



Universidad de Oviedo

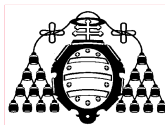
MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

**Diseño y optimización de fases sensoras para la
detección electroquímica de ADN de bacterias
patógenas.**

Raquel Sánchez Salcedo

Julio 2016, Oviedo



Rebeca Miranda Castro, Investigadora 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 “Diseño y optimización de fases sensoras para la detección electroquímica de ADN de bacterias patógenas”

ha sido realizado por la alumna Raquel Sánchez Salcedo 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 2015-16, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 14 de julio de 2016

Fdo: Rebeca Miranda Castro

Agradecimientos

Quiero agradecer la realización de este TFM al grupo de investigación de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo; en concreto, a mi tutora la Dr. Rebeca Miranda Castro, por su ayuda e implicación en este trabajo. Sin ella no hubiese sido posible.

Gracias también a mi compañera de laboratorio Susana Barreda por sus consejos y su compañía.

A mi familia, por su apoyo incondicional, por su amor y comprensión, por enseñarme que “querer es poder”.

Por último, a mis compañeros del máster por compartir este año inolvidable; en especial, a mis “vecinitos” por todos los momentos que hemos pasado juntos, por vuestra amistad, cariño y apoyo.

Lista de abreviaturas

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

Ufc: unidades formadoras de colonia.

VBNC: viables pero no cultivables.

MBA: ácido mercaptobenzoico.

TMB: 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina.

MCH: 6-mercapto-1-hexanol.

EDC: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocloreuro.

NHS: N-hidroxisuccinimida.

PBS: reguladora fosfato salina.

SSPE: reguladora fosfato con AEDT.

BSA: Seroalbúmina bovina.

HEPES: 4-(2-Hidroxietil)-piperazina-1-ácido etanosulfónico.

POD: Enzima peroxidasa.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Un problema de salud pública: <i>Legionella pneumophila</i>	2
1.2 Métodos de detección de <i>Legionella</i>	3
1.3 Monocapas autoensambladas	6
1.4 ARN ribosómico 16S	7
1.5 Fundamento de la cronoamperometría	9
2. Objetivos	11
3. Reactivos, instrumentación y protocolos	13
3.1 Reactivos	14
3.2 Instrumentación	15
3.3 Protocolos	16
4. Resultados y discusión	22
4.1 Selección de la secuencia analito	23
4.2 Selección de la sonda de captura e indicadora	24
4.3 Condiciones experimentales de medida	26
4.4 Optimización de la concentración de sonda de captura	27
4.5 Cuantificación de la cantidad de ADN: Método de Tarlov	28
4.6 Optimización condiciones de hibridación	31
4.7 Selectividad	34
4.8 Estabilidad de la fase sensora	35
4.9 El ARN como analito	37
5. Conclusiones	41
6. Bibliografía	43
Anexo I	49

1.Introducción

1.1 Un problema de salud pública: *Legionella pneumophila*

La *Legionella pneumophila* se considera la bacteria acuática más importante en términos de mortalidad [1]. Se trata de una bacteria Gram-negativa aerobia con 56 especies y subespecies que corresponden a más de 70 serogrupos [2]. De todos ellos la *Legionella pneumophila* Serogrupo 1 es responsable de la mayoría de infecciones por *Legionella* detectadas en el ser humano y, además, es la que se aísla más frecuentemente en estudios ambientales.

De forma natural, la *Legionella pneumophila* habita en ecosistemas de agua dulce (ríos, lagos) donde se encuentra en pequeña concentración. En estos medios la bacteria sobrevive a las variaciones ambientales en el interior de protozoos donde presenta una alta resistencia al estrés, capacidad que justifica su gran patogenicidad [3] [4].

Sin embargo, desde su hábitat natural la bacteria puede colonizar sistemas de agua artificiales (circuitos de refrigeración de aire acondicionado, piscinas, spas, etc) cuyas condiciones de temperatura (en torno a 25 °C) y la presencia de materia orgánica e inorgánica resultan favorables para su crecimiento y multiplicación. Se ha demostrado que el material utilizado en las tuberías del sistema también influye en el crecimiento de la bacteria. El uso de cobre disminuye el riesgo, al contrario que el plástico, que suele suponer la presencia de una mayor cantidad de *Legionella* [3]. Si en las instalaciones existe un mecanismo generador de aerosoles, la bacteria se dispersa en el aire y las gotas de agua contaminada pueden penetrar por inhalación en el aparato respiratorio humano desencadenando la infección.

De forma general se utiliza el término legionelosis para referirse a la enfermedad provocada por la bacteria *Legionella* que afecta al hombre y que fue identificada por primera vez en 1976 en Philadelphia durante la convención anual de la legión americana; a este suceso debe su nombre [5]. Esta puede presentar dos formas clínicas distintas: neumonía por *Legionella* y Fiebre de Pontiac. Esta última es un forma no neumónica similar a un proceso gripal (proceso febril leve); mientras que la primera es un proceso infeccioso pulmonar cuyos síntomas son malestar general, dolor muscular, síntomas gastrointestinales, fiebre alta, alveolitis y bronquiolitis ocasionando daños de pulmón; no difieren mucho de la neumonía común por lo que su identificación solo es posible mediante una prueba de laboratorio.

Personas ancianas o con deficiencias en su sistema inmunológico son las más susceptibles de padecer legionelosis y presentan mayor riesgo de mortalidad [3].

En la legislación medioambiental española [6] se recogen los protocolos de actuación y las medidas preventivas para el control de la legionelosis dependiendo del número de unidades formadoras de colonias detectadas (ufc). Las unidades formadoras de colonias son las células viables del patógeno, es decir, con capacidad para crecer y cultivarse. En la siguiente tabla se recogen las medidas correctoras dependiendo de los niveles de ufc/L:

Tabla 1. Acciones en función de los resultados de los análisis microbiológicos.

Ufc/L	Protocolo de actuación
100-1000	Se revisará el plan de mantenimiento y se realizarán las correcciones oportunas. Al cabo de 15 días se repetirá el ensayo.
1000-10000	Se llevará a cabo la limpieza y desinfección. Se realizará un nuevo recuento a los 15 días.
> 10000	Se detendrá el funcionamiento de la instalación, se procederá a la limpieza y tratamiento de choque y se volverá a muestrear pasados 15 días.

1.2 Métodos de detección de *Legionella*

Método oficial de detección de *Legionella*

Treinta años después del primer brote de *Legionella* existe todavía la necesidad de buscar un método de análisis rápido, sensible y selectivo para la detección y cuantificación de esta bacteria en muestras de agua. Los métodos utilizados hasta ahora para su determinación son los métodos estándar de cultivo. Estos métodos se corresponden con el método oficial internacional según la norma ISO 11731. [7]

Métodos de cultivo:

La capacidad de aislar y cultivar bacterias patógenas en un medio artificial fue uno de los mayores descubrimientos sobre métodos de diagnóstico en el siglo pasado y aún sigue siendo el principal procedimiento utilizado para diagnóstico microbiológico.

En el caso particular de la *Legionella*, su aislamiento mediante cultivo y posterior identificación y cuantificación presenta una serie de problemas: la dificultad de crecimiento de la bacteria, debido a la presencia de otros microorganismos; y, la incapacidad para detectar bacterias en estado viable pero no cultivables (VBNC), que afecta a la sensibilidad del método (error por defecto en la cuantificación).

El estado VBNC se puede definir como una estrategia de supervivencia en respuesta a una situación de estrés (exposición de la bacteria a desinfectantes químicos, al calor o a la luz UV) en la que las bacterias están vivas, pero han perdido su habilidad para crecer y desarrollarse. [8]

Otro inconveniente importante es el elevado tiempo de análisis ya que necesita al menos 10 días para obtener resultados definitivos.

El método de cultivo consiste en el crecimiento de la bacteria en un medio específico; situado en las placas Petri que se incuban a una temperatura de 36 ± 2 °C, en una atmósfera húmeda y durante 10 días. Las bacterias de la muestra de agua se concentran mediante filtración por membrana y, a continuación, el filtro se trata con tampón ácido para inhibir el crecimiento de otras bacterias distintas a la *Legionella pneumophila*. Una vez el filtro ha sido tratado, se transfiere a una placa con un medio selectivo y se incuban. En el caso de la *Legionella pneumophila* el medio selectivo es un medio de agar tamponado de extracto de levadura y carbón vegetal que contiene L-cisteína y hierro (III). [9] [10]

Técnicas alternativas al método oficial de análisis

Los métodos de determinación de *Legionella* alternativos al método de cultivo se pueden clasificar en:

- Inmunoensayos
- Métodos basados en el material genético:
 - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
 - Genosensores

Inmunoensayos:

Para intentar solventar los problemas que plantea el método oficial para la detección de *Legionella* se han propuestos numerosos ensayos inmunoquímicos que se basan en la reacción de reconocimiento entre un anticuerpo y un antígeno.

Se ha demostrado que el principal agente causante de la legionelosis es el serogrupo 1 de la *Legionella pneumophila*; luego los inmunoensayos van a consistir en el reconocimiento de este antígeno.

El formato de inmunoensayo más utilizado es un ensayo directo tipo sándwich que usa anticuerpos policlonales específicos del antígeno del serogrupo 1 como anticuerpos de captura e indicadores. La marca del anticuerpo indicador puede ser una enzima o una molécula fluorescente.

Estos ensayos suponen una gran mejora respecto al método de cultivo en cuanto al tiempo de análisis ya que su duración es aproximadamente de 3 horas. Aun así es necesaria una mejora de la sensibilidad antes de que se puedan aplicar en el control bacteriológico rutinario de muestras de agua. [11] [12]

Cuantificación por PCR a tiempo real:

Los métodos de amplificación de ADN basados en la reacción en cadena de la polimerasa para detección de bacterias patógenas ofrecen una alternativa a los métodos convencionales de cultivo ya que no solo detectan la secuencia del organismo (específicos) sino que también la amplifican (mejoran la sensibilidad). También supone una mejora en la duración del ensayo respecto a los métodos de cultivo. [13]

La PCR a tiempo real permite la cuantificación de *Legionella* en un período de 24-48 h, aunque precisa de instrumentación cara y personal cualificado para su desarrollo.

Otra limitación importante es su incapacidad para diferenciar entre células viables y no viables; debido a que también amplifica el ADN procedente de células muertas, lo que conduce a una sobreestimación y, en ocasiones, a falsos positivos [14] [5]

Aun así, es preferible una estimación por exceso del contenido de *Legionella* en las muestras que la subestimación de unidades formadoras de colonias del patógeno determinadas por el método oficial [15].

Por otro lado, se ha observado inhibición de la amplificación en muestras que contienen metales pesados (hierro) y materia orgánica (ácido húmico) [16] lo que conlleva procesos más complejos de tratamiento de las muestras. En los últimos años se han aportado soluciones en ese sentido [17].

Genosensores:

La demanda de ensayos rápidos para medidas de campo que faciliten el control de la bacteria en las instalaciones, permitiendo una aplicación inmediata de las medidas correctivas oportunas ha convertido los biosensores en una buena alternativa para la detección de *Legionella* [18].

Un biosensor es un dispositivo que integra un elemento sensor biológico como enzimas, anticuerpos o ácidos nucleicos que reconocen el analito de interés, con un transductor que convierte la señal de reconocimiento en una señal eléctrica medible.

Los genosensores son biosensores de ADN que utilizan la reacción de hibridación entre secuencias de ADN complementarias como reacción de reconocimiento, aportando una gran selectividad [19] [20]. Si a esto se añaden las ventajas propias de la detección electroquímica: alta sensibilidad, rapidez, bajo coste, potencial para la miniaturización y automatización [21]; es posible obtener plataformas de análisis complementarias al método estándar de cultivo para el control de rutina de *Legionella* en muestras ambientales.

1.3 Monocapas autoensambladas

En la construcción de biosensores existe una gran variedad de estrategias para inmovilizar el elemento de reconocimiento biológico sobre la superficie del transductor, siendo la preparación de monocapas autoensambladas o SAMs (self-assembled monolayers) una de las alternativas más comunes. [22]

De entre todos los sistemas capaces de autoensamblarse sobre un sustrato sólido, la interacción entre el azufre y los metales nobles, fundamentalmente oro ya que es un material bastante inerte, ha sido uno de los más empleados.

La reacción que se lleva a cabo entre un compuesto tiolado y un sustrato de oro es la siguiente:



Este proceso presenta una energía de quimisorción de aproximadamente 30 Kcal/mol [23], próxima a un enlace covalente. Tiene lugar en dos fases; una primera fase en la que

se forma la unión S-Au y una segunda fase que consiste en la reorganización de las cadenas. Las cadenas se empaquetan y adquieren su conformación gracias a que interaccionan entre sí mediante fuerzas de van der Waals; para obtener capas ordenadas se necesita un cierto tiempo. Las SAMs no están orientadas totalmente perpendiculares a la superficie sino que posee un pequeño ángulo de inclinación [24].

La mayor parte de los trabajos descritos para la inmovilización de ADN utilizan monocapas autoensambladas mixtas del oligonucleótido modificado con un grupo tiol en su extremo 5' y un compuesto tiolado inerte que tiene la función de controlar la densidad de empaquetamiento, actuando como espaciador, y de evitar adsorciones inespecíficas sobre la superficie electrónica, actuando como bloqueante. La molécula tiolada más usada para cumplir este fin es el 6-mercapto-1-hexanol (MCH). [25]

Aunque inicialmente se asumió la homogeneidad de las monocapas autoensambladas mixtas de ADN [26], ha sido puesta en entredicho mediante estudios de microscopía de fuerza atómica (AFM) [27] que proporcionan una imagen de la superficie a nivel molecular en lugar de la información promedio obtenida mediante técnicas más convencionales: Resonancia de Plasmón de superficie (SPR) [28], Microbalanza de cristal o cuarzo [29] y métodos electroquímicos [30].

Según estos estudios más recientes, las moléculas de ADN tienden a agruparse formando agregados o “clusters” lo que se traduce en una menor eficiencia de hibridación (no todas las hebras inmovilizadas están accesibles para unirse a la hebra complementaria) y una limitada estabilidad de la fase sensora. El empleo de SAMs puras, de un único componente, que permiten enlazar mediante técnicas de bioconjugación las hebras de ADN podría ser una buena alternativa a las tradicionales SAMs mixtas ya que posibilitarían la obtención de capas sensoras más homogéneas y con mayor estabilidad en el tiempo. [31]

1.4 ARN ribosómico 16S

El ARN ribosómico 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. Esto se atribuye a que está presente en todas las bacterias, su estructura y función han permanecido constantes en el tiempo; es relativamente largo (1500 nucleótidos) y ha conservado su estructura secundaria caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena alternando con segmentos

de cadena sencilla (**Figura 1**). Por todo ello se considera un cronómetro molecular que permite distinguir entre distintos organismos procariotas en general y bacterias en particular.

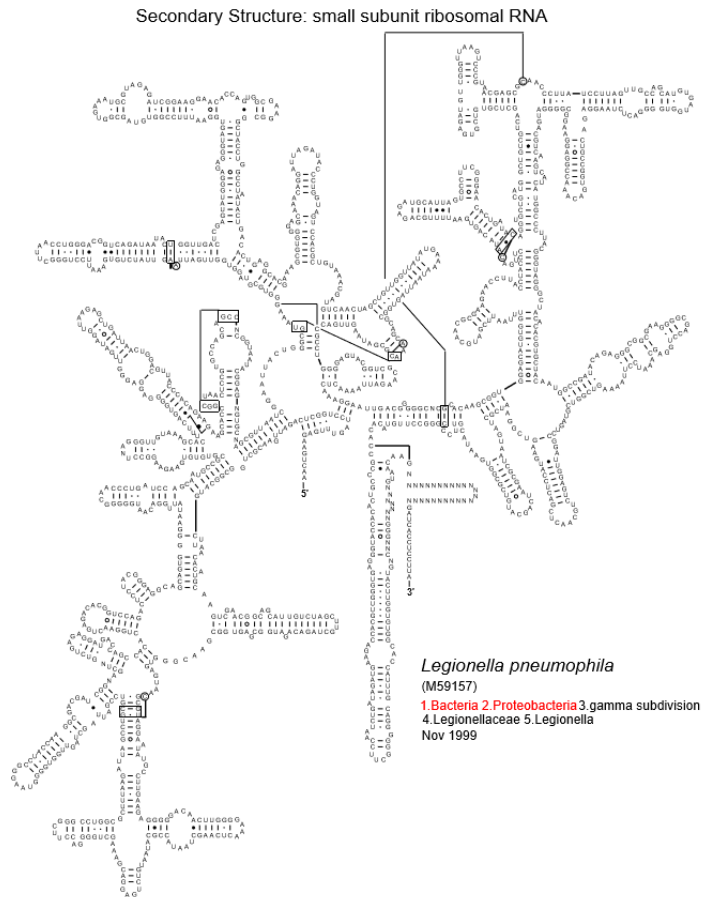


Figura 1. Estructura secundaria del ARNr 16S.

El ARNr 16S se encuentra contenido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano junto con 21 proteínas diferentes; posee secuencias cortas específicas (oligonucleótidos firma) que están presentes en todas las bacterias de un mismo grupo, pero no se encuentran en el resto de grupos.

La identificación molecular de bacterias basada en el análisis del ARNr 16S o del gen que lo codifica está indicado especialmente para cepas cuya determinación mediante métodos fenotípicos resulte complicado (bacterias no cultivables, de crecimiento lento, con requerimientos nutricionales complejos, etc) como es el caso de la *Legionella*.

El ARN ribosómico resulta una diana ventajosa desde el punto de vista de la sensibilidad ya que el número estimado de ribosomas por célula es de 6800 [16]. Además la presencia

de ARN es indicativa de actividad metabólica, luego es adecuado para detectar *L. pneumophila* viva. [32]

1.5 Fundamento de la cronoamperometría

La cronoamperometría es una técnica sencilla muy empleada en el campo de genosensores. En esta técnica la respuesta que se registra es la corriente generada en el electrodo de trabajo en función del tiempo a un potencial constante, al que la especie electroactiva se encuentra totalmente reducida u oxidada.

La función de excitación es un salto de potencial desde un valor inicial (E_1), al cual no existe corriente, hasta un valor de potencial (E_2), al cual tiene lugar la reducción u oxidación de la especie electroactiva instantáneamente (**Figura 2**).

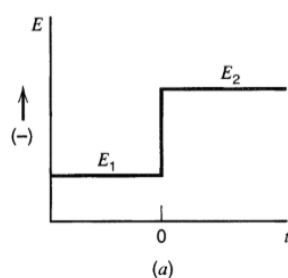


Figura 2. Señal de excitación en cronoamperometría cuando la especie que se encuentra en disolución es oxidada. [33]

Este proceso provoca un gradiente de concentración; y como consecuencia, un transporte de materia debido a la difusión de la especie medida desde la disolución a la superficie del electrodo. Una vez la especie medida alcanza el electrodo es transformada; luego, la velocidad de transformación de una especie a otra está controlada por su velocidad de difusión en disolución, que depende del gradiente de concentración. [34]

Debido al flujo continuado de la especie la corriente faradaica (I_f) decae tras el salto de excitación. Esto viene descrito por la ecuación de Cottrell:

$$I_f(t) = (nFAD^{1/2}C_o)/\pi^{1/2}t^{1/2}$$

Donde n es el número de electrones que intervienen en el proceso electroquímico, A es el área del electrodo (cm^2), F es la constante de Faraday (96500 C/mol), D es el coeficiente de difusión (cm^2/s), C_o es la concentración del analito en el seno de la disolución (mol/cm^3) y t es el tiempo transcurrido desde la aplicación del pulso de potencial en segundos.

La corriente que se registra posee también una componente capacitiva (I_c) que disminuye exponencialmente con el tiempo; es decir, solo es significativa en tiempos cortos. La variación de la I_c con el tiempo se refleja en la siguiente ecuación:

$$I_c(t) = \frac{\Delta E}{R} \cdot e^{-t/RC}$$

Donde R es la resistencia en ohmios y C la capacidad en Faradios. [33]

El experimento consiste en mantener constante el potencial durante un tiempo y registrar la intensidad de corriente. La corriente es proporcional al gradiente de concentración en la superficie del electrodo. La respuesta que se obtiene es una curva de I-t. (**Figura 3**)

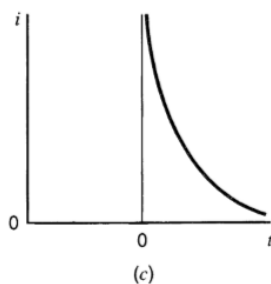


Figura 3. I corriente vs. t. Cronoamperograma. [33]

En este proyecto la oxidación se lleva a cabo enzimáticamente; por lo tanto, lo que se registra es la intensidad de corriente de reducción del producto oxidado por la enzima.

2. Objetivos

Existe un elevado número de microorganismos cuyo control es esencial para garantizar la seguridad medioambiental y agroalimentaria. La mayor parte de los métodos de detección de patógenos, entre ellos *Legionella pneumophila*, recogidos en la legislación se basan en cultivos celulares que requieren largos periodos de incubación retrasando el diagnóstico.

El objetivo de este proyecto es la identificación y cuantificación de *Legionella pneumophila* mediante la detección del gen 16S ARNr de esta bacteria. Para ello, se propone diseñar y desarrollar un genosensor rápido y de elevada sensibilidad y selectividad; empleando un formato tipo sándwich con un método de amplificación enzimática de la señal y determinación electroquímica, que permita la detección de *Legionella* en muestra de origen medioambiental. Para alcanzar este objetivo general se proponen los siguientes objetivos parciales:

- Optimización de la construcción de la fase sensora, actuando sobre las características de diseño que puedan afectar a su respuesta, así como de las condiciones de operación de la misma para conseguir la máxima sensibilidad y selectividad
- Evaluación de las características de respuesta del sensor; en especial la estabilidad de almacenamiento de la fase sensora.
- Estudio de la capacidad del sensor desarrollado para detectar ARN ribosómico procedente de *Legionella pneumophila*.

3. Reactivos, instrumentación y protocolos

3.1 Reactivos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo han sido sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT, Leuven, Bélgica) y suministrados en su forma libre de sales. Sus secuencias de bases se especifican en la **Tabla 2**:

Tabla 2. Secuencias de nucleótidos empleadas en la construcción del genosensor.

Nombre	Función	Secuencia (5'-3')
SC	Sonda de Captura 28 mer	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -AGTCAACCAGTATTATCTGACCGTCCCA
SI	Sonda Indicadora 30 mer	GGTTAAGCCCAGGAATTTACAGATAACTT-6FAM*
SD	Secuencia Diana 80 mer	AAGGGTGCGTAGGTGGTTGATT AAGTTATCTGTGAAATTCC TGGGC TTAACCTGGGACGGTCAGATAATACTGGTTGACT

La parte azul de la sonda diana se corresponde con la zona sin hibridar situada alejada del electrodo, la parte verde hibrida con la sonda de captura y la parte en cursiva hibrida con la sonda indicadora.

*6-FAM = 6-carboxifluoresceína; fluoróforo comúnmente utilizado como marca en oligonucleótidos ya que posee un grupo carboxilo fácil de bioconjugarse al grupo fosfato del ADN.

Otros reactivos utilizados en este proyecto se resumen en la **Tabla 3**:

Tabla 3. Reactivos empleados en el ensayo.

Reactivo	Casa comercial	Pureza
Ácido mercaptobenzoico	Sigma-Aldrich	99 %
3,3',5,5'Tetrametilbencidina	Sigma	≥ 99 %
EDC	Sigma-Aldrich	
N-hidroxisuccinimida	Sigma-Aldrich	97 %
Etanolamina	Sigma	98 %
Seroalbúmina bovina	Sigma	98 %
Fab anticuerpo-POD	Roche Diagnostics	

PBS-Caseína	Sigma-Aldrich	
20xSSPE*	Sigma-Aldrich	
10xPBS**	Sigma-Aldrich	
HEPES***	Sigma-Aldrich	99 %
Acetato sódico anhidro	Merck	≥ 99 %
[Ru(NH ₃) ₆]Cl ₃	Sigma-Alrich	98 %
D-(+)-Glucosa	Fluka	≥ 99 %
Reguladora Tris-HCl	Sigam-Aldrich	
H ₂ SO ₄	J.T.Baker	95-97 %
Etanol	J.T.Baker	Absoluto

*Reguladora de fosfato 0,2 M de pH 7,4 con NaCl 2,98 M, AEDT 0,02 M y libre de DNasas y RNasas.

**Reguladora de fosfato 0,1 M de pH 7,4 que contiene 1,54 M NaCl, libre de ADNasas y ARNasas.

*** 4-(2-Hidroxietyl)-piperazina-1-ácido etanosulfónico.

Todas las disoluciones utilizadas en este proyecto se prepararon con agua purificada con el sistema Milli Q (Direct-Q, MilliPore).

3.2 Instrumentación

Las medidas electroquímicas se llevaron a cabo empleando un potenciostato Autolab PGSTAT10 (EcoChemie) controlado mediante el software GPES 4.9.

El transductor empleado para la fabricación del sensor es una celda electroquímica plana sobre un soporte de alúmina suministrada por la casa comercial DropSens que consiste en un electrodo de trabajo de oro (4 mm de diámetro), un semicírculo también de oro que actúa como contraelectrodo y un electrodo de pseudoreferencia de Ag. (**Figura 4**)



Figura 4. Electrodo serigrafiado de oro.

El potenciostato y el electrodo serigrafiado se unen mediante un conector específico de DropSens.

El control de la temperatura durante la reacción de hibridación de la secuencia diana y la sonda de captura se realizó con un termostato de bloque metálico para tubos de centrifuga (Tembloc, Selecta).

3.3 Protocolos

Acondicionamiento y caracterización de los electrodos serigrafiados

Previo a su utilización es necesario lavar los electrodos serigrafiados con etanol y agua doblemente purificada (Mili Q) para eliminar los restos de sustancias aglutinantes y disolventes procedentes del proceso de curado, obteniendo una superficie más hidrofílica.

A continuación, el electrodo de trabajo se sometió a un pretratamiento electroquímico en ácido sulfúrico 0,5 M aplicando un potencial positivo de 1,3 V frente al pseudoreferencia de plata durante 30 s, seguido de diez barridos cíclicos de potencial entre 0 y 1,3 V a una velocidad de 0,1 V/s en el mismo medio.

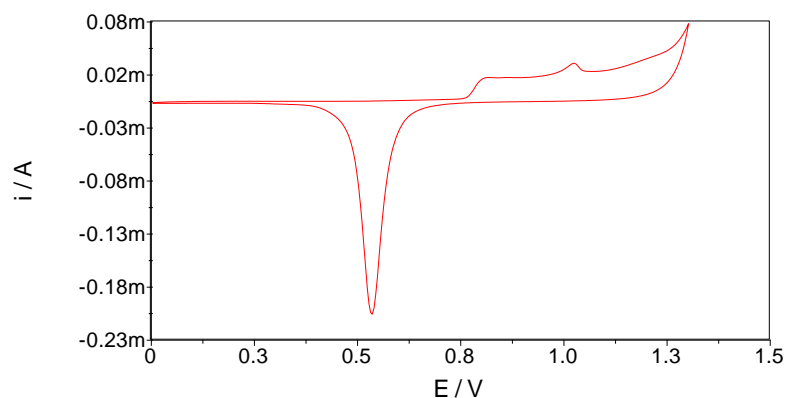


Figura 5. Limpieza electroquímica.

Construcción de la fase sensora

El proceso de inmovilización de la sonda de captura es muy importante ya que la sensibilidad y selectividad del ensayo dependerá de la orientación de las hebras, la densidad de estas y la capacidad que tengan de transferir electrones.

En este proyecto se ha optado por inmovilizar la sonda de captura covalentemente a una monocapa autoensamblada (SAM), previamente formada sobre la superficie de oro del electrodo serigrafiado. Para la formación de la monocapa pura concretamente se seleccionó el ácido mercaptobenzoico que permite un enlace tipo amida entre sus grupos carboxilo y el grupo amino presente en el extremo 5' de la sonda de captura.

El procedimiento experimental de la inmovilización de la sonda de captura se detalla a continuación:

1. Formación de una monocapa autoensamblada de ácido mercaptobenzoico:

El electrodo de oro, previamente sometido al pretratamiento electroquímico, se incubó con una disolución de ácido mercaptobenzoico 1 mM en una reguladora de acetato de pH 4 (valor de pH al cual los grupos carboxilos se encuentran protonados, [35] favoreciendo una SAM más compacta) durante toda la noche en atmósfera saturada de agua, permitiendo la formación de una SAM sobre su superficie. **(Figura 6, etapa 1)**

2. Incorporación mediante enlace covalente de la sonda de captura:

La inmovilización de la sonda de captura consta de tres etapas

- A) Activación de los grupos carboxilos presentes en la superficie de oro. Tras lavar la superficie modificada con agua doblemente purificada se lleva a cabo la incubación con una mezcla de 2 mM EDC y 5 mM NHS en HEPES 0,1 M de pH 7,4 durante 30 minutos a temperatura ambiente. **(Figura 6, etapa 2)**

- B) Enlace de la sonda de captura mediante incubación con una disolución 1 μ M de sonda de captura (la selección de este parámetro se detalla en el apartado de resultados) en reguladora HEPES 0,1 M de pH 7,4 durante 1 hora a temperatura ambiente. **(Figura 6, etapa 3)**

- C) Bloqueo de los grupos carboxilos que permanecen activados y sin reaccionar mediante etanolamina 1 M en HEPES 0,1 M de pH 7,4 durante 20 minutos. **(Figura 6, etapa 4)**

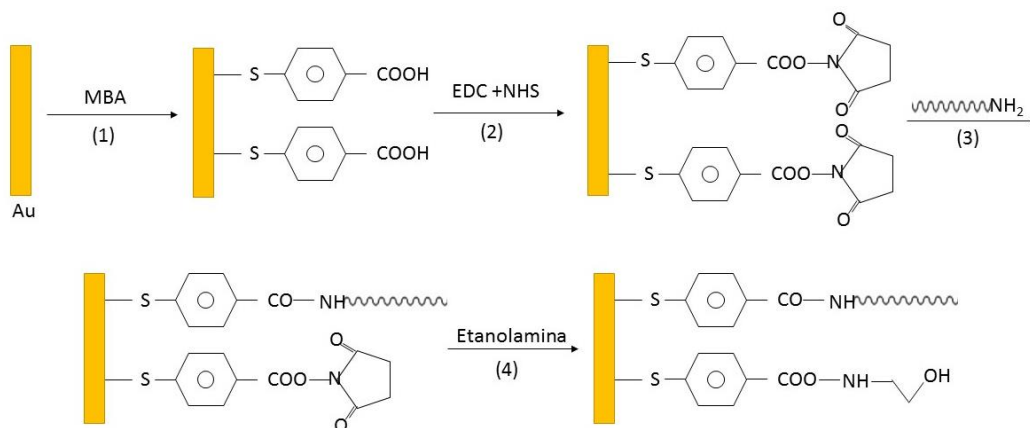


Figura 6. Esquema de la preparación de la fase sensora. (1) Formación de la SAM. (2) Activación de los grupos carboxilo. (3) Inmovilización de la SC. (4) Bloqueo de los sitios activos.

Etapa de hibridación

Para cuantificar la secuencia diana se empleó un formato tipo sándwich en dos etapas: hibridación homogénea e hibridación heterogénea. Esta modalidad proporciona un mayor control sobre el ensayo ya que las reacciones de hibridación se hacen por separado y una de ellas ocurre en disolución por lo que su eficacia y velocidad es máxima.

1. Hibridación en fase homogénea:

En primer lugar se llevó a cabo la hibridación homogénea entre la secuencia diana (cantidad variable) y la sonda indicadora en concentración constante de 100 nM en disolución 2xSSPE de pH 7,4 calentando a 95 °C durante 5 minutos seguido de un enfriamiento lento hasta alcanzar temperatura ambiente. (**Figura 8, etapa 1**)

Al calentar se destruye la estructura secundaria presente, debido a que la temperatura es superior a la temperatura de fusión (ver **Tabla 4**), y al enfriar se produce la hibridación de las hebras complementarias gracias a que el dúplex formado es más estable que las estructuras secundarias de partida.

2. Hibridación en fase heterogénea:

A continuación se realiza la hibridación heterogénea entre la sonda de captura inmovilizada sobre el transductor de oro y el dúplex previamente formado entre la sonda diana y la indicadora durante la hibridación homogénea. Para ello, la fase sensora se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y en ausencia de luz. (**Figura 8, etapa 2**)

Etapa de fijación de la marca enzimática

La siguiente etapa que se llevó a cabo fue la incorporación de una etiqueta enzimática: la enzima peroxidasa (POD). (**Figura 8, etapa 3**)

Para lo cual, tras un lavado con reguladora 2xSSPE de pH 7,4 y un acondicionamiento con la disolución de marcaje 1xPBS de pH 7,4 y 0,05 % de caseína para prevenir adsorciones inespecíficas, se incubó sobre la fase sensora el conjugado anticuerpo antilfluoresceína-POD (0,5 U/mL) en la disolución de marcaje durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz.

Transcurrido el tiempo indicado, se lavan los electrodos con la disolución 1xPBS de pH 7,4 y se dejan cubiertos con esta disolución hasta que se realiza la medida electroquímica. Justo antes de la medida los electrodos se secan con corriente de nitrógeno.

Etapa de detección

Para llevar a cabo la detección electroquímica se añaden 60 μL de la disolución de los sustratos enzimáticos, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Tras 30 segundos de reacción enzimática, se mide por cronoamperometría el producto electroactivo generado enzimáticamente. (**Figura 8, etapa 4**)

Reacción enzimática: la forma reducida de la enzima (POD_{red}) cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a agua generándose la forma oxidada del catalizador (POD_{ox}) que, a continuación, oxida el sustrato TMB_{red} a TMB_{ox} . De esta manera se completa el ciclo catalítico consiguiendo regenerar la enzima. (**Figura 7**)

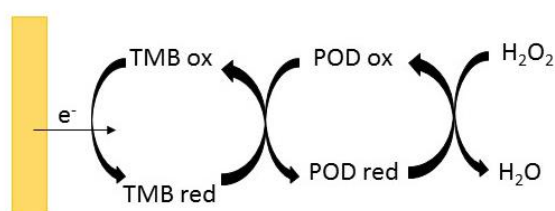


Figura 7. Reacción enzimática.

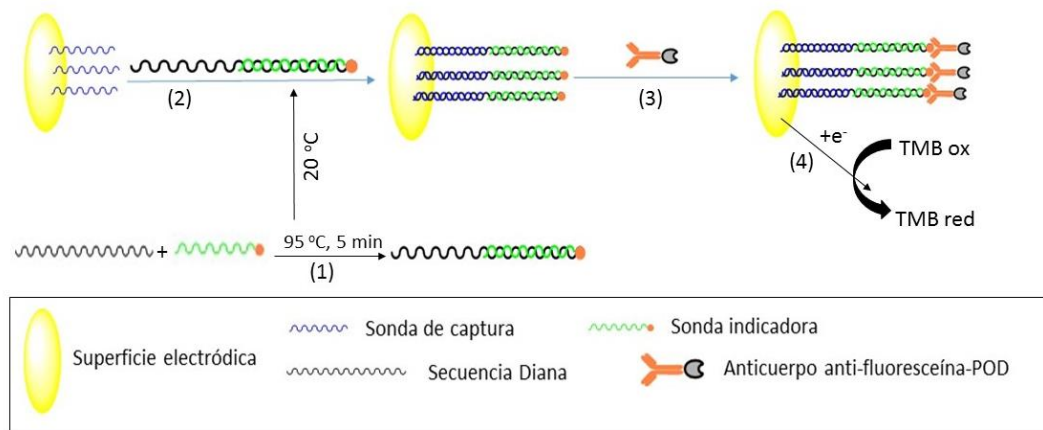


Figura 8. Esquema del genosensor. (1) Hibridación homogénea. (2) Hibridación heterogénea. (3) Marcado enzimático. (4) Determinación electroquímica.

El ARN como analito

El fragmento de ADN sintético de 80 nucleótidos específico de *Legionella pneumophila* empleado como diana se sustituyó por ARN extraído del patógeno. Este se obtiene a partir del liófilo CECT 7109 *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* de la Colección Española de Cultivos Tipo. La manipulación de esta bacteria patógena exige un nivel 2 de bioseguridad (cabina de seguridad biológica, empleo de guantes y bata); por ello, la cepa se manejó en los laboratorios de microbiología del Hospital Universitario Central de Asturias donde se cultivó en un medio BCYE enriquecido con hierro, L-cisteína y α -cetoglutarato hasta alcanzar la fase logarítmica del crecimiento de la bacteria.

El proceso de extracción se desarrolla mediante el kit *E.Z.N.A. Bacterial RNA* de la casa comercial OMEGA que permite una extracción rápida y reproducible de ARN de alta calidad. Para ello, se recoge un volumen de cultivo de 1 mL ($< 5 \cdot 10^8$ bacterias) y se somete a las etapas que se detallan a continuación:

1. Centrifugar a 5000 g durante 5-10 min a 4 °C con el objetivo de separar las células del medio de cultivo.
2. Desechar el sobrenadante y resuspender las células en 150 μ L de lisozima, la enzima encargada de romper la pared de las bacterias Gram-negativas. Incubar a 30 °C durante 15 minutos con agitación continua.
3. Añadir 350 μ L del tampón de lisis BRK y 25 mg de bolitas de cristal a la muestra y agitar en el vortex 5 minutos. Centrifugar durante 5 minutos.

4. Transferir el sobrenadante a un tubo de centrífuga.
5. Incubar la muestra a 70 °C durante 5 minutos y centrifugar 2 minutos a 13000 g. Transferir el sobrenadante a un tubo de centrífuga. (Etapa que permite reducir la cantidad de ADN copurificado)
6. Añadir 280 µL de etanol absoluto (96-100 %) a la muestra lisada y agitar con el vortex.
7. Transferir la mezcla obtenida a una mini columna que posee una resina con carga positiva. En medio etanol las cargas negativas de los grupos fosfato del ARN quedan expuestas permitiendo su retención en la resina mediante interacciones electrostáticas con las cargas positivas de esta. Centrifugar para ayudar a la separación del resto de componentes celulares.
8. Adicionar a la columna el tampón de lavado I y centrifugar a 10000 g.
9. Repetir la etapa anterior de lavado y centrifugar de nuevo.
10. Adicionar a la columna el tampón de lavado II y centrifugar.
11. Repetir la etapa de lavado y centrifugado anterior.
12. Secar la columna por centrifugación durante 2 minutos a 10000g (permite eliminar los residuos de etanol).
13. Por último, eluir el ARN retenido en la columna mediante la adición de agua tratada con DEPC que inactiva las ARNasas. En medio acuoso se forma una esfera de solvatación en torno a las moléculas de ADN que desencadena la ruptura de las interacciones electrostáticas, facilitando la recuperación del ARN puro.

4. Resultados y discusión

4.1 Selección de la secuencia analito

En el diseño de un genosensor para detectar *Legionella pneumophila* es muy importante seleccionar la secuencia de oligonucleótidos adecuada que se va a emplear como diana del ensayo. La secuencia debe ser específica del patógeno que se quiere determinar.

Por estas razones, la secuencia elegida forma parte del gen ARNr 16S que como se ha comentado en la introducción permite la identificación bacteriana ya que posee fragmentos únicos para cada especie. La longitud de este gen es de aproximadamente 1500 pares de bases; las cuales se encuentran recogidas en la base de datos del GenBank [36], cuyo número de acceso es M59157. [32]

Concretamente se seleccionó un fragmento de 80 nucleótidos cuya secuencia se recoge en la **Tabla 2**.

Para comprobar su especificidad se introduce en el programa BLAST [36] que compara la secuencia problema con las secuencias de material genómico de todos los seres vivos recogidas en la base de datos del GenBank. Escriben la secuencia dirección 5'-3'; se comprueba que esta no forma parte del genoma de otras bacterias patógenas y que corresponde en un 100 % a la especie *Legionella pneumophila*.

Otra característica importante de la secuencia analito a considerar es su capacidad para formar estructuras secundarias. Estas deberían destruirse durante el proceso de hibridación con las secuencias de captura e indicadora para formar un híbrido estable.

Con el objetivo de determinar la estructura secundaria de la secuencia diana se emplea el servidor web MFold [37]. Esta herramienta permite predecir en unas condiciones de temperatura y concentración salina dadas las estructuras secundarias de un fragmento de ADN y sus parámetros termodinámicos (temperatura de fusión, energía libre de formación, entropía y entalpía). En la **Figura 9** se muestran las estructuras secundarias proporcionadas por el servidor a 20 °C y 0,3 M de Na⁺, también se muestran sus energías libres de formación.

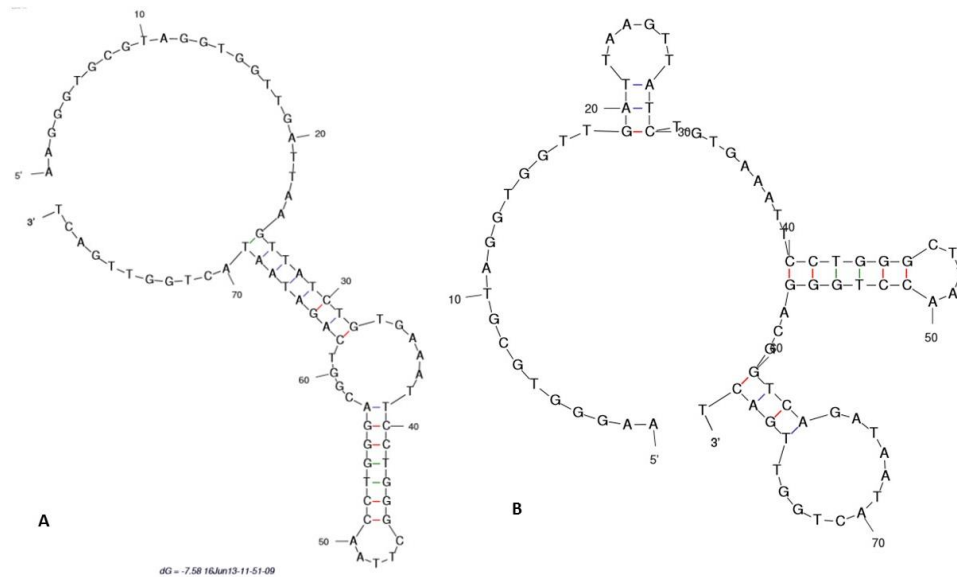


Figura 9. Estructura secundaria de la secuencia diana. A) ΔG -7,58 Kcal/mol. B) ΔG -7,31 Kcal/mol

4.2 Selección de la sonda de captura e indicadora

Como se ha comentado anteriormente en este proyecto se seleccionó un formato de ensayo tipo sándwich por lo que además de la secuencia de ADN diana hay que diseñar dos secuencias complementarias a esta en distintas regiones. Una que actúa como sonda de captura, por tanto se inmoviliza sobre la superficie del transductor, y otra que actúa como sonda indicadora, y que posee una marca en un extremo.

Al producirse dos reacciones de reconocimiento molecular, los ensayos tipo sándwich aumentan la selectividad de la detección.

Para seleccionar las secuencias de captura e indicadora es necesario tener en cuenta también sus estructuras secundarias que, al igual que la de la diana, deben ser desfavorables respecto a la reacción de hibridación. Se emplea de nuevo el servidor web MFold, específicamente la herramienta *DINA Melt*.

La sonda de captura (SC) seleccionada se corresponde con una secuencia formada por 28 bases complementarias a la secuencia diana con un extremo modificado con un grupo amino. La sonda indicadora (SI) diseñada para el ensayo posee 30 bases y un extremo modificado por la molécula de 6-carboxifluoresceína. Las secuencias de la SC y la SI están recogidas en la **Tabla 2**. Sus estructuras se muestran en la **Figura 10**.

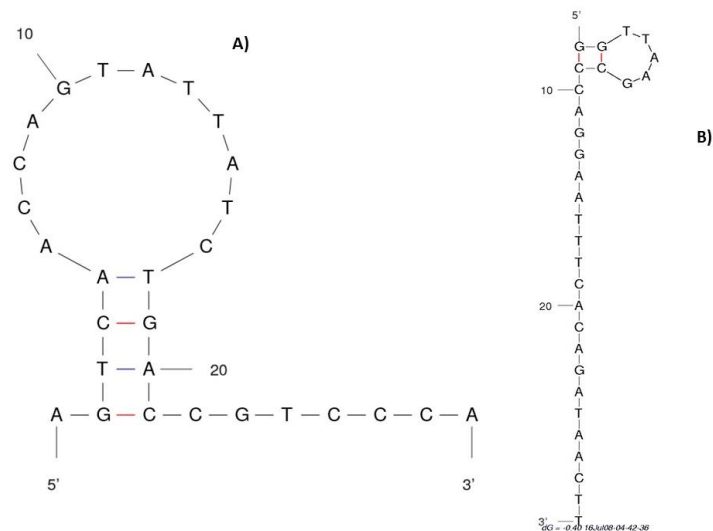


Figura 10. Estructuras secundarias A) Sonda de captura ΔG -2,09 Kcal/mol. B) Sonda indicadora ΔG -0,40 Kcal/mol.

La suma de las bases de las sondas de captura e indicadora es 58; por lo tanto, quedarán 22 bases de la secuencia diana sin hibridar situadas alejadas del transductor de oro. En trabajos previos [38] [39] se demostró que la presencia de ADN de hebra simple en el extremo distal del dúplex ternario no afecta significativamente a la sensibilidad del genosensor.

También se obtiene a través de MFold los parámetros termodinámicos de las secuencias de ADN y de los dúplex resultantes en la reacción de hibridación. Se recogen en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Parámetros termodinámicos predichos por el programa MFold para cada secuencia de ADN involucradas en el ensayo a 20 °C y 0,3 M Na⁺.

	T_m (°C)	ΔG (Kcal/mol)
SD	43,9	-7,31
SC	40,2	-2,09
SI	27,9	-0,40
SC-SD	72,2	-41,1
SD-SI	71,7	-43,8
SC-SD-SI	80,9	-87,5

Los datos termodinámicos recogidos en la **Tabla 4** indican que en presencia de la diana debería de producirse la reacción de hibridación generando el dúplex de tres componentes, lo que permitiría la unión posterior del conjugado enzimático y la detección del producto generado tras la adición del sustrato de la enzima.

4.3 Condiciones experimentales de medida

Como se ha indicado en apartados anteriores las medidas se llevan a cabo mediante la técnica electroquímica de cronoamperometría. Para fijar el potencial de medida adecuado se estudia el comportamiento electroquímico del sustrato enzimático en voltametría cíclica. Nos interesa seleccionar un potencial al cual se consiga reducir completamente todo el TMB. Para ello se aplicó al electrodo de trabajo un potencial de $-0,25$ V frente al de pseudoreferencia durante 5 segundos, a modo de pretratamiento, seguido de un barrido cíclico de potencial desde $-0,25$ V a $+0,4$ V a una velocidad de $0,1$ V/s.

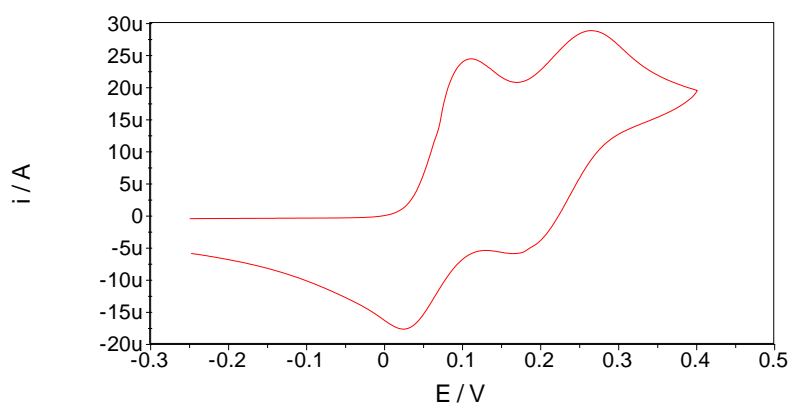


Figura 11. Voltamperometría cíclica del TMB sobre electrodos serigrafados de oro.

El potencial de medida para la cronoamperometría se fija en $-0,2$ V ya que el TMB se encuentra completamente reducido y se registra la corriente durante 60 s. En las medidas cronoamperométricas (se aplica un potencial y se mide la intensidad de corriente) se obtienen valores negativos de intensidad de corriente, puesto que se mide la reducción del TMB, como los que se presentan a continuación:

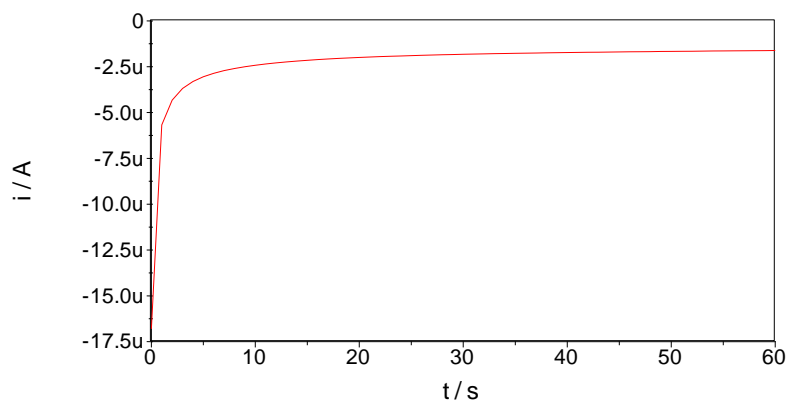


Figura 12. Cronoamperograma típico registrado para la reducción electroquímica del TMB sobre sustratos de oro.

4.4 Optimización de la concentración de sonda de captura

La inmovilización de las hebras de ADN sobre la superficie electródica debe llevarse a cabo de forma que permita obtener un control preciso del empaquetamiento y orientación de la sonda inmovilizada, con la mínima pérdida de capacidad de hibridación de las hebras, y de la forma más simple y estable que sea posible.

En este trabajo se diseñó una fase sensora basada en el enlace covalente de la sonda de captura, modificada con un grupo amino en el extremo 5', a un monocapa del tiol aromático mercaptobenzoico. (**Figura 6**)

Esta fase de reconocimiento se preparó de acuerdo al protocolo explicado en el apartado 3.3 variando la concentración de sonda de captura en la disolución de inmovilización y se evaluó la respuesta del genosensor siguiendo el ensayo descrito en la **Figura 8** para una concentración de secuencia diana de 0,5 nM.

Además se realizó un control negativo o blanco, en ausencia de ADN diana, que permite obtener una señal de fondo debida a interacciones no específicas con la sonda de captura o la superficie modificada.

Las concentraciones de sonda de captura que se ensayaron fueron: 0,1 μM (concentración óptima para las monocapas mixtas); 1 μM y 10 μM . Las señales cronoamperométricas correspondientes se resumen en la **Figura 13**.

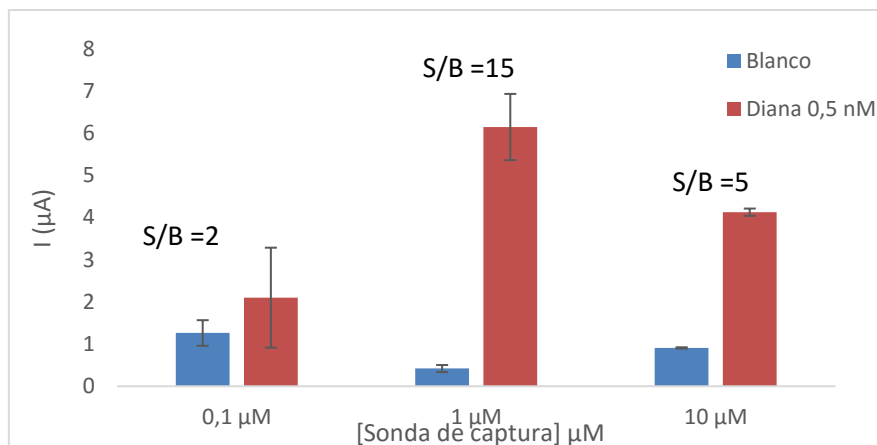


Figura 13. Respuesta del genosensor en función de la concentración de sonda de captura en la disolución de inmovilización.

Los datos obtenidos muestran que la señal correspondiente al blanco no varía significativamente siendo la señal específica la que más varía. En concreto, el valor máximo de la relación señal/blanco se alcanza para una concentración de sonda de captura de 1 μM.

Para la optimización de la densidad de sonda de captura inmovilizada hay que tener en cuenta que debe de haber un equilibrio entre la eficiencia de la hibridación y la magnitud de la señal registrada. A concentraciones bajas de sonda de ADN se logran las mayores eficiencias de hibridación, pero se obtienen señales bajas; mientras que para concentraciones altas de la sonda de ADN se forman aglomerados por lo que muchas hebras no están accesibles para hibridar. Los resultados que se presentan en la **Figura 12** podrían explicarse con este razonamiento.

Para comprobar si la hipótesis anterior se cumple en este caso concreto, se evaluó la densidad superficial de ADN sobre la superficie del transductor de oro empleando un método cronocoulombimétrico descrito por Tarlov para monocapas mixtas de ADN y MCH.

4.5 Cuantificación de la cantidad de ADN: Método de Tarlov

La cuantificación del ADN inmovilizado en la superficie del electrodo se puede determinar electroquímicamente mediante el método desarrollado por Tarlov. Este método se basa en la relación que se puede establecer entre el catión $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ y el ADN.

Este catión se intercambia con los contraiones del ADN (Na^+); de tal manera, que si se trabaja con una disolución reguladora de baja fuerza iónica, cada catión de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ neutraliza la carga de tres grupos fosfatos que pertenecen a tres nucleótidos. Por lo que se establece una relación entre:



La medida de la cantidad de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ adsorbido en el electrodo se determina mediante la técnica de cronoculombimetría, es decir, se mide la carga que circula por unidad de tiempo. Este proceso viene definido por la ecuación de Cottrel:

$$Q(t) = (2nFA D_o^{1/2} C_o^*)/\pi^{1/2} \cdot t^{1/2} + Q_{dl} + nFA\Gamma_0$$

El primer término de la ecuación representa la carga debida a la difusión de la especie redox. Donde n es el número de electrones intercambiados por molécula reducida ($1e^-$ en este caso); A es el área del electrodo (cm^2); D_o es el coeficiente de difusión (cm^2/s); C_o^* es la concentración de hexaminorutenio (III) en disolución ($100 \mu\text{M}$) y F es la constante de Faraday.

El segundo término representa la carga de la doble capa (Q_{dl})

Por último, el tercer término es la contribución de la especie adsorbida. Γ_0 es el exceso superficial o cantidad de marcador redox adsorbido sobre la superficie electródica.

De la ordenada en el origen de la representación de Q frente a $t^{1/2}$ se obtiene la suma de la carga de la doble capa más la correspondiente a la reducción del marcador redox adsorbido (Q_2). Si a este valor se le resta la ordenada en el origen obtenida en un experimento idéntico, pero en ausencia del marcador redox (Q_1) se puede determinar el valor Γ_0 .

$$\text{En ausencia de } [\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+} \rightarrow Q_{dl} = Q_1$$

$$\text{En presencia } [\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+} \rightarrow Q_{dl} + nFA\Gamma_0 = Q_2$$

Luego por diferencia tendríamos:

$$Q_2 - Q_1 = nFA\Gamma_0 \rightarrow \Gamma_0 = \frac{Q_2 - Q_1}{nFA}$$

Una vez conocido Γ_0 se puede calcular la densidad superficial de la sonda de ADN, Γ_{ADN} , mediante la expresión:

$$\Gamma_{ADN} = \Gamma_{Ru} \cdot \frac{z}{m} \cdot N_A$$

Donde:

N_A = número de Avogadro

z = carga de la especie adsorbida (en este caso $z = 3$)

m = número de nucleótidos por molécula de ADN

Las disoluciones tienen que desairearse con corriente de nitrógeno antes de proceder a las medidas. Se emplea un medio de baja fuerza iónica para que sea el $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ el que se una electrostáticamente al ADN y no los iones del medio. En este trabajo se utilizó una reguladora 10 mM Tris-HCl de pH 7,4 [30]

En la **Figura 14** se puede observar el tipo de curvas que se obtienen para esta técnica.

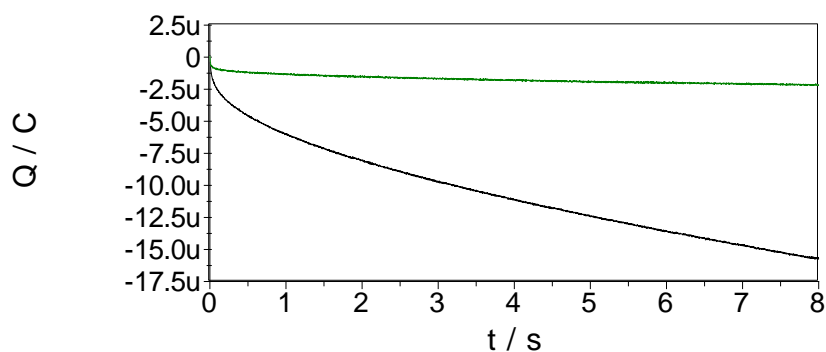


Figura 14. Medida en ausencia de Ru^{3+} (curva verde). Medida en presencia de Ru^{3+} (curva negra)

Se llevó a cabo la cuantificación del ADN inmovilizado para distintas concentraciones de sonda de captura (0,1 μ M, 1 μ M y 10 μ M). Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Variación del recubrimiento superficial de SC dependiendo de su concentración en la disolución de inmovilización.

	Promedio Γ_{ssADN}	SD Γ_{ssADN}	RSD (%)
[SC] = 1 μ M	$4,99 \cdot 10^{12}$	$4,27 \cdot 10^{11}$	8,55
[SC] = 0,1 μ M	$2,37 \cdot 10^{12}$	$2,49 \cdot 10^{11}$	10,53

[SC] = 10 μ M	$3,22 \cdot 10^{12}$	$2,28 \cdot 10^{11}$	7,07
-------------------	----------------------	----------------------	------

Según los resultados obtenidos, la concentración de sonda de captura que condujo a un mayor recubrimiento superficial fue 1 μ M, siendo además la que proporciona mayores relaciones S/B. Por tanto, se puede concluir que, en este caso, una mayor cantidad de ADN inmovilizado viene asociada a una mayor sensibilidad.

Finalmente se selecciona la concentración de 1 μ M como concentración óptima de sonda de captura en la disolución de inmovilización.

En el **Anexo I** se recogen las tablas con todas las medidas realizadas.

4.6 Optimización condiciones de hibridación

Una vez seleccionadas las condiciones de diseño de la fase sensora, se optimizaron las condiciones experimentales para las etapas implicadas en el funcionamiento del genosensor. Los parámetros optimizados fueron la composición de la disolución y el tiempo de hibridación heterogénea.

En primer lugar, se evaluó la respuesta del ensayo a concentraciones crecientes del analito. En la **Figura 15** se representa la intensidad de corriente registrada empleando una concentración de 1 μ M de sonda de captura y un tiempo de hibridación heterogénea de 1 hora. Todas las medidas se hicieron al menos por triplicado.

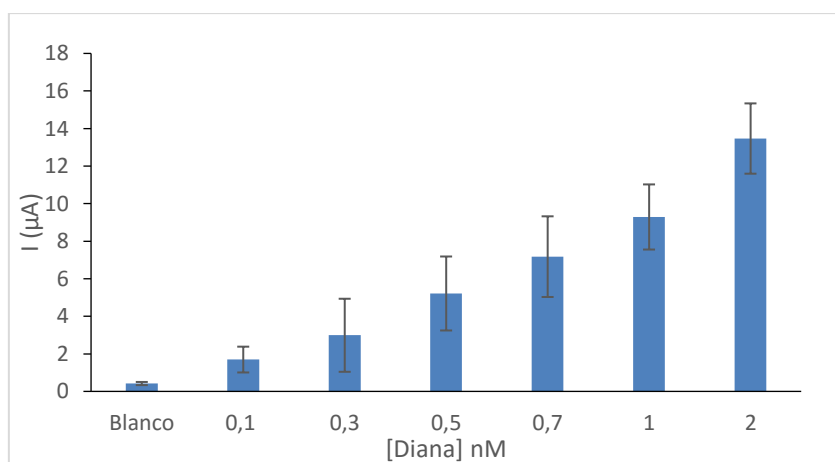


Figura 15. Representación de intensidad de corriente frente a concentración de *Legionella pneumophila*.

La señal inespecífica correspondiente al control negativo resultó elevada para este tipo de ensayos y la reproducibilidad de la respuesta cronoamperométrica expresada como desviación estándar relativa (RSD = 36%), es aceptable aunque se puede mejorar.

Con el objetivo de disminuir la señal inespecífica (valor del blanco) se llevó a cabo la adición de BSA al medio de hibridación en una concentración 2,5 % (m/v). Esta proteína es ampliamente utilizada como bloqueante en el desarrollo de genosensores y su capacidad para favorecer la hibridación en disolución ha sido descrita en estudios previos [38]. Como se puede observar en la **Figura 16** la BSA no solo reduce los blancos sino que se obtienen señales, en general, más reproducibles (RSD menores).

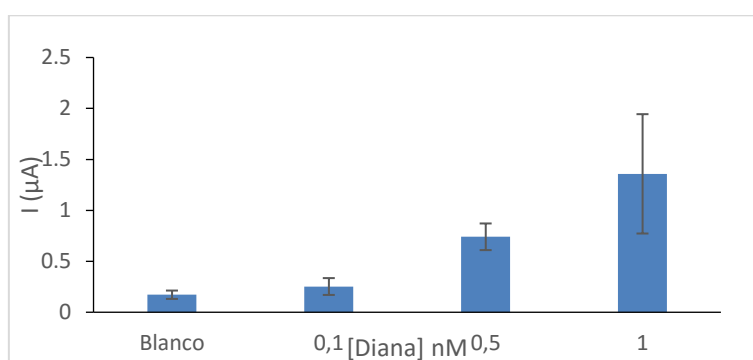


Figura 16. Respuesta del sensor empleando BSA en la disolución de hibridación.

Posteriormente, se estudió la influencia del tiempo de hibridación heterogénea sobre la respuesta del genosensor. Para ello, se llevó a cabo el ensayo habitual incorporando 2,5 % de BSA en el medio de hibridación y realizando la hibridación heterogénea durante 2 horas.

A continuación se presentan los resultados en la **Figura 17**:

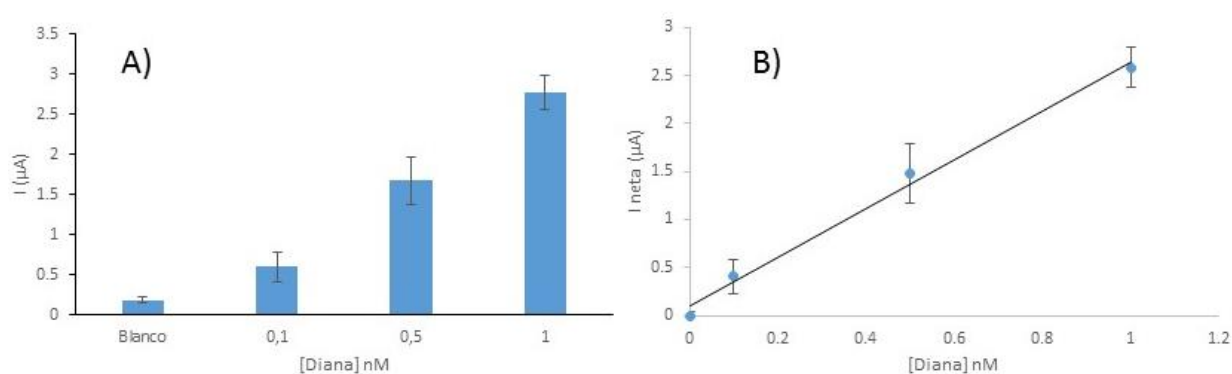


Figura 17. Respuesta del sensor con tiempo de hibridación de 2 horas en presencia de BSA. A) Diagrama de barras. B) Calibrado.

Como se puede observar con el aumento de tiempo de hibridación la relación señal/blanco aumenta en todo el intervalo de concentraciones ensayadas, es decir, se consigue una mejora en la sensibilidad del método.

Por tanto, las condiciones óptimas para las etapas de hibridación son las resumidas en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Condiciones óptimas de hibridación.

Hibridación homogénea	Medio	2xSSPE pH 7,4 + BSA 2,5 %
	[SI]	1 μ M
	Ciclo térmico	95 °C, 5 min
		20 °C, \geq 30 min
Hibridación heterogénea	Temperatura	20 °C (ambiente)
	Tiempo	2 horas

Hay que tener en cuenta que las señales obtenidas para un tiempo de hibridación de 1 hora son elevadas lo que permitiría la detección de *Legionella pneumophila* más rápida; sin embargo, se optó por un tiempo de hibridación de 2 horas ya que proporciona una mayor sensibilidad.

Las características del genosensor desarrollado se detallan a continuación:

- Ecuación de calibración: $I (\mu\text{A}) = (2,5 \pm 0,1) C_{\text{SD}} (\text{nM}) + (0,10 \pm 0,08)$; $r^2 = 0,993$
- Intervalo lineal: el genosensor responde a la concentración de secuencia específica de *Legionella pneumophila* en el intervalo de concentraciones estudiadas (0,1-1) nM.
- Reproducibilidad: el ensayo muestra una reproducibilidad aceptable. La desviación estándar relativa promedio es de 18 %.
- Límite de detección: el límite de detección es la concentración mínima de analito que se puede detectar, ya que produce una señal significativamente diferente del blanco. Se define como: $C_{\text{LD}} = 3S_{\text{b}}/m$; y siendo m la pendiente de la recta de calibración. Límite de detección $\rightarrow C_{\text{LD}} = 3S_{\text{b}}/m = 40 \text{ pM}$.

4.7 Selectividad

Un aspecto importante a considerar para la aplicación analítica del genosensor es el efecto de posibles interferentes. Con este propósito se evaluó la respuesta del ensayo frente a:

- *Escherichia coli*, otro patógeno que puede estar presente en muestras ambientales de agua que puedan contener *L. pneumophila*.
- *L. longbeache*, especie de *Legionella* de menor virulencia cuya secuencia de nucleótidos se diferencia de la secuencia específica de *L. pneumophila*, como máximo, en 7 bases situadas de forma no consecutiva a lo largo del fragmento de 80 nucleótidos.
- Secuencia aleatoria de 80 (random) nucleótidos.

Todas ellas en concentración 0,5 nM. Los resultados se muestran en la **Figura 18**.

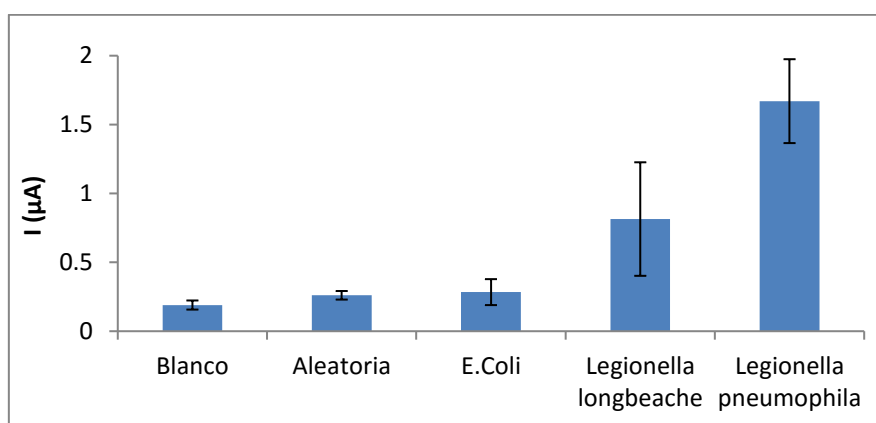


Figura 18. Estudio de la selectividad del sensor..

De la comparación de las señales cronoamperométricas registradas se puede concluir que el genosensor desarrollado exhibe una buena selectividad. En particular, la intensidad de corriente asociada a la secuencia aleatoria coincide con la medida en el ensayo de control negativo. Por otra parte, la señal debida a la presencia de 0,5 nM de secuencia específica de *E. coli* coincidiría con la registrada para 63 pM de *L. pneumophila*, valor ligeramente superior al límite de detección del ensayo. Además, dado que la señal debida a *L. longbeachae* es 2 veces inferior a la de *L. pneumophila*, el genosensor permite discernir entre estas dos especies de *Legionella* íntimamente relacionadas, si bien el factor de diferenciación no permite hablar de especificidad.

La selectividad de un biosensor de ADN está condicionada por la selectividad de la reacción de reconocimiento molecular, en este caso, la reacción de hibridación. Para la

discriminación de secuencias de ADN que difieran en un número muy pequeño de bases nitrogenadas, tradicionalmente se emplean condiciones rigurosas en la etapa de hibridación (alta temperatura, aplicación de potencial, empleo de agentes caotrópicos, etc.) que complican el ensayo, especialmente cuando se pretende desarrollar un dispositivo para medidas “en el punto de necesidad” (*at point of need*). Una alternativa más adecuada con vistas a mejorar la selectividad del ensayo sería diseñar una sonda de captura con forma de horquilla o mango-bucle [40] en lugar de la sonda lineal empleada en este trabajo.

4.8 Estabilidad de la fase sensora

A la hora de desarrollar un dispositivo sensor para el control rutinario de *Legionella pneumophila* en muestras medioambientales con posibilidad de ser comercializado, la estabilidad en el tiempo de la fase sensora tiene especial importancia.

A pesar de los numerosos estudios publicados en los últimos años y su gran utilidad en campos como Nanotecnología, Biomedicina o Ciencia de los Materiales [41], la mayor limitación de las monocapas autoensambladas constituye su inestabilidad térmica y oxidativa (se degrada al aire con relativa facilidad) así como su fotosensibilidad, lo que restringe su comercialización. En el caso particular de las monocapas binarias de ADN y MCH se ha observado una pérdida de señal del 60 % tras 10 días de almacenamiento; este resultado puede estar íntimamente relacionado con el comportamiento de las SAMs como líquidos bidimensionales capaces de desensamblarse y reensamblarse en sitios contiguos [42]. Esta propiedad podría tener un efecto menos perjudicial en el caso de monocapas autoensambladas puras, de un único componente, como las empleadas en este trabajo; además las interacciones π del ácido mercaptobenzoico podrían restringir parcialmente la movilidad lateral de los tioles [43]

Para estudiar la estabilidad de la fase sensora desarrollada se comenzó evaluando la respuesta registrada con electrodos modificados siguiendo el protocolo habitual; almacenando los electrodos con una gota de disolución salina de fosfato (2xSSPE, pH 7,4) en nevera. Tras cuatro días bajo las condiciones especificadas se registró una disminución de señal del 70 %; el método de almacenamiento no es adecuado, por lo tanto, se buscaron alternativas.

A continuación se probó a almacenar los electrodos en seco tras un lavado con una disolución reguladora suplementada con glucosa. El empleo de glucosa y otros azúcares como agentes estabilizantes aparece descrito en la bibliografía. [44] [45] [46] [47]

Aunque se desconoce el mecanismo exacto de actuación, parece que estos monosacáridos protegen las moléculas de ADN frente a la desecación y, a través de la formación de puentes de hidrógeno entre el hidroxilo del azúcar y el fosfato del ADN, estabilizan la monocapa.

El protocolo de almacenamiento elegido se detalla a continuación:

Se lleva a cabo una etapa de lavado de los electrodos modificados con disolución reguladora 2xSSPE y secado con corriente de nitrógeno. Seguida de una etapa de incubación de 30 minutos con una disolución de BSA y glucosa al 2,5 %. Por último, se retira la gota con nitrógeno y se almacena en nevera en un desecador.

Antes de evaluar los electrodos almacenados, estos han de lavarse con disolución reguladora 2xSSPE, secarse con corriente de nitrógeno e hidratarse con una gota de 2xSSPE durante 2 horas.

A continuación se desarrolla el ensayo con las etapas habituales del protocolo experimental.

El estudio de estabilidad de la fase sensora en el tiempo se realizó evaluando la respuesta para una concentración de secuencia diana de 0,5 nM y de 0 nM siguiendo el protocolo de almacenamiento explicado. Se representa a continuación cómo evoluciona la relación señal/blanco con el paso de los días. (**Figura 19**)

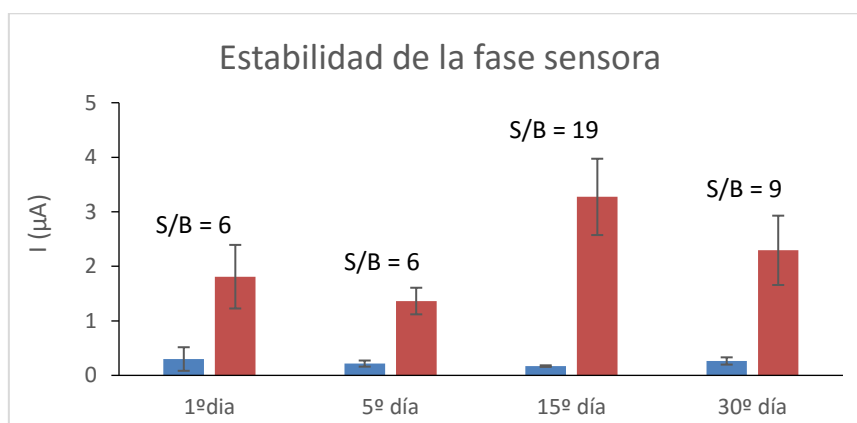


Figura 19. Estudio de la estabilidad de la fase sensora en el tiempo.

De acuerdo con los datos experimentales, la relación señal/blanco no disminuye tras 30 días de almacenamiento en el desecador, por lo que se puede concluir que la fase sensora es estable durante al menos un mes, resultado de gran importancia para la comercialización del sensor.

Resulta llamativo que después de 15 días la relación S/B obtenida sea tres veces superior al valor registrado empleando una fase sensora recién construida. La misma tendencia se encontró con un segundo lote de electrodos modificados cuyo estudio se prolongó durante dos semanas, luego los datos son consistentes.

Este fenómeno no aparece descrito en la bibliografía con anterioridad. Podría estar relacionado con una reorganización de la monocapa autoensamblada que se traduciría en una mejora de la eficiencia de la reacción de hibridación y por consiguiente un aumento en la sensibilidad. En todo caso, se necesitan estudios adicionales para terminar de esclarecer esta cuestión.

La aplicación de un protocolo muy similar al que aquí se describe para la conservación de monocapas autoensambladas mixtas constituidas por la sonda de ADN tiolada y 6-mercaptohexanol o 11-mercaptoundecanol como alcanotiol bloqueante condujo a un decrecimiento de la señal específica entorno a un 10 % al cabo de un mes [48]. Esto apunta a la existencia de efectos positivos adicionales sobre la estabilidad de la capa sensora derivados de la inmovilización covalente de las sondas de ADN sobre monocapas autoensambladas puras de tioles aromáticos.

Por otro lado, la estabilidad de las monocapas sensoras optimizadas en este trabajo resulta comparable a la obtenida con monocapas autoensambladas ternarias formadas por la sonda de ADN tiolada y los alcanotioles 1,6-hexanoditiol y 6-mercaptohexanol almacenadas a 4 °C en atmósfera seca; sin embargo, su obtención es más laboriosa [49].

4.9 El ARN como analito

El genosensor desarrollado responde a la secuencia de ADN sintético específica de *Legionella pneumophila* que forma parte del gen ARNr 16S, pero también puede utilizarse para detectar directamente el ARN ribosómico pues su secuencia de bases es idéntica excepto por la presencia de uracilo que sustituye a la timina.

La medida de ARN bacteriano posee dos ventajas frente a la medida de ADN genómico: el número de copias de ARN ribosómico es superior y su longitud es menor por lo que su hibridación con la sonda de captura inmovilizada sobre el transductor es más favorable que la del ADN genómico completo.

El ARN extraído de las células cultivadas de *Legionella pneumophila* se cuantificó mediante un chip de electroforesis obteniendo un valor promedio de 200 ng/μL (**Figura 20**) con una pureza adecuada para su análisis (relación 23S/16S ≥ 1,5).

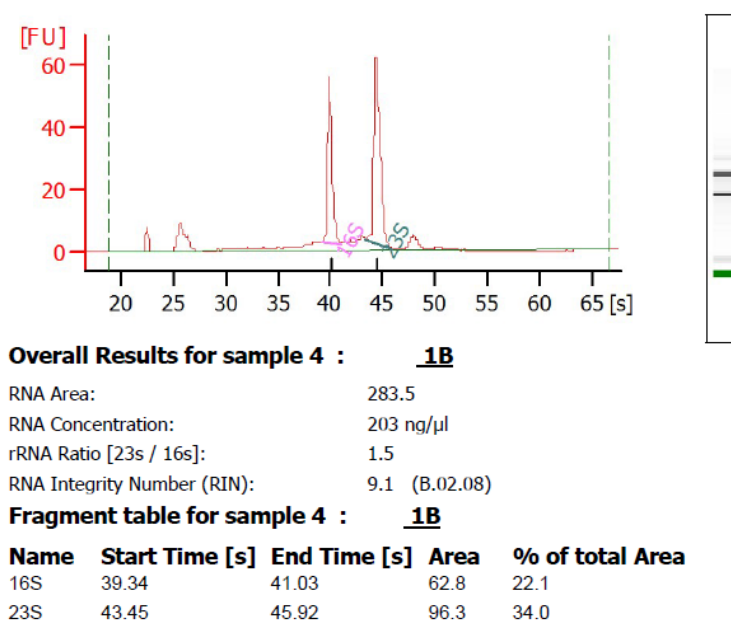


Figura 20. Electroferograma del extracto de ARN.

Se realizaron diluciones seriadas del extracto de ARN para su determinación con el genosensor desarrollado. Los resultados se recogen en la **Figura 21**.

Para transformar el valor de 200 ng/μL de ARN en molaridad, lo que facilita su comparación con el resto de resultados del proyecto, es necesario conocer el peso molecular de la molécula de ARNr 16S de *Legionella pneumophila*. Este se estimó sabiendo que posee 1474 nucleótidos y que la masa molecular promedio de un nucleótido es de 330 g/mol; resultando un valor de 486420 g/mol. Por tanto, el extracto de partida se corresponde con 410 nM.

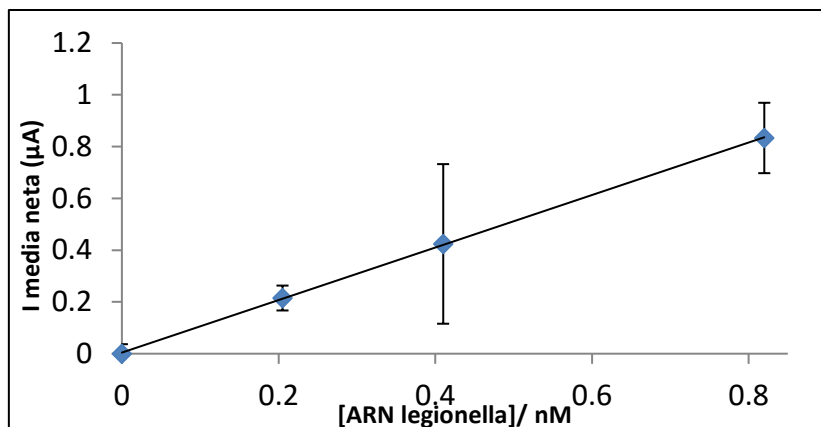


Figura 21. Medidas de ARN.

Ecuación de calibración: $I (\mu\text{A}) = (2,5 \pm 0,1) C_{\text{SD}} (\text{nM}) + (0,10 \pm 0,08)$; $r^2 = 0,993$

Ecuación de calibración para ARN extraído: $I (\mu\text{A}) = (1,01 \pm 0,01) C_{\text{ARN}} (\text{nM}) + (0,004 \pm 0,004)$; $r^2 = 0,9999$.

La pendiente de la recta obtenida, $(1,01 \pm 0,01) \mu\text{A}/\text{nM}$, es aproximadamente 2 veces menor que la pendiente obtenida para el calibrado realizado con ADN sintético, $(2,5 \pm 0,1) \mu\text{A}/\text{nM}$, en las mismas condiciones **Figura 17**. Esto indica que el sensor es menos sensible para detectar ARN ribosómico; lo que no es de extrañar dado que el ADN sintético es corto (80 nucleótidos) al contrario que el ARN extraído que posee una longitud mayor, aproximadamente de 1500 nucleótidos. A esta longitud mayor vendrá asociada una estructura secundaria interna fuerte (ver **Figura 1**) lo que hará más complicado su hibridación en superficie.

Límite de detección del genosensor desarrollado para determinar muestras de ARN extraído y purificado de células de *L. pneumophila* $\rightarrow C_{\text{LD}} = 3S_b/m = 110 \text{ pM}$.

Los valores umbral de concentración de *Legionella* en la legislación medioambiental española vienen expresados en unidades formadoras de colonia (ufc).

Para correlacionar el límite de detección en molaridad con la legislación (unidades ufc) hay que transformar la cantidad de analito presente en el volumen de medida a moléculas de ARN ribosómico, para lo cual, se multiplican los moles de analito por el número de Avogadro. Después, se estima el número total de células dividiendo las moléculas de ARN ribosómico obtenidas entre el número de ribosomas que hay en una célula (6800 ribosomas/célula). [16]

$$\begin{aligned} \text{Límite de detección} &\rightarrow C_{LD} = 0,11 \text{ nM} \cdot 60 \cdot 10^{-6} \text{ L} \cdot \frac{1 \text{ mol}}{10^9 \text{ nmol}} \cdot 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} \cdot \frac{1 \text{ célula}}{6800 \text{ ribosomas}} \\ &= 5,8 \cdot 10^5 \text{ ufc de } \textit{Legionella pneumophila}. \end{aligned}$$

5. Conclusiones

En este proyecto se ha desarrollado un genosensor electroquímico para la detección de *Legionella pneumophila* a partir de su material genético como alternativa a los métodos de análisis oficiales basados en el cultivo microbiológico.

Se han optimizado varios parámetros que afectan a la sensibilidad de la detección permitiendo alcanzar un límite de detección de 40 pM para una secuencia de 80 nucleótidos específica de *Legionella pneumophila* en un tiempo inferior a cuatro horas.

El genosensor desarrollado es altamente selectivo permite distinguir entre dos especies de *Legionella* con distinta virulencia para el hombre (*L. pneumophila* y *L. longbeache*) y otros patógenos como *E. coli* presentes en muestras ambientales.

El empleo de electrodos serigrafados de oro permite utilizar la reacción de la quimisorción muy útil para modificar la superficie del transductor y permitir la inmovilización de la fase sensora.

La fase sensora descrita presenta una buena estabilidad en el tiempo cuando se almacena a 4 °C en desecador tras unas etapas de lavado con glucosa y BSA. En estas condiciones no se registra pérdida de la señal; esto se puede asociar al hecho del empleo de una monocapa pura que se caracteriza por ser más homogénea y compacta.

El empleo de ARN ribosómico 16S purificado, extraído de cultivos de *Legionella pneumophila* como analito permiten detectar $5,8 \cdot 10^5$ ufc. Futuras mejoras deberán ir dirigidas a la detección directa de este ARN en lisados bacterianos sin necesidad de una purificación previa, disminuyendo la complejidad y el tiempo de procesado de la muestra.

6. Bibliografía

- [1] S. A. Hines, D. J. Chappie, R. A. Lordo, B. D. Miler, R. J. Janke, H. A. Lindquist, K. R. Fox, H. S. Ernst y S. C. Taft, «Assessment of relative potential for Legionella species or surrogates inhalation exposure from common water uses,» *Water Research*, vol. 56, pp. 203-213, 2014.
- [2] L. Gómez-Valero, C. Rusniok y C. Buchrieser, «Legionella pneumophila: population genetics, phylogeny and genomics,» *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 9, nº 5, pp. 727-739, 2009.
- [3] M. Steinert, U. Hentschel y J. Hacker, «Legionella Pneumophila: an aquatic microbe goes astray,» *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 26, pp. 149-162, 2002.
- [4] N. P. Cianciotto, «Pathogenicity of Legionella Pneumophila,» vol. 291, pp. 331-343, 2001.
- [5] A. Mansi, I. Amori, I. Marchesi, A. M. Marcelloni, A. R. Proietto, G. Ferranti, V. Magini, F. Valeriani y P. Borella, «Legionella spp. survival after different disinfection procedures: comparison between conventional culture, qPCR and EMA-qPCR,» *Microchemical Journal*, vol. 112, pp. 65-69, 2014.
- [6] «Boletín Oficial del Estado (B.O.E), Real Decreto 861/2003, 4 de julio de 2003,» España.
- [7] J. Behets, P. Declerck, Y. Delaedt, B. Creemers y F. Ollevier, «Development and evaluation of a Taqman duplex real-time PCR quantification method for reliable enumeration of Legionella pneumophila in water samples,» *Journal of Microbiological Methods*, vol. 68, pp. 137-144, 2007.
- [8] A. K. Kirschner, «Determination of viable legionellae in engineered water systems: Do we find what we are looking for?,» *Water Research*, vol. 93, pp. 276-288, 2016.
- [9] UNE-EN ISO 11731, «Calidad del agua. Detección y recuento de Legionella.,» AENOR, 2007.
- [10] UNE-EN ISO 11731-2, «Calidad del agua. Detección y recuento de Legionella. Parte 2: Método de filtración directa en membrana para aguas con bajos contenidos en bacterias.,» AENOR, 2008.

- [11] P. C. Lück y B. Liebscher, «Detection of Legionella pneumophila in water samples by quantitative culture and an antigen detection assay,» *International Journal Hygiene Environmental Health*, vol. 206, pp. 201-204, 2003.
- [12] S.Blanco, C.Prat, M.D.Sánchez, D.Ferrer, T.Pellicer, L.Haba, I.Latorre, C.Vilaplana, V.Ausina y J.Domínguez, «Evaluation of a Legionella urinary antigen enzyme inmunoassay for rapid detection of Legionella pneumophila in water samples,» *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 211, p. 168171, 2008.
- [13] H. Karch, A. Schwarzkopf y H. Schmidt, «Amplification methods in diagnostic bacteriology (selected examples),» *Journal of Microbiological Methods*, vol. 23, pp. 55-73, 1995.
- [14] Haiyan Li, Hongyi Xin y Sam Fong Yau Li, «Multiplex PMA-pPCR Assay with Internal Amplification Control for Simultaneous Detection of Viable Legionella pneumophila, Salmonella typhimurium, and Staphylococcus aureus in Environmental Waters,» *Environmental Science & Technology*, vol. 49, pp. 14249-14256, 2015.
- [15] H. L. Smits y R. A. Hartskeerl, «PCR amplifications reactions in parasitology,» *Journal of Microbiological Methods*, vol. 23, 1995.
- [16] Tarja Leskelä, Anus Tilsala-Timisjärvi, Jaana Kusnetsov, Peter Neubauer y Antje Breitenstein, «Sensitive genus-specific detection of Legionella by a 16S rRNA based sandwich hybridization assay,» *Journal of Microbiological Methods*, vol. 62, pp. 167-179, 2005.
- [17] Nai-Tzu Chen y Ching-Wen Chang, «Quantification of Legionella Pneumophila by real-time quantitative PCR from samples with humic acid and ferric ion,» *Science of the Total Environment*, vol. 414, 2012.
- [18] Renu Singh, Maumita Das Mukherjee, Gajjala Sumana, Rajinder K.Gupta, Seema Sood y B.D. Malhotra, «Biosensors for pathogen detection: A smart approach towards clinical diagnosis,» *Sensors and Actuators*, vol. 197, pp. 385-404, 2014.
- [19] A. Sassolas, B. D. Leca-Bouvier y L. J. Blum, «DNA Biosensors and Microarrays,» *Chemical Reviews*, vol. 108, pp. 109-139, 2008.

- [20] C. I.L. Justino, A. C. Freitas, R. Pereira, A. C. Duarte y T. A.P. Rocha Santos, «Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors,» *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 68, pp. 2-17, 2015.
- [21] Ailin Liu, Kun Wang, Shaohuang Weng, Yun Lei, Liqing Lin, Wei Chen, Xinhua Lin y Yuanzhong Chen, «Development of electrochemical DNA biosensors,» *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 37, nº 1, pp. 101-111, 2012.
- [22] O. Alévêque y E. Levillain, «A generalized lateral interactions function to fit voltammetric peaks of self-assembled monolayers,» *Electrochemistry Communications*, vol. 67, pp. 73-79, 2016.
- [23] A. Ulman, «Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers,» *Chemical Reviews*, vol. 96, pp. 1533-1554, 1996.
- [24] J. Christopher Love, Lara A. Estroff, Jennah K.Kriebel, Ralph G. Nuzzo y George M. Whitesides, «Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology,» *Chemical Reviews*, vol. 105, nº 4, pp. 1103-1169, 2005.
- [25] Cristina Boozer, Shengfu Chen y Shaoyi Jiang, «Controlling DNA Orientation on Mixed ssDNA/OEG SAMs,» *Langmuir*, vol. 22, pp. 4694-4698, 2006.
- [26] Tonya M. Herne y Michael J. Tarlov, «Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces,» *Journal of American Chemical Society*, vol. 119, pp. 8916-8920, 1997.
- [27] Eric A. Josephs y Tao Ye, «Nanoscale Spatial Distribution of Thiolated DNA on Model Nucleic Acid Sensor Surfaces,» *ACS Nano*, vol. 7, nº 4, pp. 3653-3660, 2013.
- [28] Alexander W. Peterson, Richard J. Heaton y Rosina M. Georgiadis, «The effect of surface probe density on DNA hybridization,» *Nucleic Acids Research*, vol. 29, nº 24, pp. 5163-5168, 2001.
- [29] Frank Caruso, Elke Rodda y D. Neil Furlong, «Quartz Crystal Microbalance Study of DNA Immobilization and Hybridization for Nucleic Acid Sensor Development,» *Analytical Chemistry*, vol. 69, pp. 2043-2049, 1997.
- [30] A. B.Steel, T. M.Herne y M. J.Tarlov, «Electrochemical Quantitation of DNA Immobilized on Gold.,» *Analytical Chemistry*, vol. 70, nº 22, 15 November 1998.

- [31] E.Briand, C.Gu, S.Boujday, M.Salmain, J.M.Herry y C.M.Pradier, «Functionalisation of gold surfaces with thiolate SAMs: topography/bioactivity relationship - a combined FT-RAIRS, AFM and QCM investigation,» *Surface Science*, vol. 601, pp. 3850-3855, 2007.
- [32] M. d. R. Rodicio y M. d. C. Mendoza, «Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica,» vol. 22, pp. 238-245, 2004.
- [33] A. J. Bard y L. R. Faulkner, *Electrochemicals Methods. Fundamentals and applications.*, Second Edition ed., 2001, pp. 156-226.
- [34] J. M. Pigarrón Carrazón y P. Sánchez Batanero, *Química electroanalítica. Fundamento y aplicaciones.*, 2003.
- [35] D. Barriet, Chi Ming Yam, O. E. Shmakova, A. C. Jamison y T. Randal Lee, «4-Mercaptophenylboronic Acid SAMs on Gold: Comparison with SAMs Derived from Thiophenol, 4-Mercaptophenol, and 4-Mercaptobenzoic Acid,» *Langmuir*, vol. 23, pp. 8866-8875, 2007.
- [36] «National Center for Biotechnology Information (NCBI),» [En línea]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- [37] M.Zuker, «MFold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.,» *Nucleic Acids Research*, vol. 31, pp. 3406-3415, 2003.
- [38] Suely Moura Melo, Rebeca Miranda Castro, Noemí de los Santos Álvarez, Arturo J. Miranda Ordieres, J. Ribeiro Dos Santos Junior, Rosana A. da Silva Fonseca y María Jesús Lobo Castañón, «Targeting Helicase-Dependent Amplification Products with an Electrochemical Genosensor for Reliable and Sensitive Screening of Genetically Modified Organisms,» *Analytical Chemistry*, vol. 87, pp. 8547-8554, 2015.
- [39] Rebeca Miranda Castro, Noemí de los Santos Álvarez, María Jesús Lobo Castañón, Arturo J. Miranda Ordieres y Paulio Tuñón Blanco, «PCR-coupled electrochemical sensing of Legionella pneumophila,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, pp. 2390-2396, 2009.
- [40] R. Miranda Castro, P. De los Santos Álvarez, M. J. Lobo Castañón y A. J. Miranda Ordieres, «Hairpin-DNA Probe for Enzyme-Amplified Electrochemical Detection of Legionella pneumophila,» *Analytical Chemistry*, vol. 79, pp. 4050-4055, 2007.

- [41] Hannu Häkkinen, «The gold-sulfur interface at the nanoscale,» *Nature Chemistry*, vol. 4, pp. 443-455, 2012.
- [42] J. B. Schlenoff, M. Li y H. Ly, «Stability and Self-exchange in alkanethiol monolayers,» *Journal of American Chemical Society*, vol. 117, nº 50, pp. 12528-12536, 1995.
- [43] V. Ganesh, Ravi R. Pandey, B.D. Malhotra y V. Lakshminarayanan, «Electrochemical characterization of self-assembled monolayers (SAMs) of thiophenol and aminothiophenols on polycrystalline Au: Effects of potential cycling and mixed SAM formation,» *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 619, pp. 87-97, 2008.
- [44] C. W. Harland, Z. Botyanszki, D. Rabuka, C. R. Bertozzi y R. Parthasarathy, «Synthetic trehalose glycolipids confer desiccation resistance to supported lipid monolayers,» *Langmuir*, vol. 25, pp. 5193-5198, 2009.
- [45] F. Albertorio, V. A. Chapa, Xin Chen, A. J. Díaz y P. S. Cremer, «The α,α -(1-1) Linkage of Trehalose Is Key to Anhydrobiotic Preservation,» *Journal of American Chemical Society*, vol. 129, nº 34, 2007.
- [46] E. Baldrich, J. L. Acero, G. Reekmans, W. Laureyn y C. K. O'sullivan, «Displacement Enzyme Linked Aptamer Assay,» *Analytical Chemistry*, vol. 77, nº 15, pp. 4774-4784, 2005.
- [47] R. Y. Lai, D. S. Seferos, A. J. Heeger, G. C. Bazan y K. W. Plaxco, «Comparison of the Signaling and Stability of Electrochemical DNA Sensors Fabricated from 6- or 11-Carbon Self-Assembled Monolayers,» *Langmuir*, vol. 22, nº 25, pp. 10796-10800, 2006.
- [48] R. Y. Lai, D. S. Seferos, A. J. Heeger, G. C. Bazan y K. W. Plaxo, «Comparison of the Signaling and Stability of Electrochemical DNA Sensors Fabricated from 6- or 11-Carbon Self-Assembled Monolayers,» *Langmuir*, vol. 22, pp. 10796-10800, 2006.
- [49] F. Kuralay, S. Campuzano y J. Wang, «Greatly extended storage stability of electrochemical DNA biosensors using ternary thiolated self-assembled monolayers,» *Talanta*, vol. 99, pp. 155-160, 2012.

Anexo I

[Sonda de captura] = 1 μM				
Qfondo	QRu	ΔQ	Γ Ru	Γ ssADN
$-1,74 \cdot 10^{-7}$	$-2,64 \cdot 10^{-6}$	$2,47 \cdot 10^{-6}$	$5,25 \cdot 10^{-11}$	$4,74 \cdot 10^{12}$
$-1,32 \cdot 10^{-7}$	$-2,61 \cdot 10^{-6}$	$2,48 \cdot 10^{-6}$	$5,02 \cdot 10^{-11}$	$4,54 \cdot 10^{12}$
$-1,02 \cdot 10^{-7}$	$-2,29 \cdot 10^{-6}$	$2,19 \cdot 10^{-6}$	$5,76 \cdot 10^{-11}$	$5,20 \cdot 10^{12}$
$-9,56 \cdot 10^{-8}$	$-2,52 \cdot 10^{-6}$	$2,43 \cdot 10^{-6}$	$6,06 \cdot 10^{-11}$	$5,47 \cdot 10^{12}$
Promedio			$5,52 \cdot 10^{-11}$	$4,99 \cdot 10^{12}$
SD			$4,73 \cdot 10^{-11}$	$4,27 \cdot 10^{11}$
RSD (%)			8,56	8,56

[Sonda de captura] = 0,1 μM				
Qfondo	QRu	ΔQ	Γ Ru	Γ ssADN
$-9,49 \cdot 10^{-7}$	$-2,54 \cdot 10^{-6}$	$1,59 \cdot 10^{-6}$	$4,07 \cdot 10^{-11}$	$2,63 \cdot 10^{12}$
$-6,86 \cdot 10^{-7}$	$-2,22 \cdot 10^{-6}$	$1,54 \cdot 10^{-6}$	$3,92 \cdot 10^{-11}$	$2,53 \cdot 10^{12}$
$-1,10 \cdot 10^{-6}$	$-2,92 \cdot 10^{-6}$	$1,82 \cdot 10^{-6}$	$3,44 \cdot 10^{-11}$	$2,22 \cdot 10^{12}$
$-1,09 \cdot 10^{-6}$	$-2,44 \cdot 10^{-6}$	$1,35 \cdot 10^{-6}$	$3,25 \cdot 10^{-11}$	$2,10 \cdot 10^{12}$
Promedio			$3,67 \cdot 10^{-11}$	$2,37 \cdot 10^{12}$
SD			$3,86 \cdot 10^{-12}$	$2,49 \cdot 10^{11}$
RSD (%)			10,53	10,53

[Sonda de captura] = 10 μM				
Qfondo	QRu	ΔQ	Γ Ru	Γ ssADN
$-3,94 \cdot 10^{-7}$	$-3,20 \cdot 10^{-6}$	$2,81 \cdot 10^{-6}$	$4,91 \cdot 10^{-11}$	$3,17 \cdot 10^{12}$
$-2,61 \cdot 10^{-7}$	$-2,80 \cdot 10^{-6}$	$2,53 \cdot 10^{-6}$	$4,51 \cdot 10^{-11}$	$2,91 \cdot 10^{12}$
$-2,32 \cdot 10^{-7}$	$-3,00 \cdot 10^{-6}$	$2,77 \cdot 10^{-6}$	$5,19 \cdot 10^{-11}$	$3,35 \cdot 10^{12}$
$-2,37 \cdot 10^{-7}$	$-2,78 \cdot 10^{-6}$	$2,54 \cdot 10^{-6}$	$5,14 \cdot 10^{-11}$	$3,32 \cdot 10^{12}$
$-2,30 \cdot 10^{-7}$	$-2,65 \cdot 10^{-6}$	$2,42 \cdot 10^{-6}$	$4,71 \cdot 10^{-11}$	$3,04 \cdot 10^{12}$

-1,84·10 ⁻⁷	-2,52·10 ⁻⁶	2,34·10 ⁻⁶	5,49·10 ⁻¹¹	3,54·10 ⁻¹²
Promedio			4,99·10⁻¹¹	3,22·10⁻¹²
SD			3,53·10⁻¹²	2,28·10⁻¹¹
RSD (%)			7,07	7,07