

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Desarrollo de *microarrays* de altas prestaciones basados en atrapamiento con un hidrogel. Aplicación a inmunoensayos y ensayos genéticos.

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: ISMAEL GUERRERO PICÓ

TUTORA: MARÍA JOSÉ BAÑULS POLO

COTUTOR: ÁNGEL MAQUIEIRA

Curso Académico: 2014-2015

VALENCIA, 02 de julio de 2015

Reserva de todos los derechos

*A **María José Bañuls**, mi tutora,
por aceptar mi petición de guiarme en este trabajo y
por la paciencia y dedicación que ha tenido conmigo durante estos meses.*

*Y por supuesto a **mi familia**,
por confiar en mí plenamente y no dudar ni un sólo momento y
por ofrecerme la oportunidad de seguir aumentando mis conocimientos.*

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO EN LA ACTUALIDAD.....	1
1.2. LA TECNOLOGÍA DE <i>MICROARRAY</i>	1
1.2.1. Definición de <i>microarray</i>	1
1.2.2. Tipos de <i>microarrays</i>	2
1.2.3. Aspectos a considerar en la fabricación de un <i>microarray</i>	4
1.2.3.1. Elección del soporte. Tipos de superficies.....	4
1.2.3.2. Elección de la sonda.....	4
1.2.3.3. Marcaje.....	5
1.2.3.4. Métodos de inmovilización.....	6
1.2.3.5. Lectura del <i>microarray</i> . Detección.....	8
1.3. EMPLEO DE HIDROGELES EN <i>MICROARRAYS</i>	9
1.4. FOSFORILCOLINA COMO PROPUESTA DE HIDROGEL.....	10
1.5. LOS DISCOS COMPACTOS COMO SOPORTES PARA <i>MICROARRAYS</i>	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1. MATERIALES.....	14
3.1.1. Reactivos.....	14
3.1.2. Instrumentación y <i>software</i>	45
3.2. MÉTODOS.....	16
3.2.1. Protocolo de marcaje y purificación de la proteína C reactiva (CRP).....	16
3.2.2. Protocolo de inmovilización de la fosforilcolina (MPC) y ensayo de reconocimiento de la CRP marcada.....	17
3.2.3. Protocolo de inmovilización de oligonucleótido sonda (SYM44) y cálculo de densidad de inmovilización de éstas.....	18
3.2.4. Construcción de la recta de calibrado del oligonucleótido <i>target</i> SYM5.....	18
3.2.5. Protocolo para inmovilización de sondas y ensayo de hibridación con la cadena complementaria.....	19
3.2.6. Protocolo de inmovilización y ensayo de polimorfismos de una sola base (SNP).....	19
3.2.7. Protocolo de inmovilización y ensayo con productos de PCR de <i>Salmonella</i>	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1. FORMACIÓN DEL HIDROGEL Y MARCAJE Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA C REACTIVA (CRP).....	23
4.2. ENSAYOS DE RECONOCIMIENTO DE LA PROTEÍNA C REACTIVA MRCADA MEDIANTE <i>MICROARRAYS</i> DE HIDROGEL.....	24
4.3. INMOVILIZACIÓN DE SONDAS DE AN EN EL <i>MICROARRAY</i> DE HIDROGEL.....	26
4.4. DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN PARA LOS ENSAYOS DE HIBRIDACIÓN EN EL <i>MICROARRAY</i> DE HIDROGEL.....	28
4.5. ENSAYOS DE HIBRIDACIÓN SOBRE EL <i>MICROARRAY</i> DE HIDROGEL CON AN.....	29

4.6. ENSAYOS DE POLIMORFISMOS DE UNA SOLA BASE (SNP).....	32
4.7. ENSAYOS DE HIBRIDACIÓN SOBRE EL <i>MICROARRAY</i> DE HIDROGEL CON PRODUCTOS DE PCR.....	34
5. CONCLUSIÓN.....	37
6. BIBLIOGRAFÍA.....	38
7. ANEXOS.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

Figura 1.	Esquema de funcionamiento de un <i>microarray</i> de DNA.....	2
Figura 2.	Pasos a seguir en la construcción de un <i>microarray</i>	2
Figura 3.	Diferentes moléculas que pueden ser empleadas como agentes de captura.....	3
Figura 4.	Distintas modalidades de fabricación de un <i>microarray</i>	8
Figura 5.	Esquema de un sistema de detección similar al empleado.....	9
Figura 6.	Estructura química de la molécula sintética MPC.....	10
Figura 7.	Comparación de las distintas tecnologías de discos compactos.....	12

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 8.	Esquema de la cara inferior de un BD.....	17
Figura 9.	Esquema de la plantilla con las diferentes concentraciones de SYM44 empleadas en el ensayo.....	18
Figura 10.	Esquema de la plantilla con las distintas concentraciones de SYM5 usadas en el array.....	18
Figura 11.	Esquema de la plantilla con las diferentes concentraciones de SYM55 empleadas.....	19
Figura 12.	Orden de impresión de los distintos oligonucleótidos usados en el ensayo de SNPs.....	20
Figura 13.	Esquema de la plantilla de las distintas concentraciones de sonda específica y no específica empleadas en el ensayo de los productos de PCR.....	21

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 14.	Foto de un BD.....	23
Figura 15.	Valores de fluorescencia frente a distintas concentraciones de CRP*.....	24
Figura 16.	Ensayo directo competitivo.....	25
Figura 17.	Diferentes réplicas realizadas en el ensayo de inmovilización de sondas de AN.....	26
Figura 18.	Porcentajes de retención de sondas.....	27
Figura 19.	Imagen de fluorescencia con diferentes concentraciones de SYM5.....	28
Figura 20.	Valores de fluorescencia frente a distintas concentraciones de SYM5.....	29
Figura 21.	Esquema de un <i>microarray</i> generado en los ensayos de hibridación con sondas de AN.....	30
Figura 22.	Valores de fluorescencia frente a concentraciones de SYM5 para dos concentraciones de SYM55.....	31
Figura 23.	Efectividad de los lavados.....	32
Figura 24.	Valores de fluorescencia frente a distintas concentraciones de formamida empleadas.....	33
Figura 25.	Valores de fluorescencia frente a distintas concentraciones de sales empleadas.....	34

4. ANEXOS

Figura Anexo 1.	Ajustes lineales en el ensayo de la CRP*	41
Figura Anexo 2.	Ajuste lineal en el ensayo de inmovilización de sondas utilizando SYM44.....	41
Figura Anexo 3.	Valores de fluorescencia para los distintos oligonucleótidos empleados en el ensayo de SNPs.....	42
Figura Anexo 4.	Valores de fluorescencia frente a los diferentes SYM utilizados como sondas.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.	Características de las diferentes modalidades de marcaje.....	6
Tabla 2.	Técnicas de inmovilización.....	6

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.	Nomenclatura y secuencias de los oligonucleótidos SYM.....	14
Tabla 4.	Nomenclatura y secuencias de los oligonucleótidos DAC.....	15
Tabla 5.	Ciclos realizados en el protocolo de marcaje de la CRP.....	16
Tabla 6.	Diferentes concentraciones de CRP* empleadas.....	17
Tabla 7.	Distintas concentraciones de SYM5 utilizadas en el ensayo.....	19
Tabla 8.	Condiciones de hibridación empleadas en cada zona en el ensayo de SNPs.....	20
Tabla 9.	Condiciones usadas en el ensayo de SNPs con la fuerza iónica como fuerza impulsora de la discriminación.....	20
Tabla 10.	Diferentes tipos de revelado empleados en el ensayo de productos de PCR.....	22

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 11.	Condiciones de irradiación empleadas.....	23
Tabla 12.	Valores de intensidad para distintas concentraciones de SYM44 empleadas.....	27
Tabla 13.	Valores para el cálculo del LOD.....	29

4. ANEXOS

Tabla Anexo 5.	Diferentes condiciones testadas en el ensayo directo competitivo.....	43
Tabla Anexo 6.	Distintas condiciones utilizadas en el ensayo de hibridación con productos de PCR.....	45

ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo(s)
AN	Ácidos nucleicos
ARNm	<i>Ribonucleic acid</i> mensajero
BD	Blu-ray
CD	<i>Compact Disk</i>
CRP	<i>C-reactive protein</i> (Proteína C reactiva)
CRP*	Proteína C reactiva marcada con Alexa647
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i>
DVD	<i>Digital Versatile Disk</i>
GAR-Alexa	Anticuerpo primario policlonal de cabra contra conejo marcado con Alexa647
GAR-Au	Anticuerpo primario policlonal anti-conejo de cabra marcado con oro
HTS	<i>High throughput screening</i>
LFS	Lector de fluorescencia de superficies
MPC	2-methacriloloxietil fosforilcolina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción de la cadena de la polimerasa)
PoC	<i>Point-of-care</i>
PoN	<i>Point-of-need</i>
ppb	Parte por billón
ppm	Partes por millón
qPCR	Reacción de la cadena de la polimerasa cuantitativa
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SNP	<i>Single Nucleotid Polimorfism</i> (Polimorfismos de una sola base)
TEC	<i>Tiol-ene chemistry</i> (química del tiol-eno)
UV	Ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN

1. Técnicas de diagnóstico en la actualidad.

Desde hace mucho tiempo, el interés por el diagnóstico temprano de cualquier tipo de enfermedad ha ido en aumento. Esto ha conllevado, en los últimos años, el desarrollo de nuevas tecnologías y nuevos sistemas de diagnóstico que sean más eficaces y más rápidos que los métodos tradicionales, basados generalmente en el cultivo y crecimiento de microorganismos. Estos sistemas tradicionales presentan ciertas limitaciones como son el elevado tiempo que transcurre desde la toma de la muestra hasta la obtención de los resultados o la contaminación de los cultivos por otros microorganismos diferentes (Donatin y Drancourt, 2012). Dichas dificultades se han convertido en los retos a superar por las nuevas alternativas.

Así, en la actualidad se investiga el desarrollo de sistemas de diagnóstico más sencillos, rápidos, eficaces, sensibles, de pequeño tamaño, manejables, económicos y automatizables.

Por una parte, se busca un sistema rápido que presente un diagnóstico seguro. Así, se podrían realizar ensayos tempranos con el objetivo de detectar enfermedades en los primeros estadios.

Por otra parte, se necesitan sistemas pequeños y manejables que faciliten su almacenamiento y utilización en el punto de necesidad (dispositivos denominados *point-of-care* (PoC) o *point-of-need* (PoN)). Este tipo de dispositivos presentarían la ventaja de tener bajos costes de producción y, además, la cantidad de muestra necesaria también será menor, convirtiéndolo en un sistema más fiable, sensible y barato.

Es aquí donde la tecnología de *microarrays* adquiere elevada importancia ya que se trata de una herramienta que permite realizar diagnósticos más rápidos y con mayor sensibilidad que los métodos tradicionales, satisfaciendo así las necesidades del ámbito biomédico (Lacher *et al.*, 2014). Además, tiene potencial para aunar todas las características deseables en los dispositivos de diagnóstico de nueva generación que se han mencionado anteriormente.

2. La tecnología de *microarray*.

2.1. Definición de *microarray*.

Los *microarrays* forman parte de lo que se conoce como técnicas de alta capacidad de trabajo o *high-throughput*. Es una técnica que se utiliza en la actualidad para el diagnóstico de enfermedades, el análisis genómico funcional (Schena *et al.*, 1995), el descubrimiento de fármacos (Debouck and Goodfellow, 1999), la monitorización del medio ambiente (Dugat-Bony *et al.*, 2012), y también para el análisis clínico (Schaaf *et al.*, 2011). Dicha tecnología presenta diferentes variantes dependiendo de la naturaleza de la molécula que participa en el ensayo. Así, existen tanto *microarrays* de DNA como *microarrays* de proteínas.

Según Schrenzel *et al.* (2009), los *microarrays* consisten en una colección de moléculas (oligonucleótidos, fragmentos de DNA, proteínas, azúcares o lectinas) ancladas con una disposición determinada sobre un soporte sólido y que actúan de agentes de captura específicos para las moléculas que se quieren analizar ó detectar.

Una característica de los *microarrays* que los diferencia de las otras herramientas de diagnóstico es su capacidad de multiplexado, es decir, el análisis simultáneo de diferentes moléculas. Esto se traduce en una disminución de las posibles variaciones experimentales y facilita el análisis y la comparación de resultados.

2.2. Tipos de *microarrays*.

Los primeros que surgen son los *microarrays* de DNA. Estos consisten en una colección de moléculas de ácidos nucleicos (AN) ancladas a una superficie sólida con una ordenación determinada, y se emplean para estudios genéticos o para estudios de expresión (López *et al.*, 2002).

Las moléculas de AN ancladas están formadas por una cadena simple, lo cual permitirá la hibridación con otra molécula de AN que presente elevada complementariedad y que también sea monocatenaria. Así, los fragmentos inmovilizados son denominados sondas, mientras que los fragmentos que hibridarán se denominan dianas o *target*. Las primeras presentan la característica de que su secuencia es conocida totalmente mientras que los segundos, en general, tienen la característica de presentar un marcaje que facilite su detección y lectura (Figura 1).

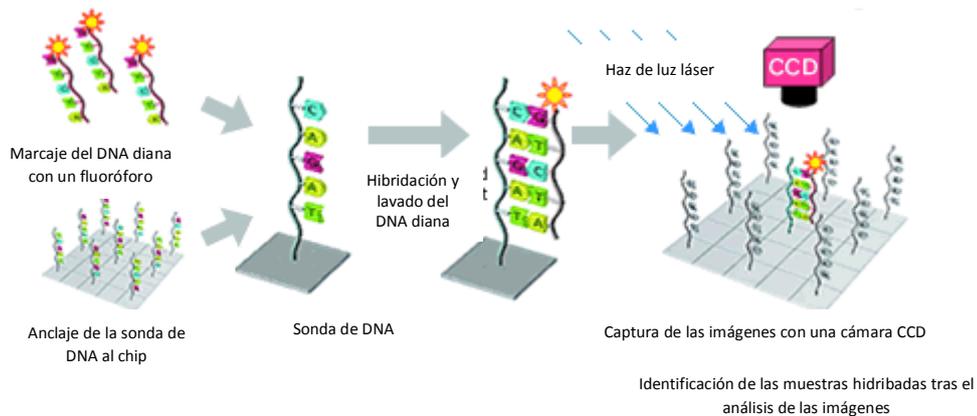


Figura 1. Esquema de funcionamiento de un *microarray* de DNA.

Cabe comentar que, para el diseño de *microarrays* de este tipo, se deben tener en cuenta diferentes parámetros como la elección de la sonda, el soporte, el modo y tecnología de inmovilización de dicha sonda, y el método de detección, entre otros (López *et al.*, 2002). Es por ello que se deben seguir unas pautas a la hora de su fabricación (Figura 2).

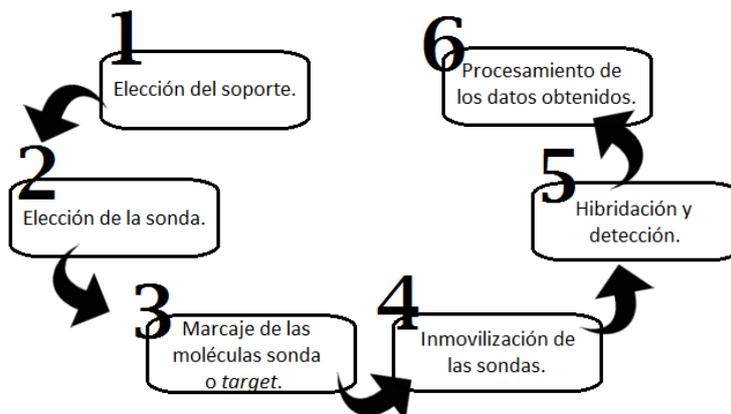


Figura 2. Proceso esquematizado de los pasos a seguir en la construcción de un *microarray*, tanto de DNA como de proteínas.

Entre las aplicaciones de los *microarrays* de DNA destacan los empleados para el diagnóstico molecular, los utilizados para farmacogenética y farmacogenómica y los usados para el desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos (López *et al.*, 2002).

Por otro lado, los *microarrays* de proteínas son una herramienta muy potente en el ámbito de la bioquímica y la biología molecular (Kodadek, Thomas., 2001). Los *microarrays* de proteínas consisten en chips de proteínas inmovilizadas en una posición concreta sobre una superficie sólida, dispuestas de forma similar a como se disponen las sondas en los *microarrays* de DNA (López *et al.*, 2005). Este tipo de *arrays* se ha ido consolidando con el paso del tiempo debido a que la determinación de la cantidad de RNA mensajero (RNAm) no proporciona suficiente información acerca de la cantidad de proteínas, ya que éstas sufren diferentes modificaciones post-traduccionales y esto, junto con cómo se han plegado, influye en su detección.

Hay dos tipos de *microarrays* de proteínas definidos. Por una parte, están los *arrays* de proteína de función que consisten en la inmovilización de millones de proteínas nativas en una superficie según un patrón definido. Éstos pueden ser utilizados para analizar funciones proteicas de una manera masiva. Por otra parte, se encuentran los *arrays* de proteínas de detección que consisten en inmovilizar un elevado número de agentes de unión a proteínas (agentes de captura). Este tipo de *arrays* permiten analizar diferentes perfiles de expresión a nivel proteico.

Existen, además, otros tipos de moléculas que también pueden ser empleadas como agentes de captura en la tecnología *microarray* como se ilustra en la figura siguiente (Figura 3).

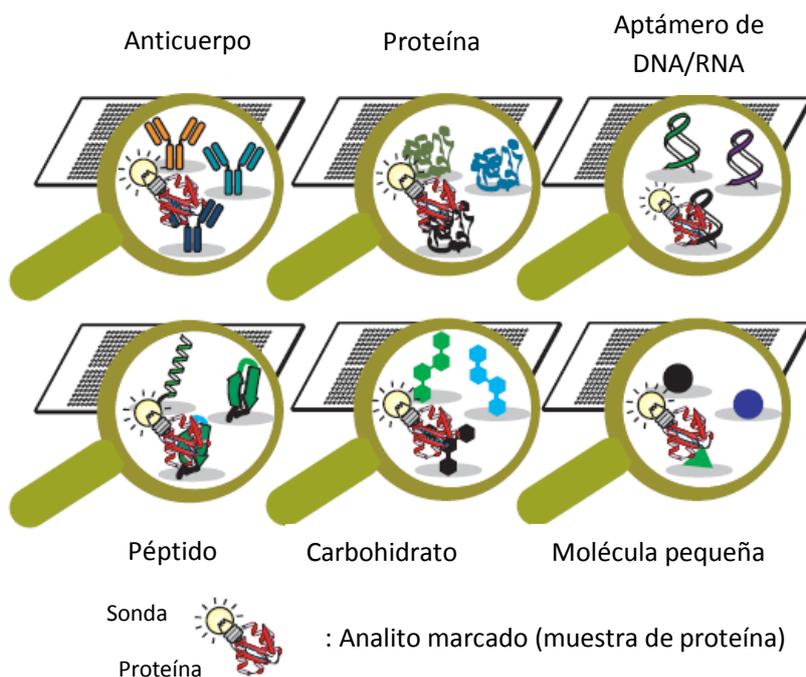


Figura 3. Representación de las diferentes moléculas que pueden ser empleadas como agentes de captura en un *microarray*. Imagen adaptada de Tomizaki *et al.* (2010).

En los siguientes apartados, se va a explicar con mayor precisión cada uno de los pasos a seguir en el diseño de ensayos en los que se empleen los *microarrays* como herramienta de diagnóstico.

2.3. Aspectos a considerar en la fabricación de un *microarray*.

2.3.1. Elección del soporte. Tipos de superficies.

El primer paso que se debe llevar a cabo en el diseño de *microarrays* es la elección del soporte o superficie sobre la cual se va a desarrollar el experimento, ya que ésta condicionará las etapas siguientes de marcaje, funcionalización y detección, y podrá determinar la eficacia y el rendimiento del sistema (Hérraez, 2010).

Además, también es de vital importancia el conocimiento de la naturaleza de la molécula a inmovilizar, ya sea molécula de ácido nucleico (DNA o RNA) o una proteína, pues la funcionalización que se llevará a cabo variará.

Así, las superficies sobre las cuales se inmovilizan las sondas pueden ser de diferente naturaleza pero todas ellas han de presentar una serie de características comunes que son: estabilidad química, mínimas uniones inespecíficas, baja señal de fondo, alto ratio superficie/volumen y compatibilidad con los distintos sistemas de detección (López *et al.*, 2005).

Hoy en día existen una variedad de superficies bien caracterizadas, con diferentes propiedades, que pretenden cubrir un gran intervalo de aplicaciones. Los materiales más usados son membranas de nylon o nitrocelulosa, vidrio y plásticos, en menor extensión. Las tradicionales superficies porosas como las membranas de nylon son idóneas debido a sus características rugosas que aumentan la superficie y por ende, la capacidad de unión. Sin embargo, están siendo actualmente reemplazadas por superficies producidas químicamente cuya base es el vidrio, dado que no se requiere bloqueo de las mismas y reducen la inmovilización inespecífica (Hall *et al.*, 2007). Asimismo, el uso del plástico como soporte presenta también otras ventajas por su reducido coste en la producción, flexibilidad en su fabricación y capacidad de poseer una gran calidad óptica.

2.3.2. Elección de la sonda.

La elección del tipo de sonda y el diseño de la misma es el siguiente paso a considerar en la fabricación de un sistema en formato *microarray*. Cabe realizar ciertas distinciones dependiendo de la naturaleza de la sonda.

Por una parte, cuando se trate de sondas de DNA dicho diseño es posible gracias a la existencia de bases de datos como *GenBank* o EMBL las cuales contienen mucha información acerca de secuencias de DNA e incluso para distintos organismos. Las sondas de DNA pueden clasificarse en oligonucleótidos, productos de PCR o clones de DNAc (Chou *et al.*, 2004).

Por el contrario, cuando la sonda sea de naturaleza proteica dicho diseño puede llevar mayor complejidad debido a que no es suficiente con la búsqueda bibliográfica en bases de datos de proteínas, como *Protein Data Bank* (PDB), sino que, para obtener dicha molécula, se debe realizar la expresión de su gen y la posterior separación y purificación. Además de no tener un patrón de unión específico y una estructura homogénea, como ocurre con los de DNA, tampoco existe una técnica de amplificación de la cantidad de proteínas presente en una muestra. Es por ello que la complejidad y diversidad estructural de las proteínas ha hecho que el desarrollo de *microarrays* de proteínas haya sido técnicamente más complicado (López *et al.*, 2005).

2.3.3. Marcaje.

Tras elegir el soporte sobre el que tendrá lugar la construcción del *microarray* así como el tipo de sonda, el siguiente paso es el marcaje. Este marcaje puede realizarse tanto de las moléculas sonda como para las *target*, facilitando así su posterior detección.

Existen diversos tipos de marcaje que permitirán diferentes métodos de detección. Entre ellos destacan el marcaje fluorimétrico (empleando fluoróforos), colorimétrico (utilizando moléculas, normalmente enzimas, que catalizan una reacción la cual está asociada a un cambio de color), radiactivo (usando moléculas radiactivas) o quimioluminiscente. Entre todos éstos, el más utilizado es el fluorimétrico debido a su gran aplicabilidad y sus protocolos sencillos. En particular, en este proyecto se han utilizado tanto detección colorimétrica como fluorimétrica.

En primer lugar vamos a hablar del marcaje fluorimétrico. Éste es una herramienta sencilla que conlleva una detección flexible y rápida (Johnson y Spence, 2010). Pero para ello requiere el uso de escáneres especiales de fluorescencia, como el lector de fluorescencia de superficies (LFS) basado en una cámara CCD (Mira *et al.*, 2004) que se utiliza en el presente trabajo. También presenta otras limitaciones, como que algunas superficies empleadas ya presentan una cierta fluorescencia de fondo, por lo que esto se habrá de tener en cuenta si se llevan a cabo experimentos sobre ellas (Liu y Rauch, 2003). Además, la señal va disminuyendo conforme avanza el tiempo con la consiguiente pérdida de sensibilidad.

Normalmente, los fluoróforos utilizados son las cianinas Cy3 o Cy5, que difieren en las longitudes de onda donde presentan los máximos de absorción y de emisión. Mientras que Cy3 tiene un máximo de absorción a 550 nm y uno de emisión a 570 nm, Cy5 los tiene a 650 nm y 670-700 nm, respectivamente. Así, ambos pueden ser empleados en estudios génicos o proteicos con marcaje diferencial potenciando el multiplexado, característica principal de la tecnología de *microarrays*.

Concretamente, en nuestro trabajo, los fluoróforos empleados han sido Cy5 y su análogo Alexa647. Una de las características de este último es que tiene mayor fotoestabilidad que los comentados con anterioridad (Ballard *et al.*, 2007), presentando el máximo de absorción a 650 nm y de emisión a 665 nm.

Alternativamente al marcaje fluorimétrico se encuentra el marcaje colorimétrico. A pesar de que implica un mayor número de pasos que el fluorimétrico, incluyendo el revelado con un sustrato adecuado, es considerada una técnica más sensible.

Normalmente el marcaje colorimétrico consiste en el uso de proteínas, como la biotina o la digoxigenina (*linkers*), que actuarán de puentes entre la sonda y la enzima de revelado, la cual está fusionada con la molécula que reconoce dicho *linker*. Así, y tras la adición del sustrato, la enzima será capaz de catalizar la conversión a productos que presentan un viraje de color.

Además de las técnicas de marcaje comentadas, existen otras técnicas denominadas sin marcaje o *label-free* que en la actualidad no se están empleando pero pueden ser consideradas como de gran potencial en la tecnología de *microarray* futura (Tabla 1).

Tabla 1. Diferentes modalidades del marcaje y características de cada una de ellas (Syahir *et al.*, 2015). *QCM: Microbalanza de Cuarzo, SPR: Resonancia de Plasmón de Superficie, AR: Reflexiones Anómalas sobre Superficies de Oro.

		Marcaje/ Preparación	Manejo	Coste de la instrumentación	Cuantitativo	High Throughput
Con Marcaje	Fluorescencia	Si/Medio	Fácil	Barato	Si/No	Si
	Radioisótopos	Si/Difícil	Difícil	Medio	Si	Si/No
	Quimioluminiscencia	Si/Medio	Fácil	Barato	Si/No	Si
	Electroquímica	Si/Medio	Fácil	Barato	Si	Si/No
	Nanopartículas	Si/Medio	Fácil	Barato	Si	Si
Sin Marcaje (Label- free)	MS	No/Fácil	Fácil	Caro	No	Si/No
	Microcantilever	No/Difícil	Difícil	Caro	Si	No
	QCM*	No/Medio	Fácil	Barato	Si	No
	SPR*	No/Medio	Fácil	Caro	Si	Si
	AR*	No/Medio	Fácil	Barato	Si	Si

2.3.4. Métodos de inmovilización.

Como se ha indicado en la Figura 2, tras la elección del soporte, de la sonda y del marcaje, se ha de abordar la inmovilización de la sonda. Este paso consiste en determinar el método por el cual se unirá la sonda al soporte escogido. Se trata de un paso bastante importante y complejo, por lo que en la actualidad se han desarrollado diferentes estrategias con el fin de obtener una inmovilización óptima.

Para llevar a cabo una unión adecuada, en algunos casos se requiere la activación de la superficie. Pero además, también se necesita la modificación de las moléculas sonda mediante la adición de diferentes grupos químicos (tiol, amino) o de una proteína (biotina) (Aboytes *et al.*, 2003). Es lo que se conoce como funcionalización de la sonda. Se trata de un proceso costoso aunque hoy en día está bastante estandarizado y existen numerosas casas comerciales que lo suministran a demanda.

En cualquier caso, existen distintas técnicas de inmovilización dependiendo de la biomolécula problema y de la superficie de apoyo (Tabla 2).

Tabla 2. Técnicas de inmovilización. Características de las distintas técnicas de inmovilización de las sondas sobre las superficies. + = Bajo, ++ = Medio, +++ = Alto

Tipo de unión	Método de inmovilización	Preparación	Unión	Estabilidad	Reusabilidad	Coste
Unión física o pasiva	Atrapamiento	+	++	+++	Posible	++
	Inclusión en membranas	++	+	++	Posible	+++
	Adsorción	+	++	+	Si	+
Unión química	Enlace covalente	+++	+++	+++	Posible	+++
	Afinidad	++	+++	+++	No	++
	Electrostática	+	+++	+	Si	++

A continuación, se detallan cada una de éstas.

En primer lugar se encuentran las estrategias de retención física o pasiva. En estas se trata de inmovilizar los receptores sin que exista una reacción química (mediante adsorción o atrapamiento, por ejemplo). A su vez se dividen en técnicas por atrapamiento, por inclusión en membranas o por adsorción. En la primera de éstas la retención de las sondas tiene lugar porque quedan fijadas entre la matriz porosa de un polímero. En cambio, en las estrategias pasivas de inclusión en membranas, el factor que favorece dicha inmovilización es la membrana en sí. Finalmente en la retención por adsorción, ésta tiene lugar mediante el uso de moléculas que establecen interacciones débiles con la superficie. Se trata de una técnica sencilla, rápida y económica ya que no es necesario el uso de reactivos adicionales para la unión. Cabe comentar que la interacción entre las moléculas que actúan como sondas y el soporte tiene lugar de manera aleatoria, por lo que las interacciones que se formarán serán de diferentes tipos. Además, una vez realizada dicha unión, ésta permanece grandes periodos de tiempo sin sufrir cambio alguno. Sin embargo, y como cualquier estrategia, presenta también inconvenientes. La aleatoriedad en la formación de las uniones conlleva que, de vez en cuando, la sonda, no esté de manera orientada y accesible para la molécula *target*. Además la unión se puede ver afectada por variaciones en el pH, en la concentración de sales, etc.

En segundo lugar se encuentran las técnicas de retención química. Éstas, al igual que las físicas, se pueden dividir en:

- Unión por afinidad: depende de la interacción biológica entre una molécula anclada a la superficie y un ligando (Hérraez, 2010). Tiene lugar mediante la utilización de moléculas que presentan cierta afinidad y selectividad entre ellas como por ejemplo el tándem biotina-(estrept)avidina (THERMO SCIENTIFIC, 2014) y presenta la ventaja de disponer las sondas de manera altamente orientada.
- Unión electrostática: tiene lugar cuando la superficie está cargada positiva o negativamente. Un ejemplo de soporte sería el vidrio derivatizado con poli-L-lisina para inmovilizar las sondas de ANs.
- Unión por enlace covalente: en este caso, existe una reacción química entre algún grupo del receptor y un grupo de la superficie de forma que la sonda queda anclada covalentemente, y por tanto, se trata de una unión más robusta. Esta estrategia presenta la ventaja de poder orientar las moléculas con la consiguiente facilidad de reconocimiento por las moléculas *target*. Además, al tratarse de una unión fuerte, es resistente a variaciones de temperatura, pH o presencia de sales.

En este trabajo, la estrategia empleada ha sido la estrategia física de atrapamiento mediante el uso de un hidrogel combinada con el enlace covalente de la sonda. Dicho hidrogel se forma y queda adherido a la superficie por fotopolimerización, es decir, cuando es irradiado con luz UV, ya que empieza su entrecruzamiento que favorece su adhesión a la superficie y permite atrapar a la molécula sonda al mismo tiempo (Moshchalski *et al.*, 2013). El uso de hidrogeles ofrece una selección más amplia en la química de activación y/o inmovilización en comparación con las superficies básicas, además de mejorar la estabilidad de las biomoléculas y la calidad de detección (Tanase *et al.*, 2011). En este trabajo, con el fin de mejorar la inmovilización de sondas, se utilizan secuencias con, al menos, un grupo tiol, de manera que la irradiación empleada a la vez que entrecruza el polímero permite el anclaje covalente de la sonda a algunos de los dobles enlaces mediante la reacción de acoplamiento tiol-eno (Posner, 1905)(Hoyle y Bowman, 2010). De esta manera se añan las ventajas de la inmovilización por atrapamiento con las del enlace covalente.

Además de lo comentado previamente, otro aspecto importante en la etapa de inmovilización de la sonda es la manera en la que este paso se lleva a cabo en la construcción de los *microarrays*. Existen dos

modalidades: síntesis *in situ* o *spotting*. La primera de éstas queda restringida a sondas de DNA, mientras que la segunda puede aplicarse tanto en la construcción de *microarrays* de DNA como de proteínas.

La modalidad de fabricación *in situ* consiste en la síntesis en el momento del oligonucleótido mediante la deposición de nucleótidos de manera cíclica. Previamente, la superficie debe haberse activado por la aplicación de luz (fotoquímicamente) o por sustancias químicas (electroquímicamente) (Figura 4a).

En cambio, la modalidad de *spotting*, se caracteriza por depositar la disolución que contiene las moléculas sonda ya sintetizadas mediante un robot. Esta deposición puede realizarse por contacto (Figura 4b) o sin contacto (*ink-jet*) (Figura 4c). Asimismo, la deposición en la impresión *ink-jet* se puede llevar a cabo mediante jeringas solenoides, inyectoros piezoeléctricos o inyectoros térmicos.

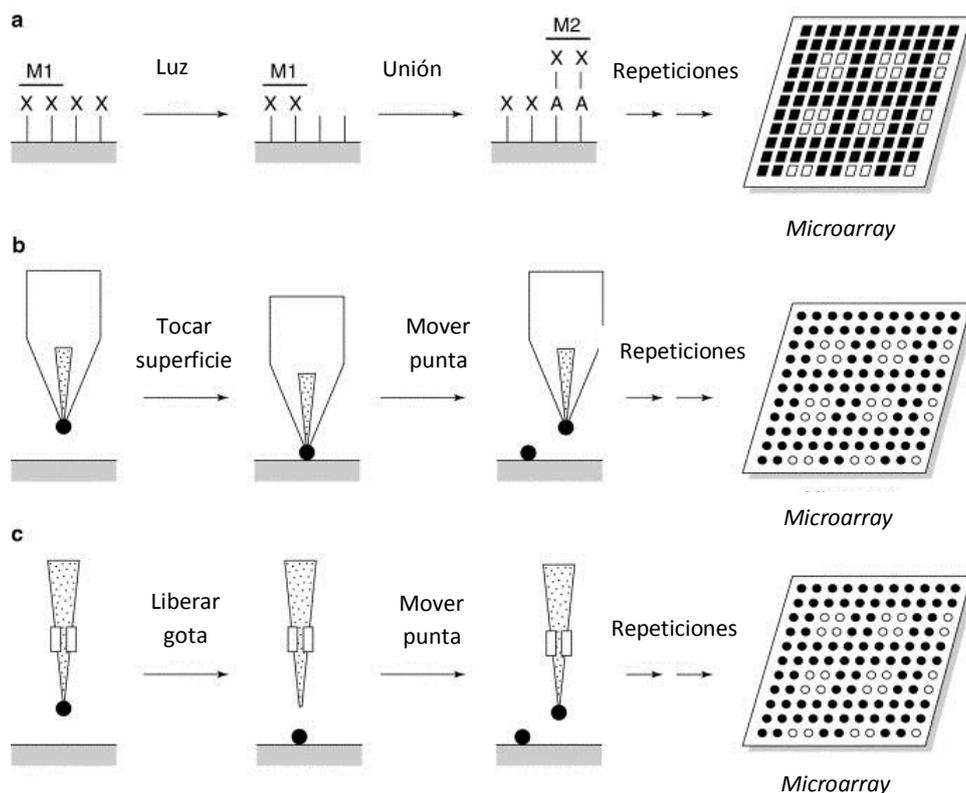


Figura 4. Diferentes modalidades de fabricación de un *microarray*: a) fabricación *in situ* b) *spotting* por contacto c) *spotting* sin contacto (Schena *et al.*, 1998).

Como bien se observa, la deposición requiere el uso de tecnología avanzada que aumenta el coste de las técnicas, pero que reduce los errores experimentales que podrían cometerse. En este trabajo, la modalidad utilizada es la de *spotting*. En concreto, la deposición se realiza mediante impresión *ink-jet* con una jeringa solenoide. La técnica utilizada se caracteriza por emplear volúmenes de muestra entre 4-80 nL lo que conlleva a una disminución de la miniaturización y de la densidad (Lang *et al.*, 2010). Sin embargo, se trata de una técnica rápida, sencilla, flexible, precisa y económica para el desarrollo de *microarrays*.

2.3.5. Lectura del *microarray*. Detección.

La técnica de detección dependerá de la estrategia de marcaje escogida. Así, si el marcaje es de tipo fluorimétrico, existen diversidad de instrumentos para poder realizar una captura de las zonas de trabajo y obtener imágenes bidimensionales como, por ejemplo, los basados en cámara CCD (Figura 5) o los escáneres de fluorescencia comerciales, como los de la serie GenePix® de la casa comercial Molecular

Devices. Si el marcaje es colorimétrico, se puede recurrir a escáneres de documentos convencionales, siempre que la naturaleza del soporte lo permita.

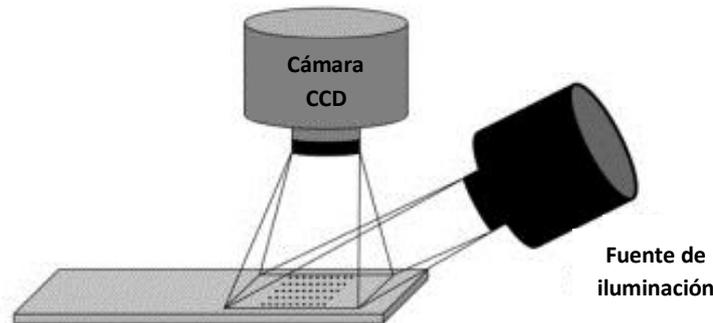


Figura 5. Esquema de un sistema de detección similar al empleado en nuestro trabajo. Consta de una cámara CCD que captura la imagen y de una fuente de iluminación, generalmente LEDs, que enfoca a la zona a capturar (Moshchalski *et al.*, 2013).

Tras la lectura del ensayo, se obtiene una imagen 2D que contiene puntos o *spots* cuya intensidad está relacionada de manera directa con la cantidad de moléculas *target* reconocidas por el agente de captura inmovilizado en la superficie.

Posteriormente, mediante herramientas bioinformáticas de tratamiento de imagen, se realiza el análisis de los datos, obteniendo así una matriz de datos correspondientes a los diferentes *spots* del *microarray*, que pueden ser posteriormente interpretados para extraer conclusiones.

3. Empleo de hidrogeles en el desarrollo de *microarrays*.

Los hidrogeles son el resultado de reacciones de polimerización entre diferentes polímeros como los acrilatos (poli-L-lisina, poliacrilamida, polietilenglicol (PEG) o poliuretano) con la consiguiente retención de moléculas de agua por parte de monómeros de éstos (Tanase *et al.*, 2011).

En la actualidad, los hidrogeles suponen una alternativa tanto a los inmunoensayos tradicionales, en los que el anticuerpo (Ab) se fija a la superficie, como a los *microarrays*. En estos ensayos el hidrogel es el agente que permitirá el atrapamiento de las diferentes moléculas sonda, tanto de ANs como de proteínas, aumentando así la superficie de contacto. Dicha inmovilización tiene lugar a la par con la formación del hidrogel, generalmente mediante reacciones de fotopolimerización (mediante la exposición a una lámpara de luz UV).

Estos hidrogeles tridimensionales permiten que el número de sondas atrapadas sea mayor, lo que conlleva unas condiciones cinéticas más favorables que las proporcionadas por la interfaz 2D líquido-sólido (Bromberg *et al.*, 2011). Es por ello que en estos *microarrays* se obtienen mayores valores de sensibilidad.

Además, los hidrogeles presentan otras ventajas como su aspecto transparente que facilita la visualización del viraje de color, su reproducibilidad y la sencillez del proceso (Beyer *et al.*, 2014).

Sin embargo, las velocidades de los procesos de reconocimiento molecular que tienen lugar en éstos, como por ejemplo procesos de hibridación de DNA, son menores debido a problemas de accesibilidad, y en muchos casos, a la propia composición del hidrogel. Aunque cabe destacar que dicho tiempo 'perdido' se recupera con antelación durante las primeras fases en la construcción de los *microarrays* ya que son rápidos de fabricar. Además, existen trabajos que afirman que el uso de hidrogeles, lejos de dificultar, facilita la accesibilidad de las sondas (H. Bunemann, 1982). Asimismo, la disposición de las moléculas

sonda es más al azar que en los chips planos 2D, donde la inmovilización es más orientada (Tanase *et al.*, 2011).

En resumen, a pesar de presentar algunos inconvenientes como el descenso de las velocidades de distintos procesos y la orientación, la utilización de hidrogeles tridimensionales surge con la finalidad de resolver los problemas que presentan los ensayos tradicionales, tanto inmunoensayos como *microarrays*, manteniendo las ventajas de multiplexado y automatización que presentan. Así, se caracterizan por tener mayor sensibilidad, facilidad a la hora de la construcción, rapidez, menores requerimientos de muestras y agentes de captura, y coste más reducido.

Por otra parte, la hidrofilia y la flexibilidad de su porosidad, que caracterizan a los hidrogeles, los hace idóneos para la formación de una estructura similar al interior celular, debido a su alto contenido en agua, para albergar interacciones bioquímicas de macromoléculas en su interior, tanto entre ácidos nucleicos (DNA, RNA) como entre proteínas (Beyer *et al.*, 2014).

En lo encontrado en la bibliografía, la validación cuantitativa o cualitativa del grado de hibridación de DNA se lleva a cabo mediante quimioluminiscencia (Le Goff *et al.*, 2013) o fluorescencia (J. Tang, P. Xiao, 2009) (Rubina *et al.*, 2004) (Rutowska *et al.*, 2010) (Neumann *et al.*, 2010). Pero éstas presentan algunos inconvenientes como evitar la exposición continua a la luz, tanto durante las preparaciones de disoluciones así como en el almacenamiento. Cabe destacar que en los últimos años la detección de DNA se ha ido optimizando mediante la combinación de hidrogeles y marcaje colorimétrico (Baeissa *et al.*, 2010) con nanopartículas de plata (detección semi-cuantitativa) potenciando así las ventajas que presentan ambos.

En conclusión, actualmente se está estudiando la aplicación de los hidrogeles para distintos tipos de *microarrays* ya que permiten obtener áreas de elevada densidad de sonda, lo que conlleva una facilidad y una mejora en la inmovilización de las sondas. Sin embargo, se trata de una tecnología muy joven con mucho potencial aún por explotar.

4. Fosforilcolina (MPC) como propuesta de hidrogel.

La 2-metacrililoietil fosforilcolina (MPC) (Figura 6) es una molécula sintética desarrollada para dotar de inercia biológica a las superficies de materiales (Goda *et al.*, 2015). Se basa en la estructura de la fosfatidilcolina presente en las membranas de las células eucariotas.

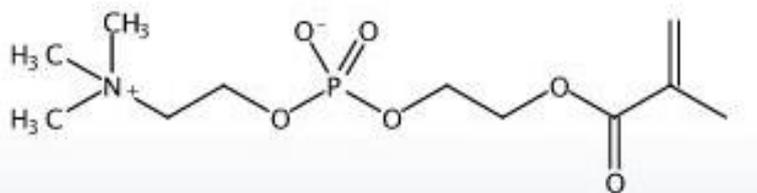


Figura 6. Estructura química de la molécula sintética 2-metacrililoietil fosforilcolina.

Por una parte, la MPC es una molécula bioinerte debido a un grupo de fosforilcolina (MPC) presente en la cadena lateral. Esto hace que se establezcan interacciones electrostáticas y se forme una fina capa rica en agua alrededor de los grupos MPC formando así un hidrogel.

Por otra parte, la MPC también contiene un monómero de metacrilato por lo que puede dar lugar a diferentes conformaciones moleculares mediante la aplicación de técnicas de polimerización las cuales son rápidas y sencillas. En este sentido, y debido a la reactividad del metacrilato, la MPC presenta

diversas aplicaciones en el ámbito biomédico. Es por ello que, en la actualidad, muchos grupos de investigación están llevando a cabo diferentes investigaciones utilizando la MPC como material de trabajo (Watanabe *et al.*, 2008) (Xu *et al.*, 2010) (Ishihara *et al.*, 2011) (Matsuno *et al.*, 2011) (Lin *et al.*, 2014).

Además, en los últimos años los polímeros de MPC han despertado mayor interés debido al descubrimiento de nuevas propiedades como, por ejemplo, el actuar como receptor de la proteína C-reactiva. Esta proteína está presente en el torrente sanguíneo y es empleada como marcador de las enfermedades cardiovasculares (Chang *et al.*, 2002). Como dato de interés, la CRP es actualmente uno de los diez biomarcadores que con más frecuencia es solicitado en los análisis por parte de los médicos. Teniendo en cuenta todo esto, en este trabajo se plantea la posibilidad de utilizar los *microarrays* de hidrogel de MPC para poner a punto un ensayo de detección de CRP.

5. Los discos compactos como soportes para *microarrays*.

Los *Blu-ray Disks* (BD), al igual que los *Compact Disk* (CD) y los *Digital Versatile Disk* (DVD), son soportes con unas propiedades físicas excepcionales, como su resistencia, su estabilidad calórica, su extensa superficie así como una mejor eficiencia en la adsorción de diferentes moléculas. Es por ello que en la actualidad se están utilizando dichos soportes para el desarrollo de ensayos como alternativa a soportes tradicionales como el vidrio o la sílice. Este uso de los discos compactos como soportes para *microarrays* se realiza de manera pionera por el grupo de investigación SYM del Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la Universitat Politècnica de València (Morais *et al.*, 2014) donde se ha realizado el presente trabajo.

Las sondas pueden inmovilizarse sobre los discos mediante diferentes estrategias como adsorción pasiva (de manera directa) (Morais *et al.*, 2009)(Morais *et al.*, 2010), mediante el uso de bioagentes de afinidad como la estreptavidina, concanavalina A, proteína A o anticuerpos (de manera indirecta) (Arnandis-Chover *et al.*, 2012), covalentemente tras la funcionalización química del polímero que forma el disco compacto original (policarbonato) (Bañuls *et al.*, 2012) o con el uso de diferentes compuestos que son aplicados mediante *spin coating*, como la resina SU-8 (Peris *et al.*, 2013) o el poliestireno (Tamarit-López *et al.*, 2008).

Por otra parte, estos soportes presentan además gran potencial en el *screening* masivo para la detección de diferentes compuestos gracias al multiplexado que ofrecen los *microarrays*. Se trata de una tecnología rápida (los tiempos requeridos oscilan entre 25 y 90 minutos, como máximo, dependiendo del ensayo), barata y con una sensibilidad y selectividad excelentes, con valores similares a los obtenidos en los ensayos ELISA (Morais *et al.*, 2014).

El BD ha sido el soporte elegido para este trabajo. Pero, ¿qué lo hace diferente del resto de la tecnología de disco como CD's o DVD's?

En respuesta a la demanda de una nueva tecnología de disco que permitiera un mayor y mejor almacenamiento frente a los CD's y DVD's ya existentes, surgió una tercera generación de sistemas de almacenamiento (Arnandis-Chover *et al.*, 2014). Entre ellos se encontraba el Blu-ray, propuesto por los *Blu-ray Disk Founders* (Meinders *et al.*, 2006).

En primer lugar, la composición de los BD's es diferente ya que no sólo es una capa de policarbonato sobre la cual es grabado el *track*, el cuál posibilitará la lectura en cualquier lector convencional, sino que los BD's están formados por un compuesto patentado por la casa TDK® conocido como Durabis que es químicamente inerte y altamente hidrofóbico (Enomoto *et al.*, 2005). Esta última característica genera un tamaño de punto menor en el *microarray* y hace a los BD's únicos para el desarrollo de estudios de

diagnóstico molecular, ya que permiten la digitalización de matrices de alta densidad con un detector óptico preciso, versátil y asequible, como es el propio lector de BD (Arnandis-Chover *et al.*, 2014).

En segundo lugar, la utilización de unas longitudes de onda menores en comparación con los CD's o los DVD's, debido al tamaño del *track*, hacen las lecturas más precisas y más sensibles que las obtenidas con los DVD's o las tecnologías de qPCR (Arnandis-Chover *et al.*, 2014), con una mejor resolución lateral. Así, se postula con posibilidades para convertirse en una tecnología de *high throughput screening* (HTS) (Figura 7). Sin embargo, pese a su potencial, uno de los problemas a resolver es la inmovilización de las sondas, que resulta difícil, pues se trata de una superficie diseñada para repeler todo tipo de adsorción y además es químicamente inerte, por lo que también dificulta la inmovilización por unión covalente.

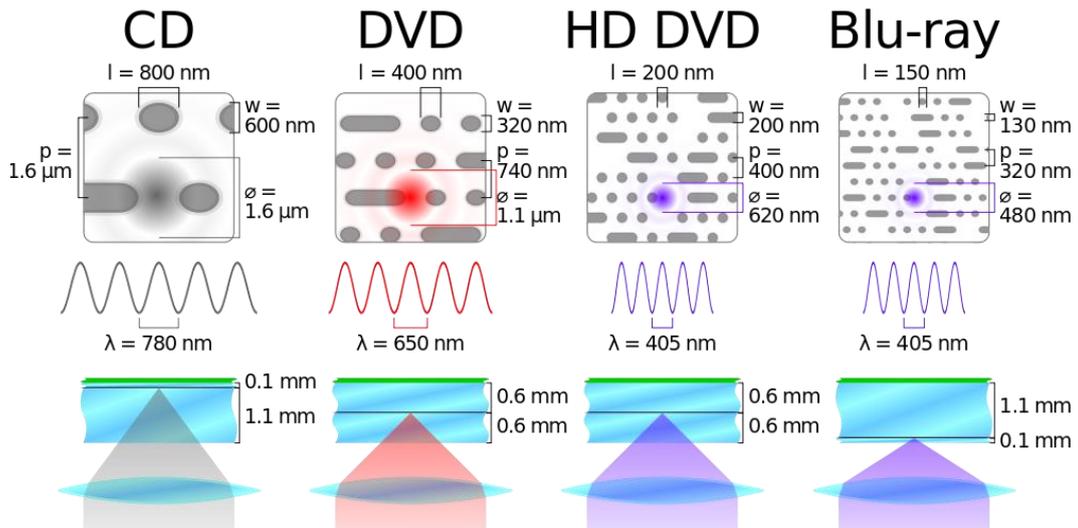


Figura 7. Comparación de las diferentes tecnologías de disco en cuanto a longitud de onda, diámetro de la lente, diámetro del láser, y dimensiones del track.

En este trabajo se plantea encontrar una manera sencilla de inmovilizar sobre la superficie del BD, tanto sondas de AN como proteínas, mediante la formación de un hidrogel que aumente la sensibilidad del ensayo por el hecho de generar un *microarray* en 3D, y por emplear el BD como soporte, el cual presenta baja fluorescencia de fondo y repele la interacción inespecífica fuera del punto. Por otro lado, el hecho de emplear el hidrogel de MPC, conllevará a una disminución de la adsorción inespecífica también dentro del *spot* como se ha mencionado en el apartado 4.

2. OBJETIVOS

En la actualidad, para el diagnóstico de muchas enfermedades, la tecnología *microarray* se presenta como una herramienta interesante por sus múltiples ventajas. Para la inmovilización de las sondas en formato *microarray*, tradicionalmente la unión covalente y la adsorción son las metodologías escogidas. Sin embargo existen alternativas, como el uso de hidrogeles, que atrapan las moléculas receptoras en su interior y generan *microarrays* en 3D.

El objetivo general de este trabajo es poner a punto una metodología de anclaje de sondas en formato *microarray* para superficie de Blu-ray (BD), basada en la formación de un hidrogel. La nueva metodología, en principio, presentaría las ventajas de sencillez, mayor sensibilidad (al aumentar la densidad de moléculas receptoras) y menor inespecificidad por emplear fosforilcolina (MPC) en dicho hidrogel.

Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos particulares:

1. Puesta a punto de un *microarray* basado en hidrogel de MPC sobre superficie de BD.
 - 1.1. Estudio de reconocimiento de proteína C reactiva (CRP) mediante *microarrays* de fluorescencia. Análisis de prestaciones.
2. Puesta a punto de un *microarray* de sondas de DNA basado en hidrogel de MPC.
 - 2.1. Estudios de inmovilización e hibridación usando marcaje fluorescente.
 - 2.2. Prueba de concepto: aplicación a la discriminación de polimorfismos de una sola base (SNP) y a la detección de productos de PCR de bacteria.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Reactivos.

Los reactivos albúmina de suero bovino (BSA) ($\geq 98\%$, polvo liofilizado), Tween 20, tetrametilbencina (TMB), estreptavidina-Atto655, soluciones A y B de revelado de plata, diacrilato de poli(etilenglicol), 2-metacrililoiloxi fosforilcolina (MPC), Trizma Base empleado para la preparación del tampón Tris-HCl y la proteína C reactiva (CRP) de plasma humano recombinante expresada en *E.coli* (en solución 0,02 M Tris, 0,28 M cloruro de sodio, 0,005 M cloruro de calcio, pH 7,8-8,2 con 0,1% azida de sodio) fueron suministrados por la casa comercial Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Los reactivos formamida y la mayoría de las sales empleadas en la preparación de los diferentes tampones fueron adquiridos de Scharlau (Barcelona, España).

Los tampones empleados en los distintos ensayos, tanto para la preparación de disoluciones como para el lavado, fueron los siguientes: PBS 1 \times : fosfato sódico dibásico 0,8 mM, fosfato sódico monobásico 2 mM, cloruro sódico 137 mM y cloruro potásico 2,7 mM, pH 7,5; SSC 1 \times : cloruro sódico 90 mM y citrato sódico 9 mM, pH 7; PBS-T 1 \times (fosfato salino-Tween): PBS 1 \times con Tween 20 al 0,05%; MES: MES 112 mM, pH 4,6; Tris HCl: Trizma base 21 mM, cloruro sódico 137 mM, cloruro potásico 37 mM, pH 8; tampón carbonato (TC): carbonato sódico anhidro 15 mM, hidrógeno carbonato sódico 34 mM, pH 9,6.

Por una parte, los oligonucleótidos denominados SYM empleados en los diferentes experimentos (SYM4, SYM5, SYM17, SYM22, SYM25, SYM43, SYM46, SYM47, SYM48, SYM54 y SYM55) fueron proporcionados por Sigma-Genosis (Suffolk, Reino Unido). Las secuencias de los mismos se especifican en la siguiente tabla (tabla 3).

Tabla 3. Nomenclatura de los oligonucleótidos empleados y secuencia de cada uno de ellos. En negrita, se resaltan los grupos funcionales o fluoróforos en los extremos 5' o 3'. Además, en la tercera columna se indica si presenta alguna complementariedad y, en caso afirmativo, con qué oligonucleótido lo hace. En el caso de complementariedad parcial, el oligonucleótido se encuentra marcado con un asterisco y en la secuencia se indica la(s) base(s) que confieren dicha complementariedad parcial mediante un subrayado.

Nombre oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Oligonucleótidos complementarios
SYM4	BTN -(T) ₁₅ -CCCGATTGACCAGCTAGCATT	SYM5
SYM5	Cy5 -AATGCTAGCTGGTCAATCGGG	SYM4 SYM43 SYM44 SYM54 SYM55
SYM17	TTACGATCGACCAGTTAGCCC(T) ₁₅ -(CH ₂) ₃ -S-S-(CH ₂) ₃ -OH	-
SYM22	H₂N -C ₇ -(T) ₁₅ CCCGATTGATTAGCTAGCATT	SYM25
SYM25	BTN -AATGCTAGCTAATCAATCGGG	SYM22
SYM43	SH -(T) ₁₅ -CCCGATTGACCAGCTAGCATT	SYM5
SYM44	SH -(T) ₁₅ -CCCGATTGACCAGCTAGCATT- Cy5	SYM5
SYM46	SH -(T) ₁₅ -CCCGATTGACC <u>I</u> GCTAGCATT	SYM5*
SYM47	SH -(T) ₁₅ -CCCGATT <u>G</u> ATTAGCTAGCATT	SYM5*
SYM48	SH -(T) ₁₅ -CC <u>A</u> TATTGACCAGCTA <u>T</u> CATT	SYM5*

SYM54	SH-CCCGATTGACCAGCTAGCATT-Cy5	SYM5
SYM55	SH-CCCGATTGACCAGCTAGCATT	SYM5

Por otra parte, los oligos denominados DAC (DAC1, DAC3, DAC4, DAC6) fueron amablemente cedidos por el *Département des Analogues et Constituant des Acides Nucléiques* (DACAN) del profesor Morvan de la Universidad de Montpellier. Sus secuencias se especifican en la tabla 4.

Tabla 4. Nomenclatura de los oligonucleótidos DAC empleados y la secuencia de cada uno de ellos. (SH)₄ indica que posee cuatro grupos tiol disponibles para reaccionar.

Nombre oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
DAC1	SH-TTTTGATTACAGCCGGTGTACGACCCT
DAC3	(SH)₄-TTTTGATTACAGCCGGTGTACGACCCT
DAC4	SH-TTTTAGACGCAATACCGCGAGGTGGAGCA
DAC6	(SH)₄-TTTTAGACGCAATACCGCGAGGTGGAGCA

El anticuerpo policlonal primario anti-digoxigenina de oveja y policlonal secundario anti-oveja de conejo marcado con HRP fueron proporcionados por Abcam (Cambridge, Reino Unido).

El anticuerpo primario monoclonal anti-digoxigenina de conejo fue adquirido de la casa Invitrogen de Life Technologies (Madrid, España).

El anticuerpo policlonal secundario anti-conejo de cabra marcado con oro (GAR-Au) fue suministrado por Sigma Aldrich (Madrid, España).

El anticuerpo policlonal secundario anti-conejo de cabra marcado con Alexa647 (GAR-Alexa) y el fluoróforo *Alexa Fluor® 647 NHS ester* fueron proporcionados por la casa Molecular Probes de Life Technologies (Madrid, España).

Los productos de PCR marcados con digoxigenina fueron obtenidos por el grupo de investigación en el que se ha realizado el trabajo siguiendo un protocolo optimizado con anterioridad (Arnandis-Chover *et al.*, 2012)

Los cubreobjetos de vidrio de dimensiones 18x18 mm fueron suministrados por Deltalab (Barcelona, España).

Los tubos *Pierce® Concentrator*, PES, 30K fueron adquiridos de THERMO SCIENTIFIC (Escocia, Inglaterra, Reino Unido).

Los tubos de centrifuga *Macrosep® Advance Centrifugal Device* fueron suministrados por la casa PALL® Life Sciences (EEUU).

Los Blu-ray (BD) empleados como soporte de todos los ensayos realizados fueron proporcionados por la casa CD Rohling-up GmbH (Saarbrücken, Alemania).

1.2. Instrumentación y *software*.

Para la impresión de los *microarrays* se empleó el equipo AD1500 de Biodot Inc. (Irvine, CA, EEUU), con sistema de impresión sin contacto y aguja de material cerámico.

Para la detección de la fluorescencia se empleó un sistema casero basado en una cámara CCD de alta sensibilidad Retiga EXi de Qimaging Inc, (Burnaby, Canadá, EE. UU) situada ortogonalmente para la lectura de la fluorescencia (Mira *et al.*, 2004), con LEDs Toshiba TLOH157P como fuente de excitación ($\lambda=633$ nm) (Llorente *et al.*, 2004). Las medidas se realizaron por acumulación de luz emitida por las muestras durante 15 s utilizando una ganancia del dispositivo CCD igual a 5.

Para el análisis y posterior cuantificación de las imágenes de los *microarrays* obtenidos se utilizó el paquete informático GenePix Pro 4.0 suministrado por Molecular Devices, Inc. (Sunnyvale, CA, EEUU).

Las centrifugas empleadas fueron Medifiger BL-S de la casa Selecta® y Labofuge 400 de Heraeus Instruments.

Como fuente de luz UV para la polimerización de la fosforilcolina se empleó el instrumento *UV-Ozone Cleaning System* de la casa comercial FHR (Ottendorf, Ockrilla, Alemania), una lámpara de mercurio *Double Bore® Lamp* de la casa comercial Jelight Co. (California) y una lámpara para cromatografía de capa fina de la casa Vilber Lourmat (Francia). Todas ellas con emisión a 254 nm.

2. Métodos

2.1. Protocolo de marcaje y purificación de la proteína C reactiva (CRP).

En primer lugar se intercambió el tampón de la proteína C reactiva (CRP) comercial usando *ependorfs Pierce®* de 30K. Se obtuvieron así 500 μ L de CRP a una concentración de 500 ppm en tampón bicarbonato (el volumen y la concentración obtenidos eran iguales a los de partida). Dicho intercambio consistió en ciclos de centrifuga de 15 minutos a 17 °C con una velocidad de 12360 rpm, adicionando volúmenes variables del tampón bicarbonato (Tabla 5).

Tabla 5. Ciclos realizados para el intercambio del tampón que contenía la CRP que iba a ser marcada y volumen de tampón bicarbonato añadido para el ciclo siguiente.

Ciclo	Volumen añadido de bicarbonato (μ L)
1	400
2	400
3	350
4	350
5	-

Una vez intercambiado el tampón, se procedió al marcaje de la proteína C reactiva. Para ello, se añadieron los 500 μ L de la disolución de CRP obtenida previamente a un tubo que contenía 100 μ g del marcador *Alexa Fluor® 647* y se dejó durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente.

Finalmente, se realizó una purificación de la proteína marcada mediante 10 ciclos de centrifugación (12360 rpm, 15 min, 17 °C) empleando tubos *Macrosep® Advance Centrifugal Device* y PBS 1 \times como tampón.

Tras la purificación, se obtuvieron 200 μ L de CRP marcada (CRP*) a una concentración de 166 ppm.

2.2. Protocolo de inmovilización de la fosforilcolina (MPC) y ensayo de reconocimiento de CRP marcada.

Se prepararon dos concentraciones distintas de fosforilcolina (MPC) en agua: 1,3 y 1,5 M (ambas preparadas a partir de una disolución madre de 3 M (0,8858 g en 1 mL)). A continuación, se imprimieron los diferentes *arrays* mediante el uso del robot AD1500 sobre la cara inferior de un Blu-ray (BD) sin modificar.

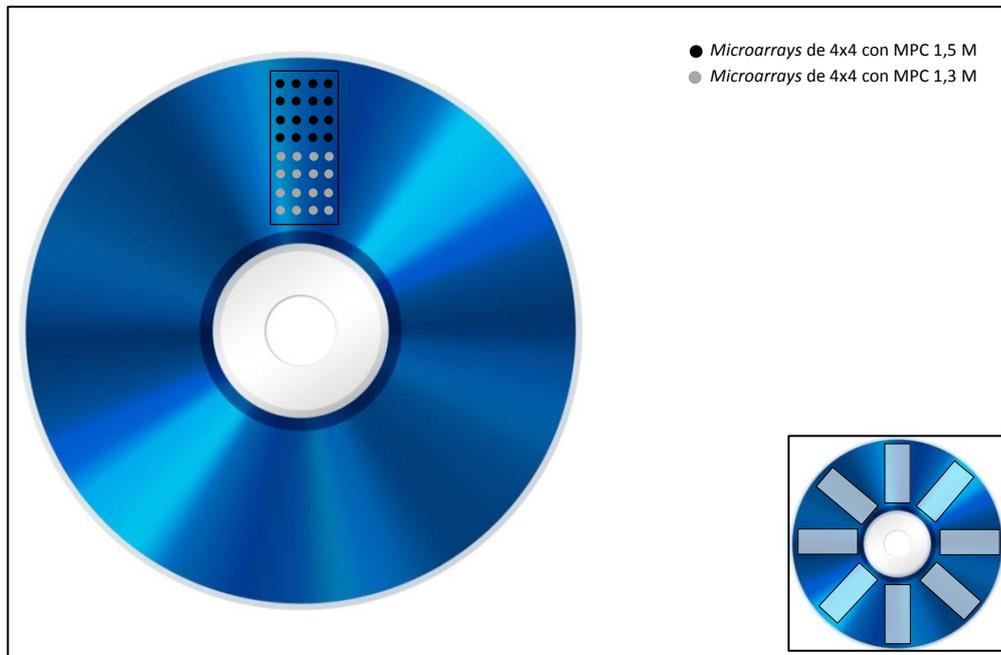


Figura 8. Esquema de la cara de incidencia del láser sobre la cual se imprime el *array* mediante el robot AD1500. En ella, se ha representado un *microarray* lo que, en nuestro trabajo, denominaremos zona. Está formada por 4 columnas y 8 filas de puntos (*spots*). Dicho *microarray* se imprimirá 8 veces a lo largo de todo el BD. En la parte derecha inferior, se representa un esquema de todas las zonas posibles a imprimir (un total de 8) en un BD.

Se definieron 8 zonas iguales sobre el disco (Figura 8). En cada zona se imprimieron 2 *arrays* de 4x4 (40 nL/*spot*). El primero empleó la disolución de 1,3 M y el segundo la de 1,5 M de MPC. Tras la impresión de la MPC, se expuso el BD a la luz UV (254 nm) del limpiador de superficies *UV-ozone Cleaning System* durante 7 minutos. A continuación, se lavó con agua destilada y se secó con aire comprimido. Posteriormente, cada una de las 8 zonas se incubó durante media hora a temperatura ambiente con concentraciones crecientes de CRP* (Tabla 6). La incubación se realizó depositando 35 μ L de CRP* en PBS-T sobre cada una de las zonas impresas y extendiendo la disolución, con la ayuda de un cubreobjetos, durante media hora a temperatura ambiente. Todas las diluciones se realizaron a partir de una dilución madre cuya concentración era de 166 ppm.

Tabla 6. Tabla que recoge las diferentes concentraciones de CRP* utilizadas y sobre qué zona se ha incubado cada una de ellas.

Zona	[CRP*] (ppm)
1	0,1
2	0,07
3	0,06
4	0,05
5	0,04
6	0,03

7	0,02
8	0,01

Tras la incubación, se procedió al lavado del disco con tampón de lavado (PBS-T), se secó con aire comprimido y se capturaron las imágenes de fluorescencia de las distintas zonas mediante el lector LFS. Una vez obtenidas las imágenes, se realizó el tratamiento de los datos mediante el uso del *software* GenePix®.

2.3. Protocolo para inmovilización de sondas (SYM44) y cálculo de la densidad de inmovilización de éstas.

En primer lugar, se preparó una dilución de MPC 1 M en agua. Ésta se utilizaría posteriormente para realizar las diferentes diluciones del oligonucleótido SYM44 a emplear en el ensayo (Figura 6).

Se imprimieron 6 zonas idénticas con una configuración 4x6 (4 puntos y 6 reactivos) con la ayuda del robot AD1500 de acuerdo al esquema de la figura 9.

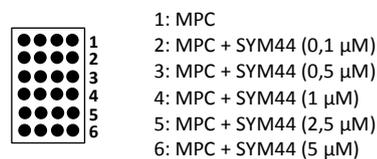


Figura 9. Diferentes concentraciones de SYM44 empleadas para la obtención de la densidad de inmovilización. Todas éstas se prepararon a partir de una disolución madre con una concentración igual a 100 μ M.

Tras dicha impresión, se irradió el BD con luz UV (254 nm) con el *UV-Ozone Cleaning System* durante 7 minutos y posteriormente se procedió a la captura de las imágenes de fluorescencia de los diferentes *microarrays* generados mediante el lector LFS. Estos datos se utilizaron para construir una curva de calibrado del oligonucleótido sonda.

A continuación, se lavó todo el disco con agua destilada y se secó con aire comprimido. Finalmente, se capturaron de nuevo las distintas zonas igual que se había hecho previamente y se procedió al tratamiento de todas las imágenes mediante el *software* GenePix® obteniendo un archivo excel con todos los valores de intensidad de fluorescencia de los diferentes *spots* del disco, con el objetivo de determinar los rendimientos de inmovilización.

2.4. Construcción de la recta de calibrado del oligonucleótido *target* SYM5.

En primer lugar se procedió a la preparación de las distintas disoluciones que se iban a imprimir. Por una parte, se preparó MPC 1 M en agua. Fue ésta la que se utilizó para realizar las diferentes diluciones (Figura 2) del oligonucleótido marcado con Cy5 (SYM5). A continuación, se diseñó un *array* de 4x7 (4 *spots*, 7 filas) según el esquema de la figura 10. Este *microarray* se imprimió por quintuplicado, ocupando 5 zonas del BD.

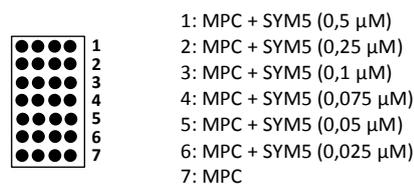


Figura 10. Diferentes concentraciones de SYM5 empleadas en el *array* para obtener la recta de calibrado. Las filas están numeradas del exterior del BD hacia el interior. La última fila es un control, donde sólo se imprime MPC.

Tras la impresión de las 5 zonas sobre el BD directamente se procedió a la lectura de la fluorescencia mediante el uso del lector LFS. Posteriormente se trataron los datos con el *software GenePix*® 4.0.

2.5. Protocolo para inmovilización de sondas y ensayo de hibridación con la cadena complementaria.

Al igual que en los protocolos anteriores, el primer paso fue la preparación de la disolución de MPC en agua a una concentración 1 M. A continuación, se prepararon dos concentraciones (5 y 1 μM) distintas de oligonucleótido sonda (SYM55) utilizando la disolución de MPC como disolvente. Una vez preparadas éstas, se imprimieron los diferentes *microarrays* de 4x8 (un total de 7 zonas) siguiendo la plantilla siguiente (Figura 11).

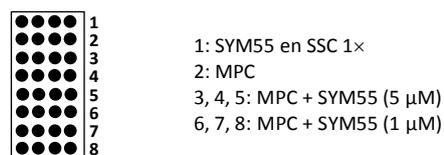


Figura 11. Esquema de la plantilla que se empleó para la impresión de los diferentes *microarrays* generados. En la leyenda de la derecha se indica qué se imprimió en cada línea.

A continuación, se irradió toda la superficie del BD durante 7 minutos a 254 nm y posteriormente se lavó con agua destilada y se secó. Seguidamente, se procedió a la preparación de las diferentes concentraciones de *target* (SYM5) a utilizar. En este caso, se utilizó tampón SSC 1x para obtener las diferentes diluciones a partir de la disolución madre (100 μM). Se depositaron 35 μL de estas diluciones sobre cada uno de los *microarrays* impresos según la tabla 7 y se incubaron durante dos horas a 37 °C en una estufa con humedad constante.

Tabla 7. Tabla que recoge las diferentes concentraciones del *target* SYM5 empleadas en el ensayo. La zona 7 se incubó sólo con el tampón empleado para realizar las diferentes diluciones (SSC 1x) como control negativo del experimento.

Zonas	[SYM5] (μM)
1	0,200
2	0,100
3	0,050
4	0,025
5	0,010
6	0,005
7	0,000

Transcurrido este tiempo, además de realizar el lavado de las diferentes zonas con el mismo tampón y un poco de agua destilada para eliminar las sales, se realizó un segundo lavado más exhaustivo con el mismo tampón pero en inmersión y agitación durante 5 minutos para eliminar las uniones inespecíficas. Finalmente, se procedió a la captura de las imágenes de fluorescencia de las diferentes zonas, cual el resto de ensayos, con el lector LFS, y el análisis de datos con el *software GenePix*®.

2.6. Protocolo de inmovilización y ensayo de polimorfismos de una sola base (SNP).

En primer lugar se prepararon disoluciones de diferentes sondas en MPC 1 M, previamente preparada en agua. En este experimento, los diferentes oligonucleótidos (SYM43, SYM46, SYM47, SYM48 y SYM17) se

prepararon a una concentración de 5 μM (añadiendo 5 μL de disolución madre (100 μM) a 95 μL de MPC 1 M) y se imprimieron según la figura 12 generando 8 *arrays* idénticos.

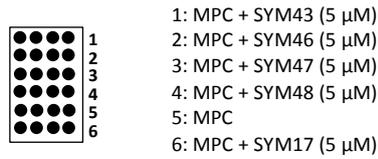


Figura 12. Orden de impresión de los distintos oligos empleados en el ensayo de SNPs.

En este experimento, se imprimieron 8 zonas iguales para poder realizar diferentes condiciones de ensayo. A continuación, se prepararon diferentes diluciones de *target* SYM5 a una concentración de 0,2 μM en SSC 1 \times con diferentes porcentajes de formamida (de 0 a 50%).

Tras imprimir, irradiar y lavar el BD se incubaron las distintas diluciones de *target* durante 2 horas, a 37 $^{\circ}\text{C}$, en una estufa con humedad constante. Cada condición de hibridación se ensayó por duplicado, según la tabla 8, depositando 35 μL de mezcla sobre cada uno de los *arrays* y extendiéndola con un cubreobjetos de 18x18 mm.

Tabla 8. Condiciones de hibridación empleadas para cada zona del BD en el experimento de discriminación de SNPs.

Zonas	Condiciones
1	SSC 1 \times / 0% formamida
2	
3	SSC 1 \times / 10% formamida
4	
5	SSC 1 \times / 25% formamida
6	
7	SSC 1 \times / 50% formamida
8	

Trascurridas las dos horas de incubación, se procedió a su lavado con SSC 1 \times mediante inmersión-agitación durante 5 minutos. Finalmente, se lavó con un poco de agua destilada para eliminar las sales retenidas, se secó con aire comprimido y se realizaron las capturas correspondientes de las diferentes zonas con el lector LFS. Para terminar, se trataron los datos con el programa GenePix[®], al igual que se ha realizado en todos los experimentos comentados con anterioridad.

Por otra parte, también se realizó el ensayo de discriminación de SNPs basándose en la fuerza iónica. Para ello, se imprimió otro BD idéntico al explicado en este apartado.

Se prepararon diferentes disoluciones de *target* SYM5 (0,2 μM) que, entre ellas, variaban en la cantidad de sales presentes (SSC 1 \times , SSC 3 \times , SSC 5 \times y SSC 10 \times) pero no en el porcentaje de formamida utilizado (0%). Una vez impreso y lavado el BD, se depositaron 35 μL de mezcla en cada uno de los *microarrays* y se siguió el protocolo de hibridación comentado previamente (Tabla 9).

Tabla 9. Condiciones empleadas para el ensayo de discriminación de SNPs. Se indica qué concentración del tampón es empleado en cada zona impresa con un porcentaje de formamida igual a 0% y una concentración de *target* SYM5 de 0,2 μM .

Zonas	Condiciones
1	SSC 1 \times
2	

3	
4	SSC 3×
5	SSC 5×
6	
7	SSC 10×
8	

2.7. Protocolo de inmovilización y ensayo con productos de PCR de *Salmonella*.

Dicho protocolo es muy similar al seguido en los ensayos anteriores, pero presenta algún paso adicional ya que los productos de PCR (amplicones) deben ‘abrirse’ para posibilitar la hibridación con las sondas utilizadas. Los productos de PCR empleados pertenecen a la especie *Salmonella*, concretamente a un gen común de dicha especie.

En primer lugar, se seleccionaron las sondas a utilizar (DAC1 como sonda específica de *Salmonella* y DAC4 como sonda no específica de *Salmonella*). A continuación, se prepararon diluciones de las distintas sondas a diferentes concentraciones (de 0,1 a 5 μM) en MPC 1 M y se imprimieron sobre la superficie del BD generando *arrays* de 4x6 (40 nL/spot) (Figura 13).

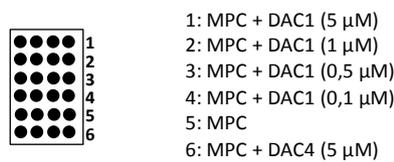


Figura 13. Diferentes concentraciones de sonda específica y no específica empleadas y orden en el que se imprimieron.

En segundo lugar, se procedió a la preparación de la dilución 1:10 de los amplicones los cuales estaban marcados con digoxigenina, aspecto importante para el revelado posterior. Dicha dilución se realizó con una disolución de SSC 1× con un 15% de formamida.

Una vez ésta está preparada, se prehibridaron las diferentes zonas con la mezcla empleada para realizar las diluciones (SSC 1× con 15% formamida) durante media hora a 37 °C en humedad en la estufa. Tras dicho paso de prehibridación, se lavó con SSC 0,1× y agua destilada y se incubaron durante 1 hora a 37 °C y en humedad los amplicones de *Salmonella* depositando 35 μL con ayuda de un cubreobjetos sobre cada *microarray* impreso. Previamente a dicha incubación de hibridación, los amplicones estuvieron 10 minutos a 95 °C con el objetivo de que la doble hebra de DNA se abriera, y así posibilitar la hibridación con las sondas escogidas. Tras los 10 minutos, se pusieron en hielo durante 2 minutos para estabilizar las hebras complementarias recién separadas.

Finalmente, y tras el paso de hibridación, se lavó con SSC 0,1×, agua, se secó con aire comprimido y se incubaron durante media hora a temperatura ambiente con los reactivos correspondientes en función del tipo de revelado (tabla 10).

Tabla 10. Diferentes tipos de revelados empleados con el objetivo de determinar el mejor para nuestras condiciones de trabajo. Además, se indica que anticuerpos (Ab) han sido empleados y en qué concentraciones. En el caso de los revelados A y C, ambos anticuerpos (primario y secundario) se pusieron en la misma disolución mientras que el revelado B requirió dos incubaciones consecutivas. Por otra parte, A y C debían incubarse con Ag y TMB como sustratos, respectivamente, ya que se tratan de métodos colorimétricos, mientras que B es fluorimétrico y es suficiente con realizar una captura en el lector LFS tras las incubaciones con los Ab. Una anotación es que todas las diluciones de Ab se realizaron en PBS-T.

Tipo de revelado	Reactivos empleados
A	Ab monoclonal anti-digoxigenina de conejo (1/10000) + Ab anti-conejo de cabra marcado con oro (1/100).
B	Ab monoclonal anti-digoxigenina de conejo (1/1000) / Ab anti-conejo de cabra marcado con Alexa647 (1/50).
C	Ab anti-digoxigenina de oveja (1/2500) + Ab anti-oveja de conejo marcado con HRP (1/100).

Tanto en la prehibridación como en la hibridación y en la incubación de los anticuerpos de revelado el volumen dispensado sobre cada uno de los *arrays* generados fue de 35 μ L usando un cubreobjetos para extender la disolución.

En los posteriores ensayos, el protocolo que se siguió fue básicamente el descrito aunque se variaron algunas de las condiciones ya que, por ejemplo, se aumentó el tiempo de hibridación a 2 horas y el tiempo de incubación con los Ab a 45 minutos. Además, se probaron diferentes diluciones de los amplicones (1:25, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500, 1:750 y 1:1000) en distintos experimentos y se puso una zona de control negativo, ya sea con amplicones de otra especie (*Campylobacter*) o con el control negativo de la misma especie de *Salmonella*. Asimismo, se imprimieron también diferentes concentraciones de sondas DAC1 (0,25, 0,1, 0,05, 0,025, 0,01 y 0,005 μ M) con la finalidad de abarcar más posibilidades (tabla 1 del apartado de Anexos).

Finalmente, también se realizaron ensayos con DAC3 y DAC6, sondas específicas de *Salmonella* y *Campylobacter* respectivamente. Dichas sondas son iguales a DAC1 y DAC4 pero presentan más grupos tiol (-SH) lo que aparentemente favorecerán el anclaje al hidrogel por formarse más enlaces covalentes.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Formación del hidrogel y marcaje y purificación de la proteína C reactiva (CRP).

Al inicio de este trabajo contábamos con la experiencia previa del grupo de investigación, que conocía la capacidad de la fosforilcolina (MPC) de entrecruzar bajo irradiación, anclándose, a la vez, a la superficie del Blu-ray (BD) sin necesidad de modificación alguna.

En la primera fase del proyecto se optimizó este proceso de anclaje, probando varias condiciones de irradiación (tabla 11). Finalmente se llegó a un protocolo optimizado que consistía en la impresión de una disolución acuosa de MPC a concentraciones superiores a 1 M e irradiación durante 7 minutos con una lámpara de radiación UV (254 nm) de 50 mW/cm².

Tabla 11. Condiciones de irradiación empleadas. Diferentes tiempos utilizados y distintas lámparas UV usadas. La longitud de onda a la que emitían todas las lámparas utilizadas era 254 nm.

Tiempo de irradiación	Lámpara empleada (potencia)
1 h	Vilber (6 mW/cm ²)
2 h	Jelight (6 mW/cm ²)
1 h 30 min	Jelight (6 mW/cm ²)
50 min	Vilber (6 mW/cm ²)
1 min	UV-Ozone (50 mW/cm ²)
5 min	UV-Ozone (50 mW/cm ²)
7 min	UV-Ozone (50 mW/cm ²)

Los *arrays* obtenidos eran altamente reproducibles y presentaban un aspecto homogéneo de alta calidad (Figura 14).

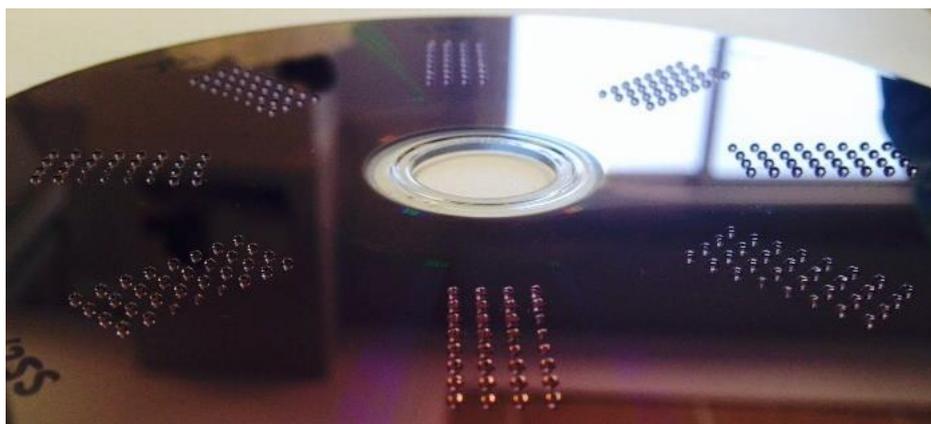


Figura 14. Foto de la superficie de un BD sobre el cual se imprimieron *arrays* con una configuración 4x8 (4 spots / 8 filas).

Puesto que la MPC es un receptor de la proteína C reactiva (CRP), en primer lugar se probó su capacidad de reconocimiento de dicha proteína.

Para ello, se procedió a marcar la CRP con un marcador fluorescente, Alexa647, siguiéndose las indicaciones del fabricante, obteniéndose 200 µL a una concentración de 166 ppm.

Cabría esperar una concentración ligeramente menor a 500 ppm (concentración de partida) debido a que los protocolos están muy estandarizados y los rendimientos son bastante elevados. En nuestro caso se emplearon dos tipos de filtros. Con los primeros, los *ependorfs Pierce® Contractor* de 1,5 mL con filtro 30K, parte del marcador que no se había unido a la proteína quedaba retenido, por lo que la purificación no era efectiva. Con el segundo tipo de filtros, los tubos de centrifuga *Macrosep® Advance Centrifugal Device*, la separación entre marcador y proteína marcada fue más efectiva, sin embargo presentaban problemas de recuperación tras el centrifugado. Por estos motivos, probablemente, la cantidad de proteína marcada obtenida fue inferior a lo que se esperaba inicialmente.

Finalmente, se calculó la relación de marcaje obteniéndose un valor de 1,13 mol Alexa647/mol proteína. Dicho valor también es ligeramente inferior a los que se obtienen normalmente con estos protocolos, seguramente por los problemas ya comentados.

2. Ensayos de reconocimiento de la proteína C reactiva marcada mediante *microarrays* de hidrogel.

Con la proteína marcada se procedió a realizar ensayos de reconocimiento, con el objetivo de determinar las capacidades del sistema.

Para ello, se imprimieron 8 zonas iguales empleando dos concentraciones de MPC (1,3 y 1,5 M) generando así *arrays* con una configuración 4x4 (2 *arrays* por zona). Tras el lavado con agua y el secado con aire comprimido, se incubaron las diferentes zonas con distintas diluciones de CRP marcada (CRP*) (desde 0,1 a 0,01 ppm) durante media hora a temperatura ambiente. Tras dicha incubación, se lavó el BD con PBS-T, se secó con aire comprimido y se procedió a la capturas de las distintas zonas mediante el lector de fluorescencia de superficies (LFS).

A continuación se trataron las imágenes de fluorescencia y se obtuvo un archivo Excel con los valores de intensidad de los diferentes *spots* impresos de los distintos *arrays* generados. Seguidamente, se procedió al cálculo de los valores promedio y desviaciones estándar para las distintas concentraciones de MPC utilizadas y para cada una de las concentraciones de CRP*. Así, se representaron éstas frente a las concentraciones comentadas (Figura 15).

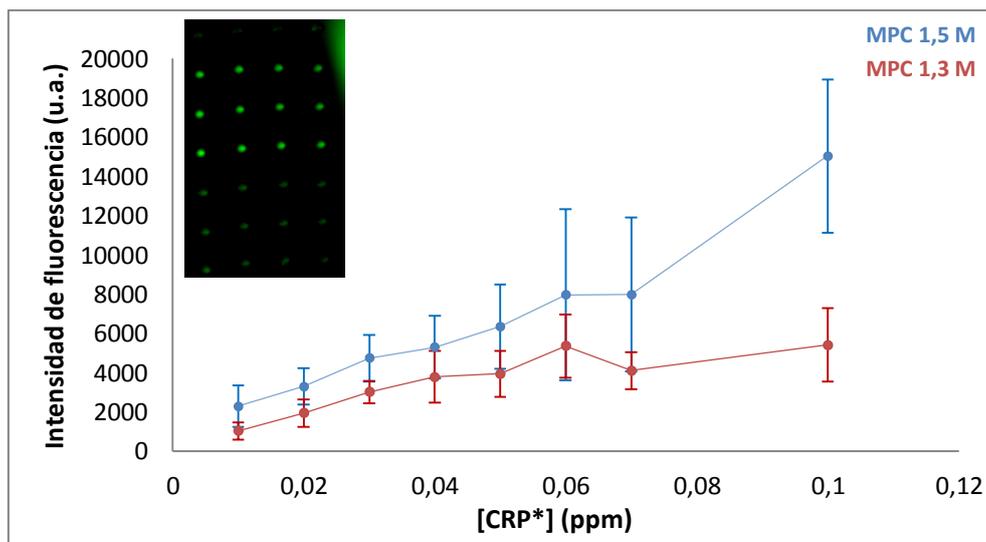


Figura 15. Valores de intensidad de los distintos *spots* de los diferentes *arrays* generados frente a las concentraciones de CRP marcada empleadas (ppm). En rojo, se representa la tendencia correspondiente a una concentración de MPC igual a 1,3 M. En azul, 1,5 M es la concentración empleada para la generación de los *microarrays*. En la parte superior izquierda una imagen de fluorescencia de una zona generada.

Como se puede observar en la figura superior, a mayor concentración de MPC mayor es la intensidad de fluorescencia de los *spots*. Se podría pensar que a mayor concentración, la intensidad fuera menor debido a que el grado de entrecruzamiento del hidrogel aumenta, impidiendo la entrada de la proteína a su interior. Esto podría ser cierto, pero también se debe ver desde otra perspectiva, a mayor concentración mayor es la superficie de contacto debido a que el tamaño de la gota aumenta y también es mayor el número de receptores. Es por ello, que los valores aumentan conforme aumenta la concentración de hidrogel.

Otro aspecto importante y, a la vez interesante, es que los valores de fondo o *background* de la superficie son muy bajos especialmente si se comparan con otros soportes empleados en *microarray*. Esto quiere decir que hay muy poca adsorción inespecífica y se atribuye a la naturaleza del soporte (BD) que es altamente hidrofóbica y muy inerte, generalmente.

Además, se observa un incremento de la intensidad bastante lineal tanto a concentraciones bajas como a elevadas de la MPC (Figura 1 del apartado de Anexos). Ambas rectas se utilizaron para conocer la cantidad de CRP* presente en los diferentes ensayos realizados *a posteriori*.

Según la bibliografía consultada, los valores normales de concentración de CRP en un organismo varían de 1 a 3 ppm. Esta concentración aumenta con procesos inflamatorios y llega a alcanzar niveles estratosféricos en enfermedades cardiovasculares. Es por ello que se utiliza como biomarcador de estas últimas. En nuestro *arrays* de hidrogel, la cantidad mínima detectable de CRP* fue de 10 ppb (0,01 ppm). Esto quiere decir que la cantidad de muestra necesaria para un análisis real sería muy pequeña, ya que con este sistema se deberían realizar diluciones de muestra 1:100, con las ventajas que esto supone.

Con el objetivo de aplicar el sistema a muestras reales de suero, se propuso un ensayo directo competitivo de la CRP usando CRP y CRP*. El esquema de este tipo de ensayos se representa en la figura 16.

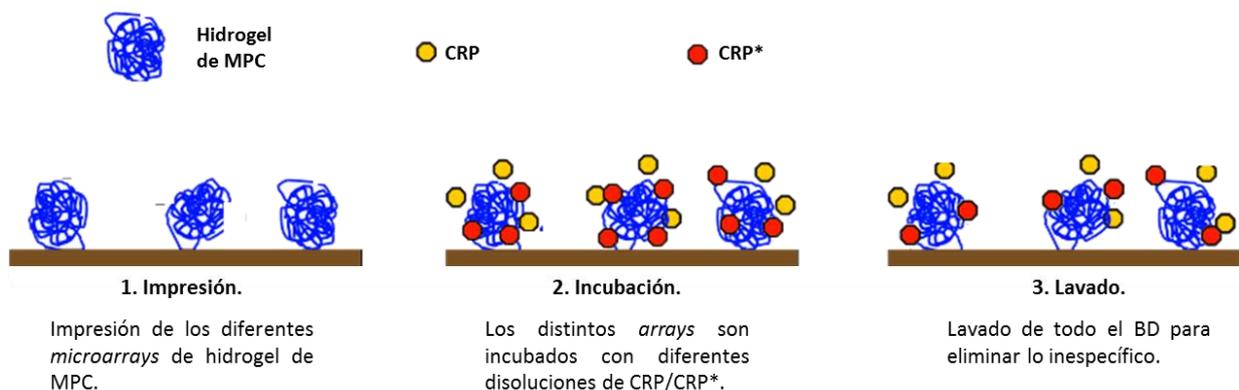


Figura 16. Esquema explicativo del ensayo directo competitivo propuesto.

En dicho ensayo directo competitivo es de esperar que a mayor concentración de CRP empleada, menor serán los valores de intensidad de fluorescencia ya que ésta desplazaría a la CRP* y viceversa.

Sin embargo, aunque se invirtió gran esfuerzo en esto y se probaron distintas condiciones, no se llegó a observar la competición buscada. Los diferentes ensayos realizados se recogen en la tabla 1 del apartado de Anexos. Esto puede ser debido a una confluencia de dos factores: por una parte la tendencia a la agregación de la CRP, que dificulta su manejo, y por otra la accesibilidad del hidrogel. En lo referente al primer factor, comentar que la CRP en condiciones naturales se encuentra en forma de pentámero y en este trabajo se trabajó con el monómero, aunque probablemente éste se agregó de manera natural.

3. Inmovilización de sondas de AN en el *microarray* de hidrogel.

Con el objetivo de dotar de mayor versatilidad al *microarray* de hidrogel propuesto, se abordaron estudios que evaluaban la capacidad del mismo para inmovilizar sondas de ANs,

En este trabajo se planteó la posibilidad de utilizar el mismo proceso de irradiación, necesario en la formación del hidrogel, para incluir de manera simultánea sondas de AN. Las sondas empleadas eran sondas tioladas, de manera que, al mismo tiempo que el polímero entrecruzaba, mediante la reacción de acoplamiento tiol-eno (TEC), las secuencias de AN se quedaban unidas de manera covalente a algunos de los enlaces dobles del hidrogel y, por tanto, atrapadas en el interior de éste.

De este modo, en un período de tiempo muy corto, 7 minutos, obtendríamos una densidad de sonda muy superior a la obtenida en los *microarrays* 2D, con las ventajas que esto supone.

Para los ensayos de inmovilización se empleó la sonda tiolada marcada fluorescentemente (SYM44) diluida en la disolución acuosa 1 M de MPC, obteniendo así distintas concentraciones de dicha sonda (5, 2,5, 1, 0,5 y 0,1 μM).

Se generaron 6 *arrays* idénticos de 4x6 (4 *spots*/6 reactivos) que se irradiaron con el *UV-Ozone Cleaning System*, se lavaron y se secaron con aire comprimido. Tras la captura y el tratamiento de los datos, se obtuvieron los diferentes valores de intensidad de fluorescencia para los distintos *spots* impresos de cada uno de los *arrays* generados. Así, se calcularon los valores promedio y las desviaciones estándar en cada una de las réplicas y se procedió a representar dichos valores frente a las distintas concentraciones de oligo SYM44 empleadas, obteniéndose el gráfico de la figura 17.

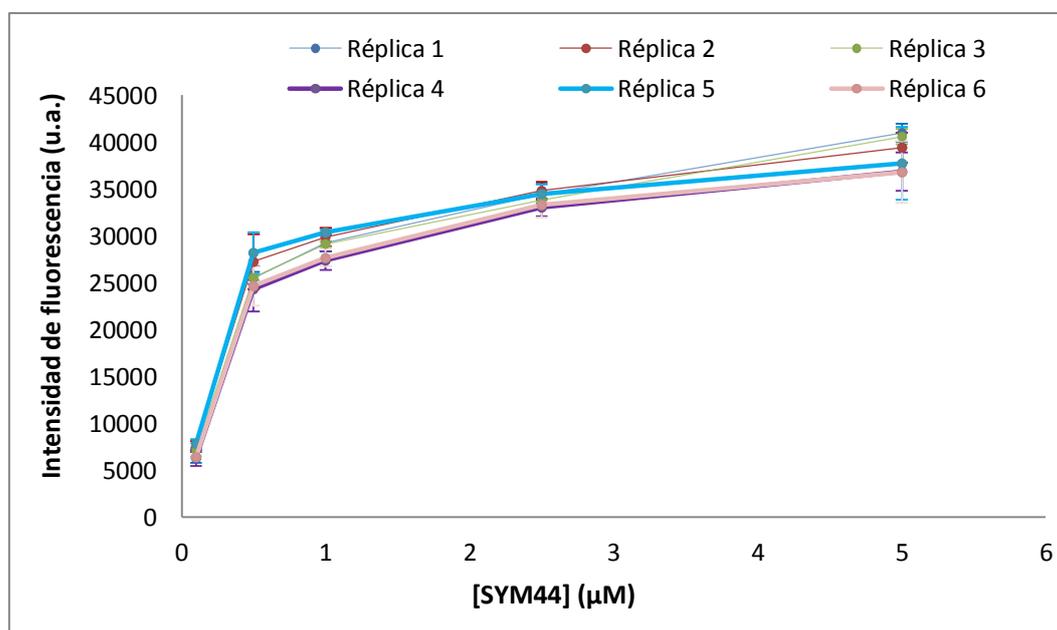


Figura 17. Representación de las distintas réplicas realizadas de los valores promedio de intensidad de fluorescencia frente a las concentraciones de SYM44 empleadas.

Como se puede observar, la reproducibilidad del ensayo fue bastante buena ya que no hay desviaciones demasiado significativas entre las réplicas realizadas.

A continuación, se calculó el promedio y las desviaciones estándar de las diferentes réplicas y se representó el tramo lineal con el objetivo de obtener una recta de calibrado del oligonucleótido empleado SYM44 (figura 2 del apartado de Anexos).

Tras el lavado del BD con agua destilada se volvió a leer la fluorescencia de los *arrays* y se trataron los datos con la finalidad de calcular la cantidad de sonda que se queda atrapada en el hidrogel. Así, mediante los promedios y la ecuación del ajuste lineal se obtuvieron las concentraciones de sonda inmovilizadas recogidas en la tabla 12.

Tabla 12. Valores de intensidad y concentración de los *spots* correspondientes a las concentraciones de oligonucleótido SYM44 de 1, 2,5 y 5 μM antes del lavado y tras el lavado. En la última columna, porcentaje de retención de sonda.

Antes de lavado		Tras lavado		
[SYM44] (μM)	Intensidad de fluorescencia (u.a.)	[SYM44] (μM)	Intensidad de fluorescencia (u.a.)	Porcentaje de retención (%)
5	38727,17	3,88	36354,96	93,87
2,5	33998,83	2,01	31242,67	91,89
1	28945,83	0,14	26138,21	90,30

Como es de esperar, la cantidad de sonda atrapada disminuye con el lavado que se realiza tras la irradiación del BD. Además, dicha disminución es más notable a concentraciones bajas de oligo SYM44. Este dato será de interés para todos los ensayos posteriores. En cualquier caso, los porcentajes de retención oscilan entre el 90 y el 94% (figura 18) y son significativamente superiores a los rendimientos de inmovilización obtenidos normalmente en los *microarrays* tradicionales 2D (33% aproximadamente).

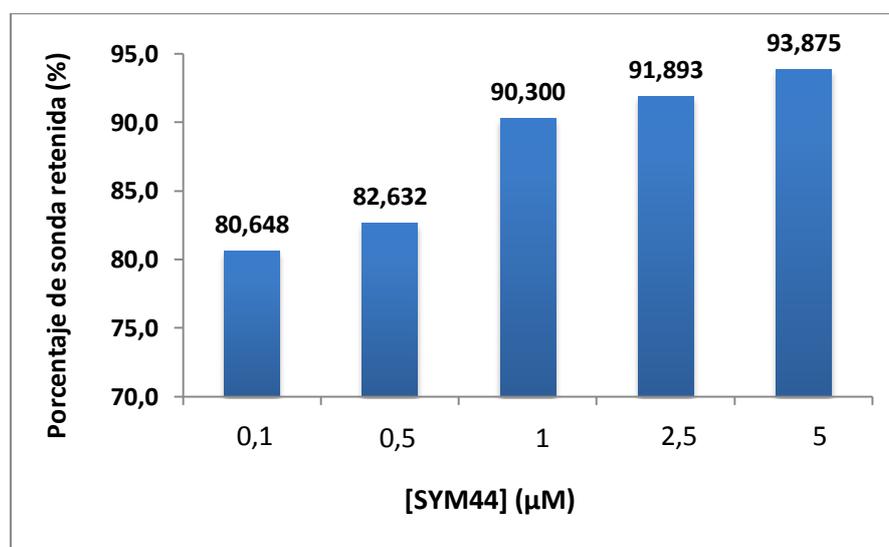


Figura 18. Distintos porcentajes de retención obtenidos para las diferentes concentraciones de oligonucleótido sonda empleadas.

En conclusión, este método de inmovilización de sondas por atrapamiento en el hidrogel es muy efectivo y reproducible, por lo que presenta gran potencial para llevar a cabo ensayos de hibridación.

Cabe comentar que también se realizaron diferentes controles de atrapamiento de sondas empleando secuencias biotiniladas y aminadas en lugar de tioladas pero, aunque se demostró la capacidad de atrapamiento también en estos casos, ésta se ve mucho más favorecida al combinar con el enlace covalente del propio hidrogel.

4. Determinación del límite de detección para los ensayos de hibridación en el *microarray* de hidrogel.

Una vez demostrada la capacidad de los *microarrays* generados de retener gran cantidad de sonda, el siguiente paso fue comprobar si, efectivamente, dicha sonda estaba accesible y disponible, dentro del hidrogel, para dar lugar al proceso de hibridación con la cadena complementaria de una manera efectiva y específica.

Las evidencias experimentales apuntaban a una gran capacidad, por lo que en primer lugar se determinó el límite de detección (LOD), a modo de estimación de lo que seríamos capaces de detectar teniendo en cuenta las características del sistema de detección (marcaje de *target*, sensibilidad del LFS, etc.).

El LOD se define como la cantidad o concentración mínima de una sustancia (en nuestro caso oligo SYM5) que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado. En términos estadísticos, el LOD corresponde al valor de la concentración que es 3,3 veces la desviación estándar de la medida del blanco.

Para ello, se imprimieron diferentes *microarrays* (un total de 5) iguales con concentraciones decrecientes de dicho oligonucleótido, SYM5, desde 0,5 μM hasta 0 μM en MPC 1 M.

A continuación, se realizaron las capturas de las distintas zonas empleadas y se procedió al tratamiento de los datos. Así, se calcularon los valores promedio y las desviaciones estándar de cada una de las réplicas impresas. La intensidad obtenida en cada uno de los *spots* es directamente proporcional a la concentración de oligonucleótido SYM5 utilizada.

Posteriormente, como se había impreso una fila control, la cual era sólo MPC, se procedió al cálculo de la diferencia de los valores obtenidos y los valores basales de fluorescencia pertenecientes al propio hidrogel. Finalmente, se representaron los últimos valores obtenidos frente a las distintas concentraciones de oligonucleótido SYM5 empleadas (Figura 19).

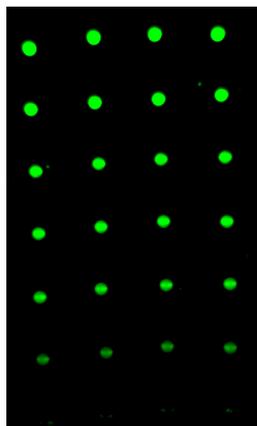


Figura 19. Imagen de fluorescencia de una de las réplicas realizadas mediante el Lector de Fluorescencia de Superficies (LFS). Las diferentes concentraciones de oligonucleótido SYM5 fueron impresas en sentido decreciente, del exterior del BD hacia el interior del mismo, es decir, de la parte superior de la imagen hacia la parte inferior.

Como se observa en la Figura 20, cuanto mayor es la concentración de oligo SYM5 impreso y atrapado en el hidrogel mayor es la intensidad obtenida hasta llegar al valor de saturación de la cámara CCD que corresponde con 65500 unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a.) brutas.

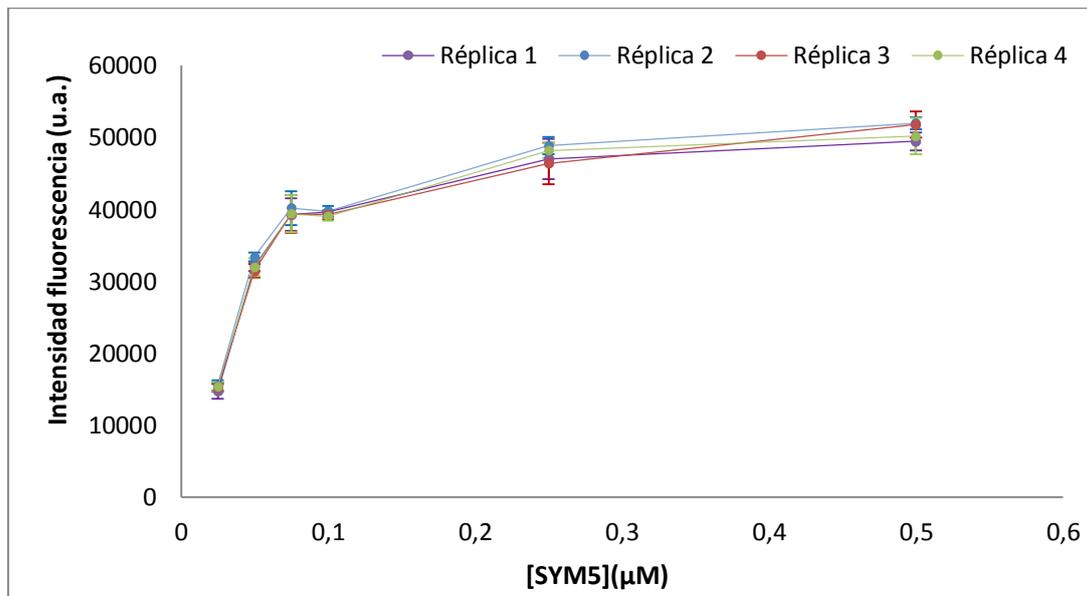


Figura 20. Representación de los valores promedio de la fluorescencia obtenida de cada *spot* frente a las distintas concentraciones de SYM5 utilizadas.

A partir de este gráfico, se determinó el intervalo lineal, es decir, las concentraciones para las cuales existe una relación directa entre la intensidad de fluorescencia y la concentración y se realizó el ajuste correspondiente con el objetivo de obtener la recta de calibrado (Anexo de estadística en el apartado de Anexos).

Se tomaron los valores de fluorescencia de las filas que contenían sólo MPC como blanco, se calculó el valor promedio y la desviación estándar y, a partir de ésta y siguiendo la fórmula analítica, se determinó un LOD de 6 nM (tabla 13).

Tabla 13. Valores del promedio y de la desviación estándar del blanco (MPC) y de la intensidad de fluorescencia y concentración del LOD. La intensidad de fluorescencia se obtuvo mediante la aplicación de la fórmula analítica ($3,3 \cdot \sigma$) y el valor de la concentración mediante el ajuste lineal realizado.

Blanco		LOD	
Promedio	Desviación estándar (σ)	Intensidad de fluorescencia	[SYM5](μM)
38,29	432,67	1427,80	0,0066

Esto significa que las limitaciones del sistema hacen que, como máximo, podemos llegar a aspirar a detectar alrededor de 6 nM. El que se alcancen unos valores tan bajos en la hibridación dependerá de las prestaciones del *microarray* que se genere.

5. Ensayos de hibridación sobre el *microarray* de hidrogel con ANs.

Para los estudios de hibridación del *microarray* de sonda atrapada en hidrogel con SYM5, se crearon *arrays* sobre el BD siguiendo el protocolo optimizado con anterioridad. En este caso, la sonda tiolada no llevaba etiqueta fluorescente (SYM55).

Estos ensayos tienen como objetivo la demostración de que se puede llevar a cabo la hibridación de dos moléculas monocatenarias totalmente complementarias, incluso con la utilización de concentraciones de

oligo *target* mucho inferiores a las de la molécula sonda. Asimismo, se verificará el valor de concentración mínima que se detecta y se comparará con el valor de LOD estimado (Tabla 13).

Para ello, se generaron 7 *arrays* idénticos empleando dos concentraciones diferentes de oligonucleótido sonda (1 y 5 μM) en la disolución acuosa 1 M de MPC. Éstos se irradiaron durante 7 minutos, se lavaron y se secaron. Seguidamente, se incubaron con distintas concentraciones de oligonucleótido *target* (desde 0,2 μM a 0 μM) durante 2 horas a 37 °C con humedad constante.

Tras dicha incubación, se lavó el BD y se realizaron las capturas correspondientes. A continuación, se procedió al tratamiento de los datos y se calcularon los valores promedio y desviaciones estándar de cada condición, cabe recordar que por cada condición hay 12 *spots* (Figura 21), menos los controles que presentan 4 *spots*. Además, se restaron los valores de fluorescencia basales que corresponden a los *spots* sólo de MPC.

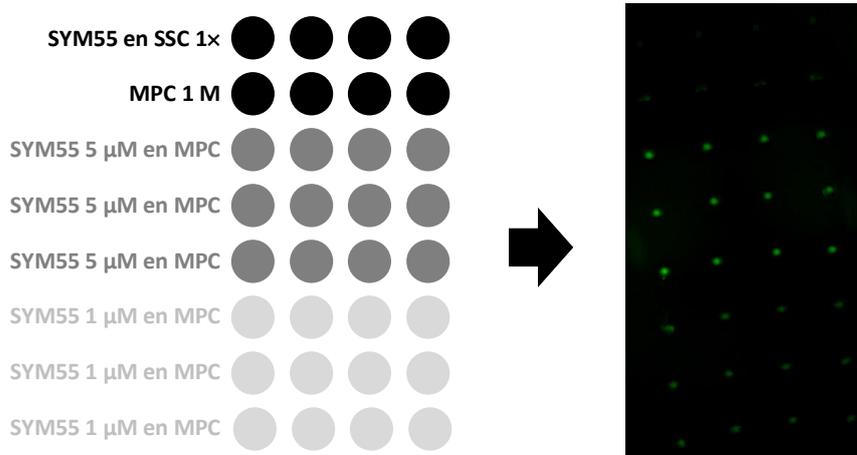


Figura 21. A la izquierda de la imagen se representa un esquema de los *microarrays* generados. En negro se representan los dos controles realizados, tanto con 0 μM de oligo sonda como la fila de oligo sonda sin el hidrogel. En gris oscuro se representan los 12 *spots* que presentan una concentración de SYM55 igual a 5 μM y en gris claro los 12 *spots* restantes con una concentración de oligo sonda de 1 μM . Así, los *microarrays* generados son de 4x8 (4 *spots* y 8 filas). A la derecha se muestra la imagen de fluorescencia correspondiente al *microarray* que fue incubado con una concentración de SYM5 de 0,05 μM .

A continuación, se representaron dichos valores frente a las concentraciones de oligo *target* empleadas como se muestra en la Figura 22.

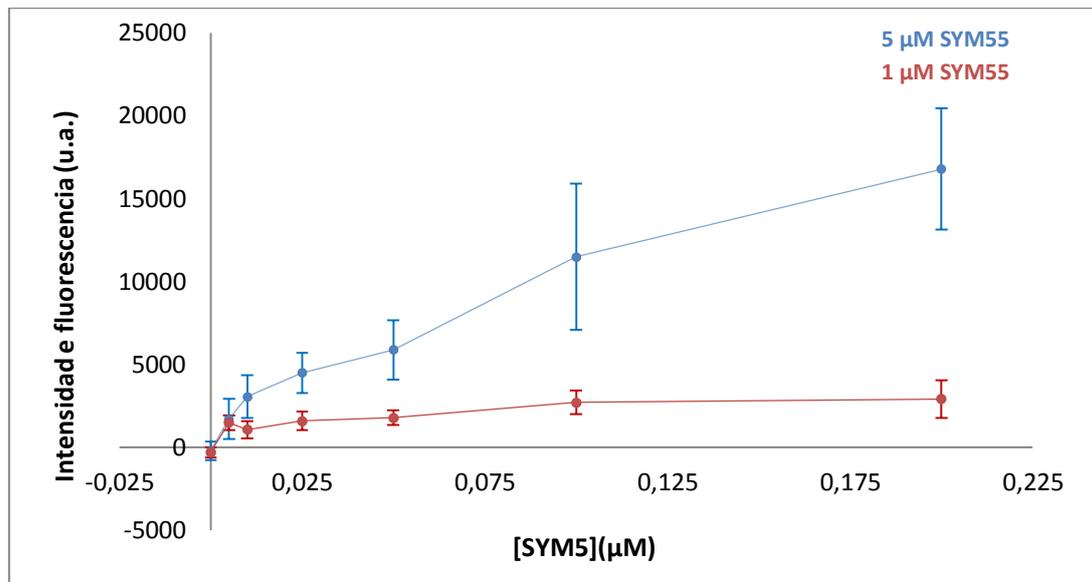


Figura 22. Representaciones de los diferentes valores promedio obtenidos frente a las diferentes concentraciones de oligo SYM5 utilizadas para la hibridación. En azul, los valores correspondientes a los *spots* con una concentración de oligonucleótido sonda de 5 μM . En rojo, los promedios de los *spots* correspondientes a una concentración de SYM5 igual a 1 μM .

Se puede observar cómo las intensidades obtenidas cuando la concentración de oligo sonda es de 5 μM son superiores a las intensidades correspondientes a los *spots* donde la concentración de SYM5 es de 1 μM . Es decir, la cantidad de sonda está directamente relacionada con los valores de fluorescencia recogidos.

Cabe comentar que, en la curva que corresponde con la menor concentración de oligo sonda utilizada (1 μM), los valores de intensidad a partir de una concentración de 0,05 μM de SYM5, aproximadamente, se mantienen bastante constantes. Esto puede deberse a que la cantidad de sonda es insuficiente para tales cantidades de *target*, por estar todas las moléculas de SYM5 accesibles ocupadas, por lo que un aumento de concentración de oligos *target* no supondría mayor número de eventos de hibridación y, por consiguiente, un aumento de intensidad. En otras palabras, se habría llegado a la saturación en la hibridación.

En cambio, para una concentración de SYM5 igual a 5 μM se observa dicha relación directa comentada previamente, aunque ésta tampoco se ajusta perfectamente a la linealidad. Esto se explica ya que con el uso de este hidrogel, y en general con la utilización de hidrogeles, existen otros fenómenos, como la difusión, que son externos a los procesos de hibridación en sí, y por ello no se obtienen resultados tan lineales como se cabría esperar en ensayos por adsorción.

También cabe comentar que la zona que se incubó sólo con tampón de hibridación (SSC1 \times) no dio valores de fluorescencia superiores a los basales tras el lavado en inmersión, es decir, a los correspondientes al hidrogel de MPC sin sonda. De esta manera se comprueba que la hibridación ha tenido lugar y de manera específica.

Asimismo, la fila impresa con el oligo sin atrapar en el hidrogel no presentó intensidad de fluorescencia. Esto es debido a que 7 minutos son insuficientes para que los oligos se anclen por adsorción. En cambio, sí que son suficientes para que el hidrogel polimerice y se adhiera a la superficie del BD a la vez que inmoviliza la sonda, lo que conlleva a un ahorro en el tiempo empleado para la fabricación del *microarray*.

Por otro lado, se puede afirmar que la menor cantidad detectable de SYM5 es de 6 nM aproximadamente ya que se observa que, aun con una concentración de 0,005 μ M (5 nM), los valores de intensidad son distinguibles del 0.

Un aspecto importante en los protocolos descritos son los lavados que se deben realizar tras el proceso de hibridación con el objetivo de eliminar lo inespecífico.

En un primer lugar, se realizaron lavados rápidos con SSC 1 \times pero se observaba que los valores de intensidad de las filas control de MPC disminuían poco por lo que no se eliminaba 100% lo inespecífico, ya que parte quedaba retenido. Por ello, se pensó en realizar lavados más exhaustivos con el mismo tampón y durante más tiempo. Se ensayaron diferentes tiempos (1, 2, 4, 5 minuto(s)) y finalmente se llegó a un protocolo efectivo que consistía en un lavado en inmersión y agitación durante 5 minutos en SSC 1 \times (Figura 23).

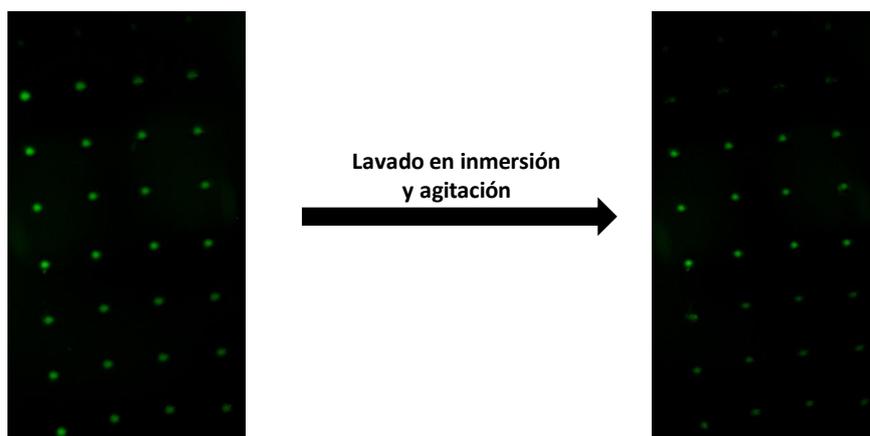


Figura 23. Capturas correspondientes al *microarray* (según el esquema de la figura 21) que se hibridó con una concentración de SYM5 igual a 50 nM. A la izquierda, la imagen tras un lavado cuidadoso con SSC 1 \times y agua destilada. A la derecha, la misma imagen tras un lavado adicional en inmersión y agitación con SSC 1 \times durante 5 minutos.

6. Ensayos de polimorfismos de una sola base (SNP).

Los polimorfismos de una sola base (SNP) constituyen la mutación genética más comúnmente encontrada en el genoma humano. Se trata de un cambio de una sola base. Sin embargo, dicha variación debe estar representada en, al menos, el 1% de la población. Presenta una amplia variabilidad y pueden encontrarse en cualquier parte de la estructura del genoma. Asimismo, su herencia es bastante estable por lo que posibilita su evolución en estudios de poblaciones.

Actualmente se han descrito algo más de 10 millones a pesar de haberse estimado unos 20 millones. Todos los descritos se encuentran recogidos en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) y son considerados una de las principales causas de muchas enfermedades como la fibrosis quística o la β -talasemia entre otras, de ahí su importancia en la actualidad.

Dadas las buenas prestaciones obtenidas en la hibridación con la cadena complementaria, se pensó en su aplicación a la detección de SNPs, debido a su alto interés, como se menciona arriba.

Para realizar la discriminación es necesario emplear un medio que debilite la formación de puentes de hidrógeno, responsables del reconocimiento entre bases complementarias. De esta manera se favorece que únicamente la cadena totalmente complementaria (la que forma el mayor número de puentes de hidrógeno y más fuertes) sea reconocida por la sonda inmovilizada.

En primer lugar, se propuso la formamida como fuerza impulsora de la discriminación ya que dicha molécula establece interacciones por puentes de hidrógeno, dificultando el reconocimiento entre pares de bases y mejorando, por tanto, el poder de discriminación.

Para ello, se imprimieron 8 *arrays* idénticos con una configuración de 4x6 empleando diferentes oligonucleótidos como sonda (SYM43, SYM46, SYM47, SYM48, SYM17) a una concentración 5 μ M (en disolución acuosa 1 M de MPC). Estas secuencias correspondían a la sonda totalmente complementaria al *target*, a las sondas conteniendo uno, dos y tres polimorfismos, respectivamente, y a una sonda totalmente no complementaria.

Tras la impresión, se irradiaron los *microarrays* generados, se lavaron con agua destilada y se secaron con aire comprimido. A continuación, cada réplica se incubó durante dos horas a 37 °C en humedad constante con una disolución de oligonucleótido *target* (SYM5) de concentración 0,2 μ M en SSC 1 \times y con cuatro porcentajes de formamida: 0, 10, 25 y 50% (cada condición se ensayó por duplicado).

Seguidamente, se lavaron los *arrays* con SSC 1 \times siguiendo el protocolo de 5 minutos en inmersión y agitación. A continuación, se realizaron las capturas mediante el LFS de las diferentes zonas y se trataron los datos. Así, se obtuvo un archivo Excel con todos los valores de intensidad de los diferentes *spots* de los distintos *microarrays* generados. A continuación, se procedió al cálculo de los valores promedio y desviaciones estándar al igual que en el resto de experimentos. Finalmente, se generaron diferentes gráficos de barras (Figura 24) para evaluar la capacidad de discriminación.

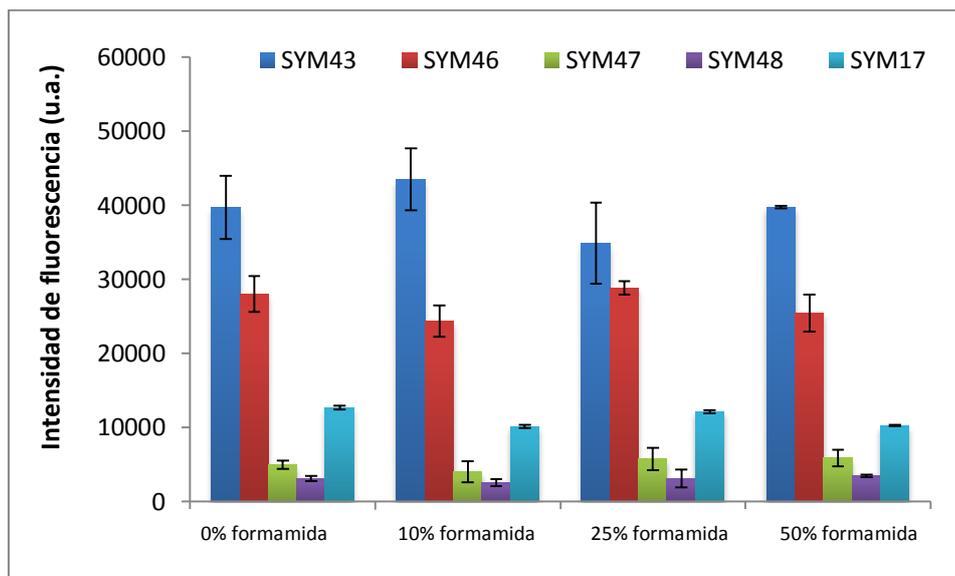


Figura 24. Valores promedio de intensidad de fluorescencia obtenidos frente a las diferentes concentraciones de formamida empleadas. SYM43 es totalmente complementario, SYM46 presenta un desapareamiento o *missmatch*, SYM47 presenta dos SNPs, SYM48 tiene tres polimorfismos de una sola base y SYM17 no es complementario.

Por una parte, se observa cómo a medida que va disminuyendo la complementariedad los valores de fluorescencia también lo hacen, es decir, hay una buena discriminación incluso con un SNP. Aunque dicha diferencia se agrava cuando los SNPs presentes son dos o más.

Por otra parte, se observan pequeñas e insignificantes diferencias entre los distintos porcentajes de formamida empleados ya que el propio hidrogel, por sí mismo, ya realiza una buena discriminación.

Además se puede observar cómo los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos para los *spots* que contenían SYM47 y SYM48 están en el orden de las intensidades de fluorescencia obtenidas con una sonda totalmente no complementaria (SYM17), lo cual quiere decir que la discriminación es total.

A continuación también se estudió el efecto de aumentar la concentración de sales en la mezcla de hibridación para analizar si tenía relación con la capacidad de discriminación de *microarray*.

Se imprimió un BD idéntico al del ensayo anterior, es decir, con los mismos oligonucleótidos sonda a una concentración 5 μM , en la disolución acuosa 1 M de MPC. Tras dicha impresión, se lavaron los diferentes *arrays*, se secaron con aire comprimido y se incubaron durante dos horas a 37 °C con humedad constante, usando cuatro disoluciones diferentes las cuales variaban en la concentración de sales (SSC 1 \times , SSC 3 \times , SSC 5 \times y SSC 10 \times), todas ellas con una concentración de *target* de 0,2 μM y un 0% de formamida.

Al igual que en la primera parte del ensayo, se procedió a la lectura y tratamiento de los resultados obteniéndose valores promedio y desviaciones estándar de las diferentes condiciones empleadas. Los datos se representan en un gráfico de barras para comparar el poder de discriminación (Figura 25).

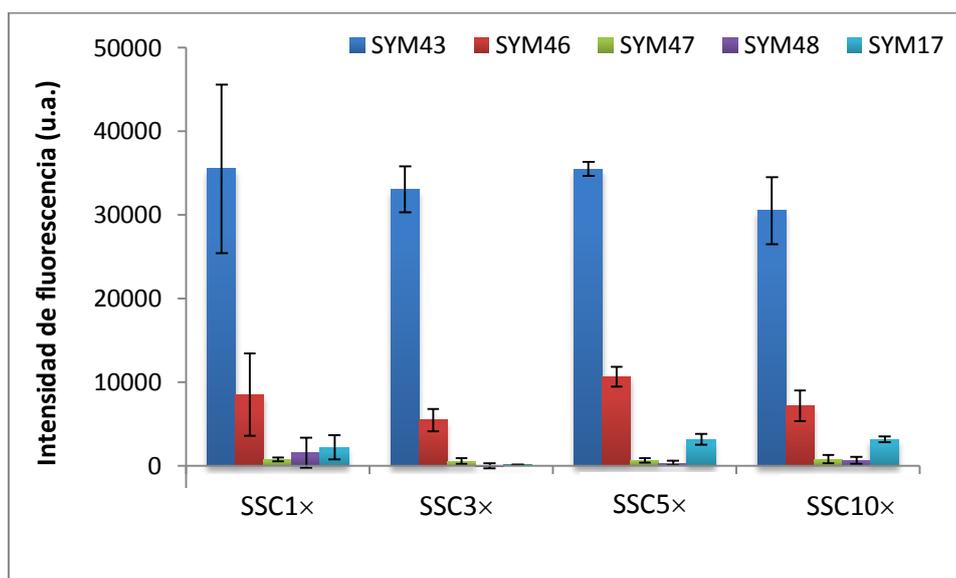


Figura 25. Valores promedio de intensidad de fluorescencia obtenidos frente a las diferentes concentraciones de tampón SSC utilizadas. SYM43 es totalmente complementario, SYM46 presenta un desapareamiento o *missmatch*, SYM47 presenta dos SNPs, SYM48 tiene tres polimorfismos de una sola base y SYM17 no es complementario.

En definitiva, con estos experimentos se pudo comprobar que el propio *microarray* de hidrogel tenía una capacidad de discriminación en sí mismo superior a la de los *arrays* en 2D, incluso sin necesidad de modificar las condiciones de hibridación (formamida, fuerza iónica,...) para hacer más específico el reconocimiento.

Este tipo de *arrays* serían, pues, interesantes en su aplicación tanto en el diagnóstico de enfermedades como en la determinación de un perfil de riesgo.

7. Ensayos de hibridación sobre el *microarray* de hidrogel con productos de PCR.

En los últimos años, el diagnóstico molecular, tanto para la detección de enfermedades como para la identificación de microorganismos en los individuos de estudio, basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha adquirido elevada importancia debido a su rapidez, estabilidad de los productos de ésta y fiabilidad de la técnica.

En numerosas ocasiones, dicho diagnóstico es realizado con los productos de PCR mediante la tecnología *microarray*, aprovechando la característica de multiplexado de ésta.

Puesto que los *arrays* de hidrogel habían demostrado en los ensayos anteriores muy buena capacidad de inmovilización de sonda, y que además se encontraba disponible para hibridar específicamente con su cadena complementaria, en el siguiente estadio de la investigación se planteó explorar la capacidad de los *microarrays* desarrollados para hibridar con productos de PCR. Éstos son mucho mayores, en cuanto a tamaño, que los oligonucleótidos empleados en estudios anteriores, por lo que podríamos encontrarnos con problemas de accesibilidad.

Para estos ensayos, se trabajó en *arrays* con una configuración de 4x6 que presentaban diferentes concentraciones de oligonucleótido sonda (5, 1, 0,5 y 0,1 μM) en la disolución acuosa 1 M de MPC. Además, también presentaban una fila control con una sonda no específica de la especie de *Salmonella* a una concentración igual a 5 μM .

Los *arrays* generados se irradiaron durante 7 minutos con el *UV-Ozone Cleaning System*, se lavaron con agua y se secaron con aire comprimido. A continuación, se incubaron con las diferentes diluciones de productos de PCR preparadas para el ensayo y seguidamente se revelaron con una mezcla de dos anticuerpos, uno primario y uno secundario. El primario reconocería la digoxigenina de los amplicones mientras que el secundario se uniría al primario.

Se realizaron diferentes ensayos con condiciones diferentes y variando distintos parámetros, como se indica en la tabla 2 del Anexo, con la finalidad de optimizar dicho ensayo según los protocolos descritos. Además, se realizaron también diferentes controles para los distintos procesos que tenían lugar como es la inmovilización de la sonda, la hibridación así como el revelado.

Por un lado, para verificar y comprobar que la sonda quedaba retenida, se desarrollaron *arrays* que tenían una fila de MPC 1 M con SYM44 (sonda tolada marcada con un fluoróforo). Tras los lavados iniciales, se capturaron estas zonas y se observó fluorescencia en dichas filas. Posteriormente, éstos se incubaron con el oligonucleótido SYM5 (*target* de SYM44 marcado también con fluoróforo) observándose un aumento de la intensidad de fluorescencia. Tras todos los lavados, tanto los posteriores a los pasos de prehibridación e hibridación como los posteriores al revelado, los niveles de fluorescencia no disminuyeron, indicando que la sonda se había quedado atrapada en el hidrogel pese a todos los lavados.

Por otro lado, se quiso verificar que el proceso de hibridación tenía lugar. Para ello, en los mismos *arrays* comentados anteriormente se imprimió una fila de MPC 1 M junto a SYM43 (sonda tiolada de secuencia similar a SYM44, pero sin marcar con un fluoróforo). Tras la incubación con SYM5, se observó una intensidad de fluorescencia significativamente diferente al resto de *spots* que contenían las sondas específicas y no específicas de los amplicones de *Salmonella*. Esto significaba que la hibridación sí que había tenido lugar con oligonucleótidos de cadena corta totalmente complementarios.

Finalmente, se realizó una zona de control de revelado. Es decir, de todos los *arrays* generados, uno de ellos no fue incubado con productos de PCR pero sí se incubó con la mezcla de anticuerpos de revelado. Tras cumplir con el tiempo estimado y realizar los lavados con PBS-T, se capturó dicha réplica cuyos *spots* sí daban fluorescencia, cuando no deberían dar. Así, se procedió a realizar lavados más exhaustivos para eliminar tanto el producto de PCR inespecífico como los anticuerpos de revelado que se habían quedado atrapados hasta que dicha zona no diese fluorescencia.

A pesar de todo ello, los resultados que se han obtenido hasta el momento no han sido positivos, pues no se ha conseguido que los productos de PCR (amplicones) penetren en el hidrogel e hibriden específicamente con las sondas atrapadas en éstos. Esto nos lleva a pensar que el tamaño de los

amplicones es excesivo para el hidrogel desarrollado por lo que no entran a su interior de manera adecuada y, por tanto, no hibridan con las sondas.

Para continuar este trabajo, un control interesante sería realizar dicho ensayo con productos de PCR que no necesiten un revelado posterior con anticuerpos, es decir, que estuviesen directamente marcados con un fluoróforo, por ejemplo Cy5. Este ensayo nos proporcionaría información acerca de si realmente los amplicones entran e hibridan con las sondas o no lo hacen y con los lavados los eliminamos. Por desgracia, este ensayo no ha sido posible realizarlo por falta de tiempo y por no disponer en el laboratorio de productos de PCR marcados como se desea.

5. CONCLUSIÓN

Conclusión

En el presente trabajo se ha demostrado el potencial del uso de un hidrogel basado en fosforilcolina (MPC) para su aplicación en la tecnología *microarray* sobre superficies altamente hidrofóbicas, como son los discos Blu-Ray (BD).

Por una parte, se ha comprobado que los *arrays* generados presentan mayor sensibilidad en comparación con los tradicionales, llegando a la detección de una concentración de oligonucleótido *target* hibridado igual a 6 nM. Asimismo, los *microarrays* generados poseen una mejor discriminación de polimorfismos de una sola base (SNP) además de presentar un porcentaje de inmovilización de oligonucleótido sonda mayor a los obtenidos en los *arrays* tradicionales 2D ($\geq 90\%$).

Por otra parte, dicho hidrogel de MPC puede actuar como receptor de la proteína C reactiva (CRP) en ensayos de pronóstico y diagnóstico de enfermedades cardiovasculares.

Así pues, se puede afirmar que los *arrays* generados presentan gran potencial para su aplicación en el pronóstico de enfermedades cardiovasculares y en el diagnóstico de cualquier enfermedad mediante, por ejemplo, el uso de microRNA.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Aboytes, K., Humphreys, J., Reis, S. & Ward, B. Slide Coating and DNA Immobilization Chemistries in A Beginner's Guide to Microarrays . *Springer US*. 1-41 (2003).
2. Arnandis-Chover, T., Morais, S., González-Martínez, M. Á., Puchades, R. & Maquieira, Á. High density MicroArrays on Blu-ray discs for massive screening. *Biosens. Bioelectron.* **51**, 109–114 (2014).
3. Arnandis-Chover, T., Morais, S., Tortajada-Genaro, L. *et al.* Detection of food-borne pathogens with DNA arrays on disk. *Talanta* **101**, 405–412 (2012).
4. Baeissa, A., Dave, N., Smith, B. D. & Liu, J. DNA-functionalized monolithic hydrogels and gold nanoparticles for colorimetric DNA detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2**, 3594 (2010).
5. Ballard, J. L., Peeva, V. K., DeSilva, C. J. S., Lynch, J. L. & Swanson, N. R. Comparison of Alexa Fluor® and CyDye™ for practical DNA microarray use. *Mol. Biotechnol.* **36**, 175–183 (2007).
6. Bañuls, M.-J., González-Pedro, M.V., Puchades, R. & Maquieira, Á. Influenza A virus infection diagnosis based on DVD reader technology. *Anal. Methods* **4**, 3133 (2012).
7. Beyer, A., Pollok, S., Berg, A., Weber, K. & Popp, J. Easy daylight fabricated hydrogel array for colorimetric DNA analysis. *Macromol. Biosci.* **14**, 889–898 (2014).
8. Bromberg, A., Jensen, E. C., Kim, J., Jung, Y. K. & Mathies, R. Microfabricated linear hydrogel microarray for single-nucleotide polymorphism detection. *Anal. Chem.* **84**, 963–970 (2012).
9. Bunemann, H., Westhoff, P. & Herrmann, R. G. *Nucleic Acids Res.* **10**, 7163–7180 (1982).
10. Chang, M., Binder, C. J., Torzewski, M. & Witztum, J. L. C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Med. Sci.* **99**, (2002).
11. Chou, C. C., Chen, C. H., Lee, T. T. & Peck, K. Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression. *Nucleic Acids Res.* **32**, 99 (2004).
12. Debouck, C. & Goodfellow, P. N. DNA microarrays in drug discovery and development. *Nat. Genet.* **21**, 48–50 (1999).
13. Donatin, E. & Drancourt, M. DNA microarrays for the diagnosis of infectious diseases. *Med. Mal. Infect.* **42**, 453-459 (2012).
14. Dugat-Bony, E. *et al.* Detecting unknown sequences with DNA microarrays: Explorative probe design strategies. *Environ. Microbiol.* **14**, 356–371 (2012).
15. Enomoto, M., Tsubo, R., Kikuchi, M. & Mori, K. US Patent US2005/0233103A1 (2005)
16. Goda, T., Ishihara, K. & Miyahara, Y. Critical update on 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer science. *J. Appl. Polym. Sci.* **132**, (2015).
17. Herráez, Á. Análisis de biomarcadores empleando *biochips* y matrices de biomoléculas. *Ed. F. Ortega*. 223–257 (2010)
18. Hoyle, C. E. & Bowman, C. N. Thiol-Ene Click Chemistry. *Angewandte Chemie.* **49**, 1540-1573 (2010).
19. Ishihara, K. *et al.* *BBA Gen. Subj.* **1810**, 268 (2011).
20. Johnson, I. & Spense, M. T. Z. Fluorescence Fundamentals, in: The Molecular Probes® Handbook. *Life Technologies* (2010).
21. Kodadek, T. Protein microarrays : prospects and problems. *Chem. & Bio.* **8**, 105–115 (2001).
22. Lacher, D. W., Gangiredla, J., Jackson, S. A, Elkins, C. A & Feng, C. H. A novel microarray design for molecular serotyping of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from fresh produce. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, (2014).
23. Lang, H. P., Hegner, M. & Gerber, C. Nanomechanical Cantilever Array Sensors, in: Springer Handbook of Nanotechnology. *Springer Berlin Heidelberg*. 457-452 (2010).
24. Le Goff, G. C., Blum L. J. & Marquette C. A. Shrinking Hydrogel-DNA Spots Generates 3D Microdots Arrays. *Macromol. Biosci.* **13**, 227–233 (2013).
25. Lin, X. & Ishihara, K. Water-soluble beaming phosphorylcholine group and other zwitterionic groups for carrying DNA. *J. Biomater. Sci. Polym.* **25**, 1461 (2014).

26. Liu, Y. & Rauch, C. B. DNA probe attachment on plastic surfaces and microfluidic hybridization array channel devices with sample oscillation. *Anal. Biochem.* **317**, 76–84 (2003).
27. López, M., Mallorquín, P. & Vega, M. Aplicaciones de los microarrays y biochips en salud humana. Genoma España-CIBT-FGUAM (2005).
28. López, M., Mallorquín, P. & Vega, M. Microarrays y Biochips de ADN. *Informe de Vigilancia Tecnológica*. Genoma España-CIBT-FGUAM (2002).
29. Matsuno, R. & Ishihara, K. *Nano Today*. **6**, 61 (2011).
30. Meinders, E. R., Mijiritskii, A. V., Van Pieterse, L. & Wuttig, M. Optical Data Storage: Phase-change Media and Recording. *Springer*. 1-21 (2006).
31. Melin, J. et al. A multiplexed point-of-care assay for c-reactive protein and H-terminal pro-brain natriuretic peptide. *Anal. Biochem.* **409**, 7-13 (2011)
32. Mira, D. et al. High Throughput Screening of Surface-enhanced Fluorescence on industrial Standard Digital Recording Media. *SPIE Proceedings*. **5617**, 364 (2004)
33. Morais, S., Tamarit-López, J., Puchades, R. & Maquieira, Á. Determination of microcystins in river waters using microsensor arrays on disk. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 9024–9029 (2010).
34. Morais, S., Tortajada-Genaro L. A. & Maquieira, Á. Array-on-a-disk ? How Blu-ray technology can be applied to molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **14**, 773–775 (2014).
35. Morais, S., Tortajada-Genaro, L. A., Arnandis-Chover, T., Puchades, R. & Maquieira, Á. Multiplexed microimmunoassays on a digital versatile disk. *Anal. Chem.* **81**, 5646–5654 (2009).
36. Moschallski, M., Evers, A., Brandstetter, T. & Rühle, J. Sensitivity of microarray based immunoassays using surface-attached hydrogels. *Anal. Chim. Acta* **781**, 72–79 (2013).
37. Neumann, T., Bonham, A. J., Dame, G., Berchtold, B. & Brandstetter, T. Temperature and Time-Resolved Total Internal Reflectance Fluorescence Analysis of Reusable DNA Hydrogel Chips. *Anal. Chem.* **82**, 6124–6131 (2010).
38. Peris, E., Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, Á. Photoattachment of thiolated DNA probes on SU-8 spin-coated Blu-ray disk surfaces for biosensing. *J. Mater. Chem. B* **1**, 6245–6253 (2013).
39. Posner, T. Beiträge zur Kenntniss der ungesättigten Verbindungen. II. Ueber die Addition von Mercaptanen an ungesättigte Kohlenwasserstoffe. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. **38**, 646-657 (1905).
40. Rubina, A. Y. et al. Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production. *Anal. Biochem.* **325**, 92–106 (2004).
41. Rutowska, M. S. et al. Integration of a 3D Hydrogel Matrix with a Hollow Core Photonic Crystal Fibre for DNA Probe Immobilisation. *Meas. Sci. Technol.* **21**, 094016
42. Schaaf, C. P., Wiszniewska, J. & Beaudet, A. L. Annu. Review of Genomics and Human Genetics. **12**, 25-51 (2011).
43. Schena, M. et al. Microarrays: Biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol.* **16**, 301–306 (1998).
44. Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467–470 (1995).
45. Schrenzel, J., Kostic, T., Bodrossy, L. & Francois, P. *Introduction to Microarray-based Detection Methods*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany, 1-34 (2009).
46. Sola, L., Gagni, P., Cretich, M. & Chiari, M. Surface immobilized hydrogels as versatile reagent reservoirs for microarrays. *J. Immunol. Methods* **391**, 95–102 (2013).
47. Syahir, A., Usui, K., Tomizaki, K., Kajikawa, K. & Mihara, H. Label and Label-Free Detection Techniques for Protein Microarrays. *Microarrays* **4**, 228–244 (2015).
48. Tamarit-López, J., Morais, S., Puchades, R. & Maquieira, Á. Use of polystyrene spin-coated compact discs for microimmunoassaying. *Anal. Chim. Acta* **609**, 120–130 (2008).

49. Tanase, C. P., Albulescu, R. & Neagu, M. Application of 3D hydrogel microarrays in molecular diagnostics : advantages and limitations. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **11**, 461–464 (2011).
50. Tang, J. & Xiao, P. Polymerizing immobilization of acrylamide-modified nucleic acids and its application. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 1817–24 (2009).
51. THERMO SCIENTIFIC. PIERCE PROTEIN BIOLOGY. Avidin-biotin interaction. (2014)
52. Tomizaki, K., Usui, K. & Mihara, H. Protein-protein interactions and selection: array-based techniques for screening disease-associated biomarkers in predictive/early diagnosis. *FEBS J.* **277**, 1996–2005 (2010).
53. Watanabe, J. & Ishihara, K. Establishing ultimate biointerfaces covered with phosphorylcholine groups. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **65**, 155–65 (2008).
54. Xu, Y., Takai, M. & Ishihara, K. Phospholipid Polymer Biointerfaces for Lab-on-a-Chip Devices. *Ann. Biomed. Eng.* **38**, 1938–53 (2010).