

Diseño de un genosensor electroquímico para la detección indirecta de gluten en alimentos

Begoña Martín Fernández, Carmen Lorena Manzanares Palenzuela, Marta Sánchez-Paniagua López, Beatriz López-Ruiz, Gloria Frutos Cabanillas

Sección Departamental de Química Analítica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. 28040 Madrid. Spain.

e-mail: bealopru@farm.ucm.es

RESUMEN

Se propone un nuevo genosensor electroquímico para la detección de una secuencia específica de ADN que codifica un fragmento inmunogénico de la α -2-gliadina, proteína del gluten de trigo responsable de la celiaquía. El diseño del genosensor se basa en la formación de una monocapa autoensamblada de sonda de captura y un agente bloqueante, mercaptohexanol, sobre electrodos de oro serigrafiados. Se eligió un ensayo tipo sándwich, utilizando una sonda indicadora marcada con biotina y el conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina como molécula de marcaje. La detección del analito se basó en la medida de la corriente de oxidación del 1-naftol, producto formado por la hidrólisis enzimática del 1-naftil-fosfato, mediante voltamperometría de pulso diferencial. Se investigaron y optimizaron los parámetros implicados en la composición de la fase sensora mediante voltametría cíclica, encontrándose como relación óptima sonda de captura:mercaptohexanol 2 μ M:9mM. Con el objetivo de minimizar las adsorciones inespecíficas, se optimizaron las concentraciones de sonda indicadora y conjugado enzima-estreptavidina, especies involucradas en la fase de medida, obteniéndose como valores óptimos 1 μ M y 1,075x10⁻³ g/L respectivamente. El genosensor propuesto presentó una respuesta lineal entre 20 y 250 nM.

Palabras clave: Genosensor; Voltamperometría; Monocapa autoensamblada; Gluten, α -2-gliadina.

ABSTRACT

Electrochemical genosensor for indirect wheat gluten detection in food

A new electrochemical genosensor has been developed for the detection of a specific DNA sequence that encodes for an immunogenic fragment of α -2-gliadin, protein of gluten wheat that plays an important role in celiac disease. The genosensor is based on a mixed self-assembled monolayer consisting on a capture probe and a diluent molecule, mercaptohexanol, both immobilized on screen-printed gold electrodes. A sandwich-type hybridization assay was selected, using a signaling-DNA probe labeled with biotin and streptavidin-alkaline phosphatase as a reporter molecule. Detection of DNA gluten is based on the measurement of the oxidization current of 1-naphthol, product formed by α -naphthyl phosphate enzymatic hydrolysis, by differential pulse voltammetry. Parameters involved in the sensing phase were investigated and optimized by cyclic voltammetry. The optimal capture probe to mercaptohexanol ratio was found to be 2 μ M:9 mM. In order to minimize unspecific adsorptions, both signaling probe and enzyme-streptavidin conjugate concentrations (measurement phase parameters) were optimized (1 μ M and $1.075 \cdot 10^{-3}$ g/L respectively). A linear response from 20 nM to 250 nM is obtained with the proposed genosensor.

Keywords: Genosensor; Voltammetry; Self-assembled monolayer; Gluten, α -2-gliadin.

1. INTRODUCCIÓN

El gluten es un conjunto de proteínas vegetales de reserva presente en los cereales (centeno, trigo, cebada y avena). La celiaquía es una enteropatía de base inmunológica debida a una intolerancia permanente al gluten, que padecen sujetos genéticamente predispuestos provocando una lesión progresiva de las vellosidades intestinales, cuya consecuencia más importante es la disminución de la absorción de nutrientes. Las proteínas inmunogénicas más estudiadas son las prolaminas, en especial las del trigo, denominadas gliadinas. La respuesta adaptativa más común y más fuerte hacia la gliadina está dirigida contra un fragmento de 33 aminoácidos de longitud de la α -2-gliadina (1, 2).

Aproximadamente una de cada cien personas padece esta enfermedad, siendo la enfermedad crónica intestinal más frecuente en España (3). El único tratamiento conocido es la dieta libre de gluten durante toda la vida. El etiquetado "sin gluten" que llevan algunos alimentos, indica un contenido máximo de 20 ppm en productos naturalmente libres de gluten y de 100 ppm para productos procesados (4). Aunque estos niveles sean considerados aparentemente no

dañinos, el nivel exacto de inocuidad para los pacientes celíacos es incierto, existiendo casos que se ven afectados con menores concentraciones.

Los métodos de detección de gluten más extendidos son los basados en ensayos ELISA. El principal inconveniente de esta metodología es producir falsos negativos cuando ocurre la desnaturalización de las proteínas por cambios de temperatura o cuando se somete el gluten a tratamientos industriales para aumentar la solubilidad. Además, se pueden producir reacciones cruzadas entre proteínas estrechamente relacionadas, como las proteínas de la soja, muy utilizadas como sustitutivos de las proteínas del gluten en algunos alimentos. No obstante, se han descrito metodologías alternativas, como son: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR) (5-8), Western Blot, espectrometría de masas y cromatografía (3, 9).

En vista de que muchos de los problemas analíticos derivan de la naturaleza proteica de la muestra, el análisis de secuencias específicas de ADN constituye una alternativa interesante dado que el ADN es más resistente a altas temperaturas que las proteínas, y la sensibilidad y especificidad de la detección es mayor.

Actualmente, han surgido nuevas herramientas para la detección de ADN: los genosensores. Éstos son biosensores de ADN, y como tales son dispositivos analíticos que convierten un evento biológico (hibridación) en una señal cuantificable, cuyo elemento de reconocimiento biológico es una secuencia de oligonucleótidos (sonda), complementaria a la secuencia de ADN a determinar (analito), formándose el híbrido de Watson-Crick con elevada eficacia y extrema selectividad en presencia de mezclas de diferentes ácidos nucleicos no complementarios (10, 11). Dentro de los posibles transductores, el electroquímico aporta ventajas como alta sensibilidad, economía, facilidad de uso, portabilidad y compatibilidad con las microtecnologías (12).

En este trabajo se propone el diseño y desarrollo de un genosensor electroquímico para la determinación indirecta de gluten, mediante la detección de una secuencia de ADN específica que codifica un fragmento proteico inmunogénico del gluten.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Instrumentación

Las medidas electroquímicas fueron realizadas en electrodos serigrafiados (DropSens, España) conectados a un potenciostato PGSTAT 12, controlado por el software GPES 4.9005 (EcoChemie B.V, Holanda). La celda consta de tres electrodos en la misma lámina de alúmina (Figura 1): un electrodo de trabajo de oro serigrafiado (diámetro 4 mm), rodeado de un electrodo auxiliar también de oro serigrafiado y uno de pseudoreferencia de plata. Previamente a su uso, los

electrodos se limpiaron con etanol y agua Milli-Q, seguido de un pretratamiento electroquímico mediante barridos cíclicos con H_2SO_4 con el fin de eliminar contaminantes y calcular el área efectiva del electrodo (13).

Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y cada medida se realizó en un nuevo electrodo. Las medidas de pH se realizaron en un pH-metro Crison micropH 2001 (España).

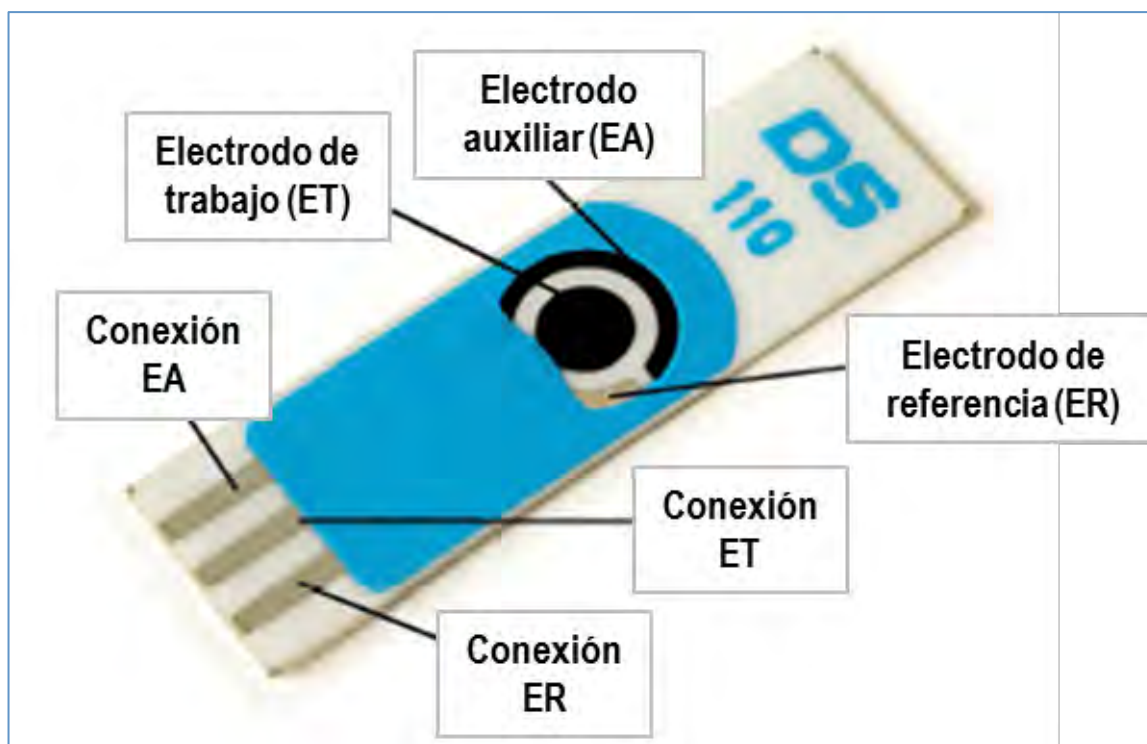


Figura 1.- Electrodo serigrafiado (www.dropsens.com).

2.2. Reactivos

El Ditiotreitól (DTT), 6-mercapto-1-hexanol (MCH), fosfatasa alcalina-estreptavidina (ALP-Strp), 1-naftilfosfato, albúmina humana (BSA) y tween 20 fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (España) y utilizados sin purificación previa. Las sales para la preparación de los buffers (Tris, $MgCl_2$, KCl) y buffer 20xSSPE (fosfato sódico salino con EDTA) pH 7,4 fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Etanol al 96% e hidroquinona fueron suministrado por Panreac (España), 1-naftol por Merck (España) y ferrocianuro de potasio por Probus (España).

Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas fueron suministradas por Sigma-Genosys (Reino Unido). Todas las disoluciones de oligonucleótidos fueron preparadas en agua Milli-Q y almacenadas a $-20^{\circ}C$.

2.3. Procedimiento experimental

A.- Sonda de captura

Con el objetivo de reducir los enlaces disulfuro S-S, formados por la unión de dos moléculas ADN-SH (14, 15) se procedió a su tratamiento con DTT. Para ello se disolvió el contenido del vial (63,6 nmol de sonda de captura) en 100 μ L de una disolución acuosa de DTT 0,1 M y se dejó a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. A continuación, la sonda tiolada fue purificada por elución en una columna NAP-10 de Sephadex G-25 (lecho de dextrano) con 1,5 mL de agua Milli-Q. Se determinó la concentración real midiendo su absorbancia a 260 nm, encontrándose un 97 % de recuperación respecto a la cantidad inicial del vial. Esta disolución fue almacenada en el congelador.

B.- Preparación del sensor

Preparación de la fase sensora.

Inmovilización de la sonda de captura mediante quimisorción (unión covalente ADN-SH – Au). Se depositan sobre el electrodo 40 μ L de una disolución de la sonda de captura en buffer 2xSSPE pH 7,4 (buffer de hibridación y de inmovilización) dejándose en atmósfera cerrada y saturada con agua durante 1 h y lavado.

Bloqueo electródico

Se adicionan 40 μ L de una disolución de MCH en buffer 2xSSPE, dejándose 30 min, seguido de lavados.

Etapa de hibridación

- Homogénea. Se mezcla la disolución del analito con la sonda indicadora en buffer 2xSSPE (Figura 2A), calentando durante 5 min a 100 °C y sumergiendo 5 min en hielo.
- Heterogénea. Se depositan 40 μ L de la disolución anterior sobre la fase sensora. Se espera 1 hora y se lava (Figura 2B).

Marcaje enzimático y detección electroquímica

Concluida la hibridación, sobre la fase sensora se añaden 40 μ L de disolución del conjugado ALP-Strp en buffer bloqueante o de incubación (5xSSPE pH 7,4, 2% BSA y 0,1% Tween 20 (Figura 2C), se deja 10 min y se lava. Se añaden 40 μ L de 1-naftilfosfato 4 mM en buffer de medida (0,5 M Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, 0,1 M KCl, pH 9,8). Transcurridos 10 min de incubación, se realiza la medida voltamperométrica (DPV) de 0 a +0,6 V (amplitud de pulso 20 mV y velocidad de barrido 10 mV/s) (Figura 2D y E), desechando el electrodo tras la medida.

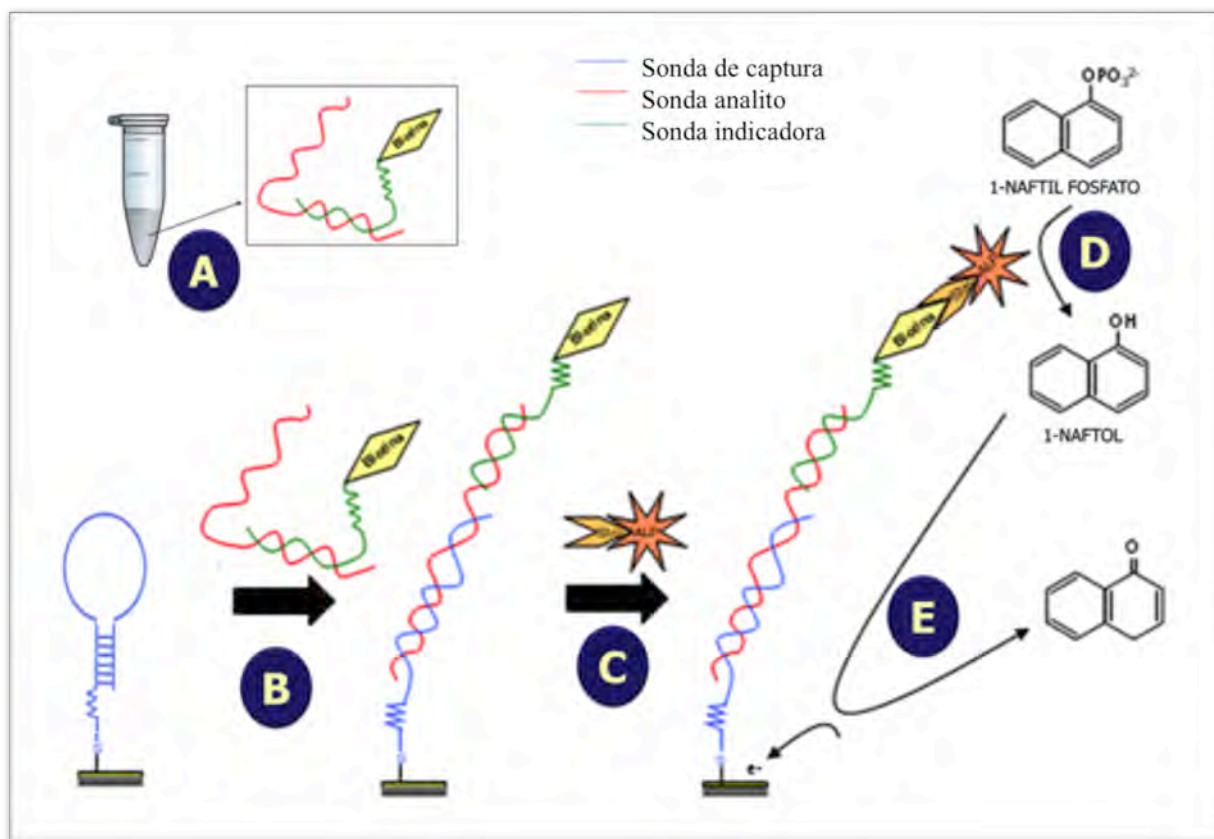


Figura 2. -Esquema del ensayo tipo sándwich.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Diseño propuesto

El diseño del genosensor se basa en la formación de una monocapa autoensamblada compuesta por sonda de captura y un agente bloqueante. Se propone un ensayo tipo sándwich en el cual parte de la secuencia del analito es complementaria con la sonda de captura y parte con una sonda indicadora, esta última marcada con una molécula de biotina en su extremo 3' para su posterior unión al conjugado estreptavidina-enzima a través del enlace de alta afinidad biotina-estreptavidina. Con este ensayo se evita la necesidad de marcar al analito. La enzima utilizada, fosfatasa alcalina (ALP), cataliza la conversión de 1-naftilfosfato a 1-naftol, producto electroactivo de estructura plana heterocíclica capaz de intercalarse en la monocapa de ADN, cuya oxidación se mide mediante voltamperometría de pulso diferencial (DPV).

3.2. Elección de la sonda de captura

Debido a la capacidad antigénica demostrada del segmento de 33-mer de la proteína α -2-gliadina, se seleccionó la secuencia de 99 nucleótidos que codifica para este fragmento proteico, para ser utilizada como analito.

Con el fin de conocer la especificidad de la secuencia elegida como analito se utilizó el programa BLAST (16) comprobándose que sólo tiene homologías con secuencias específicas de trigo y no con otras especies como hongos y bacterias ambientales, que podrían generar interferencias en el análisis.

Para predecir las posibles estructuras secundarias del fragmento de ADN y su hibridación con la sonda de captura e indicadora, se utilizó una base de datos llamada *Mfold web Server* (17). La estructura secundaria tipo mango-bucle de la sonda de captura presenta una energía libre $\Delta G = -10,7$ Kcal/mol. La formación del híbrido analito-sonda de captura presenta una $\Delta G_{\text{dúplex}} = -49,8$ kcal/mol, demostrando la apertura espontánea de la sonda en presencia de analito. El analito y sonda indicadora poseen una estructura secundaria cuya formación presenta valores de $\Delta G = -12,5$ Kcal/mol y $\Delta G = -13,2$ Kcal/mol respectivamente, superiores a la energía del híbrido analito-sonda indicadora ($\Delta G = -113,1$ Kcal/mol), lo que indica la hibridación espontánea de la sonda indicadora con el híbrido analito-sonda de captura.

3.3. Caracterización de los electrodos serigrafiados

Para comprobar reproducibilidad de la superficie electródica, se realizaron voltamperometrías cíclicas entre +0,6 a -0,1 V (60 mV/s, 10 barridos) con ferrocianuro de potasio 0,5 mM en buffer 2xSSPE (18, 19). Se midió la intensidad del pico de oxidación para 10 electrodos pretratados con H₂SO₄, y obteniéndose un coeficiente de variación de 5,7%, confirmando la adecuada reproducibilidad del proceso de serigrafiado.

3.4. Ensayos preliminares de respuesta del genosensor

Se estudió la interacción entre la sonda de captura y el híbrido analito-sonda indicadora y se evaluó la especificidad de esta interacción mediante el uso de una secuencia no complementaria. Para determinar el ruido de fondo originado en parte por las uniones inespecíficas a la superficie electródica de los reactivos utilizados, se realizó un ensayo del blanco. Estos ensayos se realizaron con sonda horquilla 2 μM ; MCH 4,5 mM; sonda indicadora 2 μM ; ALP-Strp 4,3 $\cdot 10^{-3}$ g/L y 1-naftil-P 4 mM.

El ensayo con la sonda no complementaria dio una intensidad de 1,1 μA similar a la obtenida en el ensayo del blanco. En estas mismas condiciones experimentales, una concentración de analito 1 μM dio una intensidad de 9,54 μA (Figura 3), aproximadamente 9 veces superior al blanco y al ensayo negativo. Estos resultados muestran la especificidad del método propuesto.

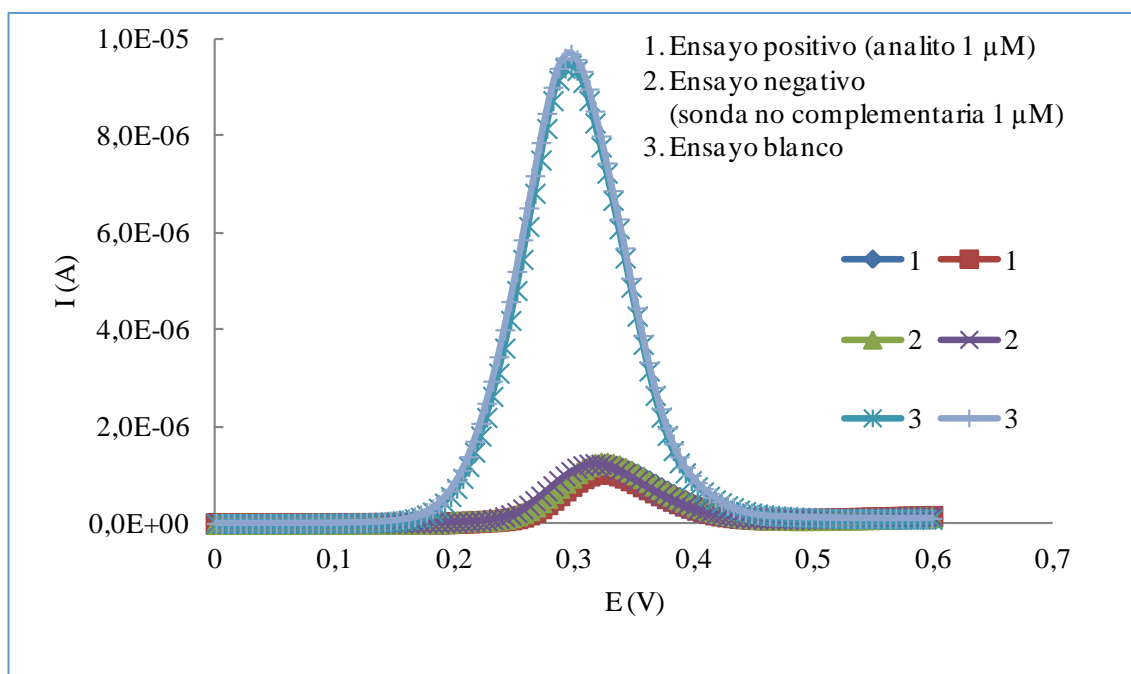


Figura 3.- Voltamperogramas obtenidos en los ensayos positivo, negativo y blanco.

Con el fin de averiguar la relación existente entre la señal y la concentración de analito se midieron disoluciones de concentraciones comprendidas entre 0,2 y 10 μM del mismo. Sorprendentemente, se obtuvo la máxima respuesta para la menor concentración de analito. Es posible que estos resultados se atribuyan a la baja concentración de algunos de los reactivos implicados en las reacciones de hibridación o amplificación enzimática, y por ello se estudió de forma individual cada etapa del proceso.

Para conocer la influencia de la sonda indicadora, se repitió la experiencia anterior utilizando una concentración de 10 μM de dicha sonda, observándose una relación proporcional entre la respuesta y la concentración de analito hasta 5 μM (Figura 4). Estos resultados dejan patente la importancia de este parámetro, ya que amplía el límite lineal superior sin olvidar su efecto negativo en la señal del blanco.

A continuación, se aumentó la concentración de conjugado ALP-Strp. Al utilizar una concentración de enzima de $8,6 \times 10^{-3}$ g/L, se obtuvieron señales proporcionales a la concentración de analito hasta 10 μM (Figura 5), confirmándose también el efecto de este parámetro en la respuesta. Mayores concentraciones de enzima ($17,2 \times 10^{-3}$ g/L) dieron curvas voltamperométricas distorsionadas y blancos anormalmente altos, resultados que confirman la adsorción inespecífica de este reactivo sobre la fase sensora.

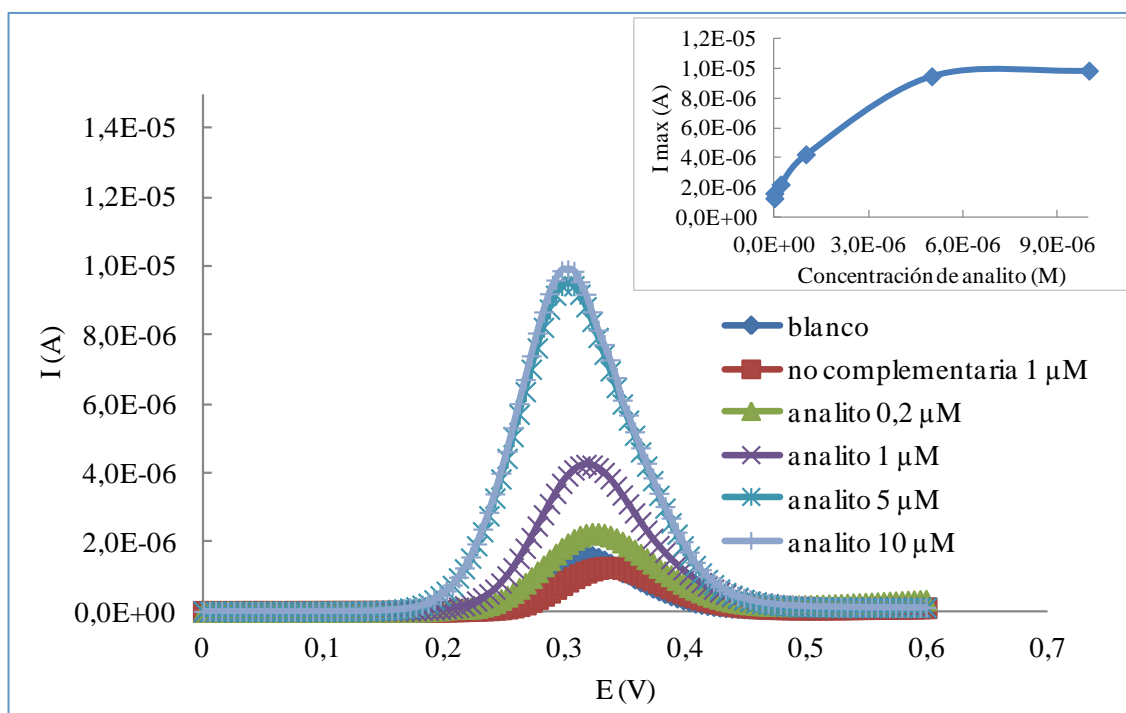


Figura 4.- Respuesta del genosensor con sonda indicadora 10 μM . Inlet: Relación I_{max} -concentración de analito.

Considerando que un aumento de la concentración de sonda indicadora y enzima conlleva un aumento en el intervalo lineal pero también origina un aumento de la señal del blanco, y dado que nuestro objetivo es la detección de concentraciones de analito inferiores a 1 μM , comenzaremos utilizando de las mínimas concentraciones estudiadas ($4,3 \cdot 10^{-3}$ g/L de ALP-Strp y 2 μM de sonda indicadora).

3.5. Optimización de la fase sensora

La optimización de la fase sensora (sonda de captura y MCH inmovilizados sobre la superficie del electrodo de trabajo) es necesaria para obtener una monocapa homogénea que favorezca la hibridación pero no tan compacta que genere repulsiones electroestáticas y electroestéricas (20).

La función del MCH es disponer adecuadamente las hebras de ADN quimisorbidas, algunas inicialmente inclinadas, situándolas de manera perpendicular a la superficie (11). El MCH se intercala entre las hebras de ADN y se obtiene así una monocapa mixta organizada, en la que las cadenas se orientan paralelas entre sí y perpendiculares a la superficie eléctrica (Figura 6), aumentando la eficiencia de hibridación.

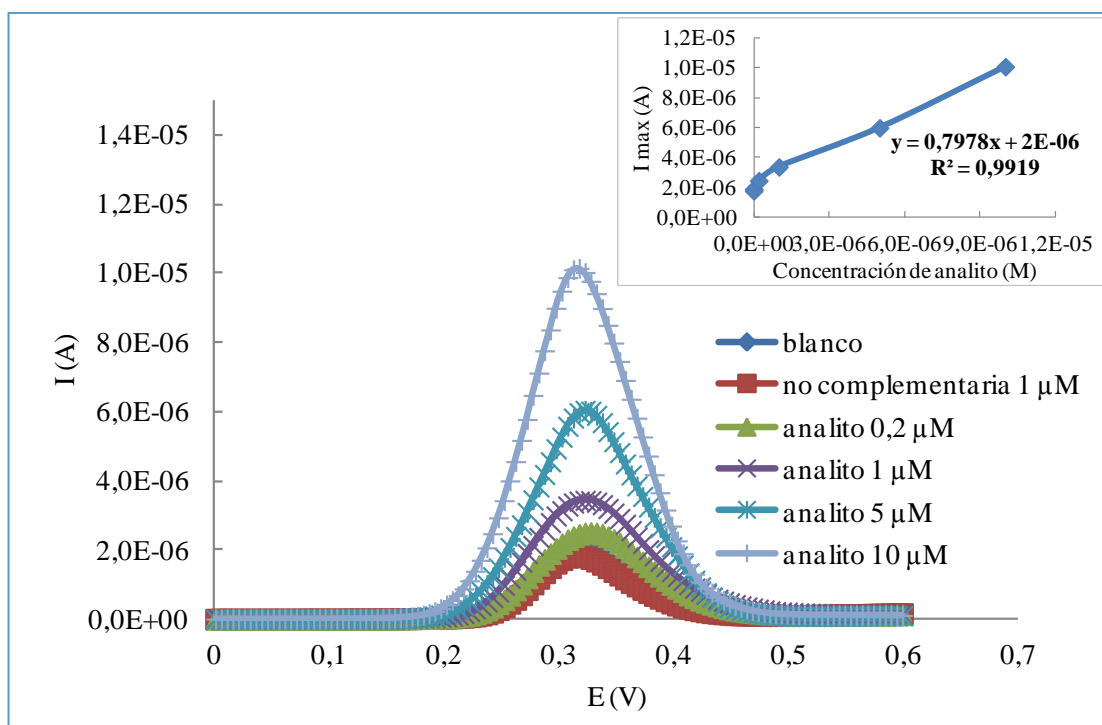


Figura 5.- Respuesta del genosensor con ALP-Strp $8,6 \times 10^{-3}$ g/L. Inlet: Relación I_{max} -concentración analito.

En la Figura 7, se comparan las respuestas obtenidas con sensores que contienen 4,5 mM y 9 mM de MCH. Al aumentar la concentración de MCH se observa un descenso de la señal generada por el blanco que permite detectar 0,1 μ M de analito.

Aunque el aumento de la concentración de MCH mejora la relación señal/ruido, deben estudiarse más a fondo las características de la monocapa formada sobre el electrodo en estas condiciones. La densidad de sonda inmovilizada es un factor decisivo en la eficiencia de la reacción de hibridación.

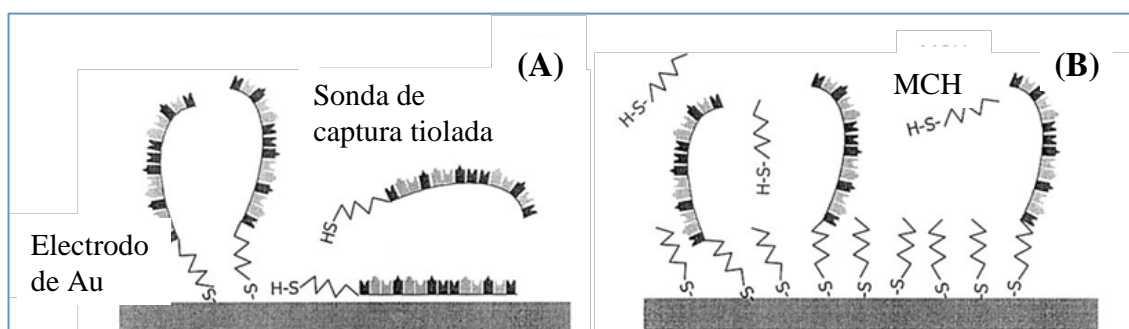


Figura 6.- Formación de monocapa autoensamblada mixta con MCH en electrodos de oro.

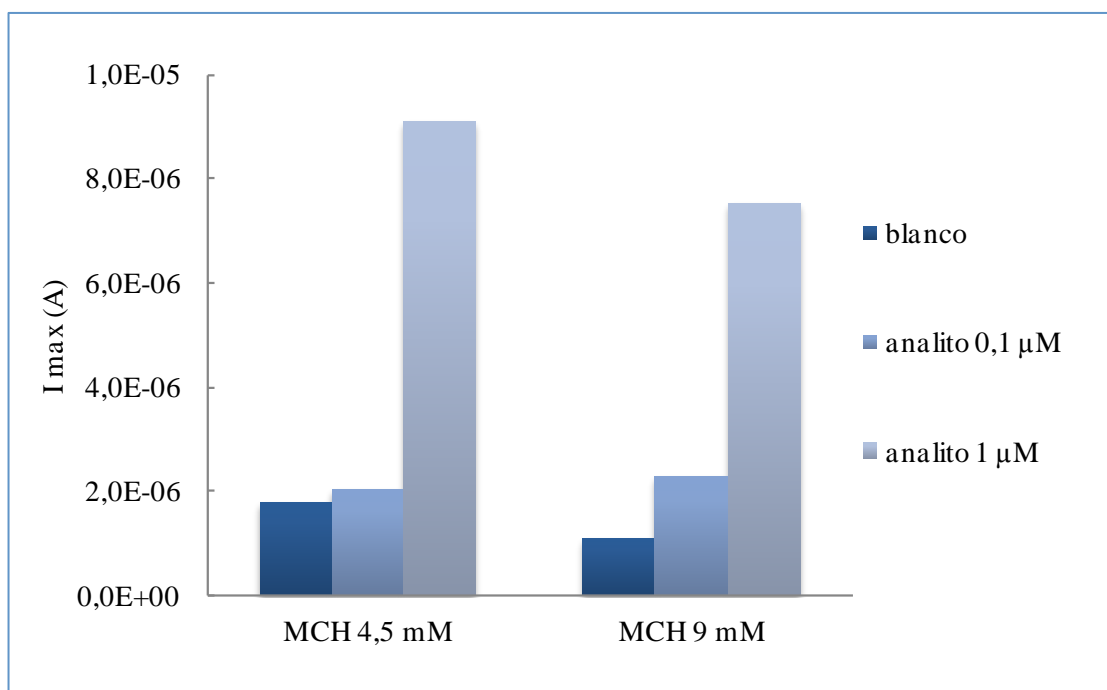


Figura 7.- Efecto de la concentración MCH sobre la intensidad de corriente.

Para obtener información acerca de la densidad de empaquetamiento de la monocapa, se estudió el comportamiento electroquímico de distintas especies electroactivas neutras, para evitar posibles interacciones electrostáticas, como hidroquinona (HQ), ferrocianuro y 1-naftol mediante voltamperometría cíclica (-0,3 V a +0,6 V $v_{\text{barrido}} = 50 \text{ mV/s}$).

3.5.1. Hidroquinona

El proceso redox de la HQ se ve modificado respecto al electrodo desnudo al inmovilizar sobre la superficie del electrodo sólo MCH de 1 a 9 mM, sólo horquilla 0,02 μM a 2 μM o ambos simultáneamente.

Este cambio se acentúa a medida que aumenta la complejidad de la monocapa observándose un descenso en la intensidad y un aumento del carácter irreversible del proceso redox.

La presencia de MCH, independientemente de su concentración, cambia el perfil redox de la HQ. Por el contrario, la presencia de la sonda de captura solo afecta al comportamiento de la HQ a partir de 0,2 μM. Debido a que interesa inmovilizar la mayor cantidad posible de sonda (horquilla), ya que la hibridación en superficie se encuentra más dificultada que la homogénea (hibridación disolución), se seleccionó una concentración 2 μM de sonda de captura.

Tal y como se muestra en la Figura 8, el cambio en el comportamiento electroquímico de la HQ una vez formada la monocapa (2 μM horquilla y 9 mM MCH) demuestra el adecuado recubrimiento del electrodo. El desplazamiento de

los potenciales se atribuye a la orientación de la HQ en la monocapa, que favorece su proceso redox.

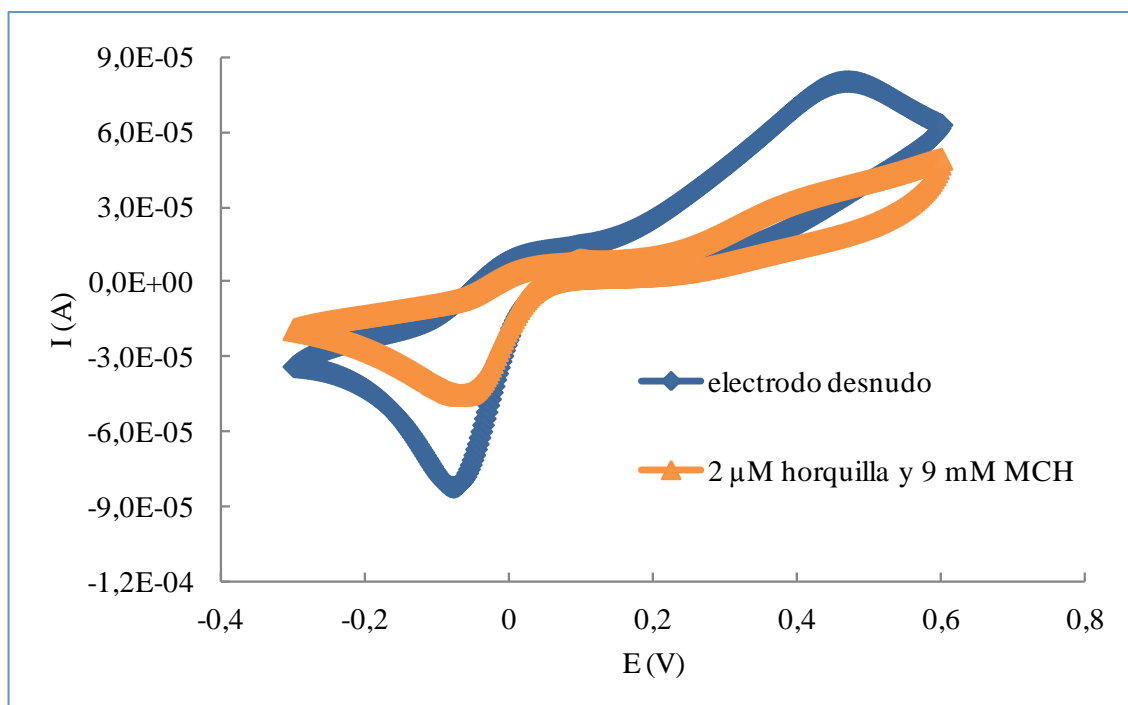


Figura 8. - Voltamperometría cíclica de hidroquinona sobre electrodo desnudo y modificado.

3.5.2. Ferrocianuro

El ferrocianuro es una molécula algo más compleja que la HQ, electroactiva, cuyo proceso redox reversible es muy conocido, y no se ve tan afectada por cambios de pH (18). En esta experiencia se procedió de igual forma que en el caso de la HQ.

En la Figura 9, se muestra el comportamiento redox del ferrocianuro (0,5 mM) en el electrodo desnudo, con un potencial de oxidación a $\sim 0,5$ V e intensidad aproximada de $50 \mu\text{A}$. Al modificar el electrodo con horquilla $2 \mu\text{M}$ disminuyen las intensidades de los picos anódico y catódico como con la HQ, pero, a diferencia de la HQ aumenta la diferencia entre potenciales, ya que esta molécula no es tan fácil de orientar como aquella dentro de la monocapa. Este cambio se acentúa en presencia de la monocapa mixta, observándose un recubrimiento efectivo al utilizar $2 \mu\text{M}$ de horquilla y 9 mM de MCH.

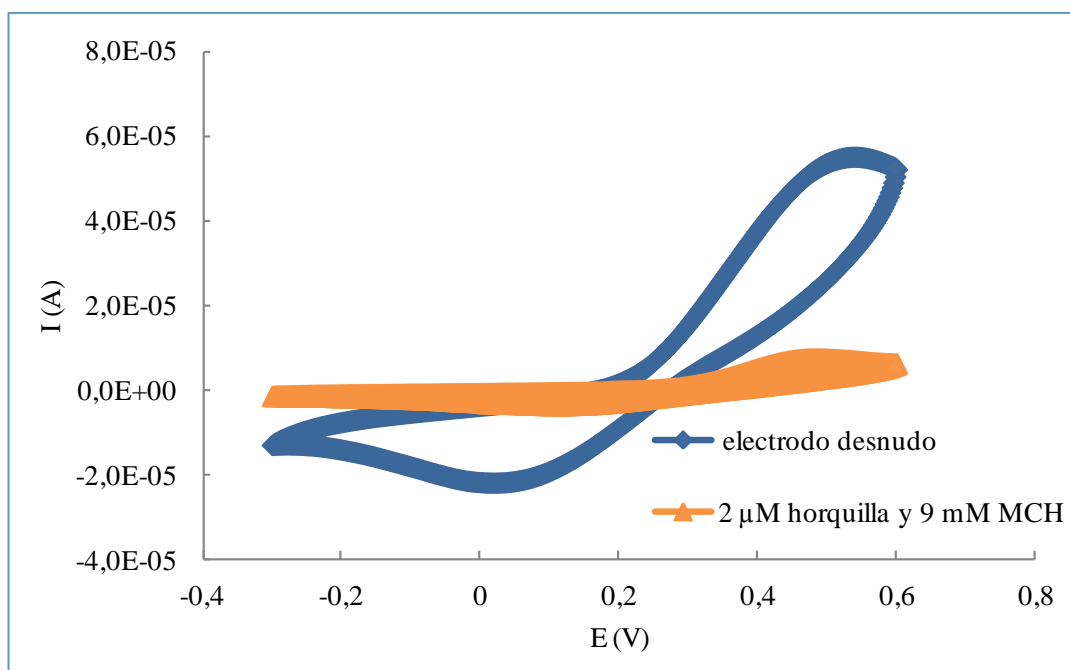


Figura 9.- Voltamperometría cíclica de ferrocianuro potásico sobre electrodo desnudo y modificado.

3.5.3. Naftol

Por último, se estudió el comportamiento electroquímico del 1-naftol (2 mM) en función de la complejidad de la monocapa por tratarse de la especie electroactiva utilizada en el genosensor propuesto. En esta experiencia se ensayaron dos configuraciones de sonda de captura tipo horquilla y lineal con la misma secuencia de nucleótidos. También se comprobó que el sustrato enzimático 1-naftilfosfato, no sufre proceso alguno sobre el electrodo.

En la Figura 10, se aprecia que en un electrodo modificado con horquilla el paso del naftol se ve dificultado requiriendo mayor potencial de oxidación que en el electrodo desnudo. Al inmovilizar tanto sonda como MCH el potencial requerido fue aún mayor.

Posteriormente, se procedió a la modificación de los electrodos con 2 μM de horquilla y concentraciones variables de MCH, dado que este último es el responsable de la organización de la monocapa y de la orientación vertical de las hebras de ADN sobre la superficie electródica, contribuyendo a la orientación del 1-naftol y su adsorción al electrodo.

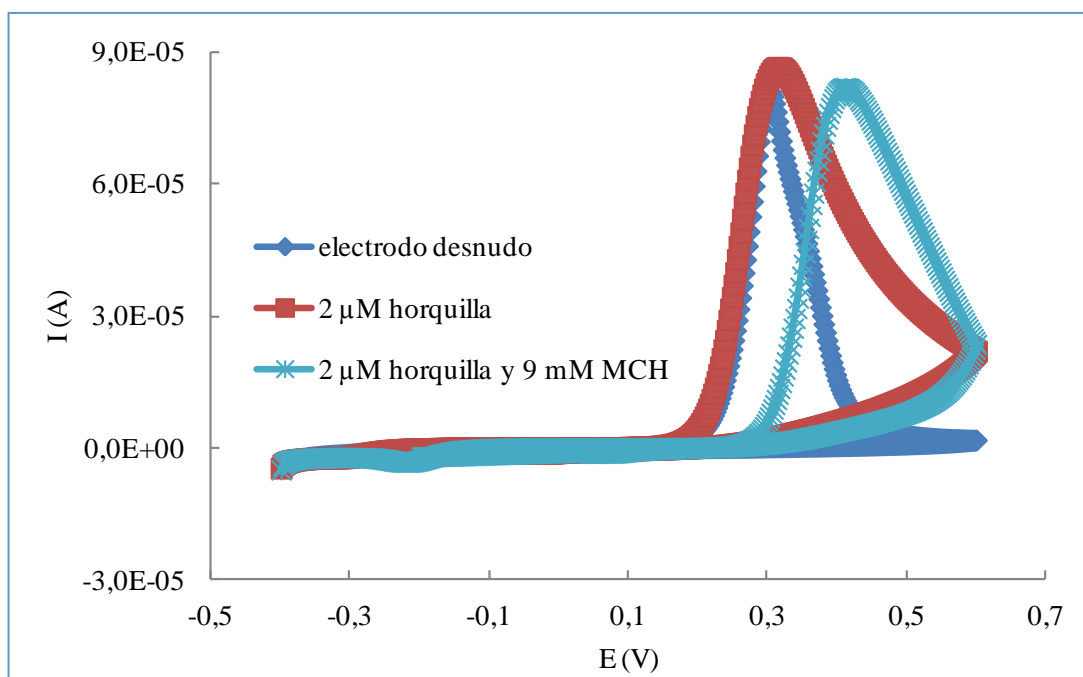


Figura 10- Voltamperometría cíclica de 1-naftol sobre electrodo desnudo y modificado.

Como se muestra en la Figura 11, al aumentar la concentración de MCH el potencial de oxidación aumenta. La máxima intensidad se obtuvo con 9 mM de MCH y 2 μ M de hoquilla, disminuyendo al utilizar MCH 13 mM, debido a que la monocapa formada es tan compacta que el paso del 1-naftol se ve muy dificultado. Con concentraciones inferiores a 9 mM de MCH se obtiene una monocapa desorganizada, disminuyendo la capacidad del 1-naftol de intercalarse y adsorberse en el electrodo.

Por ello, se seleccionó 9 mM como concentración óptima de MCH para obtener una monocapa mixta organizada y así conseguir la máxima señal analítica.

La sonda lineal provocó el mismo cambio en el potencial del pico de oxidación del 1-naftol respecto al electrodo desnudo (Figura 12), pero la intensidad sufrió un descenso significativo.

3.6. Optimización de la fase de medida

Una vez definidas las concentraciones óptimas de sonda de captura y de MCH, se procedió a la optimización de la fase de medida con el objetivo de mejorar la sensibilidad y disminuir la señal del blanco.

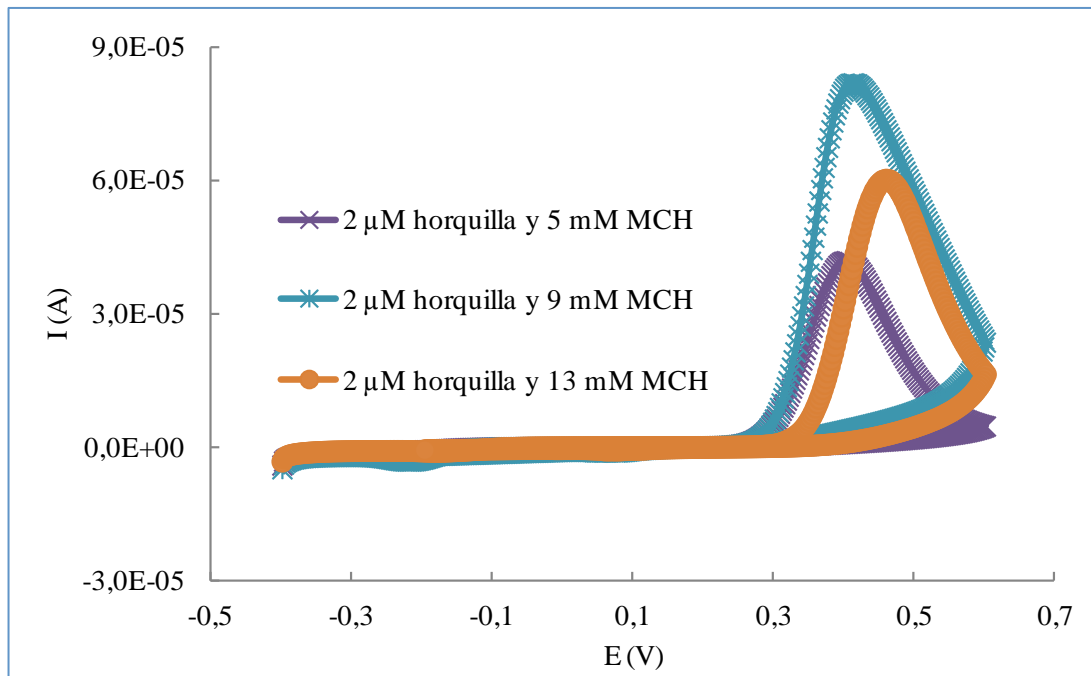


Figura 11.- Voltamperometría cíclica con 1-naftol para electrodos modificados con fase sensora.

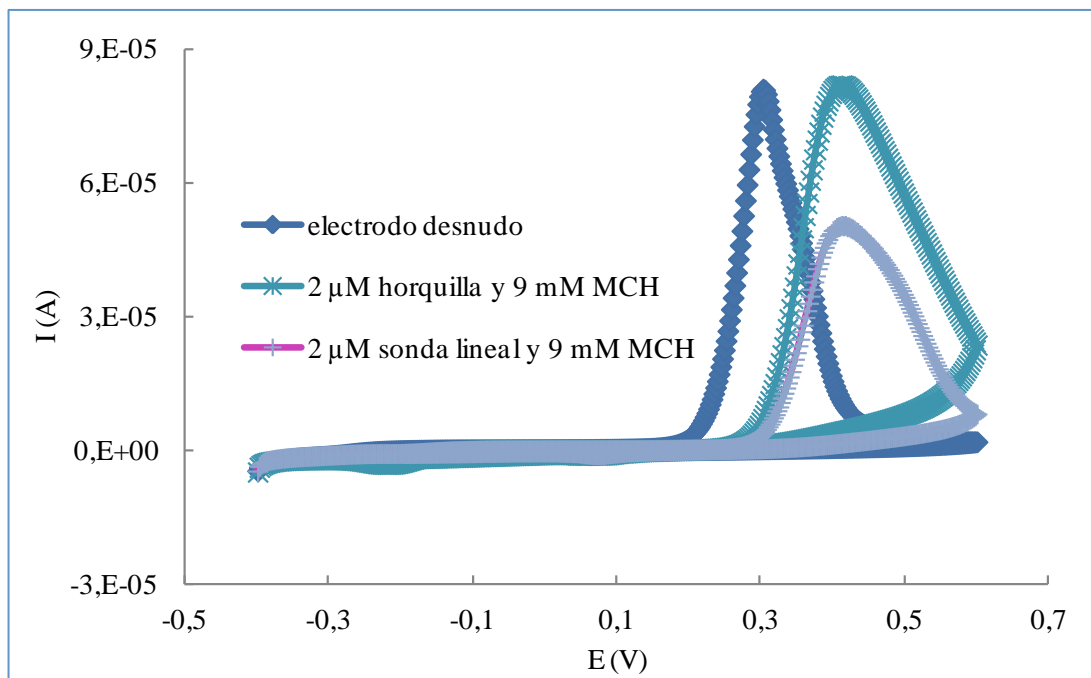


Figura 12.- Voltamperometría cíclica con 1-naftol para electrodos preparados con sonda horquilla y sonda lineal.

Se estudió la influencia de la concentración de sonda indicadora y conjugado enzimático ya que el ruido se debe fundamentalmente a la adsorción inespecífica de ambas especies. La primera se encuentra sobre la superficie electródica durante la etapa de hibridación heterogénea siendo probable su adsorción al electrodo a través de sus bases nitrogenadas. Algo similar puede ocurrir con la enzima añadida al medio catalizar la conversión del sustrato enzimático a producto electroactivo.

Se estudiaron conjuntamente tres niveles de concentración de sonda indicadora (2, 1 y 0,5 μM) y cuatro niveles de enzima ALP-Strp ($4,3 \cdot 10^{-3}$ g/L; $2,15 \cdot 10^{-3}$ g/L; $1,075 \cdot 10^{-3}$ g/L y $5,375 \cdot 10^{-4}$ g/L).

La intensidad del blanco se hace menor conforme disminuye la concentración de sonda indicadora y de enzima siendo el efecto de ésta más pronunciado (Figura 13).

Como se observa en la Figura 14, el blanco dio la mínima señal en presencia de la menor concentración de enzima estudiada ($5,375 \cdot 10^{-4}$ g/L). Sin embargo, en estas condiciones la señal del blanco no se vio afectada por la concentración de sonda indicadora. Según estos resultados, el efecto de la sonda indicadora en el ruido parece menor que el de la enzima.

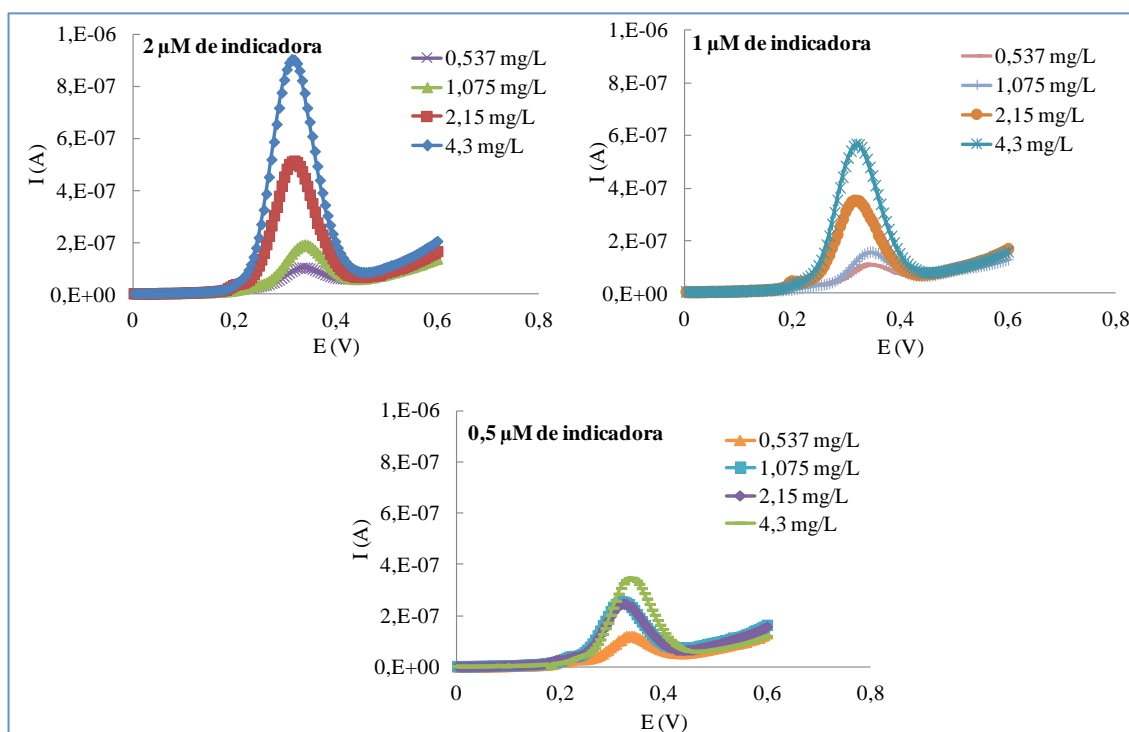


Figura 13.- Influencia de la adsorción inespecífica de la enzima en el ruido de fondo.

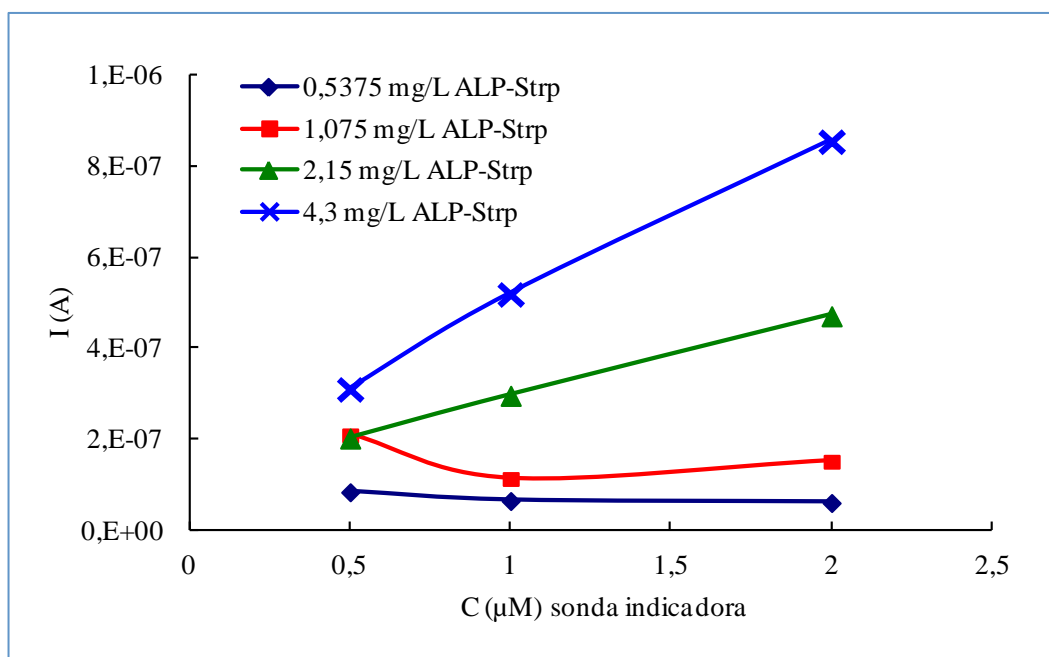


Figura 14.- Influencia de sonda indicadora en la señal blanco para diferentes concentraciones de enzima.

Disminuir la cantidad de estos reactivos podría afectar a la sensibilidad del ensayo ya que constituyen dos de las etapas clave del marcaje y amplificación de la reacción de hibridación. Es necesario llegar a una situación de compromiso en donde la intensidad del blanco sea lo menor posible, sin disminuir la intensidad que origina el analito.

La experiencia siguiente, se realizó para evaluar si las condiciones experimentales óptimas permitían la determinación de diferentes concentraciones de analito. Se seleccionó una concentración de sonda indicadora de 1 μM , en exceso respecto al analito. Para esta concentración de sonda, la intensidad generada por el blanco fue similar cuando las concentraciones de enzima fueron $5,375 \cdot 10^{-4}$ g/L y $1,075 \cdot 10^{-3}$ g/L. Para asegurar que el conjugado enzimático no fuera un reactivo limitante del diseño se tomó como valor de estudio $1,075 \cdot 10^{-3}$ g/L.

En la Figura 15, se muestra la respuesta de distintas concentraciones de analito en estas condiciones experimentales. Se observa una gran diferencia entre el blanco y 0,001 μM de analito.

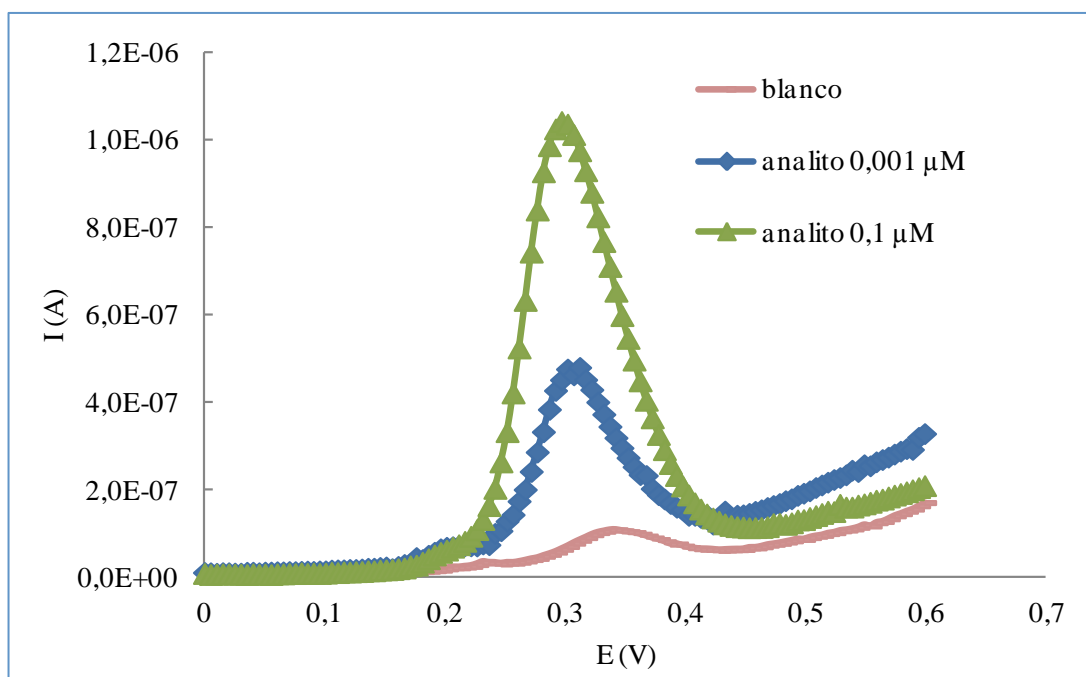


Figura 15.- Voltamperogramas obtenidos en condiciones óptimas: $1\mu\text{M}$ de sonda indicadora y $1,075\cdot 10^{-3}$ g/L de enzima.

3.7. Respuesta del genosensor

Una vez optimizadas las condiciones experimentales, se procedió a evaluar la respuesta del genosensor propuesto.

Se evaluó la precisión del método en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

Se realizaron estudios de repetibilidad utilizando un mismo genosensor para la realización de determinaciones de analito sucesivas, tras una etapa de lavado con buffer 2x SSPE. En la Figura 16 se aprecia una disminución del 80% de la intensidad de corriente en la cuarta utilización del dispositivo, y de hasta el 95% en la sexta medida, lo que sugiere la formación, por parte del producto de oxidación electroquímica del 1-naftol, de una capa polimérica pasivante sobre la superficie del electrodo limitándolos a un solo uso. La formación del polímero a partir del 1-naftol oxidado desactiva la superficie electroquímica, efecto que se acentúa al realizar medidas sucesivas, lo cual no es un inconveniente importante teniendo en cuenta el carácter desechable del formato de los electrodos utilizados (serigrafiados de bajo coste).

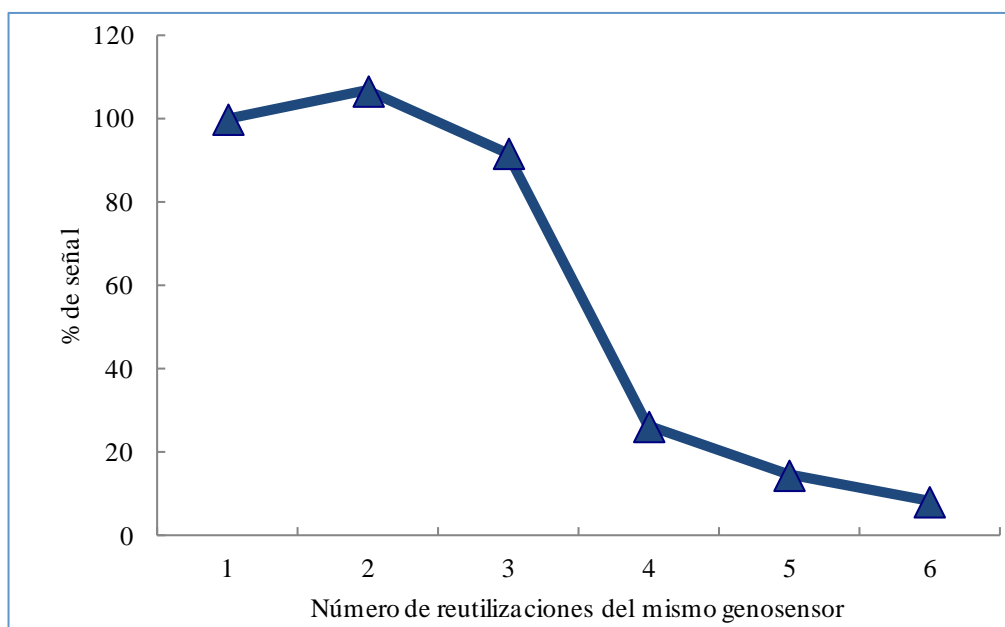


Figura 16.- Respuesta en función del número de utilizaciones de un mismo genosensor.

Para el estudio de reproducibilidad, se prepararon seis genosensores y se midió la señal generada por una disolución de analito $0,1 \mu\text{M}$. Se obtuvo un coeficiente de variación del 22,92% ($n=6$) en las medidas de intensidad, que interpretamos como una reproducibilidad aceptable, pero susceptible de mejora.

Utilizando las condiciones óptimas de la fase sensora y etapa de medida, se obtuvo respuesta lineal hasta una concentración de analito de 250 nM como se observa en la Figura 17. La relación entre la intensidad de corriente y la concentración de analito para un intervalo de concentraciones comprendido entre 20 nM y 250 nM viene dada por la siguiente ecuación: $I_{\text{max}} (A) = 1,21467 \cdot 10^{-7} + 2,18207 \times \text{concentracion } (M) \quad r = 0,994$

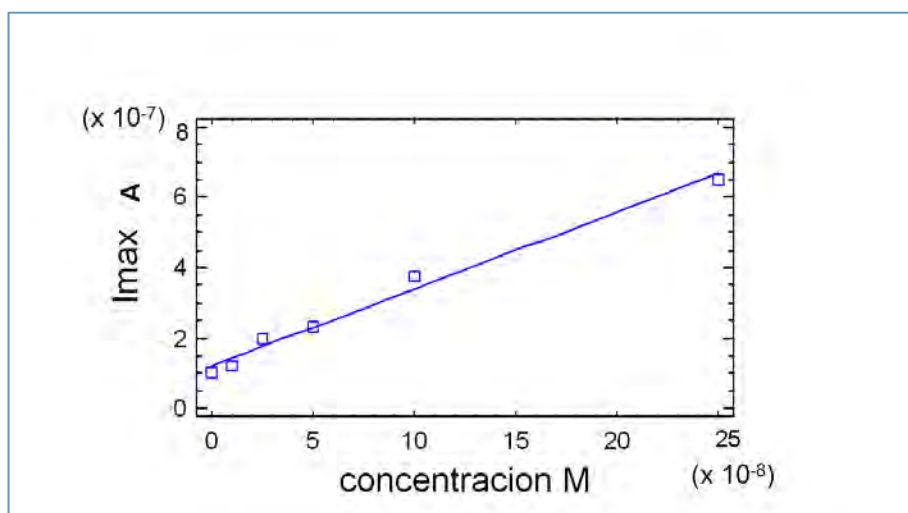


Figura 17.- Curva de calibrado con condiciones óptimas.

4. CONCLUSIONES

El genosensor electroquímico propuesto para la detección de gluten basado en un ensayo tipo sándwich, se fabricó sobre un electrodo de oro serigrafiado mediante la formación de una monocapa autoensamblada mixta. Una vez optimizadas todas las condiciones experimentales implicadas en el diseño del genosensor y en la etapa de medida se obtuvo una señal analítica proporcional a la concentración de analito lo que demuestra la validez del genosensor propuesto.

5. REFERENCIAS

1. Qiao, S.W., Bergseng, E., Molberg, O., Xia, J., Fleckenstein, B., Khosla, C., & Sollid, L.M. (2004). Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *Journal of Immunology*, 173(3), 1757-1762.
2. Beissbarth, T., Tye-Din, J.A., Smyth, G.K., Speed, T.P., & Anderson, R.P. (2005). A systematic approach for comprehensive T-cell epitope discovery using peptide libraries. *Bioinformatics*, 21(1), 129-137.
3. González, J.M, García, E., Fernández, J.L., Gago, L., & Benito, J. (2007). *Técnicas analíticas para la detección de gluten en alimentos* (pp. 3-81). Informe de vigilancia tecnológica. CEIM. Dirección General de Universidades e Investigación.
http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt9_deteccion_gluten_alimentos.pdf
4. Reglamento CE 41/2009 de la Comisión de 20 de enero de 2009 sobre la composición y etiquetado de los productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten (D.O.U.E. 21.1.2009). Corrección de errores (D.O.U.E. 1.7.2009).
5. Mujico, J.R., Lombardia, M., Mena, M.C., Méndez, E., & Albar J.P. (2011). A highly sensitive real-time PCR system for quantification of wheat contamination in gluten-free food for celiac patients. *Food Chemistry*, 128(3), 795-801.
6. Debnath, J., Martin, A., & Gowda, L.R. (2009). A polymerase chain reaction directed to detect wheat glutenin: implications for gluten-free labeling. *Food Research International*, 42(7), 782-787.
7. Zeltner, D., Glomb, M.A., & Maede, D. (2009). Real-time PCR systems for the detection of the gluten-containing cereals wheat, spelt, kamut, rye, barley and oat. *European Food Research Technology*, 228(3), 321-330.
8. Sandberg, M., Lundberg, L., Ferm, M., & Yman, I.M. (2003). Real-time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. *European Food Research Technology*, 217(4), 344-349.
9. Wieser, H. (2008). Detection of gluten. En E. K. Arendt & F. D. Bello (Eds.), *Gluten-Free Cereal Products and Beverages* (pp. 47-80). Irlanda: Elsevier.
10. Teles F.R.R., & Fonseca L.P. (2008). Trends in DNA biosensors. *Talanta*, 77(2), 606-623.
11. Pividori M.I., Merkoçi A., & Alegret S. (2000). Electrochemical genosensor design: immobilization of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. *Biosensors & Bioelectronics*, 15(5-6), 291-303.
12. Bertia F., Laschia S., Palchettia L., Rossierb J.S., Reymond F., Mascini M., & Marrazza G. (2009). Microfluidic-based electrochemical genosensor coupled to magnetic beads for hybridization detection. *Talanta*, 77(3), 971-978.
13. Miranda-Castro R., Lobo-Castañón M.J., Miranda-Ordieres A.J., & Tuñón-Blanco P. (2009). Stem-Loop DNA probes for the voltammetric determination of *Legionella pneumophila* on disposable screen-printed gold electrodes. *Electroanalysis*, 21(3-5), 267-273.

14. Carpini G., Lucarelli F., Marrazza G., & Mascini M. (2004). Oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids. *Biosensors & Bioelectronics*, 20(2), 167-175.
15. Miranda-Castro R., de-los-Santos-Álvarez P., Lobo-Castañón M.J., Miranda-Ordieres A.J., & Tuñón-Blanco P. (2007). Hairpin-DNA probe for enzyme-amplified electrochemical detection of *Legionella pneumophila*. *Analytical Chemistry*, 79(11), 4050-4055.
16. *Basic Local Alignment Search Tool*; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
17. Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3406-3415.
18. McEwen, G., Chen, F., & Zhou, A. (2009). Immobilization, hybridization and oxidation of synthetic DNA on gold surface: electron transfer investigated by electrochemistry and scanning tunneling microscopy. *Analytical chimica acta*, 643(1-2), 26-37.
19. García-González R., Abedul-Fernández M.T., Pernía A., & Costa-García A. (2008). Electrochemical characterization of different screen-printed gold electrodes. *Electrochimica acta*, 53(8), 3242-3249.
20. Levicky R., Herne T.M., Tarlov, M.J., & Satija S.K. (1998). Using self-assembly to control the structure of DNA monolayers in gold: A Neutron Reflectivity Study. *Journal of the American Chemical Society*, 120(38), 9787-9792.

NOTA DEL EDITOR

Este trabajo obtuvo el Premio FAES-FARMA en el concurso científico 2011 de la Real Academia Nacional de Farmacia.