



Universidad de Oviedo

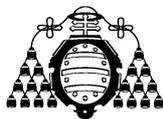
MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

“Nanopartículas de plata como marcadores en genoensayos electroquímicos: detección de organismos modificados genéticamente (OMGs)”

Enrique Albuerne Suárez

Julio 2015, Oviedo



María Jesús Lobo Castañón, Profesora del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado “Nanopartículas de plata como marcadores en genoensayos electroquímicos: detección de organismos modificados genéticamente (OMGs)”

ha sido realizado por el alumno Enrique Albuerne Suárez bajo mi dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2014-15, cuya presentación autorizo.

Oviedo, 15 de Julio de 2015

Fdo: María Jesús Lobo Castañón

ÍNDICE:

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	La problemática de los OMGs y su contexto legislativo	2
1.2	Construcción molecular de OMGs	4
1.3	Métodos de detección de OMGs	6
1.4	Genosensores para la detección de OMGs.....	10
2	OBJETIVOS	13
3	MATERIALES, INSTRUMENTACIÓN Y PROTOCOLOS	15
3.1	Reactivos	16
3.2	Intrumentación	17
3.3	Procedimientos experimentales	18
3.3.1	Síntesis y caracterización de AgNPs	18
3.3.2	Modificación de las AgNPs	19
3.3.3	Preparación de la fase sensora.....	20
3.3.4	Hibridación	20
3.3.5	Detección electroquímica.....	21
4	DISCUSIÓN Y RESULTADOS.....	24
4.1	Descripción del esquema de genoensayo seleccionado	25
4.2	Diseño de las secuencias de nucleótidos empleados en el genoensayo.....	25
4.3	Síntesis, caracterización y funcionalización de las nanopartículas de plata ...	29
4.4	Estudio de las AgNPs como marca electroactiva	35
4.5	Proceso de optimización del genoensayo	37
4.5.1	Preparación de la secuencia indicadora	37
4.5.2	Efecto de la concentración de secuencia indicadora	39
4.6	Características analíticas del genoensayo optimizado	41
5	CONCLUSIONES	42
6	BIBLIOGRAFÍA	44

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LA PROBLEMÁTICA DE LOS OMGs Y SU CONTEXTO LEGISLATIVO

Un organismo genéticamente modificado (OMG) o transgénico es cualquier organismo, con excepción de los seres humanos, cuyo material genético ha sido modificado de una manera que no se produce de forma natural en el apareamiento ni en la recombinación natural.¹

En las últimas décadas, los OMGs han tenido un gran impacto en materia de producción de alimentos. El cultivo de cosechas transgénicas ha crecido rápidamente. En 2001 la superficie cultivada era de más de 40 millones de hectáreas a lo largo del mundo.¹ Una década después, se alcanzó la cifra de 160 millones de hectáreas.² En la figura I, se muestra la distribución de cultivos de OMGs a lo largo del mundo en el año 2011.

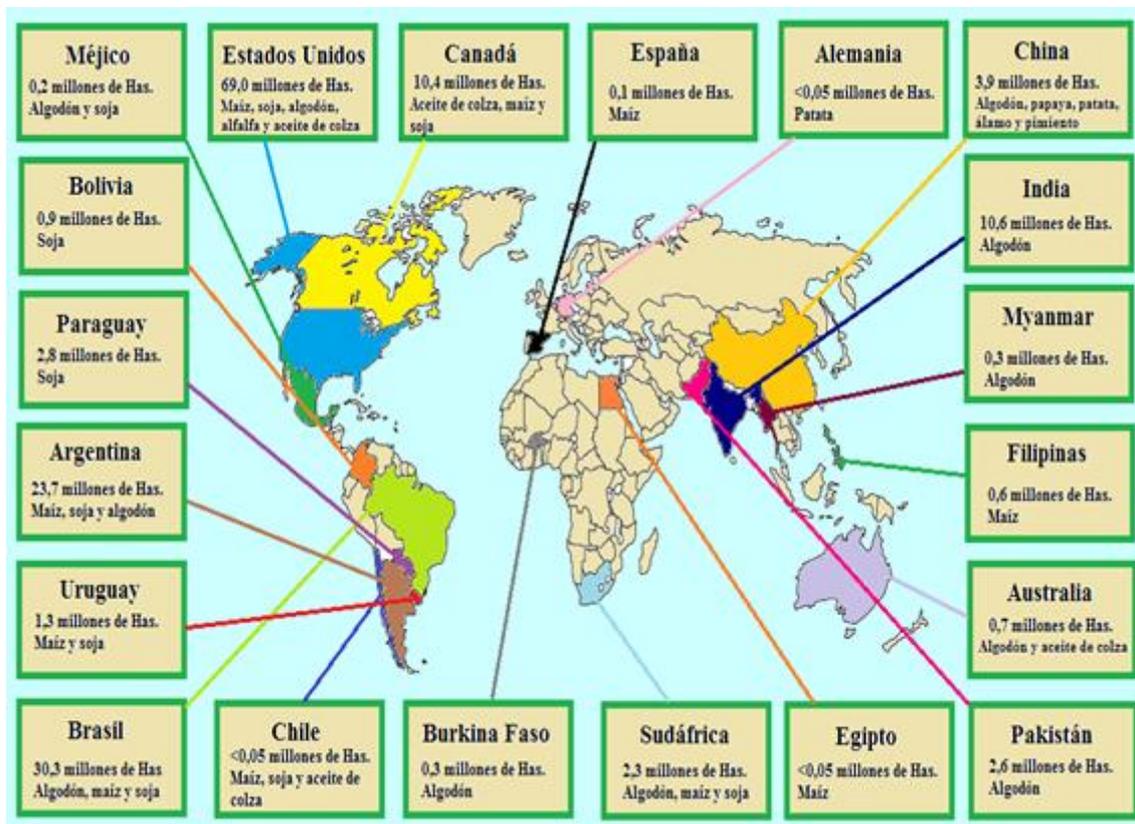


Figura I. Mapa global de los principales cultivos de OMGs en 2011 (Adaptación²)

Esto ha supuesto que el uso de OMGs se convierta en un tema de atención pública en el que surgen dos opiniones contrarias. Por un lado, las compañías biotecnológicas y gran parte de la comunidad científica hablan de los beneficios de los OMGs en la agricultura y la industria alimentaria.

Un ejemplo de esto es la empresa Monsanto, que utiliza la biotecnología y la ingeniería genética para desarrollar nuevas variedades de semillas de plantas que presenten beneficios, como puede ser la resistencia a insectos o a condiciones

climatológicas extremas, con el objetivo de obtener mayores rendimientos en las explotaciones agrícolas. Esta empresa defiende que los OMGs se han utilizado desde 1996 en más de 60 países sin evidencia de que sean perjudiciales para la salud y el medio ambiente.³

Sin embargo, existe otra corriente de pensamiento que se opone al uso de OMGs. Las asociaciones ecologistas siempre han estado preocupadas por el impacto que suponen los OMGs sobre la salud humana y el medioambiente. Como se ha indicado arriba, no existe evidencia de que los OMGs sean perjudiciales pero, aunque controvertidos, sí existen artículos científicos que respaldan esta opinión. Estos artículos explican que, dada la capacidad de los fragmentos de ADN que se insertan en los OMGs de funcionar en una gran gama de bacterias, plantas y animales, estos fragmentos pueden recombinarse para activar virus latentes, crear nuevos virus o causar cáncer por la sobreexpresión de genes normales.⁴

Estos diferentes puntos de vista han desencadenado que los OMGs generen grandes controversias entre los consumidores, que cuestionan si son seguros para su consumo.⁵ En 2006, solo un 25% de la población europea se mostraba optimista frente a ellos, mientras un 58% estaba en contra de ellos y un 17% se encontraba indeciso.⁶

Por esta razón, La UE determina que, a fin de proteger la salud humana y la sanidad animal, los alimentos y piensos que contienen o están compuestos por organismos modificados genéticamente o han sido producidos a partir de ellos deben someterse a una evaluación de la seguridad mediante un procedimiento estandarizado antes de ser comercializados en la Comunidad Europea.⁷

Esta evaluación comprende la descripción del ADN recombinante, la descripción del organismo en el cual se va a insertar y su uso como alimento, la descripción del organismo del que procede el ADN insertado, la descripción y la caracterización de la modificación genética, la evaluación de la seguridad y otras consideraciones.⁸

Todo OMG autorizado debe estar etiquetado claramente como tal, excepto para los alimentos que contengan material que, a su vez, contenga o esté compuesto por OMG o haya sido producido a partir de estos organismos, cuyo contenido no supere el 0,9 % de los ingredientes del alimento considerados individualmente o de los alimentos consistentes en un solo ingrediente, y a condición de que esta presencia sea accidental o técnicamente inevitable. Mientras que, en el caso de OMGs no autorizados, se establece que su contenido no supere el 0,5%.⁷

En línea al rechazo que existe hacía los OMG, la UE establece la posibilidad de que los estados miembros adopten actos jurídicamente vinculantes por los que se restrinja o prohíba el cultivo de OMG en su territorio una vez que se haya autorizado la comercialización de esos OMG en el mercado de la Unión, aunque estas restricciones y prohibiciones no se pueden aplicar a su comercialización.⁹

Además se ha creado un componente fundamental en el marco legislativo vigente, el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea. La misión del Laboratorio Comunitario de Referencia es evaluar y validar los métodos analíticos para garantizar que se ajustan al objetivo de cumplir la normativa.¹⁰

1.2 CONSTRUCCIÓN MOLECULAR DE OMGs

El requisito previo indispensable para la detección de OMGs es el conocimiento de la modificación genética. Por ello, en este apartado se expone cómo se construyen los OMGs y cuáles son las partes en las que se compone la modificación insertada de manera general y de manera particular en el caso del OMG que se plantea detectar en este trabajo: el maíz MON 810.

A. Visión general de la construcción molecular de OMGs:

Los métodos de modificación genética pueden dividirse en clásicos o de ingeniería genética dependiendo de cómo se lleve a cabo la inyección del material genético foráneo que les aporta características distintivas (Tabla I).

Tabla I. Métodos de modificación genética

Métodos clásicos	Selección de genotipos superiores
	Mutaciones
	Selección celular
Ingeniería genética	Introducción de vectores microbianos
	Bombardeo con micropartículas
	Electroporación
	Microinyección

Un gen insertado en una modificación genética se divide en tres regiones (figura II):

- ✚ Región promotora: Especifica cuándo y en qué cantidad se expresa la región codificadora (por ejemplo la PEP carboxilasa hace que el gen sólo se exprese en las partes verdes de las plantas).
- ✚ Región codificadora: Contiene la información necesaria para que se exprese la proteína que aporta la característica de mejora al producto transgénico.
- ✚ Región terminadora: Contiene las señales que indican a la ARN polimerasa que debe parar de transcribir.

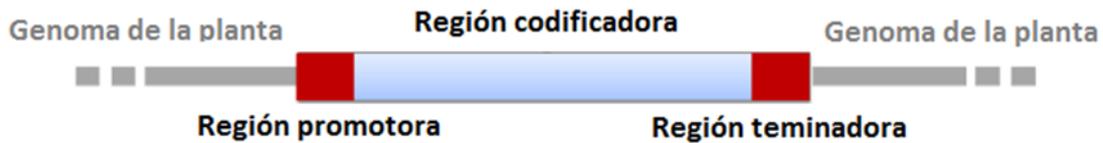


Figura II. Esquema de la construcción de un OMG

B. Maíz MON 810:

El MON 810 es un tipo de maíz modificado genéticamente desarrollado por la compañía Monsanto con el objetivo de proporcionar resistencia frente a los insectos al maíz (figura III).¹¹

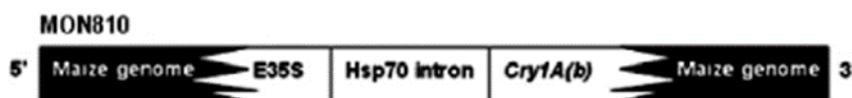


Figura III. Estructura del MON 810

La técnica de ingeniería genética que se usa para la inserción del gen que lo caracteriza es el bombardeo con micropartículas. En este método, se recubren micropartículas de oro o de tungsteno con el ADN, las cuales son aceleradas en un “cañón génico” para adquirir suficiente velocidad y poder penetrar en la célula. La eficiencia del bombardeo con micropartículas depende de un gran número de factores físicos, biológicos y ambientales. Estos parámetros incluyen la concentración de micropartículas y de ADN, las condiciones de aceleración, la distancia al objetivo, las condiciones del cultivo antes y después del bombardeo y del tipo y condiciones fisiológicas del explanto (pequeño fragmento de una planta que se escinde y se prepara de forma aséptica para su cultivo). Además de esto, también es importante la elección de un gen promotor fuerte.¹²

Como se observa en la figura I, el gen promotor que se inserta en este evento particular es el 35S, que se encuentra unido al intrón Hsp70. El promotor 35S procede del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). El CaMV ha sido uno de los principales sistemas fitogénicos que se han estudiado por su potencial uso en la transformación de plantas. Su genoma fue la primera parte significativa del ADN de una planta en ser totalmente secuenciada y sus dos principales promotores, el 35S y el 19S, fueron los primeros promotores identificados en plantas. El promotor 35S es activo en la dirección de expresiones heterólogas de genes de plantas en una gran variedad de plantas, por lo que es uno de los más utilizados en el desarrollo de plantas genéticamente modificadas.¹³ Por otra parte el intrón Hsp70 codifica a la proteína Hsp70, que es la proteína de choque térmico más típica. Las proteínas de choque térmico son un conjunto de proteínas que producen las células cuando se encuentran en un ambiente de estrés (por ejemplo por una subida de temperatura).¹⁴ El promotor 35S y el intrón Hsp70 dirigen la expresión del gen Cry1A(b).

El gen Cry1A(b) se obtiene de la bacteria *Bacillus thuringiensis* que es una bacteria Gram-positiva que tiene la capacidad de producir proteínas Cry, también llamadas cristales de proteínas, durante la esporulación. Estas proteínas poseen una actividad insecticida altamente específica. Existen más de 40 variantes de genes que producen estas proteínas. Las proteínas producidas por los genes Cry1A, como es el caso, producen toxinas específicas para larvas de lepidópteros.¹⁵ La Cry1A(b) produce concretamente la endotoxina BT.¹⁶

El terminador es el 35S, pero se perdió durante el truncamiento 3' en la inserción del gen.¹¹

El número total de bases nitrogenadas insertadas es de 3591, de las cuales 328 pertenecen al promotor 35S, 806 al intrón Hsp70 y 2457 al gen Cry1A(b).¹¹

1.3 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE OMGs

La base de todas las técnicas de detección de OMGs consiste en la diferencia entre la variedad no modificada y el organismo transgénico. Su detección se puede conseguir detectando el ADN transgénico insertado, detectando la nueva proteína expresada o, en el caso de que la proteína actúe como enzima, utilizando el análisis químico para detectar el producto de la acción enzimática.

A. Métodos basados en la determinación de la proteína expresada:

Los métodos basados en la determinación de las proteínas estarían principalmente conformados por los métodos inmunoquímicos (ELISA), el western blot y la espectrometría de masas. Los métodos inmunoquímicos permiten estudiar la presencia de proteínas específicas gracias a la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo. El problema de esta metodología es su baja selectividad en el caso de emplear anticuerpos policlonales y su alto coste en el caso de emplear anticuerpos monoclonales. La espectrometría de masas y el western blot pueden también analizar proteínas pero son técnicas que de momento están muy lejos de cumplir los requisitos impuestos por la UE.¹⁷

B. Métodos basados en la determinación del ADN insertado:

En el apartado 1.2. se ha explicado la construcción molecular de un OMG. La detección de un OMG depende en gran parte de conocer la secuencia insertada y su entorno. Dependiendo de la parte del ADN del OMG que se detecte, se puede hacer una clasificación de los métodos basados en la determinación del ADN según su especificidad, en función a la secuencia diana que se escoja (figura IV).¹⁸

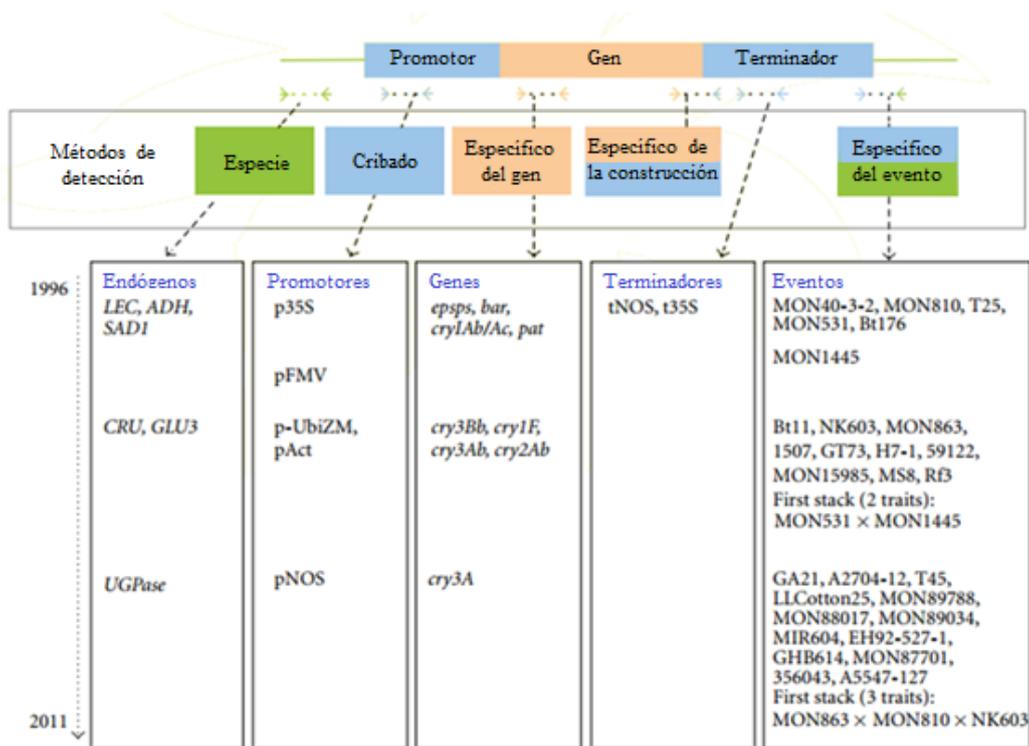


Figura IV. Métodos basados en la detección del ADN según su especificidad y algunos ejemplos (adaptado¹⁸)

En primer lugar tenemos los métodos de detección de la especie, en la que la totalidad de la secuencia diana pertenece al organismo sin modificar, por lo que no nos permite determinar si el organismo se encuentra modificado genéticamente. Los ensayos dirigidos contra esta secuencia se utilizan como ensayos de referencia para cuantificar que proporción del ADN específico de una especie corresponde al material transgénico. A continuación se encuentran los métodos de cribado, cuyas secuencias dianas pertenecen a los promotores y terminadores más típicos. Estos métodos permiten detectar la presencia de OMGs de manera general. Por otro lado, los métodos específicos de gen nos permiten detectar la cantidad insertada de un determinado gen. Después, los específicos de la construcción utilizan como secuencia diana una parte del promotor o del terminador junto a una parte del gen insertado. Y por último, los métodos específicos de evento son los que presentan una mayor selectividad, ya que utilizan como secuencia diana una parte del ADN insertado y una parte del ADN propio de la especie.¹⁹

Aunque existen varias técnicas que permiten detectar secuencias específicas de ADN, la más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR usa la especificidad de la ADN polimerasa para permitir la amplificación selectiva de segmentos de ADN específicos. En una PCR estándar se utilizan dos cebadores: uno en sentido 5'-3' y otro a la inversa, 3'-5'. Estos cebadores están diseñados para unirse a los extremos de la cadena de interés y, mediante una serie de ciclos, amplificar la secuencia que se encuentra entre los cebadores millones de veces.

Estos ciclos se componen de tres etapas en las que se varía la temperatura: Desnaturalización del ADN ($T \approx 95 \text{ }^\circ\text{C}$), hibridación con cebadores ($T \approx 54 \text{ }^\circ\text{C}$) y extensión ($T \approx 72 \text{ }^\circ\text{C}$). Después, los segmentos amplificados se separan en función de su tamaño por electroforesis en gel de agarosa o incluso por cromatografía de alta resolución (HPLC) o electroforesis capilar (CE).¹⁷

El problema de la PCR tradicional es que, debido a diversos factores, la eficacia de la amplificación no es nunca del 100%, por lo que la ecuación teórica que describiría la relación entre el número de copias de la secuencia diana inicial y final, $N = N_0 \cdot (2)^n$, se convierte en $N = N_0 \cdot (1+E)^n$, donde N y N_0 son el número final e inicial de copias respectivamente, n es el número de ciclos y E es la eficiencia real de la amplificación. El valor de E depende de la composición de la muestra (presencia de inhibidores), de las secuencias de los cebadores y de la diana y, sobre todo, del número de ciclos (figura V). Esta dependencia se hace especialmente relevante cuando se alcanza la fase de “meseta”, donde no se produce un incremento neto de ADN después de cada ciclo adicional, debido a la inactivación de la ADN polimerasa, el agotamiento de reactivos y la competición creciente entre cebadores y hebras sintetizadas en anteriores ciclos en la etapa de hibridación con los cebadores. Esto hace imposible el establecimiento de una relación directa entre concentración inicial y final de ADN diana.¹⁶ Para solucionar este problema se han desarrollado métodos cuantitativos de PCR entre los que destaca la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR).

Cómo se ha indicado en el apartado 1.1., el Laboratorio de Referencia recoge todos los métodos validados para OMGs regulados por la UE. Todos los métodos validados o en proceso de validación se realizan mediante qRT-PCR.

En qRT-PCR las medidas se obtienen en la parte inicial de la amplificación, donde la amplificación sí es exponencial (figura V) por lo que sí se puede establecer una relación directa entre concentración inicial y final de ADN diana. La detección es indirecta a través de la medición de fluorescencia de marcas o intercalantes que se encuentran unidos a secuencias sonda. Las sondas más utilizadas son la Taqman y la Beacons.¹⁹ La cuantificación se establece a partir de la medida del número de ciclos necesarios para alcanzar una señal de fluorescencia umbral. Este número de ciclos aumenta a medida que disminuye el número de copias de partida de la secuencia de ADN amplificada (N_0).

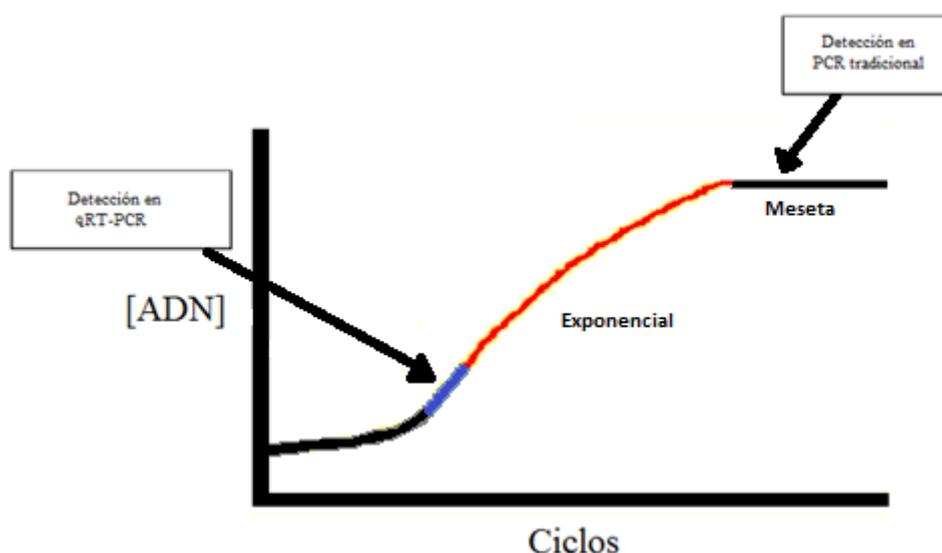


Figura V. Crecimiento de la [ADN] en función del número de ciclos en PCR

En la tabla II se resumen las ventajas e inconvenientes de los métodos descritos hasta ahora.

Tabla II. Resumen de los métodos empleados en la detección de OMGs¹⁷

Parámetros	Métodos basados en la detección de proteínas		Métodos basados en la detección de ADN		
	Western blot	ELISA	Southern blot	PCR	qRT-PCR
Dificultad de uso	Alta	Moderada	Alta	Alta	Alta
Necesidad de equipamiento especial	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Sensibilidad	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Duración	2 días	30 – 90 minutos	6 horas	2 días	1 día
Coste por muestra (US\$)	150	5	150	350	450
Resultados cuantitativos	No	Sí	No	No	Sí
Posibilidad de detección in situ	No	Sí	No	No	No

La qRT-PCR es hasta el momento el método más adecuado para el análisis, aunque presenta exigencias de instrumentación cara y personal altamente cualificado. Desarrollar un método más adecuado que la qRT-PCR, dada su alta sensibilidad, es complicado, aunque en los últimos años la investigación en biosensores (genosensores en este caso) unida al desarrollo de nanomateriales constituye una alternativa interesante desde el punto de vista económico y de la sencillez.

1.4 GENOSENSORES PARA LA DETECCIÓN DE OMGs

A. Definición de genosensor:

Un genosensor es un sensor que utiliza la reacción de hibridación entre secuencias de ADN complementarias como reacción de reconocimiento molecular. Por tanto el elemento de reconocimiento que constituye la capa selectiva es una molécula de ADN corta (oligonucleótido), complementaria a la molécula diana, inmovilizada sobre la superficie de un transductor. El transductor puede ser de varios tipos: óptico, piezoeléctrico o electroquímico.²⁰ Este trabajo se centra en este último tipo.

B. Inmovilización de la sonda:

El método seleccionado de inmovilización de la sonda es determinante para el desarrollo del genosensor. Su elección depende de la naturaleza del transductor. Los métodos más relevantes son:

- ✚ Adsorción física: Este método destaca por su sencillez pero se utiliza poco en genosensores debido a que la orientación de la sonda se produce al azar y esto dificulta el proceso de hibridación con la diana.
- ✚ Incorporación a bicapas lipídicas: Se han incorporado oligonucleótidos modificados con alcanos de cadena larga a bicapas lipídicas formadas sobre distintos metales.
- ✚ Quimisorción: En este caso se busca emular los procesos de reconocimiento molecular que ocurren en los seres vivos. En este tipo de inmovilización destaca el uso de monocapas autoensambladas de hebras tioladas sobre metales nobles.
- ✚ Enlace de afinidad: El enlace de afinidad más utilizado es el compuesto por el sistema biotina-estreptavidina. Este sistema es la interacción no covalente más fuerte conocida, con una constante de disociación, K_d , del orden de $4 \cdot 10^{-14}$ M lo que le ha llevado a ser comúnmente usado en ensayos moleculares o en inmunoensayos entre otros.²²

Una alternativa que surge en el proceso de inmovilización, es el uso de partículas magnéticas como soporte de la capa selectiva.²¹ La principal ventaja que presenta esta alternativa es la facilidad con la que se verifican las etapas de separación y lavado, minimizando así la contribución de las interacciones inespecíficas a la señal medida.

C. Métodos de detección electroquímicos de la reacción de hibridación:

La señal empleada para la cuantificación de los ácidos nucleicos se puede generar, después de que se haya producido la reacción de hibridación, de muy diversas maneras. Como se ha comentado arriba, este trabajo se centra en los métodos de transducción electroquímicos. Dentro de este grupo, existen varias estrategias que se

dividen en dos categorías: ensayos basados en el empleo de sondas marcadas y ensayos que no utilizan marcadores.²³

i. Sensores sin marcadores (label-free sensors):

Los métodos de detección de ADN en los que no se usan marcas se conocen como métodos directos (figura VI, i). Dentro de este grupo se encuentran los sensores basados en la electroactividad intrínseca de los ácidos nucleicos (de las nucleobases principalmente). Esta señal decrece con la reacción de hibridación ya que las nucleobases en el interior de la doble hélice se oxidan en menor medida que las que forman parte de hebras sencillas (signal off). Otra alternativa sería la detección voltamétrica de una molécula electroactiva externa (indicador de hibridación o agente intercalante) que presenta una mayor afinidad por el ADN de cadena doble que por el de cadena simple (complejos metálicos o compuestos orgánicos como el azul de metileno). No se consideran marcas ya que no se encuentran unidas covalentemente al ADN. La otra alternativa es la espectroscopía de impedancia electroquímica que es particularmente adecuada para estudiar reacciones de hibridación ya que es muy sensible a cambios en la interfase electrodo-disolución.

ii. Sensores basados en el empleo de marcadores (labeled approaches):

La estrategia más común es el formato sándwich (Figura VI, ii) en el que existe una segunda sonda (indicadora), que se encuentra marcada, complementaria a un segmento de la diana que no esté implicado en la hibridación con la sonda de captura. Después de la hibridación y separación se procede a la detección de la marca cuya concentración es proporcional a la de la diana.

También existen estrategias basadas en el empleo de marcadores en las que se mide un decrecimiento de la señal. Un ejemplo es el uso de sondas de captura en forma de horquilla marcadas en las que la hibridación provoca la apertura de la horquilla y produce una disminución de señal al producirse el aumento de la distancia entre la marca y la superficie electródica (figura VI, iii). Otro ejemplo es el uso de una hebra marcada que sea parcialmente complementaria a la sonda de captura y que por tanto, presente menor estringencia que la diana y sea desplazada por ella produciéndose un decrecimiento de la señal (figura VI, iv).

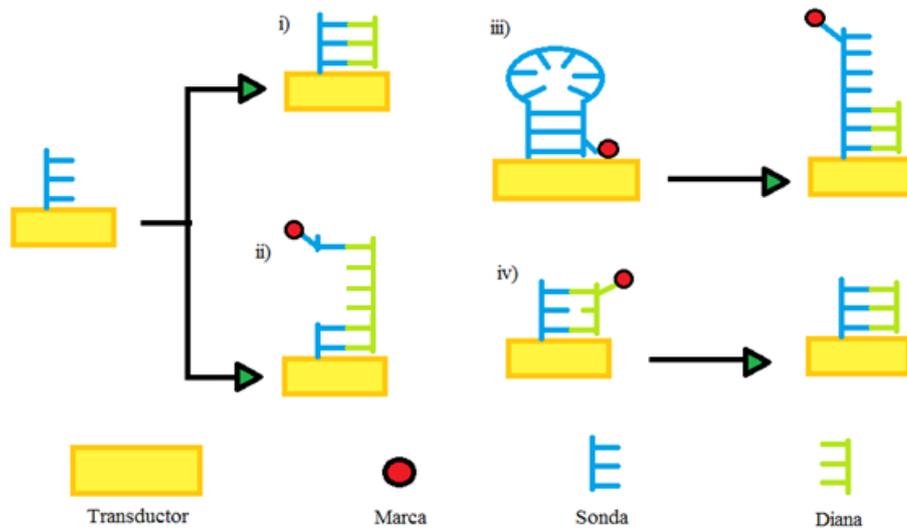


Figura VI) Estrategias de detección electroquímica de la hibridación

Existen diversas marcas útiles para la posterior transducción electroquímica que se pueden usar:

- ✚ Marcas enzimáticas.²⁴ Estas marcas se denominan indirectas porque no son electroactivas, sino que catalizan una reacción que produce un producto que sí lo es. Las más utilizadas son la peroxidasa (HRP) y la fosfatasa alcalina.
- ✚ Marcas electroactivas. Son marcas que se miden directamente como por ejemplo, el ferroceno. En este último grupo entran también las nanopartículas de metales nobles.

Las nanopartículas de metales nobles (oro y plata) atraen cada vez más atención en el ámbito de la biotecnología y la biomedicina ya que muestran propiedades químicas y físicas diferentes como gran área superficial, resonancia de plasmón superficial, propiedades catalíticas, propiedades electroquímicas y efectos de tamaño cuántico que pueden contribuir a la amplificación de la señal en bioensayos.^{25,26}

Las AgNPs presentan un coeficiente de extinción molar mayor que el de las nanopartículas de oro del mismo tamaño. Además, las AgNPs se oxidan electroquímicamente más fácilmente y presentan mejoras en Raman y en fluorescencia respecto a las de oro. A pesar de esto, las AgNPs atraen mucha menos atención que las AuNPs debido a su inestabilidad y dificultad de funcionalización.

En los últimos años, los métodos de síntesis y funcionalización de nanopartículas de plata han mejorado. Cadenas simples de ADN o ARN pueden unirse a las nanopartículas de oro o plata por autoensamblaje de SH. Esta funcionalización está muy optimizada para las de oro aunque aún se está desarrollando en el caso de las de plata.²⁵

2 OBJETIVOS

Como se ha expuesto en la introducción, los alimentos o ingredientes que contengan OMGs deben venir adecuadamente etiquetados por la incertidumbre y el rechazo que genera la posibilidad de que sean nocivos para la salud y la biodiversidad. Por ello, es necesario el desarrollo de métodos que permitan una detección rápida, sencilla y de bajo coste.

Los genosensores constituyen una excelente alternativa para detectar secuencias específicas de ADN que identifiquen el material modificado genéticamente. Sin embargo, el problema que se plantea tiene unos requerimientos de sensibilidad extrema. Para alcanzarlos suele ser habitual el uso de enzimas como marcadores, ya que estas permiten la amplificación de la señal con lo que se alcanzan límites de detección sub-pM sin procesos de amplificación previa.

En este trabajo, que se enmarca en el proyecto GMOsensor del programa Marie Curie IRSES, financiado por la Comunidad Europea, se plantea como objetivo general explorar las posibilidades que ofrecen las nanopartículas de plata (AgNPs) como alternativa a las enzimas para su empleo como marcas en el desarrollo de genoensayos con formato tipo sándwich y detección electroquímica. Se seleccionó como diana modelo un fragmento del maíz modificado genéticamente MON 810 con el objetivo de obtener un genoensayo que permita detectar este producto transgénico.

Con este fin, se han fijado los siguientes objetivos:

- i. Realizar la síntesis y caracterización de nanopartículas de plata para su uso como etiqueta en la sonda indicadora con el objetivo de aprovechar la alta sensibilidad que proporciona su redisolución en HNO_3 y medida directa de Ag^+ sobre electrodos de carbono vitrificado.
- ii. Desarrollo de un genoensayo para la detección del maíz MON 810 con formato sándwich que utilice la interacción biotina-estreptavidina para inmovilizar la secuencia de captura y la interacción S-Ag para obtener la secuencia indicadora y así conseguir la orientación adecuada de las hebras y una alta eficacia en la hibridación.
- iii. Optimización de las características de diseño del genoensayo y evaluación de las características de respuesta del mismo.

3 MATERIALES, INSTRUMENTACIÓN Y PROTOCOLOS

3.1 REACTIVOS

Las secuencias de oligonucleótidos empleadas en este trabajo fueron sintetizadas por IDT (Integrated DNA Technologies). Sus secuencias de bases se especifican en la tabla III.

Tabla III. Secuencias y función de oligonucleótidos empleados.

Función	Secuencia de 5' a 3'
Sonda de captura	TTA GAGTCC TTC GTC CTT CGA – Biotina*
Sonda indicadora	HS-TCT TCA CAA TAA AGT GAC AGA TAG CTG GGC AAT GGC AAA GGA TGT TAA ACG
Sonda analito	TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CGT TTA ACATCC TTT GCC ATT GCC CAG CTATCT GTC ACT TTA TTG TGA AGA

El oligonucleótido modificado con el grupo tiol se suministra en forma protegida con un grupo disulfuro para minimizar la oxidación que conduciría a la formación de disulfuros entre las propias hebras de ADN. Antes de realizar el ensayo es necesario, por tanto, reducir el grupo disulfuro con ditioneitol (DTT). Esta reducción se lleva a cabo en el propio vial del oligonucleótido en presencia de 100 μ L de DTT 0,1 M en agua Milli-Q. La mezcla se deja reaccionar a temperatura ambiente durante, al menos, 16 horas. Seguidamente, se añaden 900 μ L de agua Milli-Q y la disolución se purifica en una columna de exclusión por tamaños NAP-10 Sephadex G-25 DNA Grade (GE Healthcare): en la equilibración del lecho de la columna se emplean 15 mL de agua Milli-Q, a continuación se añade la disolución del oligonucleótido (1 mL) y la muestra purificada se eluye con 1,5 mL de agua Milli-Q. La concentración del oligonucleótido tiolado se determina por medida espectrofotométrica a 260 nm.

Otros reactivos generales utilizados en el trabajo se resumen en la tabla IV.

Tabla IV. Disoluciones y reactivos empleados en el ensayo.

Reactivo	Pureza	Casa comercial
SSPE 20X *		Sigma-Aldrich
Tween 20	70%	Sigma-Aldrich
Albúmina de suero bovino	99%	Sigma-Aldrich
AgNO₃		Fluka
NaBH₄		Sigma-Aldrich
Citrato de sodio		Merck
Partículas magnéticas mod. Con estreptavidina (10mg/L)		Invitrogen
Na₂HPO₄		Horkin & Williams
NaH₂PO₄		Horkin & Williams
KNO₃		Sigma-Aldrich
HNO₃	65%	Merck

*El SSPE 20X es una disolución reguladora de fosfato 0,2M de pH 7,4 que contiene 2,98M de NaCl y 0,02M de EDTA.

3.2 INSTRUMENTACIÓN

La señal electroquímica se mide por medio de un potenciostato μ AUTOLAB type II controlado por un equipo informático que lleva incorporado el software GPES 4.9.

Se trabaja con electrodos de carbono vitrificado de la casa comercial Metrohm modelo 6.1204.110 que tienen una superficie de carbono vitrificado de 2mm de diámetro (figura VII). El electrodo de referencia es un electrodo de Ag/AgCl en KCl 3 M y el electrodo auxiliar es un hilo de platino. Estos dos electrodos se disponen en una celda convencional mientras que el electrodo de trabajo se sitúa en una microcelda de metacrilato diseñada por el laboratorio.

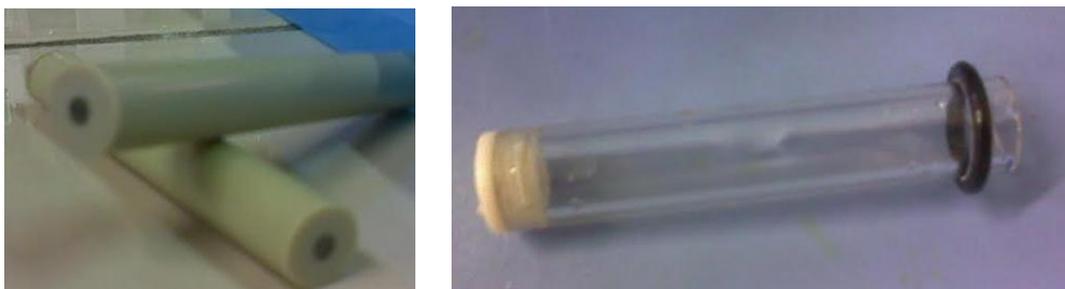


Figura VII. Electrodos de carbón vitrificado y microcelda utilizados

La caracterización de la banda del plasmón superficial de las AgNPs se realiza en un espectrofotómetro de la casa comercial Thermo Scientific modelo Genesys 10S UV-VIS (figura) y con una celda de la marca comercial Sigma de cuarzo con un volumen de 50 μ L y 10 mm de paso óptico (figura VIII).



Figura VIII. Espectrofotómetro y celda utilizados

Para la caracterización de las AgNPs también se utilizan el microscopio electrónico de transmisión (MET JEOL-2000 EX-II) y el equipo de espectroscopía de correlación de fotones de la marca comercial Malvern modelo Zetasizer Nano S controlado por un equipo informático que lleva incorporado el software Zetasizer.

Para la preconcentración de las AgNPs y la separación del ADN no enlazado a ellas se utiliza una centrifuga de la marca Thermo Scientific modelo Heraeus multifuge 1L-R.

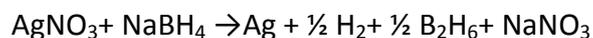
Los procesos de separación de las partículas magnéticas se realizan en un separador magnético de la marca Invitrogen.

3.3 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3.3.1 Síntesis y caracterización de AgNPs

a) Síntesis:

Las nanopartículas de plata fueron sintetizadas empleando una modificación del método descrito por *Ung et al*²⁷ pero con pequeñas modificaciones²⁹. Este método consiste en la reducción de la plata por el borohidruro de sodio:



Además, se hace en presencia de citrato que actúa de modificador superficial para estabilizar las nanopartículas y evitar su agregación.

Se lava el material que se va a usar con agua regia (HCl, HNO₃ (3:1 v/v)) y agua destilada. Se añade 1 mL de borohidruro de sodio 50 mM (preparado en el momento y en agua fría para evitar su descomposición) a una disolución en baño de hielo de citrato de sodio 0,3 mM bajo agitación (400rpm) y un minuto después se le añade 1 mL de nitrato de plata 10 mM³⁰. El valor de la relación entre la concentración de borohidruro de sodio y nitrato de plata es siempre mayor de uno para reducir la cantidad de plata iónica y estabilizar el crecimiento de las nanopartículas²⁹. La reacción sigue una serie de etapas bien definidas visualmente²⁹. En un primer momento se observa de manera casi instantánea la aparición de un color negro que nos indica la formación de partículas grandes. Después, la disolución pasa a tener un color amarillo que se corresponde con la formación de nanopartículas de alrededor de 10 nm de diámetro. Transcurrido un minuto, se detiene la agitación y se guardan las nanopartículas aisladas de la luz.

b) Caracterización:

Las nanopartículas de plata se caracterizaron por tres métodos: Espectrofotometría UV-VIS, espectroscopía de correlación de fotones (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

i. Espectrofotometría UV-VIS:

La longitud de onda de máxima absorbancia (λ_{\max}) se encuentra aproximadamente entre los 402 y 404 nm, que se relaciona con la excitación del plasmón superficial dipolar de esferas de plata cuyo radio se encuentre entre 10-20nm en agua.¹ Una anchura a la semialtura de 53-57 nm indica una monodispersidad moderada entre los tamaños de las nanopartículas.²⁷ Las nanopartículas son cuantificadas utilizando un coeficiente de extinción molar de $\epsilon = 2,87 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.³⁰

ii. Espectroscopía de correlación de fotones (*Dynamic light scattering* (DLS)):

DLS es una técnica no destructiva para la medida de nanopartículas en suspensión. Esta técnica mide las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada por una suspensión que sigue un movimiento browniano (movimiento aleatorio que se observa en algunas partículas microscópicas que se hallan en un medio fluido). El análisis de estas fluctuaciones conlleva la determinación de los coeficientes de difusión, con los que se obtienen los tamaños de las partículas a través de la ecuación de Stokes- Einstein.³²

DLS proporciona la medida del diámetro hidrodinámico y la distribución de tamaños de las partículas de plata. La medida se hace a 25 °C y el ángulo de dispersión es de 173 °. Se realizan las medidas por triplicado para asegurarse de que el ruido en los datos es menor del 0,1%.³¹

iii. Microscopía electrónica de transmisión (TEM):

Se hace gotear la suspensión de nanopartículas de plata sobre una gradilla de TEM y se deja secar. No se adiciona ninguna disolución tampón o sal. El tamaño de partícula y la distribución de tamaños se determinan manualmente a partir de las imágenes.

3.3.2 Modificación de las AgNPs

Primero se realiza una preconcentración de nanopartículas de plata (Esquema 1, etapa 1). Se centrifugan las nanopartículas a 18.600 G durante 45 minutos a 4 °C y se eliminan cuatro quintas partes del sobrenadante.

A 500 μL de estas partículas se le añade el volumen necesario de sonda indicadora tiolada y de una secuencia de veintidós adeninas también tiolada para tener una concentración de 0,5 μM de cada una. La modificación se realiza en un buffer de

citrato 0,5 M de pH 3 (HCl). A bajo pH, la densidad de carga de las nanopartículas de plata disminuye y algunas bases del ADN, como la adenina o la citosina, se protonan por lo que disminuye la repulsión de cargas entre el ADN y las nanopartículas.²⁸ Se adiciona buffer hasta alcanzar una concentración de 5 mM y cinco minutos después se añade la misma cantidad para alcanzar una concentración de 10 mM y se incuba durante 25 minutos bajo agitación.²⁹ A continuación, se neutraliza el medio añadiendo 90 μ L de una disolución tampón de fosfatos (0,5 M) de pH 7.

Se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones para eliminar el ADN no enlazado y se reconstituyen las nanopartículas en 500 μ L de SSPE 2X. Se centrifuga una vez más y se reconstituye en la mitad del volumen para volver a concentrar las nanopartículas de plata ya modificadas.

La suspensión de nanopartículas de plata modificadas se caracteriza por espectrofotometría UV-VIS.

3.3.3 Preparación de la fase sensora

La fase sensora está constituida por una secuencia oligonucleotídica corta, modificada en un extremo con biotina, inmovilizada sobre magnéticas (Esquema I, etapa 2). Su preparación se realiza de acuerdo con el siguiente protocolo.^{33 y 34}

100 μ L de la disolución de partículas magnéticas modificadas con estreptavidina comerciales son adicionados a 900 μ L de una disolución de SSPE-T (SSPE 2X con un 0,005% de Tween 20 que es un tensoactivo). Se agitan en vortex y posteriormente se separan las partículas magnéticas mediante un imán.

Se realizan dos lavados con 1000 μ L de SSPE-T.

Se separan las partículas magnéticas y se reconstituyen en 100 μ L de la disolución de sonda de captura biotinizada (3') (10 μ M) y 900 μ L de SSPE-T.

Se incuban durante 30 minutos en agitador rotatorio.

3.3.4 Hibridación

Una vez que se ha preparado la fase sensora y se han modificado las nanopartículas de plata con la sonda indicadora, se propone el empleo de un ensayo de hibridación con formato sándwich en el que se realizan dos etapas de hibridación sucesivas.

✚ Primera hibridación (Esquema I, etapa 1):

En un tubo eppendorf se añade un volumen adecuado de la disolución que contiene la secuencia diana, 50 μL de la disolución de nanopartículas de plata modificadas con la sonda indicadora y el volumen adecuado de SSPE 2X con un 2,5% de BSA, que sirve de bloqueante. Se incuba en el agitador rotatorio durante 30 minutos aislado de la luz, ya que la plata se degrada en su presencia.

✚ Segunda hibridación (Esquema I, etapa 3):

Una vez terminada la primera etapa de hibridación, 100 μL de la fase sensora son adicionados a 400 μL de SSPE 2X con un 2,5% de BSA. Se realizan tres lavados con 1mL de SSPE-T.

Se separan las partículas magnéticas y se reconstituyen en los 500 μL que contienen la sonda indicadora y la diana y se incuban durante 30 minutos aislados de la luz. A continuación, se realizan tres lavados con 1mL de KNO_3 0,5M.

Por último, se separan las partículas magnéticas y se reconstituyen en 650 μL de una disolución de HNO_3 0,1 M (Esquema I, etapa 4). Se agitan durante 10 minutos en el rotatorio para disolver las nanopartículas de plata y se separa el sobrenadante para su medida.

3.3.5 Detección electroquímica

Para realizar las medidas, se usan la técnica electroquímica de redisolución anódica y voltamperometría de onda cuadrada (Esquema I, etapa 5).³⁵

La redisolución anódica consiste en la electrodeposición catódica de la Ag^+ seguida de su redisolución anódica con un barrido de potencial para la detección de dichos iones. En este caso, se utiliza la voltamperometría de onda cuadrada. La señal de excitación empleada durante el proceso de medida se muestra esquemáticamente en la figura IX.

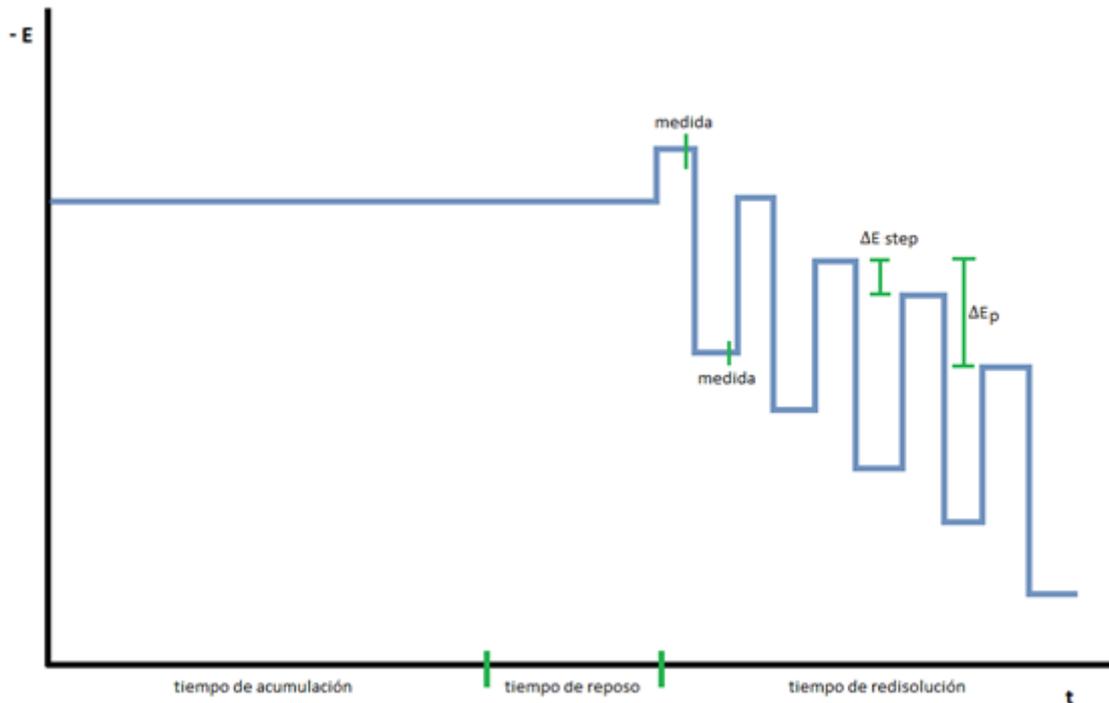
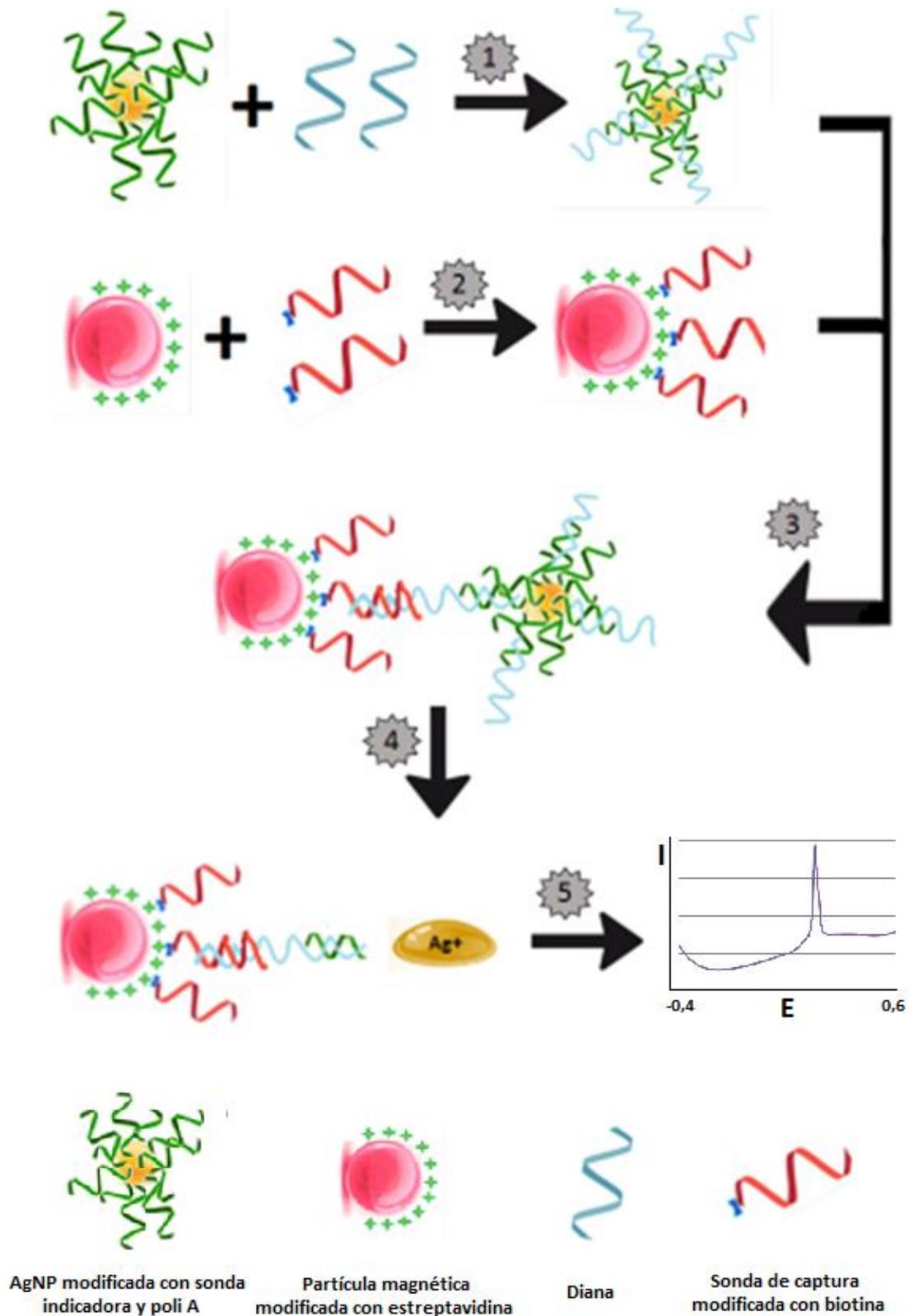


Figura IX. Fundamento esquemático de la voltamperometría de redisolución anódica

Durante el tiempo de acumulación (180s bajo agitación) se aplica un potencial constante negativo, al que se pueda electrodepositar la plata (-0,4V). A continuación, se detiene la agitación y se pasa al tiempo de reposo en el que se consigue que la concentración del metal sobre la superficie del electrodo sea uniforme (10s). Por último se hace una voltamperometría de onda cuadrada a potenciales más positivos (+0,6V) consiguiéndose la redisolución de la plata metal. La $i_{\text{anódica}}$ es proporcional a la concentración. Para la redisolución se utiliza la voltamperometría de onda cuadrada por su alta sensibilidad. Se realiza con un escalón de potencial de 5 mV, una amplitud de pulso de 25 mV y una frecuencia de 10Hz.



Esquema I. Esquema que resume todos los pasos del procedimiento experimental.
1) Primera hibridación, **2)** Preparación de la fase sensora, **3)** Segunda hibridación,
4) Redisolución de las nanopartículas de plata y **5)** Detección.

4 DISCUSIÓN Y RESULTADOS

4.1 DESCRIPCIÓN DEL ESQUEMA DE GENOENSAYO SELECCIONADO

La estrategia general seleccionada para el diseño del genoensayo para una secuencia específica del maíz MON810 se resume en el esquema I. Aunque el protocolo de ensayo ha quedado reflejado en la sección 3 de esta memoria, se resumen a continuación los criterios generales empleados en el diseño.

Como soporte de la fase sensora se han utilizado partículas magnéticas modificadas con estreptavidina que por un lado facilitan la inmovilización de la secuencia de captura (modificada en su extremo 3' con una molécula de biotina) a través de la interacción de afinidad biotina-estreptavidina, y por otro lado permiten implementar de forma fácil y eficaz sucesivas etapas de lavado con el objeto de minimizar interacciones inespecíficas. Para obtener la máxima selectividad de respuesta se optó por el empleo de un formato de ensayo sándwich, que exige diseñar dos secuencias oligonucleotídicas complementarias al fragmento de ADN seleccionado como diana. La reacción de reconocimiento molecular se realiza en dos etapas: interacción de ADN diana con la secuencia indicadora marcada con nanopartículas de plata e interacción del complejo formado con la secuencia de captura inmovilizada sobre las partículas magnéticas. Tras este doble proceso de reconocimiento se obtendrá sobre la superficie de las partículas magnéticas un dúplex de DNA ternario con una nanopartícula de plata terminal. La disolución de las nanopartículas de plata específicamente enlazadas a la superficie de las micropartículas magnéticas y la posterior determinación de los iones Ag^+ generados mediante voltamperometría de redisolución anódica sobre electrodos de carbono vitrificado genera la señal analítica, que se correlaciona directamente con la cantidad de ADN diana presente en la muestra de partida.

4.2 DISEÑO DE LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS EMPLEADOS EN EL GENOENSAYO

El proceso de diseño de un genoensayo comienza con la elección de la secuencia de nucleótidos que se va a usar como diana. En el apartado 1.2. se han explicado cómo se clasifican los métodos de detección de OMGs según su especificidad. El método validado para la detección del MON 810 es un método de qRT-PCR específico de evento que utiliza como diana parte del genoma del maíz y parte del promotor 35S.

Este método validado para el MON 810 por el laboratorio de referencia³⁶ utiliza como diana una secuencia de 92 nucleótidos que no tiene reactividad cruzada y cuyos cebadores son:

5'-TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CGT-3'

5'-GCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT-3'

Ahora se debe encontrar la secuencia completa de la diana. Para ello se utiliza una base de datos de métodos de detección de OMGs: GMDD.¹¹

En la secuencia completa se busca la secuencia del primer cebador (H) y se cuentan 92 bases a partir de este. Se comprueba que la secuencia es la correcta viendo que su parte final es complementaria al segundo cebador (H):

TCGAAGGACGAAGGACTCTAACGTTTAACATCCTTTGCCATTGCCCA
GCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGC

De esta secuencia de nucleótidos, 37 pertenecen al genoma del maíz y 55 al promotor 35S:

TCGAAGGACGAAGGACTCTAACGTTTAACATCCTTTGCCATTGCCCA
GCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGC

(H) genoma de la planta, (H) promotor 35S

Para comprobar la especificidad se introduce esta secuencia en el programa BLAST,^{37 y 38} donde es comparada con su base de datos que contiene secuencias de material genómico de todos los seres vivos. Si bien la parte de la secuencia que pertenece al promotor 35S se repite en muchas secuencias pertenecientes a los seres vivos, la secuencia completa solo tiene una igualdad del 100% con el MON 810.

Durante el proceso de operación del genoensayo es necesario que la secuencia diana forme un híbrido estable con las secuencias de captura e indicadora, por tanto, otra característica importante de la secuencia diana es su capacidad para formar estructuras secundarias, que deben destruirse durante la hibridación. En la figura X se muestra la estructura secundaria más estable de la diana, proporcionada por el programa MFOLD³⁹.

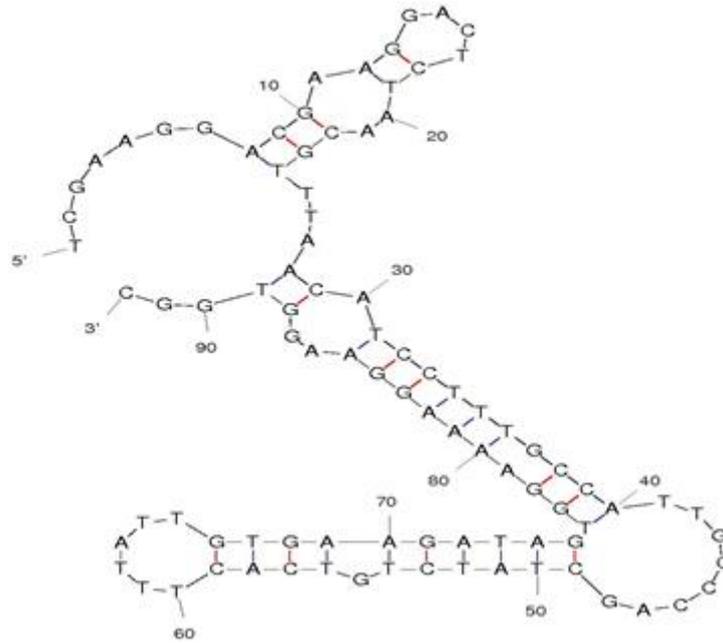


Figura X. Estructura secundaria de la secuencia diana de 92 nucleótidos

Se observa que esta secuencia seleccionada inicialmente como diana presenta una fuerte estructura secundaria ($\Delta G = -11.33$ Kcal/mol). Se prueba recortando los últimos veinte nucleótidos de la secuencia con el objetivo de escoger una diana que presente una estructura secundaria menos estable, que teóricamente daría lugar a una mayor eficacia en la reacción de hibridación con las secuencias captura e indicadora. La nueva secuencia de 72 nucleótidos presenta la estructura secundaria que se muestra en la figura XI.

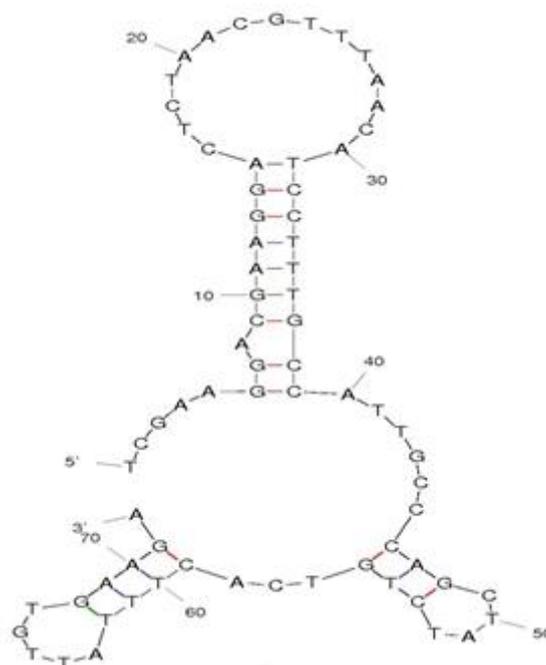


Figura XI. Estructura secundaria de la secuencia diana de 72 nucleótidos

El $\Delta G = -4.75$ Kcal/mol por lo que la autohibridación de la secuencia de 72 nucleótidos es mucho menos estable que la de la secuencia de 92 nucleótidos. Por tanto, se escoge la secuencia de 72 nucleótidos como secuencia diana.

Tal como se muestra gráficamente en el esquema I, el formato de ensayo seleccionado exige diseñar dos secuencias de ADN complementarias a distintas partes de la secuencia diana, de las cuales una actúa como secuencia de captura y es, por tanto, inmovilizada sobre las partículas magnéticas y la segunda actúa como secuencia indicadora.

Para seleccionar las secuencias de captura e indicadora es necesario tener en cuenta también sus estructuras secundarias, que deben ser desfavorables, al igual que la de la diana, con relación a la reacción de hibridación. Con este criterio se divide la secuencia diana en dos partes, siendo las secuencias de captura e indicadora complementarias a cada una.

Las estructuras secundarias de la sonda de captura e indicadora, que constan de 21 y 51 bases respectivamente, se muestran en la figura XII.

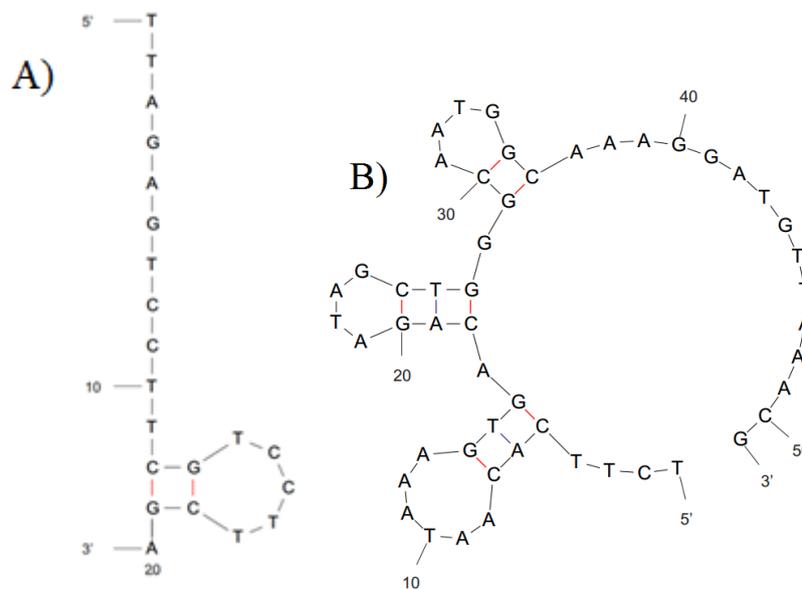


Figura XII. Estructuras secundarias de la sonda de captura (A) e indicadora (B)

La suma de nucleótidos es 72, por lo que no quedan nucleótidos de la secuencia diana sin hibridarse.

4.3 SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

A. Síntesis de las AgNPs:

Para la síntesis de las AgNPs que se emplearán como marca de la secuencia indicadora, se probaron varios protocolos para seleccionar el proceso descrito en el apartado 3.3.1. (a).

Inicialmente se utilizó un método descrito en la bibliografía⁴⁰ en el que el citrato no sólo actúa como modificador superficial, sino que actúa también de agente reductor de los iones Ag^+ . La preparación de las AgNPs se realiza a ebullición y el proceso es lento ya que el citrato tiene menor poder reductor que el borohidruro. Con este método se produjeron agregados por lo que se pasó a utilizar borohidruro como agente reductor que además simplifica el proceso de síntesis.

El proceso de síntesis utilizando borohidruro como agente reductor se optimizó probando diferentes relaciones entre la concentración de borohidruro y la concentración de nitrato de plata (R) (2,5; 5 y 10) y diferentes concentraciones iniciales (0,2 y 0,4 mM de Ag^+ y 1 y 2 mM de NaBH_4) para conseguir, sin la presencia de agregados, la banda más intensa de plasmón superficial, es decir, la mayor concentración de nanopartículas. Se seleccionan como condiciones finales $R = 5$, $[\text{Ag}^+] = 0,2 \text{ mM}$ y $[\text{NaBH}_4] = 1 \text{ mM}$.

B. Caracterización y funcionalización de las AgNPs:

Cómo se ha indicado en el apartado 3.3.1 (b), las nanopartículas de plata sintetizadas se caracterizan utilizando tres técnicas, con el objetivo de obtener su concentración, tamaño medio y dispersión de tamaños.

i. Espectrofotometría UV-Vis:

La figura XIII muestra el espectro UV-VIS de las AgNPs desde los 200 hasta los 600 nm. La medición se realiza un día después de la síntesis de las AgNPs, cuando se ha eliminado el exceso de borohidruro y estas se encuentran en su etapa madura.

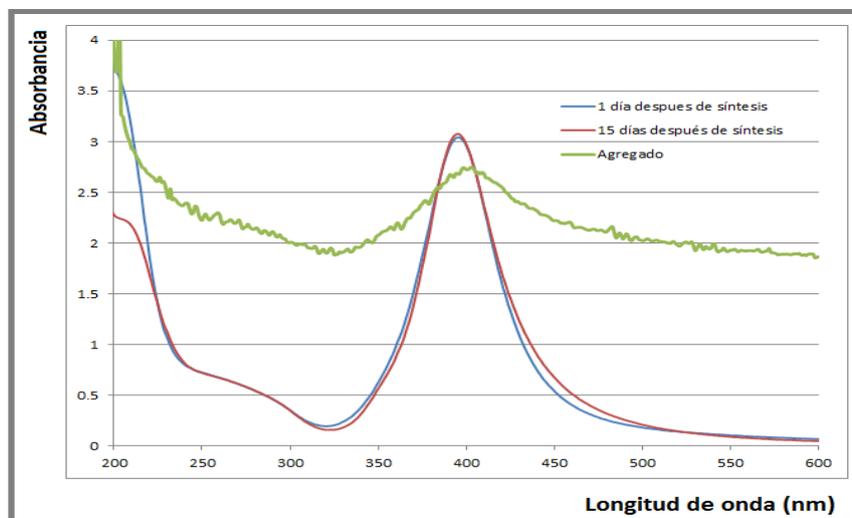


Figura XIII. Espectro UV-VIS de las AgNPs

Como puede observarse la disolución presenta una banda de absorción con un máximo a $\lambda=395$ nm. El coeficiente de extinción descrito en la literatura ($2,87 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) permite calcular una concentración de aproximadamente 0,1 nM de AgNPs aplicando la ley de Beer. También se estima una anchura a la semialtura de 56 nm lo que indica una monodispersidad moderada de tamaños.⁴⁰ Para evaluar la estabilidad de las AgNPs se vuelven a medir pasados quince días de su síntesis. Se comprueba que el máximo de absorbancia y la anchura a la semialtura se mantienen por lo que las AgNPs pueden seguir usándose. En la figura también se muestra el efecto que tendría sobre el espectro de absorbancias la presencia de agregados (mayor anchura y oscilaciones a causa de la dispersión).

El seguimiento de la funcionalización de las AgNPs también se realiza por espectroscopía UV-VIS. En la figura XIV se muestran los espectros solapados de las AgNPs sin modificar, tras la funcionalización y de una concentración equivalente de sonda indicadora a la que se utiliza en la modificación.

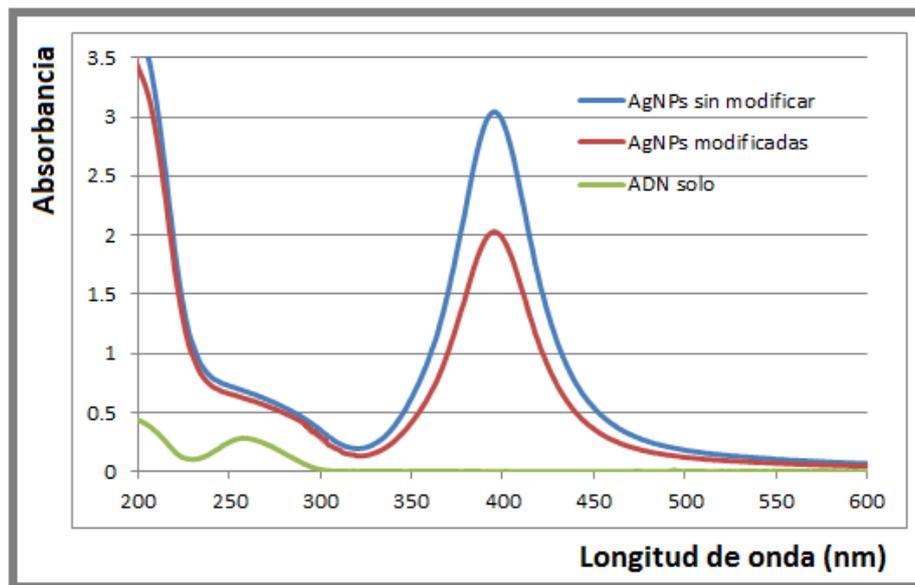


Figura XIV. Espectros UV-VIS de las AgNPs durante el proceso de funcionalización

Se observa que la concentración de las AgNPs funcionalizadas es menor a la de las AgNPs de partida. Esto se debe a que parte de ellas se pierden en los proceso de centrifugación que tienen el objetivo de separar el ADN que no se haya unido. El espectro de la sonda indicadora muestra que no es posible ver si la funcionalización ha ocurrido con éxito y el ADN se encuentra unido a las AgNPs.

Con el objetivo de aumentar en la medida de lo posible la concentración de sonda indicadora se procede a realizar un proceso de preconcentración por centrifugación. Este proceso se realiza en dos etapas. Una primera preconcentración de las partículas sin funcionalizar y una posterior a la funcionalización (figura XV).

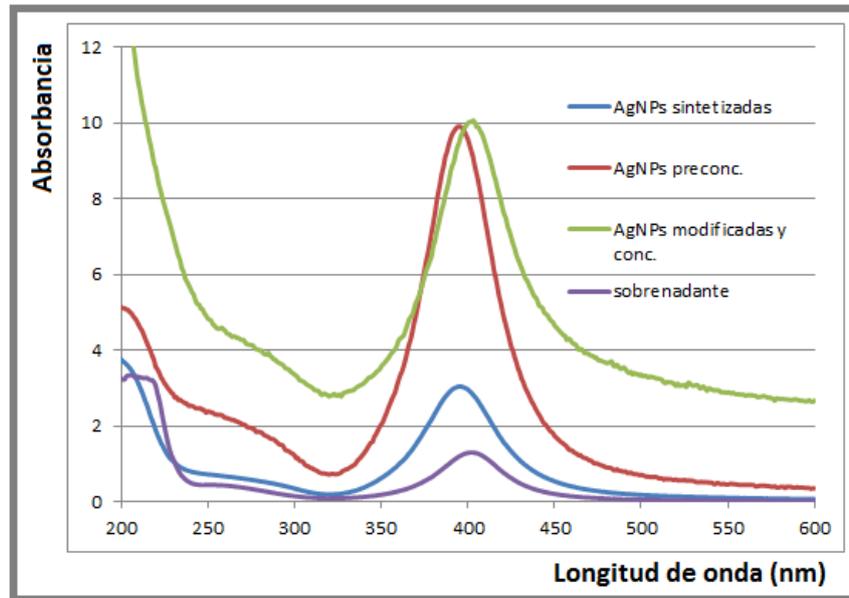


Figura XV. Espectros UV-VIS durante el proceso de funcionalización con preconcentración

Si bien la primera preconcentración consigue su objetivo (de 0,1 nM a 0,35 nM aproximadamente), se observa que, al concentrar las AgNPs después de la funcionalización, la concentración de AgNPs se mantiene al compensarse con las pérdidas durante los procesos de centrifugación. También se observa que después de la funcionalización, la anchura a la semialtura aumenta y aparecen pequeñas oscilaciones en la medida que indican que se han producido algunos agregados. El espectro de la sonda indicadora muestra que no es posible ver si la funcionalización ha ocurrido con éxito y el ADN se encuentra unido a las AgNPs.

ii. Espectroscopía de correlación de fotones (DLS) (AgNPs sin funcionalizar):

En la figura XVI se muestra el porcentaje relativo de luz dispersado (intensidad %) por las partículas en función del tamaño, medido por DLS.

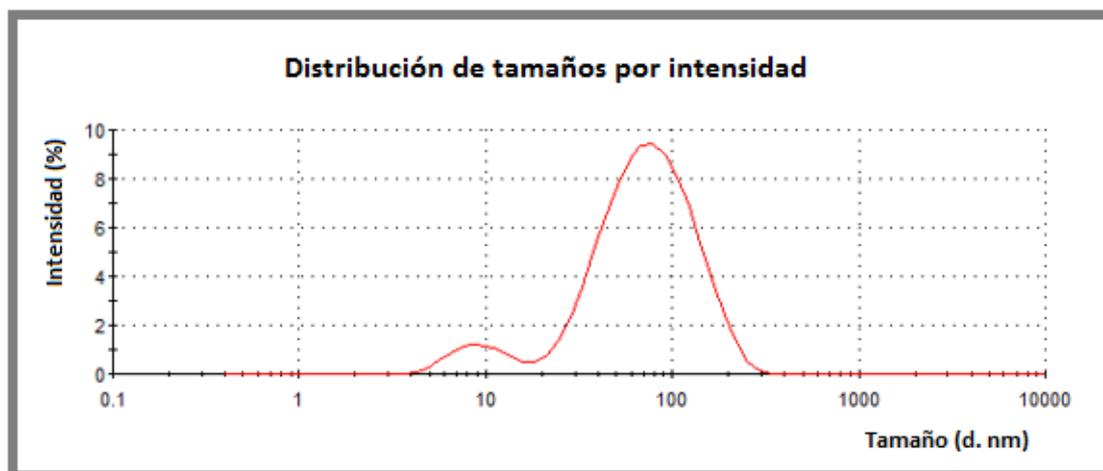


Figura XVI. Distribución de tamaños por intensidad

La distribución de tamaños por intensidad obtenida muestra que se obtienen partículas con diámetros desde 4 hasta 200 nm, con máximos a 10 y 85 nm. En la tabla IV se muestra un resumen del análisis de picos de la distribución.

Tabla IV. Resumen del análisis de picos de la distribución de tamaños por intensidad

	Tamaño medio (d. nm)	% intensidad	Desviación estándar
Pico 1	10	7,9	4
Pico 2	85	92,1	46

La distribución de tamaños por intensidad indica la existencia significativa de agregados de AgNPs. Sin embargo, la conversión a distribución de tamaños por volumen (figura XVII) muestra que los agregados se encuentran en baja concentración. La transformación de la intensidad en volumen se realiza aplicando la teoría de Mie que requiere el índice de refracción (n) y de absorción (k) de las AgNPs, a los que se les asignan valores de 0,2 y 3,32 respectivamente para la longitud de onda a la que trabaja el láser de He-Ne del DLS (633 nm).

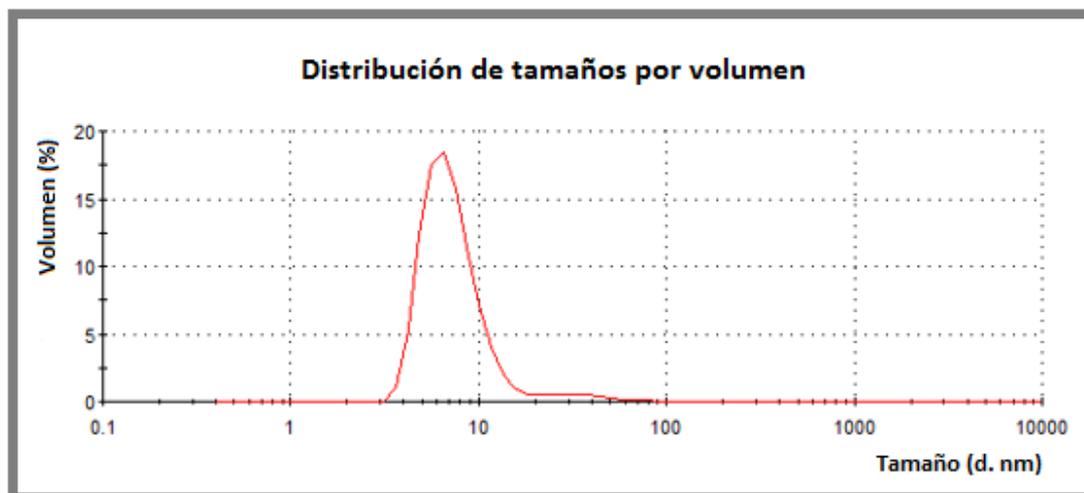


Figura XVII. Distribución de tamaños por volumen

La distribución de tamaños por volumen nos muestra que el 96,3 % en volumen de la muestra consiste en nanopartículas de alrededor de 7 ± 3 nm de diámetro.

También se puede realizar además la conversión a distribución de tamaños por número que se muestra en la figura XVIII, en el cual aparece un único pico de tamaño alrededor de los 6 nm de diámetro.

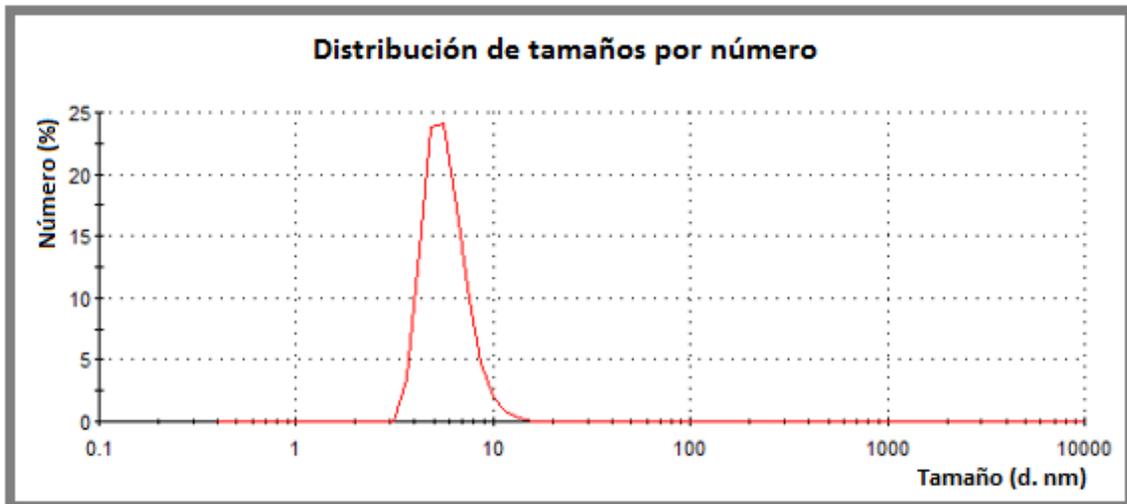


Figura XVIII. Distribución de tamaños por número

Esto indica que si la muestra se mide por microscopía electrónica, la gran mayoría de las partículas visualizadas serán de pequeño tamaño y solo se encontrarán agregados si son contabilizadas un gran número de partículas. Esto se pone de manifiesto en la figura XIX. A pesar de esto, la presencia de un número muy pequeño de agregados dispersan una gran cantidad de luz por lo que tienen una contribución mayoritaria en la distribución de tamaños por intensidad. DLS es, por tanto, una técnica de baja resolución para resolver agregados de varias nanopartículas ya que el diámetro hidrodinámico (z-average) y el índice de polidispersidad están muy influidos por la presencia de los agregados. En este caso el diámetro hidrodinámico es de 50,64 nm y el índice de polidispersidad de 0,4 (un buen índice de polidispersidad tiene un valor inferior a 0,2).

El diámetro más fiable para las medidas de DLS con las AgNPs sintetizadas es el obtenido en la distribución de tamaños por intensidad (10 nm). Los obtenidos por volumen y número son bastante menos fiables, ya que las AgNPs están recubiertas de citrato y, por tanto, los índices de refracción y absorción de la plata que se utilizan para calcular el diámetro son aproximados. La información que se saca de ellos, es que son esas AgNPs de 10 nm las que se encuentran en la muestra principalmente y no las de 85 nm, como parece indicar la distribución de tamaños por intensidad.

iii. Microscopía electrónica de transmisión (TEM):

La figura XIX muestra imágenes obtenidas por TEM de las partículas de plata (A) y de las partículas de plata funcionalizadas con la hebra indicadora (B).

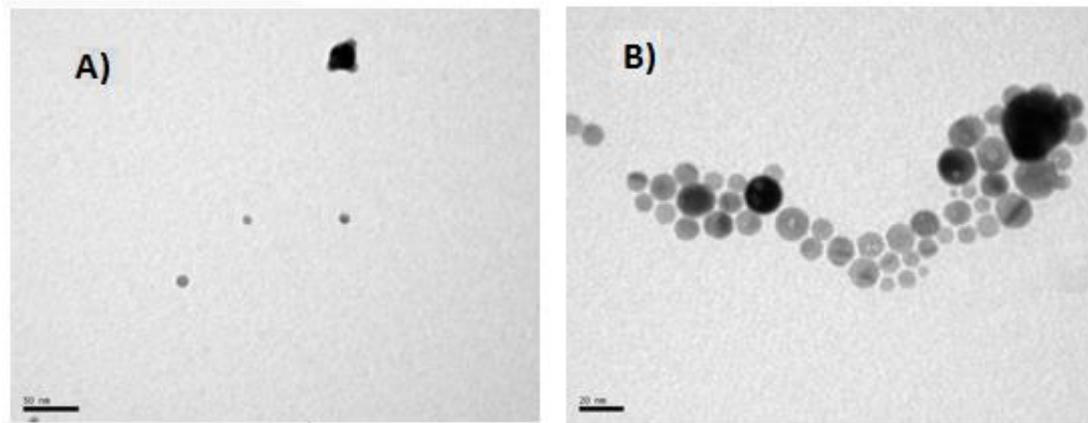


Figura XIX. Imágenes obtenidas en el TEM de las AgNPs (A) y de las AgNPs funcionalizadas (B)

Como se ha indicado en el apartado 3.3.1 (C), no se adiciona ninguna disolución tampón o sal a las AgNPs para su análisis por TEM. Esto ha debido de hacer que, al secarse sobre la gradilla, las AgNPs sin funcionalizar hayan agregado y por eso no se han encontrado en número alto. Por el contrario, parece que en las AgNPs funcionalizadas el ADN ha evitado esta agregación. En la figura X B se aprecia que parte de las AgNPs tienen una morfología hexagonal y parece que es la exposición continuada al haz de electrones del microscopio la que hace que el resto presente una morfología amorfa.

La figura XX muestra el histograma obtenido para las AgNPs ya funcionalizadas con la sonda indicadora. La medición se realizó manualmente empleando el programa Image Tool. El diámetro medio de AgNP es 11 ± 3 nm.

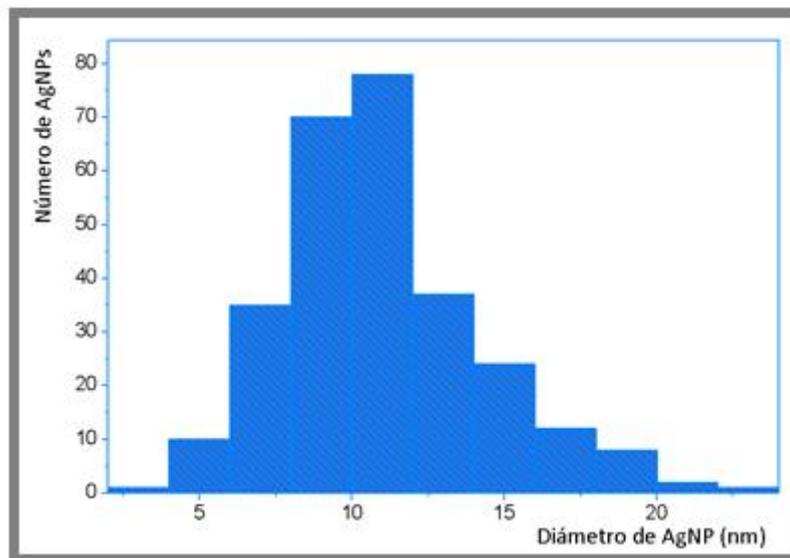


Figura XX. Histograma de los tamaños de AgNPs vistas en el TEM

4.4 ESTUDIO DE LAS AgNPs COMO MARCA ELECTROACTIVA

El uso de AgNPs como marca está mucho menos desarrollado que el de AuNPs debido a su inestabilidad y dificultad de funcionalización. Los estudios preliminares se dirigen a establecer las posibilidades que ofrece la detección electroquímica de la marca seleccionada.

Con este objetivo se estudió la respuesta en voltamperometría de redisolución anódica para concentraciones crecientes de las AgNPs, después de su disolución en HNO₃ 0,1 M durante diez minutos.

Tras la preconcentración de la Ag⁺ como Ag (0) durante tres minutos a -0,4 V, la redisolución anódica de la plata depositada da lugar a un proceso con un potencial de pico de 0,23 V. (figura XXI).

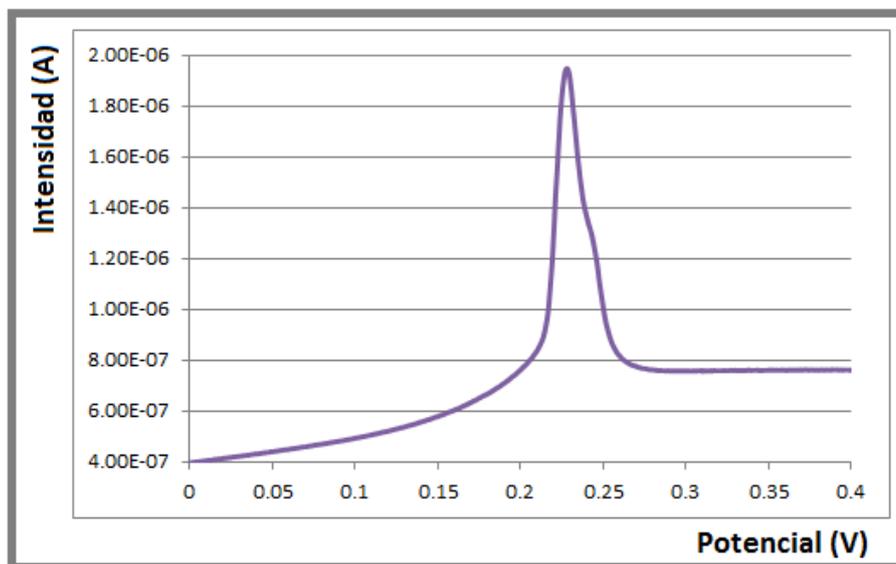


Figura XXI. Curva I/E del proceso de redisolución anódica de la plata

La corriente de pico de este proceso aumenta al aumentar la concentración de AgNPs en la disolución inicial (figura XXII). El intervalo de respuesta lineal es estrecho entre 1 y 3 pM de AgNPs.

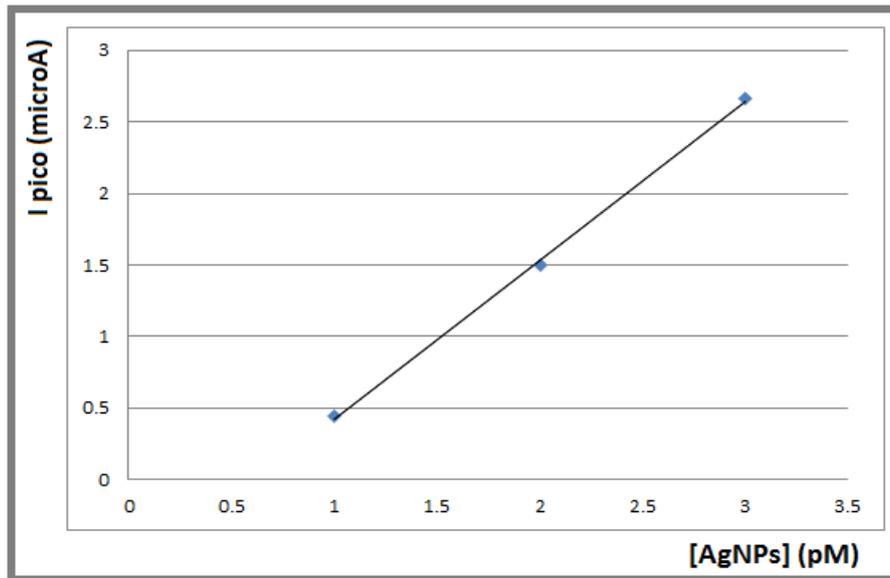


Figura XXII. Respuesta electroquímica a diferentes [AgNPs]

La ecuación de la recta es:

$$I_{\text{pico}} (\mu\text{A}) = (1,11 \pm 0,03) \cdot [\text{AgNPs}] (\text{pM}) - (0,69 \pm 0,06)$$

$$R^2 = 0,999$$

Las AgNPs no se ven expuestas únicamente al HNO₃ durante el genoensayo. En la disolución final de medida puede haber restos de SSPE del último lavado (cloruro de sodio y fosfatos) o de ADN. Para ver que efecto tienen estos compuestos en el medio, se mide un volumen constante de AgNPs con 0,1 μM de Cl⁻, 0,1 μM de PO₄³⁻ y 1 μM de ADN genómico de esperma de salmón y se comparan sus señales frente a la de las AgNPs solas. Cada medida se realiza por triplicado.

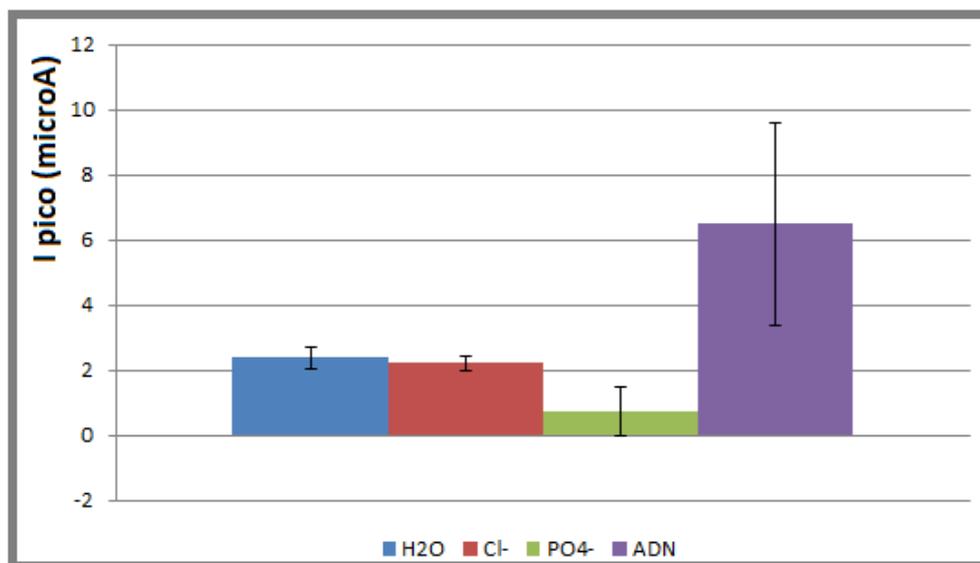


Figura XXIII. Respuesta electroquímica de las AgNPs en presencia de varios compuestos

En la figura XXIII se observa que la presencia de Cl⁻ y PO₄³⁻ en el medio decrece la señal obtenida. Esto se debe a que, una vez que el HNO₃ disuelve las AgNPs, la Ag⁺

forma complejos insolubles con estos aniones. El efecto es mayor con el PO_4^{3-} ya que el producto de solubilidad del complejo Ag_3PO_4 es mucho menor que el del AgCl ($1,3 \cdot 10^{-20}$ M y $1,8 \cdot 10^{-10}$ M respectivamente a 25 °C). Por esta razón, se sustituye el SSPE 2X por KNO_3 0,5 M en los lavados previos a la medida para evitar la formación de complejos de plata sin modificar la fuerza iónica del medio. Por otra parte parece que la presencia de ADN, inevitable en el genoensayo, amplifica la señal electroquímica pero aumenta la irreproducibilidad.

4.5 PROCESO DE OPTIMIZACIÓN DEL GENOENSAYO

Como se ha indicado previamente el formato de genoensayo seleccionado es un ensayo magnético tipo sándwich. La fase sensora, que consiste en una secuencia de ADN complementaria a una parte de la secuencia diana con una biotina terminal e inmovilizada sobre partículas magnéticas modificadas con estreptavidina, se prepara siguiendo un protocolo previamente optimizado por el grupo para la obtención de genoensayos dirigidos contra secuencias específicas de patógenos⁴¹. Por tanto, los estudios de optimización se han centrado en la preparación de la secuencia indicadora y el efecto de su concentración sobre la respuesta a la secuencia de ADN diana.

4.5.1 Preparación de la secuencia indicadora

En los estudios preliminares las AgNPs se modifican exclusivamente con la secuencia indicadora tiolada. Partiendo directamente de las nanopartículas de plata obtenidas según el protocolo descrito y tras su interacción con una concentración 0,4 μM de la sonda tiolada, la concentración de AgNPs modificadas que se obtuvo fue de 0,07 nM. Si se asume que la totalidad de secuencia tiolada se quimisorbió sobre las AgNPs se obtienen 5700 hebras por AgNP.

Una cantidad fija de AgNPs modificadas así (50 μL) se incubó con cantidades crecientes de ADN diana y con una cantidad fija de fase sensora (100 μL). La reacción de hibridación se realiza en un único paso en un medio de SSPE 2X durante una hora. Tras dos etapas de lavado con SSPE-T se procede a la disolución de las AgNPs que permanecen enlazadas a las partículas magnéticas y su posterior medida electroquímica. Las medidas se realizaron siempre por duplicado. En la figura XXIV se muestran los resultados obtenidos.

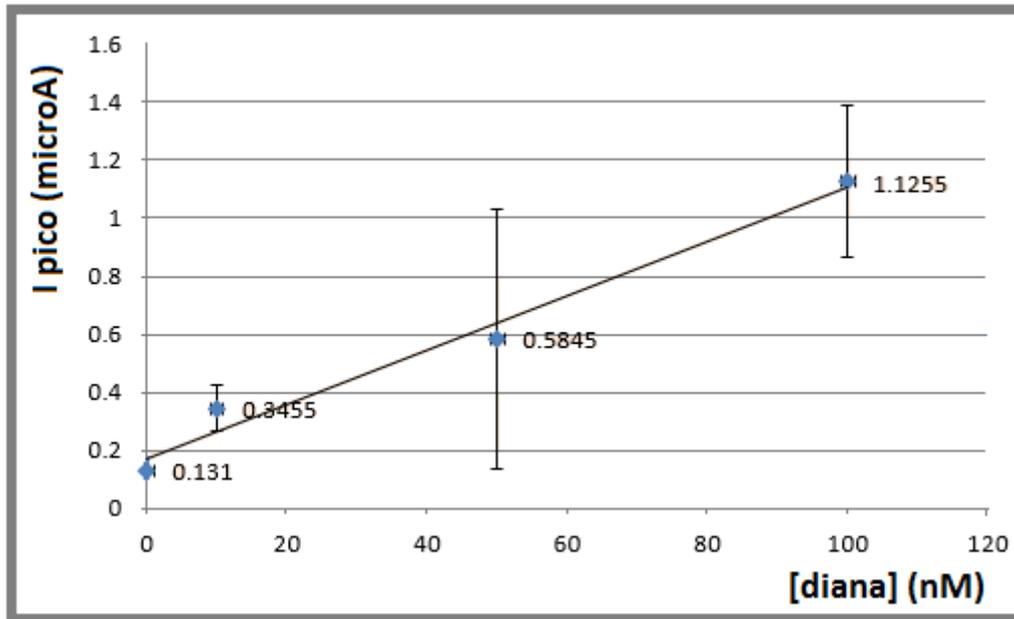


Figura XXIV. Respuesta del genoensayo a la concentración de secuencia diana

La señal crece al aumentar la concentración de ADN diana. En ausencia de ADN diana se obtiene una señal de $0,1 \pm 0,01 \mu\text{A}$. Existe una variación lineal de la señal con la concentración de diana desde 10 nM hasta 100 nM. En este intervalo la ecuación de calibración es:

$$I_{\text{pico}} (\mu\text{A}) = (0,009 \pm 0,001) [\text{diana}] (\text{nM}) + (0,22 \pm 0,09)$$

$$R^2 = 0,98$$

A concentraciones de diana mayores la respuesta es igual o inferior debido a la saturación de la fase sensora.

Una de las razones que explica la baja sensibilidad e irreproducibilidad del genoensayo es que, al estar las AgNPs funcionalizadas con muchas sondas indicadoras, una sola AgNP puede hibridar sus sondas con varias hebras diana. Este efecto se magnifica a medida que aumenta la concentración de diana. Lo idóneo sería que haya una AgNP por cada hebra diana. Con el objetivo de acercarse a esto, se propone utilizar un diluyente durante la funcionalización de las AgNPs. Como diluyente se escoge una hebra tiolada formada únicamente por veintiún adeninas que, por lo tanto, tiene pocas posibilidades de hibridación con otras hebras. Para elegir qué proporción de sonda indicadora/diluyente usar, se realiza el genoensayo con 1 nM de diana para diferentes proporciones (figura XXV). Las medidas se realizan por triplicado.

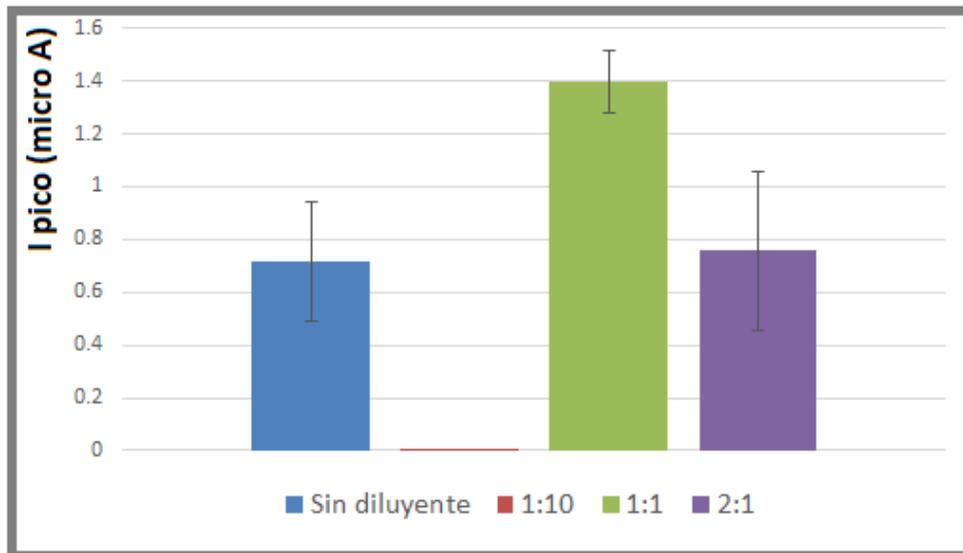


Figura XXV. Respuesta del genoensayo para [diana] 1 nM en función de la proporción sonda indicadora/diluyente

En la figura XXV se observa que cuando hay mucho más diluyente (1:10), este, al ser una hebra mucho más corta, se une mayoritariamente a las AgNPs y el genoensayo no tiene respuesta. A igual proporción de indicadora y diluyente (1:1), se consigue mejorar la reproducibilidad y la señal (mejor LOD). A mayor proporción de sonda indicadora (2:1), se produce el proceso del que se habla al principio de este apartado, produciéndose un descenso de señal y deterioro de la reproducibilidad. Por tanto, la funcionalización se pasa a realizar con una proporción 1:1 de sonda indicadora/diluyente.

4.5.2 Efecto de la concentración de secuencia indicadora

La concentración de secuencia indicadora debe estar en exceso para que no sea limitante en el ensayo. Por tanto, con este objetivo se procede a realizar un proceso de preconcentración por centrifugación. Este proceso se realiza en dos etapas. Una primera preconcentración de las partículas sin funcionalizar y una posterior a la funcionalización. Sin embargo, como se muestra en la figura XXVI, esta mayor concentración de secuencia indicadora produce un ligero incremento en la señal del blanco, lo que da lugar a una peor relación señal blanco a pesar de que la señal medida es mayor (1,8 a 1,5).

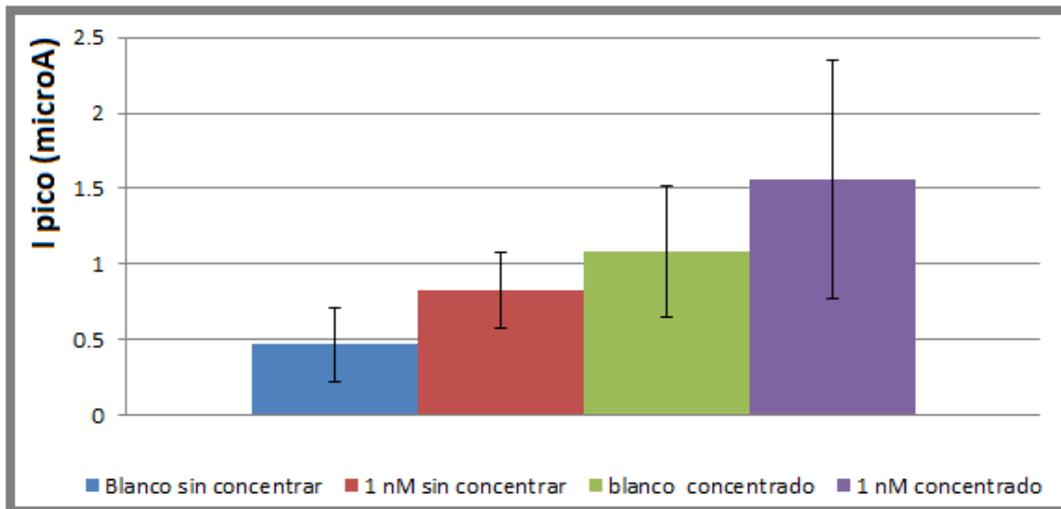


Figura XXVI. Respuesta del genoensayo para blancos y 1 nM de [diana] con y sin preconcentración

Las medidas se hacen por triplicado. Revisando la bibliografía⁴², se encuentra que las AgNPs tienen afinidad con la estreptavidina. Esto hace que puedan unirse a las partículas magnéticas en el genoensayo y por tanto elevar la respuesta del blanco. Para evitar esto, la hibridación pasa a realizarse con BSA en el medio que actúa como bloqueante (figura XXVII).

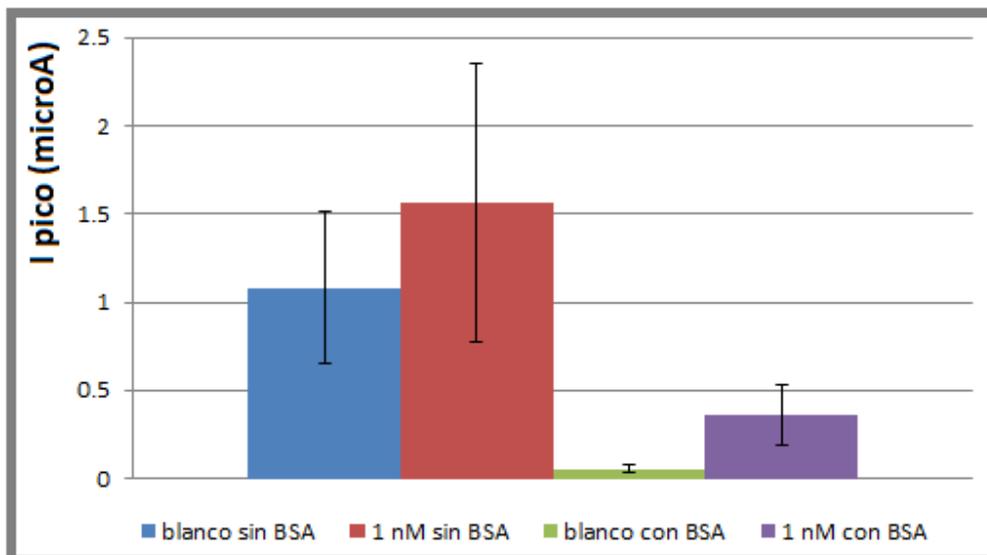


Figura XXVII. Respuesta del genoensayo para blancos y 1 nM de [diana] con y sin BSA

Las medidas se hacen por triplicado. Si bien el uso de la BSA provoca que se pierda el incremento en la señal conseguido en la preconcentración, la relación señal blanco mejora de 1,5 a 6,5, produciéndose una mejora importante de la reproducibilidad.

4.6 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL GENOENSAYO OPTIMIZADO

Una vez seleccionadas las condiciones del diseño del genoensayo se procede a caracterizar su respuesta. Se hicieron medidas para concentraciones crecientes de diana para establecer su sensibilidad, linealidad y reproducibilidad.

Las medidas se hicieron siempre por triplicado.

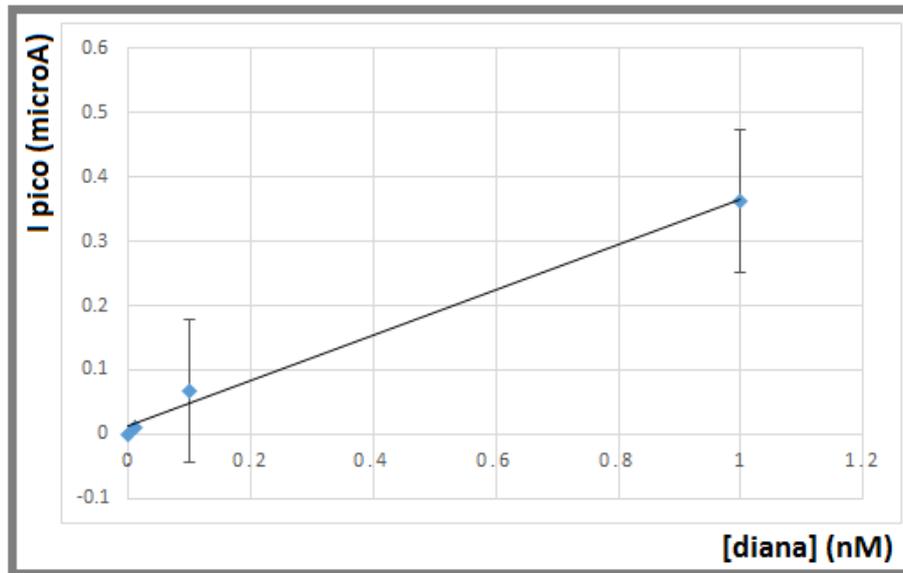


Figura X. Respuesta del genoensayo a la concentración de secuencia diana

La ecuación de calibración es:

$$I_{\text{pico}} (\mu\text{A}) = (0,35 \pm 0,02) [\text{diana}] (\text{nM}) + (0,12 \pm 0,01)$$

$$R^2 = 0,99$$

De los datos obtenidos (figura X) podemos concluir que las características de respuesta del genoensayo son:

El intervalo lineal es de dos órdenes de magnitud en el rango de concentraciones estudiadas (0,01-1 nM).

Se ha conseguido disminuir la respuesta del blanco (de 0,1 a 0,05 μA) y obtener respuesta para concentraciones mucho más bajas, siendo el LOD, calculado multiplicando tres veces la desviación estándar del blanco dividido entre la pendiente de la recta, de 0,2 nM.

Sin embargo, en estas condiciones no se obtienen mejoras sensibles en la reproducibilidad. Este es el principal problema del ensayo desarrollado. La falta de reproducibilidad se encuentra probablemente asociada a la agregación de las AgNPs sintetizadas, por lo que será necesario revisar el método de funcionalización y concentración de las AgNPs sintetizadas para mejorar las características del ensayo.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo fin de máster se ha diseñado un ensayo genomagnético para la detección de secuencias de ADN específicas del evento que caracteriza al maíz transgénico MON 810. A continuación se presentan las principales conclusiones del mismo:

- i. Las nanopartículas de plata sintetizadas usando borohidruro sódico como reductor, en una concentración cinco veces superior a la del ion Ag^+ y en presencia de citrato, tienen un diámetro de 10 ± 4 nm según medidas de DLS y de 11 ± 3 nm medidas mediante TEM.
- ii. La voltamperometría de redisolución anódica sobre electrodos de carbón vitrificado permite cuantificar las AgNPs previa disolución en HNO_3 0,1 M. La corriente de pico que aparece a 0,23 V en este medio se relaciona con la concentración de AgNPs, pudiendo medirse una concentración 1 pM de las mismas. La presencia de Cl^- y PO_4^{3-} disminuye la señal de redisolución, mientras que en presencia de ADN genómico dicha señal se ve incrementada.
- iii. Nanopartículas de plata modificadas con una secuencia oligonucleotídica tiolada complementaria a un fragmento del evento implantado en el maíz transgénico MON 810 actúan como un sistema indicador adecuado en un ensayo genomagnético con formato sándwich y detección electroquímica. El empleo de ácido poliadenilítico tiolado como diluyente favorece la hibridación y permite extender la respuesta del ensayo a concentraciones más bajas de la hebra diana que cuándo se utilizan AgNPs modificadas exclusivamente con la secuencia de captura. En estas condiciones es posible diferenciar del blanco concentraciones de ADN diana 10 pM.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. E. Anklam, F. Gadani, P. Heinze, H. Pijnenburg & G. Van Den Eed. *Euro Food Res Technology*. 2002, 214, 3 – 26.
2. <http://fundacion-antama.org/la-superficie-mundial-de-cultivos-biotecnologicos-crece-12-millones-de-hectareas-en-2011/> (último acceso: 05/07/2015).
3. <http://www.monsanto.com/newsviews/pages/food-safety.aspx#g1> (último acceso: 05/07/2015).
4. A. Kohli, S. Griffiths, N. Palacios, R.M. Twyman, P. Vain, D.A. Laurie & P. Christou. *The Plant Journal*. 1999, 17, 591 – 601.
5. L. Frewer. *Trends in Food Science & Technology*. 2003, 14, 319 – 332.
6. M. Costa-Font, J. M. Gil & W. B. Trail. *Food Policy*. 2008, 33, 99 – 111.
7. European Commission, 2003. Regulation (EC) No 1829:2003 of the European Parliament and the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. L 268
8. C. Paoletti. *Trends in Food Science & Technology*. 2008, 19, 1, 70 – 78.
9. Directive (EU) 2015/412 of the European Parliament and of the Council of 11 March 2015 amending Directive 2001/18/EC as regards the possibility for the Member States to restrict or prohibit the cultivation of genetically modified organisms (GMOs) in their territory Text with EEA relevance
10. Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing European Network of GMO Laboratories. 20 April 2015.
11. <http://gmdd.shgmo.org/event/view/81> (último acceso: 01/07/2015)
12. Y. Tadesse, L. Sagi, R. Swennen & M. Jacobs. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2003, 75, 1 – 18.
13. R. Hull, S.N. Covey & P. Dale. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2000, 12, 1 – 5.
14. D. E. Rochester, J. A. Winer & D. M. Shah. *The EMBO Journal*. 1986. 5, 3, 451 – 458.
15. H. Höfte & H. R. Whiteley. *Microbiological reviews*. 1989, 53, 2, 242 – 255.
16. V. García-Cañas, A. Cifuentes & R. González. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2004, 44, 425 – 436.
17. F. E. Ahmed. *TRENDS in Biotechnology*. 2002, 20, 5, 215 – 223.

18. S. R. M. Broeders, S. C. J. De Keersmaecker & N. H. C. Roosens. *Journal of Biomedicine and Biotechnology. Review*, 2012. doi:10.1155/2012/402418
19. N. Marmiroli, E. Maestri, M. Gullì, A. Malcevski, C. Peano, R. Bordoni & G. Bellis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008, 392, 369 – 384.
20. M. A. Arugula, Y. Zhang & A. L. Simonian. *Analytical Chemistry*. 2014, 86, 119 – 129.
21. A. Erdem, H. Karadeniz, G. Mayer, M. Famulok & A. Caliskan. *Electroanalysis*. 2009, 21, 11, 1278 – 1284.
22. A. Holmberg, A. Blomstergren, O. Nord, M. Lukacs, J. Lundberg & M. Uhlén. *Electrophoresis*. 2005, 26, 501 – 510.
23. A. Sassolas, B. D. Leca-Bouvier, and L. J. Blum. *Chemical Reviews*. 2008, 108, 109-139.
24. C. L. Manzanera-Palenzuela, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón & B. López-Ruiz. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015, 68, 259 – 265.
25. H. Li & D. Xu. *Trends in Analytical Chemistry*. 2004, 61, 67 – 73.
26. C. Yang, K. Shi, B. Dou, Y. Xiang, Y. Chai & R. Yan. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2015, 7, 1188-1193.
27. T. Ung, L. M. Liz-Marzan & P. Mulvaney, *Langmuir*, 1998, 14, 3740.
28. X. Zhang, M. R. Servos & J. Liu. *Chemical Communications*. 2012, 48, 10114–10116.
29. Supporting information X. Zhang, M. R. Servos & J. Liu. *Chemical Communications*. 2012, 48, 10114–10116
30. D. G. Thompson, A. Enright, K. Faulds, W. E. Smith & D. Graham. *Analytical Chemistry*. 2008, 80, 2805-2810.
31. W. Zhang, Y. Yao, K. Li, Y. Huang & Yongsheng Chen, Elsevier, *Environmental pollution*. 2011, 159, 3757 - 3762.
32. Characterisation of Colloidal Gold Using Dynamic Light Scattering. Malvern. Application note. 2014.
33. A. Erdem, H. Karadeniz, G. Mayer, M. Famulok & A. Caliskan. *Electroanalysis* 2009, 21, 11, 1278 – 1284
34. A. Kawde, M. C. Rodriguez, T. Lee & J. Wang. *Electrochemical Communications* 2005, 7, 537 - 540.

35. J. M. Pingarrón Cazarrón & P. Sánchez Batanero. Química electroanalítica: Fundamentos y aplicaciones. Editorial Síntesis, 1999.
36. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/> (último acceso: 14/07/20015).
37. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (último acceso: 14/07/2015).
38. A. Morgulis, G. Coulouris, Y. Raytselis, T. L. Madden, R. Agarwala & A. A. Schäffer. Bioinformatics. 2008, 24, 16, 1757 - 1764.
39. <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold> (último acceso: 14/07/2015).
40. C. H. Munro, W. E. Smith, M. Garner, J. Clarckson & P. c: White. Langmuir. 1995, 11, 10, 3712 – 3720.
41. M. J. González-Álvarez, E. Pérez-Ruiz, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, A. J. Miranda-Ordieres & M. J. Lobo-Castañón. Electroanalysis. 2013, 25, 1, 147 – 153.
42. J. Zheng, A. Jiao, R. Yang, H. Li, J. Li, M. Shi, C. Ma, Y. Jiang, L. Deng & W. Tan. American Chemical Society. 2012, 134, 19957 – 19960.