lo que supuso emplear en cada pocillo concentraciones distintas de partículas (Tabla 5).

Partículas magnéticas / mg	0.5	0.15	0.05
33-mer-Biot / pmol	2.0	0.6	0.2
Biotina / pmol	500.0	150.0	50.0

Tabla 4: Cantidades empleadas en la modificación de partículas.

En la Figura 8 se hace necesario mostrar los datos como unidades de absorbancia en lugar de porcentaje de señal para poder apreciar claramente el efecto que estas variaciones tienen sobre la señal analítica. Como se puede observar en dicha figura, la disminución de la cantidad de partículas que se emplean para construir la curva de enlace implica una fuerte disminución de la señal analítica con el consiguiente desplazamiento de la curva hacia concentraciones más altas de aptámero (curva roja). Este efecto podría estar incrementado por el hecho de que la modificación de las partículas se realizó en disoluciones más diluidas de partículas y reactivos aunque la relación entre ambos se mantuvo constante. Sin embargo las diferencias no son tan importantes cuando se emplean cantidades mayores de partículas modificadas en disoluciones más concentradas de reactivos. De echo el uso de cantidades mayores de 0.15 mg en la preparación de la fase sensora no afecta significativamente a la forma de la curva de enlace, obteniéndose un  $IC_{50}$  de  $5.0 \mu M$ . Por tanto se decidió emplear 0.15 mg de partículas magnéticas, 0.6 pmol de péptido biotinilado y 150 pmol de biotina para realizar la modificación y usar  $3 \mu g$  de estas partículas modificadas para las incubaciones.

Partículas modificadas / mg	0.5	0.15	0.05
Partículas en pocillo / $\mu g$	10.0	3.0	1.0

Tabla 5: Cantidad de partículas empleadas en el ensayo según el tipo de modificación empleado.

Sin embargo, aún no se han alcanzado el  $IC_{50}$  obtenido con el ensayo electroquímico. Comparando el procedimiento electroquímico con el procedimiento espectrofotométrico se observó que las velocidades de agitación no eran equiparables ya que en el ensayo electroquímico se emplean viales Eppendorf cerrados, lo que permite una mayor agitación que en placas, que están abiertas.

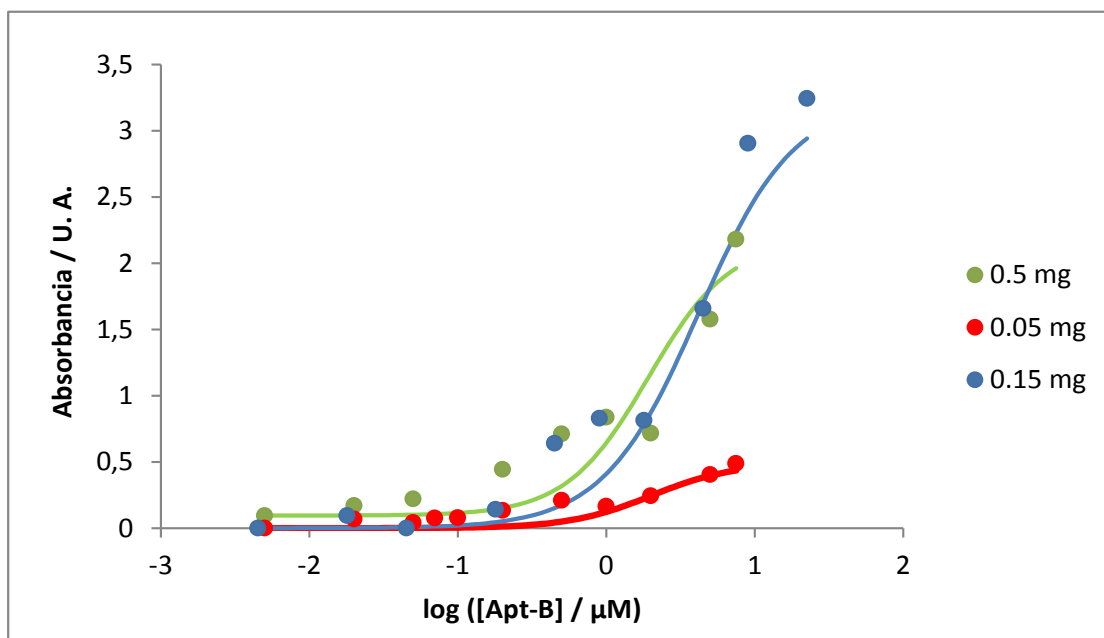


Figura 8: Curvas de enlace obtenidas con distintos protocolos de modificación.

Como se mencionó en la sección 1.4, entre las precauciones que hay que tener a la hora de trabajar con partículas magnéticas está trabajar con una agitación vigorosa de tal forma que las partículas estén suspendidas y no queden depositadas en el fondo del soporte. Por ello se probó a trabajar con volúmenes ligeramente más pequeños en cada pocillo ( $180 \mu\text{L}$ ) de tal forma que se permitiera tener una agitación vigorosa sin verter el contenido de cada pocillo.

En la Figura 9 se muestra el efecto de la agitación sobre la señal analítica. Se observa claramente que hay un cambio en la capacidad de interacción del aptámero con las partículas modificadas ya que se requiere una menor cantidad del mismo para observar señal. Además se obtiene una curva de enlace mejor definida que produce un mejor ajuste de la curva. Una agitación vigorosa permite poner en suspensión todas las partículas magnéticas y por tanto facilita el acceso del aptámero a toda la superficie modificada con el péptido. Esto se traduce en un desplazamiento de la curva de enlace hacia concentraciones de aptámero más bajas.

Esta diferencia entre tener una buena o una mala agitación es muy importante ya que hace que el  $\text{IC}_{50}$  varíe hasta en un orden de magnitud. Así mientras que con baja agitación se obtiene un  $\text{IC}_{50}$  de aproximadamente  $5.0 \mu\text{M}$ , con alta agitación este  $\text{IC}_{50}$  disminuye hasta

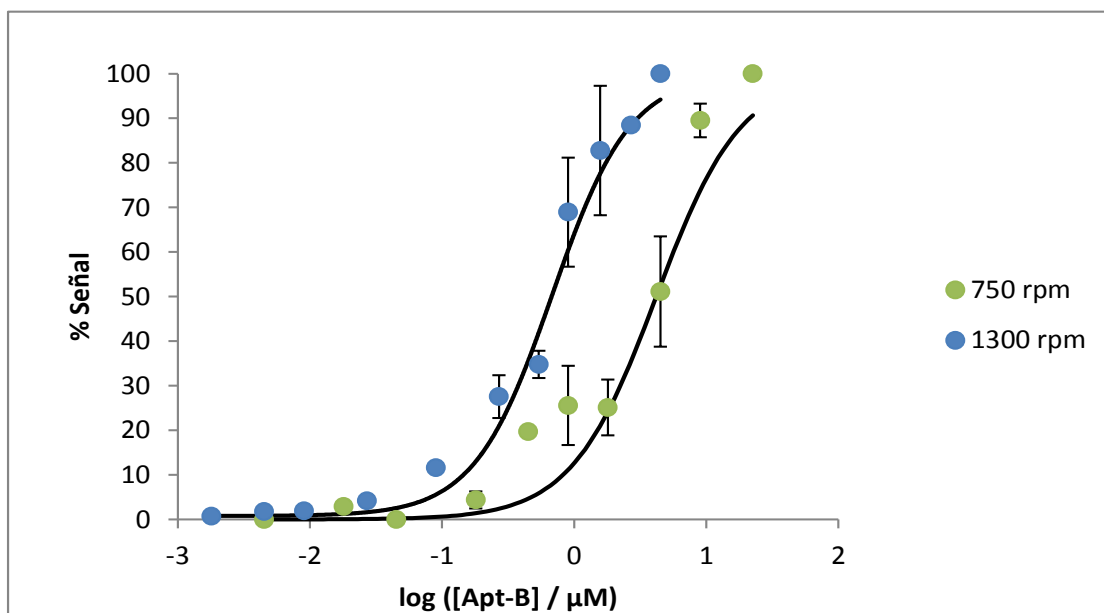


Figura 9: Curvas de enlace obtenidas en placas bloqueadas con distinta agitación (750 rpm y 1300 rpm).

aproximadamente  $0.6 \mu\text{M}$ . Por esto se utiliza la máxima agitación posible, 1300 rpm, para realizar las incubaciones. Para los lavados con disoluciones BSL y BS se usa una velocidad de agitación de 500 rpm ya que al emplearse un volumen igual a la capacidad máxima del pocillo es inviable utilizar agitaciones fuertes porque el contenido sería vertido al exterior.

Después de haber comprobado cómo se ve afectada la curva de enlace en función de la agitación de las partículas y haber optimizado dicha agitación, se repitió la optimización de la modificación de las partículas magnéticas con el fin de verificar los resultados antes obtenidos y también con la intención de mejorar aún más la curva de enlace y aproximar los resultados a los obtenidos en el ensayo electroquímico. Las modificaciones se hicieron de igual forma que antes, utilizando las cantidades mostradas en la Tabla 4. Para realizar esta optimización se realizaron nuevamente curvas de enlace pero ahora empleando la máxima agitación durante las interacciones, 1300 rpm. En esta ocasión en lugar de añadir a cada pocillo el mismo volumen de partículas magnéticas modificadas, y en consecuencia añadir cantidades distintas en masa de las mismas, se optó por ajustar los volúmenes añadidos de partículas de tal forma que en los tres ensayos que se realizan haya siempre la misma

cantidad de partículas,  $2 \mu\text{g}$ . Como se ve en la Figura 10, se observa una clara diferencia cuando las partículas están muy diluidas durante la modificación. Ésta no es tan efectiva por lo que no se une tanto aptámero como se esperaría, lo que se manifiesta en señales menores. Se observa también que modificar partículas magnéticas en disoluciones más concentradas que las obtenidas empleando la modificación con  $0.15 \text{ mg}$  no tiene ningún efecto sobre la interacción con el aptámero, es decir, no se mejoran las características de la curva de enlace. Esto se interpreta como que las partículas magnéticas están saturadas con péptido, pero sin llegar a formar agregados.

Se decidió mantener la modificación de partículas con  $0.15 \text{ mg}$  ya que permitía utilizar menos cantidades de reactivos y además permitía trabajar con partículas en disoluciones diluidas, que es siempre más beneficioso porque se evitan posibles problemas de agregaciones no observables a simple vista.

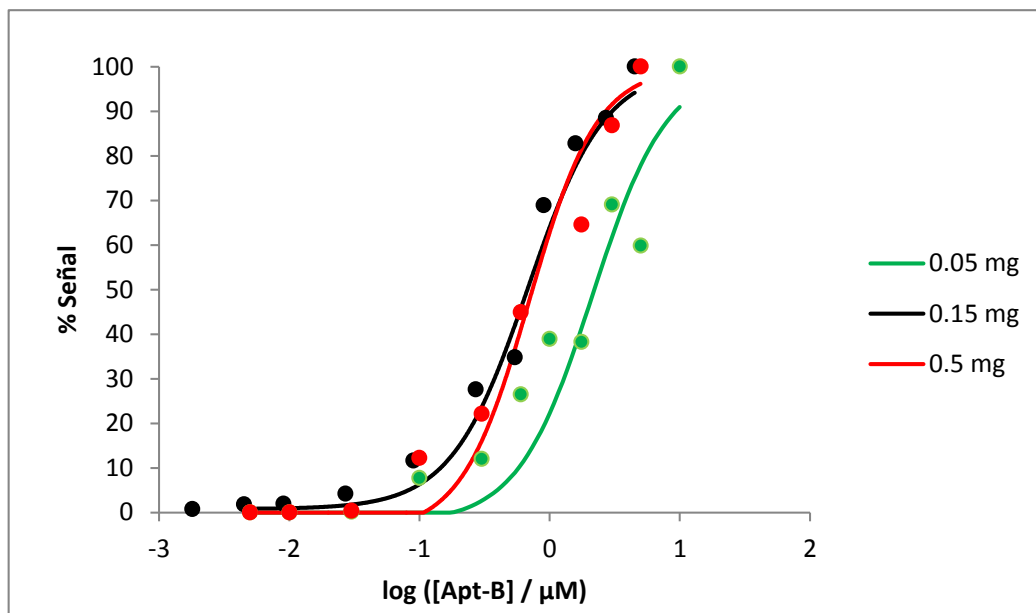


Figura 10: Comparación curvas de enlace con distintos protocolos de modificación de partículas.



## 4.2. Ensayo competitivo

Después de haber optimizado la modificación de las partículas, así como las condiciones del ensayo, se realizó el ensayo competitivo utilizando el  $IC_{50}$  obtenido de la curva de enlace realizada tras la modificación de 0.15 mg de partículas magnéticas de la Figura 10 (curva negra). Este  $IC_{50}$  se corresponde con una concentración de aptámero de 600 nM.

El ensayo competitivo se realizó de manera similar a la curva de enlace, empleando 200  $\mu$ L de disoluciones que contenían aptámero en una concentración fija de 600 nM y PWG con concentraciones crecientes de 0.1, 1, 10, 100, 1000 y 10000 ppb para la interacción con las partículas magnéticas. Con el fin de aumentar la señal analítica para disponer así de un intervalo más amplio de medida y además mejorar la reproducibilidad del ensayo, se pensó en aumentar la cantidad de partículas en los pocillos manteniendo las demás condiciones idénticas a las utilizadas en curva de enlace de 0.15 mg de la Figura 10. Se comprobó que aumentar esta cantidad hasta 6  $\mu$ g suponía un incremento demasiado elevado en la cinética de la reacción enzimática, lo que hacía imposible la medida. Por ello se decidió emplear una cantidad intermedia de partículas, 4  $\mu$ g en cada pocillo. La interacción siguió siendo de 30 minutos y a una temperatura controlada de 25 °C. A continuación se realizaron los dos lavados con 350  $\mu$ L de disolución BSL, el marcaje enzimático y los lavados análogos a los descritos antes. Finalmente se añadió el sustrato de la reacción enzimática, todo ello realizado de igual manera que en la curva de enlace. Como consecuencia del aumento en la cantidad de partículas se tuvo que disminuir el tiempo de reacción enzimática a 10 minutos.

Al realizar el ensayo competitivo se observó que la cantidad de partículas que se retenían por el imán en los pocillos aumentaba al aumentar la concentración de PWG. Este efecto no se observó al realizar las curvas de enlace, en las que no hay PWG presente, por lo que se cree que el PWG puede tener un efecto aglomerante sobre las partículas magnéticas haciendo que el aumento en masa que se produce por la aglomeración facilite su deposición en el fondo del pocillo junto al imán, de ahí que se retengan más partículas.

Para solucionar este problema se tuvieron que reducir los volúmenes empleados en las incubaciones a 40  $\mu$ L y los volúmenes empleados en los lavados a 125  $\mu$ L en lugar de los 200  $\mu$ L y 350  $\mu$ L que se venían utilizando hasta ahora. Se tuvo que ajustar también la cantidad de partículas que se añadían a cada pocillo. Este ajuste se hizo en un principio de forma proporcional a la reducción del volumen total en el pocillo, siendo la cantidad de partículas magnéticas en el pocillo de 0.8  $\mu$ g. Pero se comprobó que dicha cantidad era muy pequeña

como para producir señales fácilmente distinguibles del blanco, por lo que se optó por aumentar la cantidad de partículas empleadas a  $1.2 \mu\text{g}$  por pocillo, lo que supone un aumento en su concentración. Con esta reducción de volúmenes se fijó la velocidad de agitación en 1300 rpm para todas las etapas del ensayo, incluidos los lavados.

Primero se obtuvo la curva de enlace entre el aptámero y las partículas magnéticas modificadas con el péptido utilizando el nuevo protocolo con volúmenes reducidos (Figura 11). En ella se observa que ha habido un desplazamiento de las señales hacia concentraciones mayores de aptámero. Esto puede deberse a la reducción de volúmenes y consiguiente aumento en la concentración de las partículas lo que puede provocar peores interacciones entre ellas y el aptámero. El hecho de que una mayor concentración de partículas afecte a la curva de enlace contradice los resultados obtenidos en la Figura 8. En aquellos experimentos la concentración de partículas por pocillo era de  $0.005, 0.015$  y  $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , y en las condiciones de volúmenes reducidos es de  $0.03 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

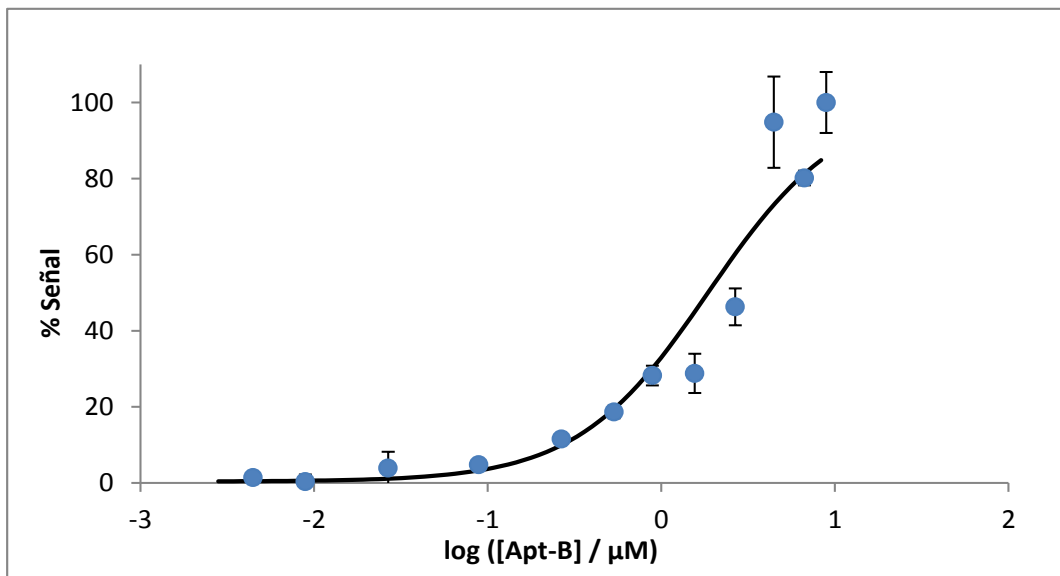


Figura 11: Curva de enlace obtenida en las condiciones optimizadas.

Cabría esperar que no hubiese cambios, sin embargo, en la Figura 8 no se había optimizado aún la velocidad de agitación. Una agitación baja podría implicar que la agregación de partículas se produzca a concentraciones más bajas con lo que se alcanzaría el máximo efecto a concentraciones de partículas relativamente bajas. Al contrario, con agitaciones altas, el

efecto negativo de la agregación de las partículas entre sí se apreciaría a mayores concentraciones. Ello podría explicar que en estas condiciones sí se aprecie un claro desplazamiento de la curva de enlace. De esta curva se selecciona la cantidad de aptámero a utilizar en el ensayo competitivo en las nuevas condiciones. Se empezó probando una cantidad de aptámero de  $3.5 \mu\text{M}$  correspondiente al  $\text{IC}_{50}$  pero no se obtuvieron resultados positivos ya que no se observó una disminución de la señal analítica al aumentar la concentración de PWG. Esto pudo deberse a que la cantidad de aptámero es demasiado elevada como para observar una competencia por él entre el PWG y las partículas modificadas. Por otro lado se observaron señales muy grandes para los blancos, en torno a 0.6 U. A., en contraposición con los blancos obtenidos hasta ahora que oscilaban en torno a 0.2 U. A. Por todo ello se decidió probar con una cantidad de aptámero menor,  $2 \mu\text{M}$ , correspondiente al valor del  $\text{IC}_{30}$ .

En el ensayo competitivo realizado empleando una concentración de aptámero que se corresponde con el  $\text{IC}_{30}$ , Figura 12, se observa que en estas condiciones la señal analítica,

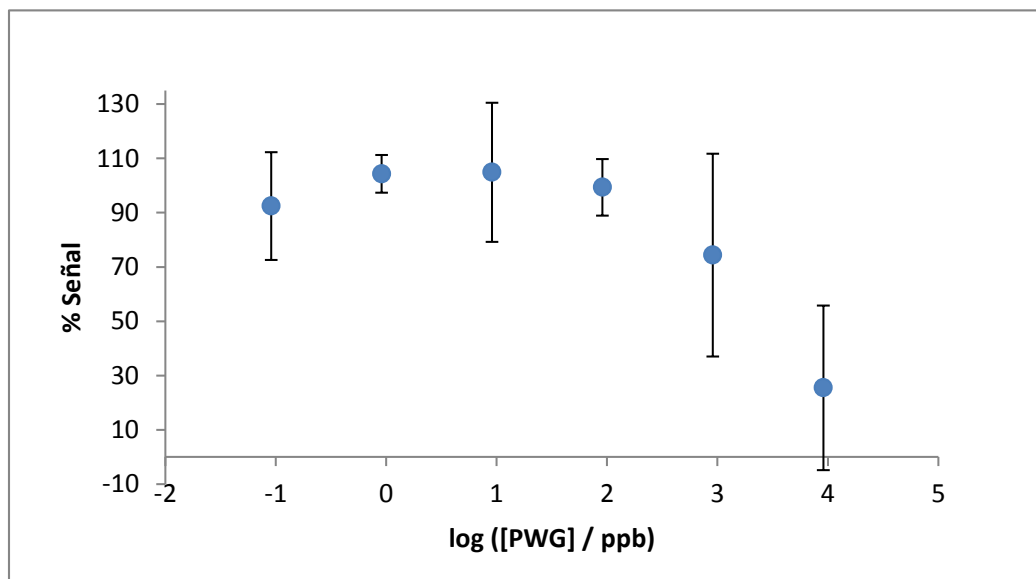


Figura 12: Curva de calibración del ensayo competitivo para gliadina.

expresada en porcentaje como  $(\text{Abs} - \text{Abs}_0 / \text{Abs}_{\text{max}})$ , disminuye a medida que aumenta la concentración de PWG, aunque esta dependencia sólo se observa a las concentraciones más

elevadas de proteína, lo cual se debe a la elevada cantidad de aptámero que se emplea.

Se observó también que las señales de los blancos seguían siendo elevadas al igual que en el caso del ensayo competitivo empleando el  $IC_{50}$ , lo que confirma que el bloqueo con caseína trabajando en concentraciones altas de aptámero no es tan efectivo, y se empieza a observar una dependencia con la concentración de aptámero. La alta desviación en las medidas se atribuye a esta adsorción inespecífica que se ve aumentada cuando se realiza el ensayo empleando una concentración de aptámero correspondiente al  $IC_{50}$ .

En general se observa que las señales netas son bajas (Tabla 6). Esto podría deberse a la baja cantidad de partículas modificadas que se emplean en cada pocillo y también a la reducción de volumen que se realiza que, como se mencionó antes, conduce a una mayor concentración de las partículas durante el ensayo y provoca una condiciones en las que la accesibilidad del aptámero libre a los sitios de unión de las partículas no es óptima. Sin embargo no es posible aumentar el número de partículas porque éstas estarían muy concentradas a la hora de interactuar con el aptámero lo cual tendría un efecto similar al de una mala agitación, es decir, una deficiente interacción que daría lugar a desplazamientos de la curva de calibración hacia concentraciones más elevadas de PWG.

[PWG] / ppb	Absorbancia / U.A.
0	0.224
0.1	0.207
1	0.234
10	0.235
100	0.222
1000	0.166
10000	0.057

Tabla 6: Señales netas obtenidas en el ensayo competitivo.

Dado que se pretende utilizar este ensayo para medir trazas de gluten en alimentos y que el límite superior para etiquetar estos alimentos como ‘sin gluten’ es de 20 ppm, el método aquí descrito no permitiría su aplicación a muestras reales.

## 5. Conclusiones

En este trabajo se ha adaptado un ensayo competitivo electroquímico ya existente a un formato que permita una elevada velocidad de procesamiento de muestras.

El empleo de placas de pocillos abiertas en los que se lleva a cabo la reacción enzimática indicadora requirió una etapa de bloqueo de los pocillos para evitar la adsorción inespecífica del ADN de cadena sencilla sobre las paredes.

Se observó además que la agitación de la disolución durante la interacción debe ser lo más elevada posible para evitar la sedimentación de las partículas magnéticas que impide la interacción del aptámero con toda la superficie sensora.

La presencia de gliadina PWG en disolución durante la etapa de competición en el ensayo tiende a agregar las partículas magnéticas, lo que las hace sedimentar e impide su correcta separación en el imán para placas PCR. Esto obligó a utilizar volúmenes aún más pequeños de ensayo y por tanto, a concentrar las partículas, cuyo efecto negativo no pudo disminuirse reduciendo la cantidad de partículas.

Bajo las condiciones optimizadas, el ensayo competitivo únicamente responde a elevadas concentraciones de gliadina, por lo que no es apropiado para la detección de trazas de gluten en alimentos.

Estudios preliminares realizados en el laboratorio indican que sería posible llevar a cabo un ensayo competitivo en pocillos sin partículas magnéticas, inmovilizando el PWG sobre la superficie de las placas.

# Referencias

- [1] *What is Celiac Disease?*; Celiac Disease Foundation; <http://celiac.org/celiac-disease/what-is-celiac-disease> 13/06/14.
- [2] Wieser, H. Chemistry of gluten proteins; *Food Microbiol.*; 2007, 24 (2), p: 115 – 119.
- [3] Diaz-Amigo, C.; Popping B.; Accuracy of ELISA detection methods for gluten and reference materials: a realistic assessment; *J. Agric. Food Chem.*; 2013, 61 (24), p: 5681 – 5688.
- [4] Shan, L.; Molberg, O.; Parrot, I.; Hausch, F.; Filiz, F.; Gray, G.; Sollid, L.; Khosla, C.; Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue; *Science*; 2002, 227 (5590), p: 2275 – 2279.
- [5] Reglamento CE 41/2009; *Official Journal of the European Union*; L 16/3.
- [6] Diaz-Amigo, C.; Popping, B.; Gluten and gluten-free: Issues and considerations of labeling regulations, detection methods and assay validation; *J. AOAC Int.*; 2012, 95 (2), p: 337 – 348.
- [7] Skerritt, J. H.; Hill, A. S.; Monoclonal-Antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods; *J. Agr. Food Chem.*; 1990, 38 (8), p: 1771 – 1778.
- [8] Sorell, L.; López, J. A.; Valdés, I.; Alfonso, P.; Camafeita, E.; Acevedo, B.; Chirido, F.; Gavilondo, J.; Méndez, E.; An innovative sandwich ELISA system based on an antibody cocktail for gluten analysis; *Febs. Lett.*; 1998, 439 (1 – 2), p: 46 – 50.
- [9] Valdés, I.; García, E.; Llorente, M.; Méndez, E.; Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol; *Eur. J. Gastroen. Hepat.*; 2003, 15 (5), p: 465 – 474.
- [10] Moron, B.; Bethune, M. T.; Comino, I.; Manyani, H.; Ferragud, M.; López, M. C.; Cebolla, A.; Khosla, C.; Sousa, C.; Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide; *Plos One*; 2008, 3 (5)
- [11] Sealey-Voyksner, J. A.; Khosla, C.; Voyksner, R. D.; Jorgenson, J. W.; Novel aspects of quantitation of immunogenic wheat gluten peptides by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry; *J. Chromatogr. A*; 2010, 1217 (25), p: 4167 – 4183.



- [12] van Eckert, R.; Berghofer, E.; Ciclitira, P. J.; Chirido, F.; Denery-Papini, S.; Ellis, H. J.; Ferranti, P.; Goodwin, P.; Immer, U.; Mamone, G.; Méndez, E.; Mothes, T.; Novalín, S.; Osman, A.; Rumbo, M.; Stern, M.; Thorell, L.; Whim, A.; Wieser, H.; Towards a new gliadin reference material-isolation and characterisation; *J. Cereal Sci.*; 2006, 43 (3), p: 331 – 341.
- [13] Wieser, H.; Koehler, P.; Is the calculation of the gluten content by multiplying the prolamin content by a factor of 2 valid?; *Eur. Food Res. Technol.*; 2009, 229 (1), p: 9 – 13.
- [14] Amaya-González, S.; de-los-Santos-Álvarez, N.; Miranda-Ordieres, A. J.; Lobo-Castañón, M. J.; Aptamer Binding to Celiac Disease-Triggering Hydrophobic Proteins: A Sensitive Gluten Detection Approach; *Analytical Chemistry*; 2014, 86 (5), p: 2733 – 2739.
- [15] Ellington, A. D.; Szostak, J. W.; In vitro selection of RNA molecules that bond specific ligands; *Nature*; 1990, 346, p: 818 – 822.
- [16] Tuerk, C.; Gold, L.; Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase; *Science*; 1990, 249 (4968), p: 505 – 510.
- [17] Mukhopadhyay, R.; Aptamers are ready for the spotlight; *Analytical Chemistry*; 2005, 77 (5), p: 114A – 118A.
- [18] de-los-Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tuñón-Blanco, P.; Aptamers as recognition elements for label-free analytical devices; *Trends Anal. Chem.*; 2008, 27 (5), p: 437 – 446.
- [19] Janata, J.; *Principles of chemical sensors*; Springer; Nueva York; 2009, p: 23 – 24.
- [20] Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B.; SELEX-A revolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands; *Biomol. Eng.*; 2007, 24 (4), p: 381 – 403.
- [21] van Emon, J. M.; *Immunoassay and other bioanalytical techniques*; CRC Press; 2006, p: 149 – 150.
- [22] *Dynabeads MyOne Streptavidin C1*; <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/65001> 17/05/14.
- [23] Johansson, A.; *Principles and practice of immunoassay*; Stockton Press; Nueva York; 1991.

- [24] Gaillard, C.; Strauss, F.; Association of poly(CA)·poly(TG) DNA fragments into four-stranded complexes bound by HMG 1 and 2; *Science*; 1994, 264 (5157), p: 433 – 436.
- [25] Belotserkovskii, B. P.; Johnston, B. H.; Polypropylene tube surfaces may induce denaturation and multimerization of DNA; *Science*; 1996, 271 (5246), p: 222 – 223.
- [26] Gaillard, C.; Strauss, F.; Avoiding adsorption of DNA to polypropylene tubes and denaturation of short DNA fragments; *Tech. Tips Online*; 1998, 3 (1), p: 63 – 65.
- [27] Howbrook, D.; Sarker, D.; Lloyd, A.; Louwrier, A.; Applications of radio frequency cold plasma treatment of polypropylene PCR plates; *Biotechnol. Lett.*; 2002, 24 (24), p: 2071 – 2074.

# Anexo de tablas

$\log ([\text{Apt-Biot}] / \mu\text{M})$	Absorbancia / U.A.
-3.0	0.022
-2.3	0.105
-2.0	0.165
-1.7	0.255
-1.3	0.579
-1.1	0.819
-1.0	1.033
-0.7	1.075
-0.3	1.284

Tabla 7: Datos correspondientes a la Figura 6, Curva 1.

$\log ([\text{Apt-Biot}] / \mu\text{M})$	Absorbancia / U.A.
-3.0	0.031
-2.3	0.113
-2.0	0.329
-1.7	0.432
-1.3	0.951
-1.1	2.400
-1.0	2.619
-0.7	3.341
-0.3	3.402

Tabla 8: Datos correspondientes a la Figura 6, Curva 2.

$\log ([\text{Apt-Biot}] / \mu\text{M})$	Absorbancia / U.A.
-3.0	0.007
-2.3	0.036
-2.0	0.056
-1.7	0.151
-1.3	0.302
-1.1	0.538
-1.0	0.836
-0.7	1.391
-0.3	2.084

Tabla 9: Datos correspondientes a la Figura 6, Curva 3.

$\log ([\text{Apt-Biot}] / \mu\text{M})$	% Señal	Desviación estándar
-2.30	4.35	2.11
-1.70	7.82	0.71
-1.30	10.13	0.62
-0.70	20.30	5.86
-0.30	32.67	16.88
0.00	38.38	11.60
0.30	32.93	0.52
0.70	72.32	10.98
0.87	100.00	5.67

Tabla 10: Datos correspondientes a la Figura 7.

	0.05 mg	0.15 mg	0.5 mg
$\log ([\text{Apt-B}] / \mu\text{M})$	Abs/U.A.	Abs/U.A.	Abs/U.A.
-2.35	0.000	0.000	0.095
-1.70	0.069	0.094	0.171
-1.30	0.041	0.000	0.222
-1.15	0.078	—	—
-1.00	0.078	—	—
-0.70	0.135	0.143	0.443
-0.30	0.211	0.640	0.713
0.00	0.165	0.831	0.837
0.30	0.245	0.816	0.718
0.70	0.404	1.660	1.578
0.87	0.490	2.905	2.182
1.30	—	3.246	—

Tabla 11: Datos correspondientes a la Figura 8.

$\log ([\text{Apt-Biot}] / \mu\text{M})$	% Señal	Desviación estándar
-2.35	0.00	0.31
-1.75	2.90	0.92
-1.35	0.00	0.22
-0.75	4.16	1.90
-0.35	19.72	—
-0.05	25.59	8.87
0.25	25.13	6.25
0.65	51.15	12.38
0.95	89.51	3.79
1.35	100.00	1.20

Tabla 12: Datos correspondientes a la Figura 9, Curva 750 rpm.

$\log ([\text{Apt-Biot}] / \mu\text{M})$	% Señal	Desviación estándar
-2.75	0.80	0.17
-2.35	1.81	0.88
-2.05	1.98	0.52
-1.57	4.22	1.23
-1.05	11.64	0.52
-0.55	27.57	4.80
-0.27	34.79	3.06
-0.05	68.95	12.22
0.20	82.79	14.52
0.43	88.49	—
0.65	100.00	0.19

Tabla 13: Datos correspondientes a la Figura 9, Curva 1300 rpm.

	0.05 mg	0.15 mg	0.5 mg
$\log ([\text{Apt-B}] / \mu\text{M})$	% Señal	% Señal	% Señal
-2.35	0.00	1.80	0.00
-2.05	0.00	1.98	0.00
-1.57	0.18	4.23	0.38
-1.05	7.69	11.64	12.25
-0.57	11.99	27.57	22.11
-0.27	26.47	34.78	44.93
-0.05	38.94	68.95	—
0.20	38.22	82.79	64.58
0.43	69.04	88.49	86.87
0.65	59.86	100.00	100.00
1.00	100.00	—	—

Tabla 14: Datos correspondientes a la Figura 10.

$\log ([\text{Apt-Biot}] / \mu\text{M})$	% Señal	Desviación estándar
-2.35	1.40	1.08
-2.05	0.37	1.87
-1.57	3.87	4.33
-1.05	4.75	0.65
-0.55	11.53	0.52
-0.27	18.67	1.65
-0.05	28.22	2.59
0.20	28.80	5.16
0.43	46.30	4.85
0.65	94.85	12.19
0.83	80.16	1.92
0.95	100.00	8.35

Tabla 15: Datos correspondientes a la Figura 11.

$\log ([\text{PWG}] / \text{ppb})$	% Señal	Desviación estándar
-1.05	92.41	19.83
-0.05	104.32	6.95
0.96	104.91	25.63
1.96	99.33	10.42
2.96	74.40	37.36
3.96	25.44	30.31

Tabla 16: Datos correspondientes a la Figura 12.