

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN DIRECTA DE ADN GENÓMICO EN SOPORTES POLIMÉRICOS

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: BEATRIZ LUCAS GARROTE

TUTOR/A: SERGI MORAIS EZQUERRO

Curso Académico: 2014-2015

VALENCIA, 1 septiembre 2015





Datos personales

Nombre y apellidos: Beatriz Lucas Garrote

Datos del trabajo fin de grado

Título: Estrategias para la detección directa de ADN genómico en soportes poliméricos

Titulación: Grado en Biotecnología

Tutor/a: Sergi Morais Ezquerro

Fecha de lectura: septiembre curso 2014/2015

Resumen

El objetivo principal del trabajo ha sido la detección directa de secuencias específicas de ADN genómico en ensayos de hibridación sin pasar por la etapa de amplificación. Los ensayos se han realizado en soportes poliméricos derivados de la industria audio-video. Para alcanzar este reto, el trabajo se ha fundamentado en poner a punto un método de activación de la superficie de policarbonato de discos compactos para la inmovilización covalente de oligonucleótidos sin alterar las propiedades ópticas ni mecánicas del soporte. Además, se ha implementado en el ensayo la utilización del sistema tiramida como método de amplificación de la señal para la detección de ADN genómico. El principio del ensayo de hibridación está basado en la fragmentación y biotinilación masiva de ADN genómico el cual interacciona con las sondas específicas inmovilizadas en el disco, proporcionando una señal analítica, dependiente de la concentración de este, que es determinada posteriormente mediante un grabador de DVDs, utilizado como detector. Los resultados del ensayo propuesto se comparan con los obtenidos mediante amplificación por PCR en términos de sensibilidad, selectividad y versatilidad.

Palabras clave

Genómica, biosensor, ADN, disco compacto, detección directa, tiramida.



Abstract

The aim of the work was the direct detection of specific sequences of genomic DNA in hybridization assay without the polymerase chain reaction amplification step. The assays were performed on polymeric surfaces derived from the audio-video industry. In order to achieve this challenge, the work was based on the development of a method for the covalent immobilization of oligonucleotides by means of the chemical surface activation of a compact disc, keeping at the same time its optical and mechanical properties. In addition, a tyramide based signal amplification system was implemented in the hybridization assay for the genomic DNA detection. The principle of the hybridization assay is based on genomic DNA fragmentation and massive biotinylation. These biotinylated fragments interact with the specific immobilized probes on the disk, generating an analytical signal which depends on the biotinylated fragments concentration. This signal is quantified with a DVD player, used as a detector. The results of the proposed assay are compared with those achieved including the PCR amplification step in terms of sensitivity, selectivity and versatility.

Key words

Genomic, biosensor, AND, compact disk, direct detection, tyramide.

Agradecimientos

*Nobody said it was easy.
No one ever said it would be this hard.
"The scientist", Coldplay.*

Primero agradecer la paciencia de todos aquellos, a los que puedo llamar AMIGOS/AS, que durante el transcurso de este trabajo han tenido que aguantar el mono-tema TFG, sobre todo a mis *Hackers* (MH) de Cieza, que desde la distancia han compartido las alegrías por los buenos resultados y han conseguido animarme cuando estos no eran tan buenos.

En segundo lugar, agradecer a mi tutor, Sergi, porque a pesar de tener una agenda repleta de trabajo y de tener que buscarlo hasta debajo de las bancadas cada vez que surgía alguna duda, hemos realizado un gran trabajo. Ha sabido guiarme y enseñarme los entresijos de la vida en el laboratorio. También a todo el grupo de investigación, que me han aceptado y ayudado cada vez que lo he necesitado. Mención especial a Raquel e Isma, entre marujas y jirafas se trabaja mejor.

Llegué a Valencia hace cuatro años, con tan sólo 17 años y sin conocer a nadie. Durante este tiempo he crecido y madurado gracias a personas que han pasado por mi vida. Algunas tuvieron que marcharse, dejando una huella imborrable; otras han permanecido hasta el final, convirtiéndose en mi familia y haciendo de cada momento un recuerdo único. Los XIXOS, ellos han hecho que estos cuatro años hayan volado (literalmente), gracias por las XIXokupaciones, despedidas interminables, "*Bon dia, ¿on esteu?*", desayunos-comida y cumpleaños "improvisados".

Por último, aunque no menos importante, no podía cerrar este apartado sin agradecer el incondicional apoyo de mi familia. Es un tópico decir que sin ellos no habría llegado a ser lo que soy, pero es una realidad.

¡GRACIAS A TODOS!

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Técnicas de detección de ADN.....	1
1.2 Detección directa de ADN.....	4
1.3 <i>Microarrays</i> de ADN	6
1.4 Sistema de marcaje de ADN	11
1.5 Electrónica de consumo.....	12
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Reactivos e inmunorreactivos	15
3.2 Activación química de policarbonato e inmovilización de sondas	16
3.3 Ensayos de hibridación de oligonucleótidos.....	16
3.4 Extracción de ADN genómico	17
3.5 Amplificación por PCR.....	17
3.6 Hibridación de productos de PCR	18
3.7 Detección directa de ADN genómico	18
3.8 Hibridación de ADN genómico, amplificación de la señal y revelado	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1 Activación química de policarbonato	21
4.2 Inmovilización covalente de sondas aminadas.....	22
4.2.1. Tiempo de reacción	22
4.2.2. Efecto pH	23
4.2.3. Recapitulación	24
4.3 Ensayos de hibridación	26
4.3.1. Efecto de la longitud de la sonda inmovilizada	27
4.3.2. Amplificación de la señal con el sistema tiramida	28
4.3.3. Hibridación de productos PCR (<i>Salmonella spp.</i>).....	29
4.4 Detección de ADN genómico	31
4.4.1. Fragmentación de ADN genómico: Reacción Fenton	31
4.4.2. Hibridación de ADN genómico.....	32
4.4.3. Recapitulación.....	33
5. CONCLUSIONES	34
6. BIBLIOGRAFÍA	35
7. ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Esquema de la técnica de amplificación con tiramida	6
Fig. 2. Representación esquemática de los tipos de inmovilización de sondas de ADN en soportes sólidos	9
Fig. 3. Ejemplo del uso de la electrónica de consumo para el desarrollo de metodologías de diagnóstico más accesibles tipo <i>point-of-care</i>	13
Fig. 4. Esquema del tratamiento de las superficies para el anclaje de las sondas aminadas	16
Fig. 5. Esquema del ensayo de hibridación con oligonucleótidos	17
Fig. 6. Esquema del protocolo de extracción de ADN genómico	17
Fig. 7. Esquema del tratamiento del ADN genómico	19
Fig. 8. Esquema del proceso de amplificación de señal, tras la hibridación de ADN genómico	20
Fig. 9. Unidad de repetición del polímero policarbonato	21
Fig. 10. Imágenes de las matrices impresas resultantes de los diferentes tratamientos	22
Fig. 11. Representación de las señales de fluorescencia para cada concentración de oligo inmovilizado y diferentes tiempos de reacción	23
Fig. 12. Efecto del pH del tampón de impresión sobre la inmovilización de la sonda BEA-8.	24
Fig. 13. Recta de calibrado oligo BEA-8	25
Fig. 14. Efecto de la composición del tampón de hibridación en la señal analítica	26
Fig. 15. Efecto de la concentración de formamida en el ensayo de hibridación de productos de PCR	27
Fig. 16. Efecto de la longitud de la sonda inmovilizada en ensayos de hibridación con oligo complementario	28
Fig. 17. Sensibilidad de los ensayos de hibridación con oligo complementario en presencia y ausencia del sistema de amplificación con tiramida.....	29
Fig. 18. Ensayo hibridación con productos de PCR	30
Fig. 19. Sensibilidad de los ensayos de hibridación con productos de PCR en presencia y ausencia del sistema de amplificación con tiramida	30
Fig. 20. Sensibilidad de los ensayos de hibridación con productos de PCR obtenidos a partir de diferentes concentraciones de ADN molde	31
Fig. 21. Imagen del gel de electroforesis de ADN genómico de <i>Salmonella spp.</i>	32
Fig. 22. Detección directa de ADN genómico en ensayos de hibridación empleando el sistema tiramida	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de enlace, ventajas y desventajas de inmovilización	10
Tabla 2. Grupos reactivos utilizados en la construcción de <i>arrays</i> de ADN	11
Tabla 3. Secuencias y modificaciones de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos.....	15
Tabla 4. Concentraciones iniciales y de reacción de los reactivos de PCR	18
Tabla 5. Ángulo de contacto tras diferentes tratamientos de la superficie de PC	22
Tabla 6. Recopilación de los porcentajes de la composición elemental de superficies tratadas de diferente forma	25

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CARD	Catalyzed Reporter Deposition
CD	Disco compacto
COC	Copolímero olefín cíclico
ddNTPs	Didesoxirribonucleótidos trifosfato
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DVD	Disco digital versátil
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
HRP	Peroxidasa de rábano picante
LAMP	Amplificación isoterma mediada en ciclo
LD	Límite de detección
LQ	Límite de cuantificación
NASBA	Amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos
PC	Policarbonato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDMS	Poli(dimetilsilano)
PE	Poliestireno
PET	Tereftalato de polietileno
PMMA	Polimetil metacrilato
Q-PCR	PCR cuantitativa o a tiempo real
RFLP	Polimorfismo en longitud en fragmentos de restricción
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
SNP	Polimorfismo en una única base
SPR	Resonancia de plasmones de superficie
SPRi	Resonancia de plasmones de superficie por imagen
STR	Pequeñas repeticiones en tándem
TSA	Amplificación de la señal por tiramida

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Técnicas de detección de ADN

La investigación en genómica necesita herramientas analíticas de elevada sensibilidad para la detección de ácidos nucleicos a un coste razonable. La necesidad de detectar ácidos nucleicos (ADN, ARN) no apareció con las técnicas modernas de biología molecular, sino que estas surgieron, entre otros motivos, para aumentar la sensibilidad de los métodos de detección. Las técnicas tradicionales de detección de ADN comenzaron con el uso de sondas complementarias marcadas con isótopos radioactivos. Así, Pardue y Gall implantaron a finales de los años 60 ensayos de hibridación *in situ*. Estos desarrollaron la técnica para la detección de secuencias de ADN en preparaciones citológicas, empleando el isótopo timidina- H^3 (Pardue and Gall, 1969). A pesar del alto grado de especificidad de la técnica, esta requería utilizar una elevada concentración de sonda y secuencia diana (límite de detección menor de 10^{-18} moles), y la necesidad de exposiciones largas con isótopos radioactivos con el consiguiente problema de seguridad asociado a ello (Pollard-Knight, 1990). Además, el uso de isótopos radiactivos como método de marcaje, reducía el uso de la técnica a expertos en el área. Empleando el isótopo ^{32}P , Sanger y colaboradores en 1977 (Sanger *et al.*, 1977) marcaron dideoxynucleótidos (ddNTPs) con los que desarrollaron la técnica de secuenciación que ha sido base para las técnicas implantadas posteriormente (NGS) y para el desarrollo del proyecto de secuenciación del genoma humano.

A mediados de los años 70 Edwin Southern (Southern, 1975) desarrolló la técnica de detección de ADN a partir de muestras complejas separadas en geles conocida actualmente como *Southern blot*. Esta técnica consiste en transferir fragmentos de ADN a una membrana de nylon o nitrocelulosa para poder detectar secuencias específicas por hibridación de sondas complementarias marcadas con isótopos radioactivos. Desde entonces, han aparecido variantes de esta técnica para la detección de secuencias de ARN o de proteínas en su modalidad *Northern* y *Western blot*, respectivamente. Al igual que ocurría con los ensayos de hibridación *in situ*, la sensibilidad del método era baja y dependiente del tamaño de la sonda (para una sonda de 1 kb, se obtenía un límite de detección de 3×10^6 moléculas) (Pollard-Knight, 1990).

A principio de los 80, Langer y colaboradores describieron la síntesis de nucleótidos con biotina unida al anillo de pirimidina de los dUTPs (Langer, 1981). Este tipo de marcaje fue utilizado por Pinkel y colaboradores en 1986 para el marcaje indirecto de sondas de ADN con fluoróforos. El protocolo consistía en el marcaje de sondas complementarias a secuencias diana con biotina y una vez hibridadas se implementaba una etapa de incubación con avidina marcada con fluoresceína (Pinkel *et al.*, 1986). En 1989, Müllegger y colaboradores desarrollaron otra forma de marcaje indirecto de ácidos nucleicos, gracias a la síntesis de dUTPs marcados con digoxigenina (Mühlegger *et al.*, 1989).

Los investigadores de la época no sólo se interesaban por la detección de ADN de diferentes organismos, sino que también comenzaron a estudiar anomalías genéticas. El mapeo genético utilizando marcadores de ADN se volvió una técnica rutinaria, gracias a que a finales de los años 80 comenzaron a descubrirse un gran número de marcadores de ADN en el genoma humano (Marian, 1995).

Los marcadores más usados eran los basados en la longitud diferencial de fragmentos producidos tras un ensayo de restricción con endonucleasas (RFLPs: *Restriction Fragment Length Polymorphism*) y los basados en la repetición diferencial de secuencias de di- o trinucleótidos en el genoma humano (STR: *Short Tandem Repeats*).

Las endonucleasas de ADN fueron descubiertas por Smith y Wilcox en 1970 (Smith and Wilcox, 1970). Estas enzimas reconocen sitios específicos en las cadenas de ADN y generan cortes en ella. En este principio se basan los marcadores RFLPs. La variabilidad entre individuos puede hacer que se ganen o se pierdan sitios de restricción de un enzima concreto. De esta forma, si esa secuencia se incubaba con un enzima de restricción se puede comprobar en un gel de electroforesis o por Southern blotting, si en la región existen diferencias a nivel de secuencia entre los individuos (Malcolm, 1990). Este tipo de marcador tiene limitaciones, debido a que presenta un número de variantes limitado, sólo informa de si hay o no sitio de corte. Esto hace que no sea un marcador útil por sí sólo (Botstein *et al.*, 1980). En esta línea de trabajo, los STRs fueron descubiertos por Hamada *et al.* en 1982. Se trata de secuencias microsatélite únicas que se repiten en tándem en diferentes regiones del genoma. El número de unidades repetidas difiere de un individuo a otro, por lo que utilizando combinaciones de varios STRs se puede diferenciar un individuo de otro e incluso saber si están emparentados. Gracias a la gran variabilidad de secuencias, este marcador, a diferencia de los RFLPs, aporta gran cantidad de información y ha sido utilizado para pruebas de paternidad y en criminología.

A finales del siglo XX se produjo un crecimiento exponencial en el número de técnicas disponibles en genética molecular y en las aplicaciones de las mismas. Esto hizo que las técnicas tradicionales de diagnóstico y tratamiento fuesen rápidamente reemplazadas.

La revolución en el desarrollo de técnicas de análisis de ADN comenzó con la llegada de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *Polimerase Chain Reaction*) en 1986 por Mullis y compañeros, empleando la DNA polimerasa I de *E. coli* (Mullis *et al.*, 1986). En 1988, Saiki y compañeros introdujeron el uso de la *Taq* ADN polimerasa en la tecnología PCR (Saiki *et al.*, 1988). Este enzima es termoestable y fue aislada de la bacteria hipertermófila *Thermus aquaticus* en 1976 por Chien y colaboradores (Chien *et al.*, 1976). Las ventajas que ofrece el uso de este enzima es que su temperatura óptima es 80°C, manteniendo su actividad a las altas temperaturas utilizadas durante la PCR.

Con el desarrollo de la PCR la facilidad para detectar polimorfismos y/o secuencias específicas de ADN en mezclas complejas, así como el número de marcadores específicos aumentó de forma exponencial. La detección de diferencias entre secuencias de ADN dejó de ser dependiente de la presencia de sitios de corte de enzimas de restricción y los tiempos de ensayo se redujeron considerablemente. Tan solo un par de años después apareció su homóloga para amplificar y detectar ARN mensajero, utilizando el enzima transcriptasa reversa: RT-PCR (*Reverse Transcriptase-PCR*) (Steinbach and Rupp, 1999).

Esta parecía ser la técnica definitiva en biología molecular para la detección de ADN, pero presenta algunas limitaciones (Ermini *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013):

- La polimerasa es susceptible de ser inhibida por algunos componentes de la muestra. Esto puede resultar en falsos negativos, lo que es un serio problema en el diagnóstico clínico.

- Amplificación errónea de secuencias lo que provoca la aparición de falsos negativos y positivos.
- Es relativamente cara en comparación con otras técnicas sensibles de análisis, como inmunoensayos, ya que requiere el uso de una gran cantidad de reactivos (cebadores, polimerasa, dNTPs, etc.) y equipos caros.
- La amplificación por PCR de muestras positivas genera una elevada concentración de secuencia diana, lo que puede causar que se produzca contaminación cruzada.

Para solventar estos problemas, se desarrollaron variantes de la PCR tradicional, que incluían mejoras y permitían agilizar el diagnóstico; ejemplos de estas variantes son la PCR a tiempo real (Q-PCR: *Quantitative-PCR* ó *Real Time-PCR*) o la PCR múltiple. Así, la PCR múltiple permite la amplificación de varias secuencias diana en la misma reacción, gracias a que utiliza más de un par de cebadores. Este tipo de PCR presentaba varios inconvenientes, como una baja sensibilidad y especificidad y la amplificación preferente de unas secuencias frente a otras. Además, dado el elevado número de parejas de cebadores necesario, la probabilidad de que estos hibriden unos con otros y se generen productos secundarios no deseados es alta, por lo que el diseño de sondas es crítico para obtener unos buenos resultados (Markoulatos *et al.*, 2002).

La PCR a tiempo real fue desarrollada por Higuchi *et al.* en 1992 y una de las principales ventajas que presenta es que permite la cuantificación de secuencias diana de ADN en una mezcla compleja a tiempo real, utilizando sondas marcadas con fluoróforos (Fraga *et al.*, 2008). Así pues, la tecnología existente para la detección de ADN precisa de la realización de numerosos pasos previos de tratamiento de muestra, diseño de sondas y cebadores, etapas de amplificación con control de temperatura muy preciso, marcaje fluorescente y sistemas de detección que no están al alcance de todos los laboratorios.

Las técnicas de amplificación de una secuencia específica de ADN que surgieron tras la invención de la PCR no sólo se basaban en variaciones de esta, sino que en la última década se han ido desarrollando diferentes técnicas de amplificación de ADN isotermas, como LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*) para detectar secuencias de ADN ó NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*) para la detección de ARN. Ambas surgieron para simplificar, aumentar la rapidez y disminuir el coste de los ensayos de amplificación, pues no requieren ciclos térmicos, por lo que se reducen costes en el proceso de amplificación. La amplificación por LAMP se basa en el principio de reacción de desplazamiento por recircularización de la cadena. Se caracteriza por el uso de seis diferentes cebadores, especialmente diseñados para reconocer ocho regiones diferentes de un mismo gen diana. Esto dificulta el uso de la técnica, pues requiere un amplio conocimiento en el diseño de cebadores. La técnica NASBA genera unidades de cDNA a partir de fragmentos de ARN, gracias al enzima transcriptasa reversa, que genera híbridos de ADN/ARN; a la actividad hidrolasa del enzima RNasa H que degrada la secuencia de ARN en híbridos ADN/ARN; y al enzima ARN polimerasa T7, que genera cadenas de ARN a partir de fragmentos de doble cadena de ARN. Estos tres enzimas actúan de forma cíclica. El número de reactivos necesarios para llevarla a cabo es superior a los empleados en la PCR tradicional, por lo que puede encarecer los ensayos (Parida *et al.*, 2008; Asiello & Baeumner, 2011).

A pesar de todas las técnicas desarrolladas con posterioridad a la implantación de la PCR, ninguna ha podido desbancar a la reacción en cadena de la polimerasa, ya que, independientemente de las limitaciones que presenta, las ventajas y el potencial que muestra son innegables. Aun así, la baja capacidad de multiplexado ha hecho que aparezcan alternativas analíticas que permiten analizar un número elevado de secuencias diferentes en un mismo ensayo. En resumen, la PCR es una metodología costosa en medios materiales, humanos y en tiempo de análisis. En esta última década, comienzan a aparecer en la bibliografía aproximaciones basadas en la detección de ADN genómico sin amplificación por PCR.

1.2 Detección directa de ADN

En la actualidad, el desarrollo de metodologías que permitan la detección de ADN sin necesidad de la etapa de amplificación es un reto científico. (Ermini *et al.*, 2012). Por ello, en aras de abordar este reto se vienen describiendo aproximaciones basadas en la utilización de técnicas sofisticadas como la Resonancia de Plasmones de Superficie (SPR). Esta metodología fue descrita a principios de los años 90 (Vadgama and Crump, 1992).

Desde ese momento, la metodología SPR fue empleada para estudiar diferentes tipos de procesos biológicos. Nelson, *et al.*, en 2001 desarrolló una variante de la SPR, SPR por imagen (SPRi), con la que se pueden analizar, bajo las mismas condiciones, múltiples interacciones en formato *array*. Con esta tecnología consiguieron detectar secuencias de ADN y ARN de 18 bases de longitud con un límite de detección de 10 nM (Nelson *et al.*, 2001). Para aumentar la sensibilidad de la técnica, en 2003 Goodrich, *et al.* incluyeron un sistema de amplificación de la señal, basado en la actividad del enzima RNasa H. Este enzima hidroliza las secuencias de ARN en los heterodúplex ADN-ARN. Diseñaron un *microarray* con secuencias de ARN inmovilizadas y complementarias a las secuencia de ADN diana. Cuando la muestra se pone en contacto con las matrices de secuencias de ARN, si el ADN complementario está presente, se formará un heterodúplex y la RNasa H hidrolizará la secuencia de ARN, dejando disponible al fragmento de ADN libre para hibridar con otra secuencia de ARN y que vuelva a ser hidrolizada. Este proceso se produce de forma cíclica, haciendo que, con muy poca cantidad de ADN diana en la muestra, la señal sea perceptible a concentraciones de 1 fM (Goodrich *et al.*, 2004).

En 2005, Ahn y Walt desarrollaron una nueva metodología para la detección directa de *Salmonella* spp. con un límite de detección de 10^3 - 10^4 CFU/mL. Esta consistía en un *microarray* de fibra óptica de ADN, construido con microesferas sobre las que se inmovilizaban sondas de ADN específicas de *Salmonella*. Para la detección empleaban sondas secundarias marcadas con la cianina Cy3 (Ahn and Walt, 2005).

En 2006, Baptista *et al.*, introdujeron el uso de nanopartículas de oro para funcionalizar sondas de ADN con las que detectar de forma más eficiente y rápida *Mycobacterium tuberculosis* después de un ciclo de amplificación con PCR (Baptista *et al.*, 2006). Por otra parte, Liandris y colaboradores en 2009, utilizaron estas sondas con oro para diseñar un sistema colorimétrico, para la detección directa de ADN. La detección colorimétrica se basaba en la agregación de las sondas marcadas con oro inducidas por la presencia de ácidos. La presencia de la diana complementaria, evitaba la agregación de las sondas, manteniendo la disolución de color rosa, mientras que en aquellas en las que las sondas podían agregar, la disolución de volvía de color morada. Con esta metodología alcanzaron un límite de detección de 1,875 ng/ μ L (Liandris *et*

al., 2009). Existen también otras aproximaciones más actuales para la detección directa de ADN genómico, como la de Song y colaboradores que describen un método basado en el uso de pequeñas sondas de ADN biotiniladas y sondas de captura ancladas a partículas magnéticas complementarias a la secuencia de ADN que se quiere detectar (Song *et al.*, 2013). Las sondas biotiniladas hibridan en diferentes regiones de la secuencia diana. Una vez unidas, el complejo partículas magnéticas-secuencia diana-sondas biotiniladas se incuba con estreptavidina funcionalizada con un enzima, cuyo producto genera una señal detectable. Con este método detectar una concentración de ADN de 0,042 fM.

Ermini y colaboradores describen la optimización de la técnica de resonancia de plasmones de superficie por imagen (SPRi) para conseguir mejores resultados en la detección directa de secuencias específicas de ADN (Ermini *et al.*, 2012). Estos diseñaron un biosensor que consistía en una secuencia específica del gen humano ABCB1 inmovilizada en la superficie. La región diana queda unida a esta secuencia específica. Para aumentar la especificidad y la señal generada, utilizaron una segunda sonda que reconocía otra región del fragmento hibridado. La interacción entre la sonda y el analito se seguía a tiempo real mediante SPRi, alcanzando un límite de detección de 0,14 fM.

En 2015, Seo y colaboradores publicaron un método que permite la detección de *Francisella tularensis* a una concentración de 0,046 ng/mL lo que implica un límite de detección 1500 veces superior a las técnicas de detección tradicionales (ELISA ó RT-PCR) (Seo *et al.*, 2015). La técnica se basa en dirigir al antígeno diana anticuerpos marcados con partículas de oro que contienen sondas ancladas y que al liberarse hibridarán con secuencias de ARN marcadas con fluoróforos que serán liberados por acción de la RNasa H.

La detección directa de ADN genómico también se puede conseguir mediante la reacción de reducción de la plata por irradiación con UV. Berti y colaboradores en 2005 descubrieron que los iones de plata podían intercalarse entre las cadenas de ADN y ser reducidos por irradiación con luz UV a una longitud de onda de 254 nm. Esta fotorreducción genera complejos de plata en la hélice de ADN. Por esta razón, se aplicaron en la construcción de nanoestructuras en las que las cadenas de ADN actuaban como agente reductor y como soporte (Berti *et al.*, 2005). Jung y colaboradores en 2013 propusieron el uso de esa capacidad de fotorreducción como método *label-free* que permitiera la detección directa de ADN genómico. Basando en el cambio de color que supone la fotorreducción de la plata: la disolución vira de transparente a color amarillo (Jung *et al.*, 2013).

La reacción de reducción de la plata puede servir como sistema de amplificación de la señal emitida por la hibridación de moléculas marcadas con nanopartículas de oro, cuyo tamaño impide la visualización directa de las mismas. La amplificación con plata consiste en la reducción de iones plata a plata metálica, generando un precipitado insoluble. El papel del oro en este proceso es catalizar la reacción de reducción, permitiendo que en pocos minutos se obtenga el precipitado. La cantidad de precipitado dependerá de la cantidad de oro presente en la reacción, y por tanto, de la cantidad de molécula marcada hibridada (Morais *et al.*, 2007).

En la bibliografía se recogen otras estrategias de amplificación de señal interesantes como el sistema de amplificación con tiramida (TSA: *Tyramide System Amplification*). Esta técnica fue introducida por Bobrow *et al.* en 1989 como CARD (*Catalyzed Reporter Deposition*) con el objetivo de aumentar la sensibilidad de ensayos de inmunotransferencia y ELISA (Bobrow *et*

al.,1989; Speel *et al.*, 2006). La técnica se basa en el uso del enzima HRP para activar la molécula tiramida marcada. Esta molécula cuando se encuentra en su estado reactivo se une a residuos ricos en electrones de las proteínas circundantes, como triptófano y tirosina. En la Figura 1 se representa gráficamente el proceso de amplificación utilizando tiramida marcada con biotina. Contra esta biotina se puede dirigir la combinación de anticuerpos anti-biotina de conejo y anti-conejo marcado con oro y revelar con plata (Fig. 1A); o dirigir un anticuerpo anti-biotina-HRP que permite el revelado con TMB (Fig. 1B) o realizar otro ciclo de amplificación con tiramida (Fig. 1C). El ciclo de amplificación se puede hacer multitud de veces, permitiendo aumentar la relación señal-ruído.

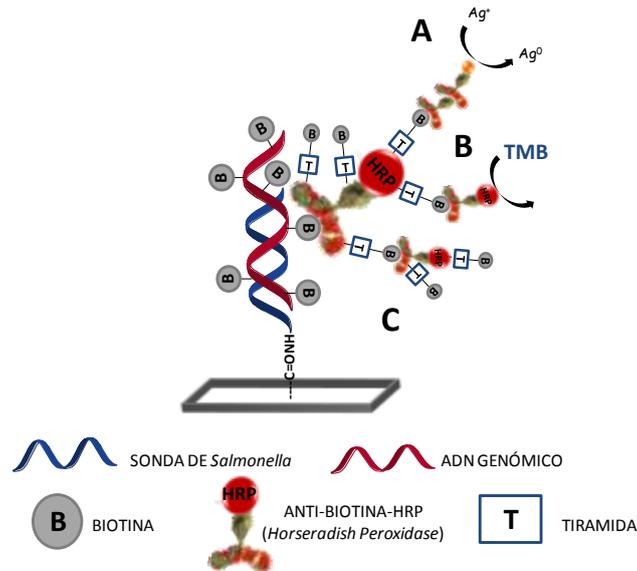


Fig. 1. Esquema de la técnica de amplificación con tiramida. La etapa de amplificación por tiramida puede estar seguida de: A) revelado por reacción de reducción de la plata, empleando como catalizador oro anclado a un anticuerpo secundario que reconoce un anticuerpo anti-biotina; B) revelado con anti-biotina-HRP, empleando el sustrato TMB que genera un precipitado azul; C) segunda etapa de amplificación con tiramida, incubando de nuevo el anticuerpo anti-biotina-HRP. Esta última opción puede repetirse n veces.

Con esta metodología se consiguen límites de detección 60-100 veces inferiores a los obtenidos con técnicas colorimétricas. (Buchwalow and Böcker, 2010; Berti *et al.*, 2005).

Muchos de estos ejemplos de metodologías para la detección directa de ADN genómico utilizan la tecnología *microarray*, es decir, precisan de la inmovilización de sondas de ADN que hibriden con secuencias diana.

1.3 *Microarrays* de ADN

Los *microarrays* de ADN consisten en una superficie sólida que contiene secuencias de ADN inmovilizadas de manera ordenada. Esta tecnología puede aplicarse en diferentes campos que requieran la detección de cualquier aspecto relacionado con material genético, ya que se basa en el principio de hibridación entre secuencias de ADN complementarias. Algunas de estas aplicaciones son el análisis de expresión, detección de agentes infecciosos, diagnóstico molecular y pronóstico de enfermedades, farmacogenómica, cribado de compuestos activos y validación de dianas terapéuticas, entre otras (GENOMA ESPAÑA / CIBT-FGUAM, 2002). Esta metodología fue descrita a principios de los 80, revolucionando la tecnología de diagnóstico y análisis del ADN, pero no fue hasta 1995 cuando Schena la utilizó para el diseño de un

dispositivo con el que determinar patrones de expresión génica (Schena *et al.*, 1995). A día de hoy los *microarrays* de ADN permiten el análisis de millones de secuencias diferentes de forma rápida y relativamente barata.

Actualmente, el uso de secuencias de simple cadena de ADN para la construcción de biosensores es muy popular debido a que son moléculas muy estables, sensibles y específicas. Además, se puede diseñar oligonucleótidos a la carta modificados químicamente con grupos funcionales, lo que facilita el desarrollo de distintos formatos de ensayo (Saikrishnan *et al.*, 2014).

La principal ventaja que presenta los *microarrays* frente a las técnicas de detección convencionales es su capacidad de multiplexado y análisis simultáneo de multitud de muestras, reduciendo los tiempos de análisis. Además, tiene numerosas aplicaciones en diferentes áreas. Unas de las aplicaciones más relevantes que demuestran su elevada capacidad de multiplexado son los ensayos de *screening* masivo o los basados en la búsqueda de SNPs en secuencias de ADN. Así, por ejemplo, Sobrino *et al.*, diseñaron un dispositivo *microarray* para reconocimiento de 29 SNPs en el cromosoma Y en la población europea (Sobrino *et al.*, 2004). Arnandis-Chover *et al.*, en 2014 desarrollaron un *microarray* de alta densidad en un disco Blu-ray para realizar *screenings* masivos de diferentes compuestos (Arnandis-Chover *et al.*, 2014).

Desde la construcción del primer *microarray*, la tecnología ha ido mejorando mediante la incorporación de nuevos soportes en los que inmovilizar secuencias de ADN utilizando formas alternativas de anclaje e implementando sistemas de detección más sensibles. En definitiva, desarrollando dispositivos versátiles y económicos que permitan la detección de ADN a muy baja concentración.

Normalmente, las superficies empleadas para la fabricación de *microarrays* son planas y uniformes. Estas superficies se pueden dividir en superficies porosas y superficie no porosas. Las primeras se caracterizan porque las interacciones entre el elemento a inmovilizar y la superficie no son del tipo covalente, mientras que en las segundas sí que se puede dar este tipo de enlace (GENOMA ESPAÑA / CIBT-FGUAM, 2002).

Los soportes porosos incluyen membranas de nylon o nitrocelulosa o geles que recubren superficies sólidas. Este tipo de soporte suele presentar elevado ruido de fondo, por lo que el modo de detección empleado es habitualmente por radioactividad o colorimétrico. Estas formas de detección presentan inconvenientes, por lo que los soportes porosos cada vez se utilizan menos para la construcción de *microarrays*.

Los soportes no porosos suelen ser los más utilizados para la fabricación de *microarrays*. Estos pueden ser de vidrio, óxido de silicio, plástico u oro (Tang *et al.*, 2012; GENOMA ESPAÑA / CIBT-FGUAM, 2002). De todos ellos, el vidrio es el más utilizado desde los inicios de la tecnología. Este presenta numerosas ventajas, lo que explica su uso generalizado, como la buena calidad óptica, que es un material fácilmente funcionalizable, relativamente barato y puede resistir altas temperaturas. Además, permite gran variedad de vías de inmovilización química de sondas (Aboytes *et al.*, 2003). Gudnason *et al.*, en 2008 desarrollaron un método simple y barato para la inmovilización de sondas de ADN en superficies de vidrio sin modificar, mediante radiación UV y una secuencia poliT y poliC espaciadora entre las sondas y la superficie (Gudnason *et al.*, 2008).

Las superficies de vidrio se pueden recubrir con monocapas de polímeros o metálicas (oro, aluminio, cobre, etc.) que atribuirán unas características químicas concretas para la inmovilización de sondas. El oro es uno de los recubrimientos más empleados. Como se muestra en la Tabla 2, este permite la unión covalente de sondas funcionalizadas con grupos tiol (Nimse *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2011). Como se puede suponer, el principal inconveniente de este tipo de superficies es el precio del oro, lo que encarece bastante los ensayos.

El óxido de silicio y sus derivados también han sido ampliamente estudiados como soporte sólido para la fabricación de chips de ADN. Este es considerado uno de los materiales más versátiles, por lo que, al igual que el vidrio, puede sufrir gran cantidad de modificaciones químicas para la inmovilización de sondas (Gopinath *et al.*, 2012). Otras de las características que presenta es que soporta un amplio rango de pH, es inerte, transparente en el espectro UV-visible y económico. Al igual que el vidrio, las superficies de óxido de silicio se pueden recubrir con monocapas para atribuir diferentes características y facilitar la unión de sondas de ADN. En 2014 Escorihuela *et al.* diseñaron una estrategia rápida y simple para la inmovilización covalente de sondas de ADN sobre superficies de silicio modificadas con monocapas de grupos tiol (Escorihuela *et al.*, 2014).

Una alternativa prometedora de los últimos años es el uso de polímeros orgánicos. Este es un material de bajo coste que permite la fabricación de chips en grandes cantidades (Kimura, 2006). Uno de los inconvenientes es que puede presentar ruido de fondo por fluorescencia y requiere tratamientos químicos concretos para su biofuncionalización (GENOMA ESPAÑA / CIBT-FGUAM, 2002). Ejemplos de polímeros utilizados para la fabricación de *microarrays* son el copolímero olefin cíclico (COC), polimetil metacrilato (PMMA), poli(dimetilsiloxano) (PDMS), policarbonato (PC), poliestireno (PE), poli(etileno tereftalato) (PET), etc.

El policarbonato (PC) es un importante material termoplástico, que presenta excelentes propiedades mecánicas, como alta tenacidad y buena resistencia al calor y al impacto. En cuanto a coste, es un material muy accesible y de miniaturización elevada, lo que lo hace idóneo para ensayos de *microarrays* (Kido *et al.*, 2000).

Un aspecto en la construcción de chips de ADN es la inmovilización de las sondas. Este es un paso esencial para el desarrollo de *microarrays* ya que determina las propiedades del mismo. Para conseguir un dispositivo altamente sensible y selectivo, es necesario reducir la adsorción no específica y que la molécula sea estable. Esto depende del modo de inmovilización de sondas, que puede ser de forma directa, indirecta o por síntesis *in situ* de las cadenas de ADN (Fig. 2) (Nimse *et al.*, 2014). En la Tabla 1, se muestran las ventajas y desventajas de los diferentes modos de inmovilización de sondas de ADN.

La inmovilización directa de sondas al soporte mediante enlace covalente es una estrategia muy utilizada y apropiada si se pretende una unión irreversible. Sin embargo, si lo que se pretende es reutilizar las superficies sólidas en diferentes ensayos, conviene utilizar una unión de tipo reversible, como la unión por afinidad. La síntesis *in situ* de las sondas puede ser un proceso más costoso, pues requiere de un gran número de etapas, pero se consigue la orientación correcta de las moléculas. La elección de un método u otro, depende del tipo de superficie, del tipo de biomolécula que se quiere inmovilizar y del tipo de enlace que se quiere conseguir. Por otro lado, hay que considerar la selectividad y sensibilidad que requiere el ensayo en los que se

utilizará, la estabilidad de las biomoléculas y el coste y la reproducibilidad de la construcción de las micromatrices (Sassolas *et al.*, 2012).

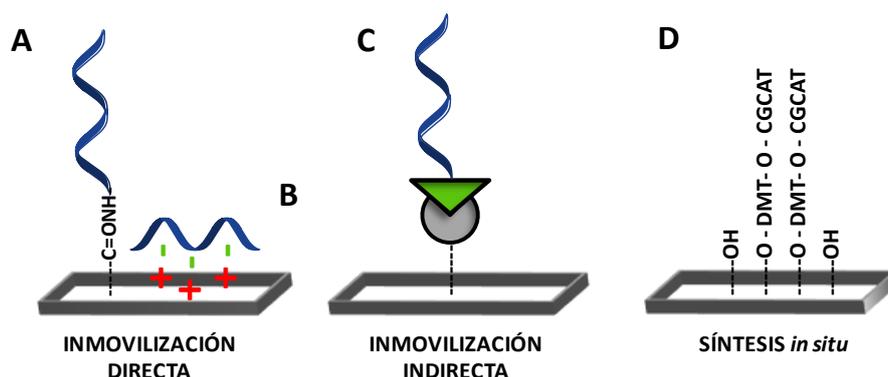


Fig. 2. Representación esquemática de los tipos de inmovilización de sondas de ADN en soportes sólidos. A) Inmovilización mediante enlace covalente; B) Inmovilización por adsorción; C) Inmovilización por afinidad; D) Síntesis *in situ* de las sondas sobre la superficie.

La técnica de fotolitografía para la síntesis *in situ* de sondas de ADN fue desarrollada en 1991 (Fodor *et al.*, 1991). Esta tecnología se basa en la reacción química de la fosforamidita, la cual consiste en la repetición de cuatro reacciones:

1. Generación grupos hidroxilo ($-OH$).
2. Unión de DMT (5'-O-4,4'-dimethoxytrityl) a los grupos hidroxilos generados, para proteger los monómeros de nucleofosforamidita.
3. Bloqueo de grupos hidroxilo libres.
4. Oxidación de los fosfitos internucleótidos para dar lugar a fosfatos triéster.

Al final de la síntesis, los grupos protectores en las bases y en los fosfotriésteres se eliminan por tratamiento con disolución acuosa concentrada de amoníaco. Para activar cada punto en el que se elonga la sonda, se irradia con luz UV a una longitud de onda de 365 nm. Para la activación selectiva, se emplean máscaras con patrones de puntos diferenciales, en función de qué puntos tienen que activarse y de cuáles no.

A partir de las etapas básicas de la reacción de la fosforamidita se han ido desarrollando otras metodologías que aumentan la eficacia de la síntesis y reducen los tiempos de ensayo. Un ejemplo de esto es la síntesis *in situ* utilizando técnicas de impresión o técnicas electroquímicas. La primera de ellas se basa en la impresión de cada reactivo necesario para la elongación de las sondas exclusivamente en el punto que tiene que elongar sobre la superficie tratada con compuestos hidrofóbicos de silano.

Por otra parte, las técnicas electroquímicas utilizan un sustrato que actúa como un chip semiconductor que contiene micromatrices de electrodos individuales. Los oligos se elongarán sólo en aquellos puntos en los que se generen grupos ácidos y estos sólo se generarán en aquellas electrodos que estén activos (Gao *et al.*, 2004).

Tabla 1. Tipos de enlace, ventajas y desventajas de inmovilización

	TIPO DE ENLACE	VENTAJAS	INCONVENIENTES
INMOVILIZACIÓN DIRECTA: UNIÓN COVALENTE	Unión entre un grupo funcional de la sonda de ADN y la superficie activa	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Unión estable ▪ Tiempo de respuesta corto 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Uso de reactivos peligrosos ▪ Unión irreversible.
INMOVILIZACIÓN DIRECTA: ADSORCIÓN	Fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas o puentes de hidrógeno	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sencilla ▪ Rápida ▪ No requiere moléculas intermediarias 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Baja reproducibilidad ▪ Orientación aleatoria ▪ Adsorción inespecífica ▪ Cambio conformacional
INMOVILIZACIÓN INDIRECTA: AFINIDAD	Unión por bioafinidad (estreptavidina-biotina)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inmovilización controlada y orientada ▪ Elevada especificidad y funcionalidad ▪ Reversible 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Requiere funcionalización previa ▪ Costosa ▪ Baja reproducibilidad ▪ Requiere instrumental de elevado coste
SÍNTESIS <i>in situ</i>	Generación de grupos hidroxilo (-OH) que reaccionan con los grupos fosfato de los dNTPs	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alta densidad de inmovilización ▪ Diseño <i>in situ</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Necesarios protocolos adecuados para asegurar la calidad de los resultados ▪ Longitud limitada de las sondas

Las técnicas de síntesis *in situ* requieren metodologías tediosas y, en algunos casos, equipos caros que dificultan su uso. Por estas razones, la inmovilización de sondas pre-sintetizadas es un método de inmovilización más extendido.

La inmovilización directa de las sondas puede ser de dos tipos: covalente y por adsorción. La inmovilización covalente se basa en el anclaje de las sondas funcionalizadas con grupos reactivos por reacción con la superficie activa. En la Tabla 2 se muestran los grupos reactivos más comúnmente empleados para la inmovilización covalente de sondas de ADN en superficies sólidas. En general, el enlace covalente genera un anclaje fuerte y estable, lo que hace que sea muy utilizado en el desarrollo de *microarrays* de ADN.

La inmovilización por adsorción es un tipo de anclaje reversible ya que intervienen enlaces débiles como fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas o puentes de hidrógeno entre las cargas negativas de las sondas de ADN y cargas positivas de la superficie. Esto hace que sea muy sensible a cambios de pH o temperatura (Mohamad *et al.*, 2015). A pesar de los inconvenientes que presenta frente a la unión covalente, se trata de una metodología sencilla y versátil.

La inmovilización indirecta consiste en emplear un elemento que sirve de unión entre la superficie y la sonda. Este elemento sirve como brazo espaciador entre ambos, reduciendo los impedimentos estéricos y aumentando la eficacia de la hibridación (Nimse *et al.*, 2014). Este elemento intermedio puede ser dos moléculas que presenten entre sí elevada afinidad, como la estreptavidina y la biotina. Así, una se ancla en la superficie y la otra al extremo de la sonda por la que se quiere inmovilizar. La interacción de ambas moléculas generará una unión fuerte tipo covalente ya que la constante de afinidad de la interacción estreptavidina-biotina es elevada (Sassolas *et al.*, 2012).

Tabla 2. Grupos reactivos utilizados en la construcción de *arrays* de ADN (Nimse *et al.*, 2014)

GRUPOS REACTIVOS SUPERFICIE	MODIFICACIÓN Sonda ADN	ENLACE GENERADO	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Oro (Au)	Grupo tiol (-SH)	Enlace dativo	<ul style="list-style-type: none"> Interacción fuerte (quimiosorción) Monocapa 	<ul style="list-style-type: none"> Coste
Carboxilos (-COOH)	Grupo amino primario (-NH ₂)	Enlace amida (R-CO-NH-R')	<ul style="list-style-type: none"> Método simple Alta densidad de inmovilización 	<ul style="list-style-type: none"> Requiere reactivos intermediarios (EDC)
Aldehídos (-CHO)	Grupo amino primario (-NH ₂)	Enlace amida (base de Schiff) (R-CO-NH-R')	<ul style="list-style-type: none"> Método simple Alta densidad de inmovilización 	<ul style="list-style-type: none"> Etapas de reducción
Epoxi (-CHCH ₂ O)	Grupo amino primario (-NH ₂)	Enlace amida (R-CO-NH-R')	<ul style="list-style-type: none"> Fácil protocolo de inmovilización Estabilidad 	<ul style="list-style-type: none"> Reacción lenta Baja densidad de inmovilización
Isotiocianato (-N=C=S)	Grupo amino primario (-NH ₂)	Enlace amida (R-CO-NH-R')	<ul style="list-style-type: none"> Método simple Estabilidad 	<ul style="list-style-type: none"> Hibridaciones no específicas Largo tiempo de hibridación
Maleimida (-HC ₂ (CO) ₂ NH)	Grupo tiol (-SH)	Enlace carbono-azufre	<ul style="list-style-type: none"> Reacción rápida 	<ul style="list-style-type: none"> Degradación en disoluciones acuosas
Mercaptosilano (-Si-R-SH)	Grupo tiol (-SH)	Enlace disulfuro (R-S-S-R')	<ul style="list-style-type: none"> Estabilidad 	<ul style="list-style-type: none"> Interacciones no específicas

1.4 Sistema de marcaje de ADN

La detección de las sondas de ADN se puede realizar por marcaje o sin él. Las técnicas sin marcaje, también denominadas *label-free* en anglosajón, están adquiriendo cada día más protagonismo, ya que reduce el número de etapas, incrementando a su vez la sensibilidad del ensayo. Sin embargo, el material instrumental es más sofisticado y caro, haciendo que su uso sea reducido. Esta estrategia detecta sondas de ADN de forma indirecta, por ejemplo, por cambios en el índice de refracción o por métodos electroquímicos. Una de las técnicas más comúnmente empleada para la detección de ADN es la técnica SPR (Ermini *et al.*, 2012).

A pesar de las ventajas que suponen los ensayos libres de marcaje, las estrategias de detección con marcaje siguen siendo más habituales, sobre todo la detección luminiscente y la absorciométrica. La detección por radioactividad está en desuso por los motivos comentados anteriormente.

Actualmente, los fluoróforos más utilizados son los pertenecientes a la familia de las cianinas, comercializadas bajo el nombre de Cy3, Cy5, Alexa, ATTO, etc. El marcaje por fluorescencia es una técnica muy reproducible, flexible y de fácil manejo. En este sentido, los fluoróforos se comercializan como ésteres de N-hidroxisuccinimida con el fin de conjugarlos a proteínas y utilizarlos a su vez como reactivos auxiliares de detección. Sin embargo, requiere el uso de escáneres de alta resolución, lo que hace que la detección luminiscente sea relativamente

cara. Por otra parte, estos compuestos sufren mecanismos de *photobleaching* lo que afecta a la sensibilidad del ensayo, disminuyendo la relación señal-ruido.

Los productos de PCR se pueden marcar directamente en el proceso de amplificación, utilizando nucleótidos marcados. En la PCR cuantitativa o a tiempo real, por ejemplo, se suelen utilizar sondas marcadas con fluoróforos tipo Taqman, y en cada ciclo de amplificación, la señal de fluorescencia aumenta, indicando los números de copias generadas.

La detección absorciométrica es menos sensible que la luminiscente, pero más económica y versátil. Además, es muy apropiada para ácidos nucleicos en ensayos tipo *screening* o *point-of-care*, ya que permite detección visual sin necesidad de equipos instrumentales adicionales. Se basa en el uso de enzimas que catalizan la reacción de sustratos cromogénicos o quimioluminiscentes (GENOMA ESPAÑA / CIBT-FGUAM, 2002). Ejemplos de este tipo de detección se basan en el uso de enzimas (peroxidasas, fosfatasas, etc.) y sustratos colorimétricos (TMB, BCIP/NBT, etc) o nanopartículas de oro, plata, platino, etc., en presencia de iones inorgánicos y agentes reductores. Este tipo de detección indirecta requiere el uso de anticuerpos primarios y/o secundarios conjugados con enzimas o nanopartículas. Como resultados de la reacción se genera un precipitado insoluble cuya densidad óptica se relaciona directamente con el grado de reacción sonda/anti-sonda. Se trata en definitiva de metodologías de amplificación de la señal analítica con el fin de aumentar la sensibilidad del ensayo. ¡Error! Marcador no definido.

1.5 Electrónica de consumo

Una de las necesidades más importantes de las metodologías analíticas es la mejora de la sensibilidad, selectividad, rapidez y precio de los ensayos. En este sentido, los nuevos avances tecnológicos en imagen y computación han aumentado la calidad y cantidad de la investigación en genómica (Boppart and Richards-kortum, 2014; Urban, 2015). Además, el desarrollo de ensayos de *screening* masivo utilizando dispositivos tecnológicos de uso común ha hecho que el coste de la tecnología se reduzca considerablemente, haciendo de ellos metodologías de diagnóstico más accesibles tipo *point-of-care*.

La electrónica de consumo es el conjunto de equipos electrónicos utilizados de forma cotidiana para el entretenimiento, las comunicaciones o para desempeñar el trabajo diario. Dentro de este grupo se encuentran teléfonos móviles, cámaras digitales, ordenadores, reproductores y grabadores de videos, consolas, entre otros (Fig. 3).

Muchos han sido los grupos de investigación que han apostado por estos dispositivos para el desarrollo de sus líneas de investigación, desde que Kido propusiera ensayos de *microarrays*, utilizando como superficie discos compactos (CDs) (Kido *et al.*, 2000). Esa propuesta supuso una revolución en la tecnología de *microarrays* y fue seguida por la incorporación de escáneres, lectores de DVD/CD, cámaras digitales y de, incluso, teléfonos móviles para el análisis de los datos. Así en esta última década se han publicado numerosas aplicaciones que tenían como protagonistas CDs, DVDs o Blu-rays (Morais *et al.*, 2014). Todos ellos tenían en común el objetivo de desarrollar dispositivos *microarray* de bajo coste, sencillos y sin necesidad de equipos sofisticados para la recopilación de los resultados.



Fig. 3. Ejemplo del uso de la electrónica de consumo para el desarrollo de metodologías de diagnóstico más accesibles tipo *point-of-care*. Fotografía de un soporte de base policarbonato transparente como superficie analítica con microarrays de ADN y un teléfono móvil inteligente como sistema detector.

Los sistemas biosensores basados en la tecnología de disco compacto es un ejemplo del uso de equipos de electrónica de consumo aplicados a la detección de ADN. En este sentido, el grupo de investigación señal y medida (SyM) del centro de investigación tecnológico y desarrollo molecular (IDM) de la UPV ha puesto a punto un sistema de lectura de micromatrices que integra el reconocimiento biomolecular en la superficie de un disco compacto y la detección mediante un grabador de discos comercial. Los ensayos realizados sobre esta plataforma se llevan a cabo en formato micromatriz, minimizando el gasto de reactivos y reduciendo considerablemente los tiempos de ensayo. El principio de los ensayos se basa en generar un producto que como resultado del ensayo de hibridación con sondas complementarias modifique las propiedades ópticas del disco compacto, produciendo una señal detectable mediante el grabador de discos. Así, mientras que los métodos de lectura de resultados de *microarrays* de ADN convencionales se basan en la generación de señales ópticas debidas a marcadores absorciométricos y luminiscentes, los que utilizan tecnología de discos compactos se basan en la atenuación de la intensidad de la señal que detecta el cabezal óptico (fotodiodo) del grabador de discos debida a un precipitado que se produce como consecuencia del reconocimiento molecular sonda/anti-sonda. Los resultados de las investigaciones realizadas por el equipo de la UPV han permitido utilizar discos compactos comerciales como plataformas analíticas, utilizando sondas de ácidos nucleicos para la detección de virus vegetales (Morais *et al.*, 2006) y patógenos transmitidos por alimentos (T. Arnandis-Chover *et al.*, 2012).

La estructura base de los discos compactos está compuesta por policarbonato. Las características físicas del PC presentan múltiples ventajas para su uso como plataforma analítica. Como se ha comentado anteriormente, se trata de un plástico muy hidrofóbico, con gran resistencia y estabilidad a altas temperaturas. Además de sus buenas propiedades ópticas, es fácilmente derivatizable químicamente. Asimismo, los discos compactos son accesibles, se producen en masa y por lo tanto se comercializan a precios muy competitivos.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de un sistema biosensor para la detección directa de ADN genómico en formato de micromatriz sobre soportes poliméricos derivados de la industria audio-video. Para conseguir este desarrollo, se plantean los objetivos concretos siguientes:

- 1) Activación y funcionalización química de la superficie de policarbonato de un disco compacto para la inmovilización covalente de sondas de ADN
- 2) Puesta a punto de un método de amplificación de señal basado en el sistema tiramida
- 3) Desarrollo de una metodología de fragmentación y biotilación masiva de ADN genómico

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos e inmunorreactivos

Hidróxido de sodio (NaOH), MES monohidratado, 99+%, reactivo EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida), cloruro de sodio (NaCl), citrato tri-sódico dihidratado, formamida, anticuerpo anti-conejo-IgG marcado con oro y las disoluciones de revelado fueron suministrados por Sigma-Aldrich Química (Madrid). Los anticuerpos policlonales primario anti-digoxigenina de oveja, secundario anti-oveja marcado con HRP de conejo, anti-digoxigenina-HRP monoclonal de ratón, primario anti-digoxigenina de conejo, anti-biotina-HRP policlonal de conejo y primario anti-biotina policlonal de conejo fueron adquiridos a Abcam.

En la Tabla 3 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Todos fueron suministrados por Sigma-Aldrich Química (Madrid).

Tabla 3. Secuencias y modificaciones de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos

OLIGO	SECUENCIA (5'-3')	Modificación 5'	Modificación 3'
BEA-1	AGGGTCGTACACCGGCTGTAATCAA	Digoxigenina	-
BEA-2	AGGGTCGTACACCGGCTGTAATCAA	Biotina	-
BEA-4	(T) ₁₀ TTTGATTACAGCCGGTGTACGACCCT	NH ₂	-
BEA-5	(T) ₁₀ TTCCATTGCTTTTTTGTATTACAGCCGGTGTACGACCCT	NH ₂	-
BEA-6	(T) ₁₀ CTTACCTGTTCTTCCATTGCTTTTTTGTATTACAGCCGGTGTACGACCCT	NH ₂	-
BEA-7	(T) ₁₀ TCTTCCAGTTGCTTACCTTGTCTTCCATTGCTTTT TTGATTACAGCCGGTGTACGACCCT	NH ₂	-
BEA-8	(T) ₁₀ TTTGATTACAGCCGGTGTACGACCCT	NH ₂	Cy5
BEA-9	TTCCAGTTGCTTACCTTGTCTTCCA	-	-
BEA-10	ACTGGTCGATCG-C ₇	Biotina	NH ₂
BEA-11	TTCACGCCGATAACTCTGTCTCT	NH ₂	-
BEA-12	TACCAAAGCTAAACGCGCAGCT	-	-

Para la amplificación de ADN genómico por PCR, los reactivos que se utilizaron fueron Taq ADN polimerasa, desoxirribonucleótidos (dNTPs), digoxigenina-dUTPs, los cebadores BEA-12 (*forward*) y BEA-9 (*reverse*) de la Tabla 3, tampón Tris-KCl 1× (pH 8.3) con MgCl₂ (100 mM). Todos fueron adquiridos a Roche (Mannheim, Alemania) y la reacción se llevó a cabo en un termociclador VWR modelo *unicycler*.

La extracción de ADN de cultivos puros de *Salmonella spp.* se llevó a cabo utilizando el kit de purificación PureLink® Genomic DNA (Invitrogen, Life Technologies).

La agarosa para los geles de electroforesis fue proporcionada por Fisher Bioreagents. Para amplificar la señal se utilizó el kit TSA™ Plus Biotin de PerkinElmer, Inc. (Waltham, MA USA).

Los tampones utilizados fueron: SSC 20× (cloruro sódico 90 mM, citrato sódico 9 mM, pH 7,0); PBS 1× (fosfato sódico dibásico 0,8 mM, fosfato potásico monobásico 2 mM, cloruro sódico 137 mM y cloruro potásico 2,7 mM, pH 7,5); PBS-T 1× (PBS 1× con Tween 20 al 0,05 %); MES 0,1 M pH 5,5.

Los discos compactos DVD se leen con un prototipo lector desarrollado por el grupo de investigación (Super-multi, LG) y los discos transparentes mediante la cámara de un teléfono móvil inteligente. La lectura de la fluorescencia se realizó con una cámara CCD de alta sensibilidad Retiga EXi de Qimaging Inc. (Burnaby, Canadá) la cual tiene acoplados LEDs monocromáticos ($\lambda = 633 \text{ nm}$) (Toshiba TLOH157P) como fuente de luz para la excitación de los fluoróforos.

3.2 Activación química de policarbonato e inmovilización de sondas

Las superficies de PC fueron discos DVDs y transparentes de (MPO Ibérica, Madrid, España). La superficie de PC (Fig. 4) se irradia durante 10 min con luz UV (254 nm , 50 mW/cm^2), utilizando un equipo *UV-ozone cleaning system* de FHR (Ottendorf, Okilla, Alemania). A continuación, la superficie se sumerge en una disolución 1M de NaOH a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min. Estos tratamientos generan carboxilatos en la superficie. Posteriormente, el DVD se lava con agua destilada y se seca con aire comprimido. La medida de los ángulos de contacto de las superficies se realizó con un microscopio DinoLite y el programa DinoCapture. La impresión de sondas sobre la superficie del disco se realiza dispensando 50 nL de oligonucleótidos utilizando un arrayer de líquidos automático (AD1500, Biodot. Inc., Irvine, CA, EEUU). Las sondas aminadas (50, 100, 200 y 400 nM) se preparan en tampón 0,1 M MES, pH 5,5 con EDC 20 mM y 10% de glicerol, y se imprimen en el disco en formato de micromatriz 4×4 . La reacción de las sondas aminadas con los grupos carboxílicos de la superficie activa tiene lugar mediante la reacción de la carbodiimida (Hermanson, 2008). El disco se deja incubar a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, el disco se lava con PBS-T y después con agua destilada para eliminar las sondas que no se han anclado covalentemente.

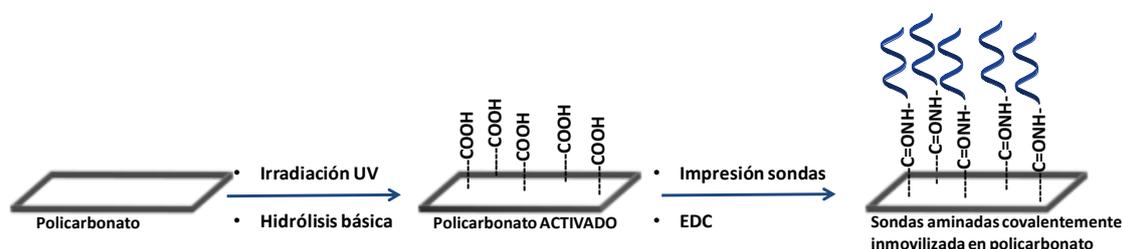


Fig. 4. Esquema del tratamiento de las superficies para el anclaje de las sondas aminadas

3.3 Ensayos de hibridación de oligonucleótidos

El ensayo de hibridación (Fig. 5) de la sonda inmovilizada con el oligo complementario tiene lugar en medio SSC $2\times$, pH 7,0. Para ello, se dispensan $30 \mu\text{L}$ de disolución de oligo complementario marcado con digoxigenina sobre cada matriz y la reacción se incuba a 37°C . Transcurridos 15 min, el disco se lava con PBS-T, se enjuaga con agua destilada y se seca con aire comprimido. A continuación, se dispensa 1,0 mL de la disolución detectora preparada en PBS-T, compuesto por anticuerpo anti-digoxigenina (1:10.000) y anticuerpo secundario marcado con oro (1:100). La reacción se deja incubar durante 15 min. Luego el disco se lava como antes y se dispensa 1,0 mL de disolución de amplificación (silver enhancer A y silver enhancer B 1:1 (v/v)) y se deja incubar durante 8 min. La reacción se para lavando el disco con agua. La disolución de amplificación genera un precipitado de plata (Ag^0). Los discos se leen con el prototipo lector de DVDs o con la cámara de un teléfono móvil y las imágenes obtenidas

se procesan con un programa de tratamiento de imágenes desarrollado por el grupo de investigación.

El principio de detección con un lector de DVD se basa en registrar la intensidad de luz reflejada por la capa metálica del disco por medio del fotodiodo del cabezal del grabador. Cualquier alteración de las propiedades ópticas del disco modifica la intensidad de luz reflejada por este, atenuando la señal detectada por el fotodiodo. Esta atenuación de la señal reflejada se relaciona directamente con la concentración de analito, causante de la alteración de las propiedades del disco.

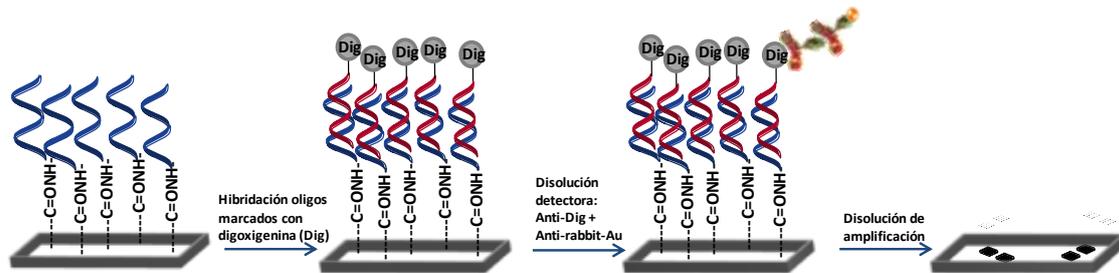


Fig. 5. Esquema del ensayo de hibridación con oligonucleótidos

3.4 Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico (Fig. 6) se emplea el kit de PureLink® de Invitrogen. Se parte de 1-4 mL de cultivos con una concentración superior a 10^6 unidades formadoras de colonias por mL (CFU/mL). Las muestras se centrifugan 5 min a 10.000 rpm para precipitar las células y descartar el sobrenadante. El pellet de células se resuspende en 180 μ L de tampón de digestión y 20 μ L de proteinasa K para lisar las células. La reacción se incuba a 55°C durante 2 h. Tras esto, se añade 20 μ L de RNasa A y se incuba a temperatura ambiente durante 2 min. Después, se añade 200 μ L de tampón de lisis y de unión y 200 μ L de etanol 96%. Añadidos todos estos compuestos, se pasa la muestra a las columnas de extracción del kit y se sigue el protocolo proporcionado por Invitrogen.



Fig. 6. Esquema del protocolo de extracción de ADN genómico

3.5 Amplificación por PCR

Los reactivos utilizados en la PCR y sus concentraciones iniciales y finales se recogen en la Tabla 4. Para poder detectar los productos de PCR en los ensayos de hibridación, se utilizan dUTPs marcados con digoxigenina. Se utiliza un volumen de reacción de 25 μ L, en el que se incluyen 2 μ L de ADN molde. Las concentraciones de ADN molde empleadas en este trabajo fueron 0,02; 0,31; 1,25 y 5,0 ng/ μ L. La preparación de las muestras se realiza en una cabina de flujo laminar, para evitar la contaminación de las mismas.

Los volúmenes de cada reactivo para la reacción MIX fueron: 16,5 μ L de agua destilada esterilizada; 2,5 μ L de tampón Tris-KCl 1x pH 8.3 con MgCl₂; 0,5 μ L de dNTPs; 0,5 μ L de dUTPs;

1 µL cebador BEA-12; 1 µL cebador BEA-9; y 1 µL Taq polimerasa. El último componente que se añade es el ADN molde, justo antes de introducir las muestras al termociclador. La reacción se lleva a cabo en tubos *Eppendorf* de 0,2 mL.

El programa utilizado para el proceso de amplificación consistió en 40 ciclos de desnaturalización (95°C)- hibridación de los cebadores (60°C) –elongación (80°C) de 30 segundos cada una. Tras esto, se realiza la etapa de elongación final, que consiste en 10 min a 70 °C. Finalizada la reacción, las muestras se conservan a 4°C, hasta su uso.

Tabla 4. Concentraciones iniciales y de reacción de los reactivos de PCR

	[STOCK]	[REACCIÓN]
Tris-KCl 1× pH 8.3 con MgCl₂	10 ×	1 ×
dNTPs	10 mM	200 µM
dUTPs	1 mM	20 µM
Cebador forward	10 µM	400 nM
Cebador reverse	10 µM	400 nM
Taq polimerasa	1 U/ µL	1U/25 µL

3.6 Hibridación de productos de PCR

La hibridación de los productos de PCR se lleva a cabo en tampón SSC 2× con 20% de formamida. Los productos de PCR son fragmentos de ADN de doble cadena, por tanto, previamente a la hibridación, estos se desnaturalizan incubándolos durante 10 min a 95°C en tampón de hibridación. Tras los 10 min, el producto de PCR diluido en el tampón de hibridación se añade sobre las matrices (30 µL). A continuación se dejan incubar a 37°C. Transcurridos 15 min, el disco se lava con PBS-T, después con agua destilada y se seca con aire comprimido. Las etapas de detección y revelado se realizan como se ha descrito para el ensayo de hibridación de oligos complementarios.

3.7 Detección directa de ADN genómico

La detección directa de ADN genómico requiere la biotilación y fragmentación del mismo. La biotilación del ADN (Fig. 7) se realizó utilizando el kit EZ-Link® Psoralen-PEG₃-Biotin (Thermo Scientific) mediante irradiación con luz UV con una lámpara de una longitud de onda de 365 nm y una potencia de 4 W. La disolución de biotina se encuentra a una concentración de 20 mM y se utiliza a una concentración 200 µM (dilución 1:100). La muestra se irradia durante 30 min, manteniendo el tubo abierto y en baño de hielo. Pasado este tiempo, es necesario eliminar la biotina que no ha reaccionado. Para ello, el ADN biotilado se precipita empleando dos volúmenes de etanol 96% y acetato potásico 0,2 M.

Para comprobar que los fragmentos se han biotilado, se imprime con el arrayer de líquidos automático diferentes concentraciones de estreptavidina en tampón carbonato 0,1 M, pH 9,6 (40, 20, 10 y 5 mg/L) en formato de micromatriz (4 × 4) sobre la superficie de PC transparente. El chip se incuba a 37°C para que quede inmovilizada por adsorción en la superficie. Transcurrido 1 h, la superficie se lava con PBS-T, después con agua destilada y se seca con aire comprimido. Tras esto, se incuba cada matriz con 30 µL de la disolución de fragmentos biotilados en tampón PBS-T. La reacción se incuba durante 15 min a temperatura ambiente, después se lava con PBS-T, con agua destilada y se seca con aire comprimido. En este caso la

disolución detectora consiste 1,0 mL de estreptavidina marcada con HRP a una concentración 1:1000 en PBS-T. Se incuba durante 15 min a temperatura ambiente y se lava con PBS-T, agua destilada y se seca con aire comprimido. A continuación se añade 1,0 mL de TMB y se deja incubar durante 10 min, generando un precipitado azul en caso de que la biotilación del ADN haya sido satisfactoria. La reacción se para lavando con agua destilada.

La fragmentación del ADN genómico biotilado (Fig. 7) se lleva a cabo mediante la reacción Fenton con pequeñas modificaciones (Zhang *et al.*, 2001). Los reactivos utilizados en la fragmentación y sus concentraciones finales fueron 10 μ M complejo Fe(II)-EDTA, realizado mediante la mezcla de volúmenes iguales de 0,4 mM Fe(II) (preparado disolviendo en agua destilada sulfato hierro amónico $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$) y 0,8 mM EDTA; 0,06% peróxido de hidrógeno (H_2O_2); y 2 mM ascorbato sódico. La cantidad de ADN en la reacción fue 1 μ g en PBS 0,1 \times . La reacción se incuba a 95°C. Transcurridos 10 min, la reacción se para añadiendo tiourea y EDTA a una concentración final de 10 mM y 2 mM, respectivamente.

Los fragmentos de ADN (Fig.7) generados se purifican para eliminar el exceso de sales. Para ello se utilizan columnas del kit PCR Purification de Jena Bioscience (Jena, Alemania).

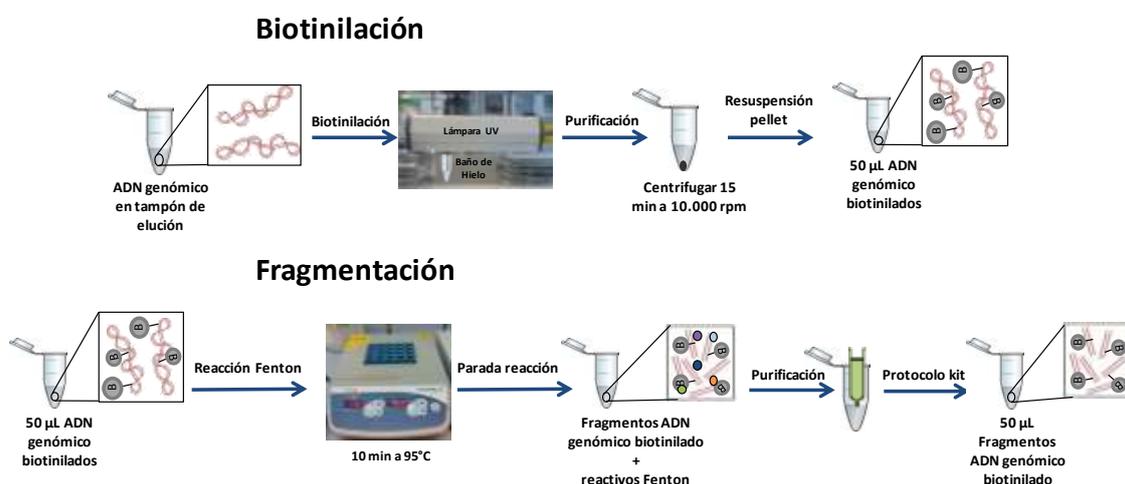


Fig. 7. Esquema del tratamiento del ADN genómico; desde la biotilación del ADN genómico, hasta la fragmentación del mismo.

Para comprobar el grado de fragmentación del ADN genómico, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2%, conteniendo una dilución del GelRed 1/5000 en TAE 1 \times (Tris 40 mM, ácido acético 19 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). Los pocillos se cargan con 1 ng de ADN. La electroforesis se lleva a cabo a 75 V durante 45 min.

3.8 Hibridación de ADN genómico, amplificación de la señal y revelado

La hibridación del ADN genómico se realiza en las mismas condiciones que la hibridación de los productos de PCR: tampón SSC 2 \times con 20% de formamida. Los fragmentos se desnaturalizan incubando las muestras en el tampón de hibridación 10 min a 95°C. La reacción de hibridación se lleva a cabo dispensando 30 μ L de la disolución de ADN genómico sobre las matrices y dejándola reaccionar a 37°C. Transcurridos, 15 min, el disco se lava, primero con PBS-T y después con agua destilada y se seca con aire comprimido.

La amplificación de la señal (Fig. 8) se realiza con el sistema tiramida, utilizando el kit TSA™ Plus Biotin. Las matrices se incuban con anti-biotina-HRP (1:500) durante 15 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se lava con PBS-T, se enjuaga con agua destilada y se seca con aire comprimido. El enzima HRP es la especie responsable de activar las moléculas de tiramida para que se unan a los residuos de tirosina próximos. La tiramida se incubaba a una dilución de 1:100, en el tampón proporcionado por el suministrador del kit. El volumen de reacción es 30 μ L y se incuban durante 10 min a temperatura ambiente. Tras esta etapa, el disco se lava con PBS-T, después con agua destilada y se seca con aire comprimido.

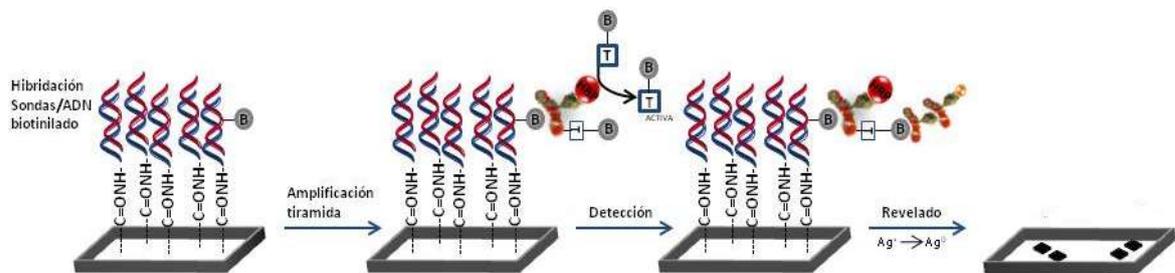


Fig. 8. Esquema del proceso de amplificación de señal, tras la hibridación de ADN genómico

El revelado de la interacción sonda/ADN genómico se lleva a cabo de la misma forma que con los productos de PCR, pero empleando anti-biotina en lugar de anti-digoxigenina. Los discos se leen con el prototipo lector de DVDs o con la cámara de un teléfono móvil y se procesan con el programa de tratamiento de imágenes.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Activación química de policarbonato

Uno de los objetivos del trabajo ha sido el anclaje covalente de sondas de ADN en la superficie de policarbonato (PC). El modo de anclaje habitual de sondas de ADN que viene empleando el grupo de investigación SyM de la UPV es la vía indirecta a través de la adsorción de estreptavidina en la superficie y biointeracción con oligonucleótidos modificados en uno de sus extremos con biotina. En el presente trabajo se pretende optimizar un método de anclaje covalente, directo y sencillo que supere en prestaciones a la inmovilización indirecta en cuanto a direccionalidad y densidad de inmovilización se refiere y que mantenga las propiedades mecánicas y ópticas de la superficie. La estrategia empleada consiste en generar carboxilatos en la superficie de PC (Fig. 9) que reaccionen con grupos amino presentes en las sondas de ADN modificadas por medio de la química de la carbodiimida. En la bibliografía se han descrito metodologías de modificación de policarbonato, algunas de ellas muy agresivas de modo que modifican las propiedades mecánicas y ópticas de la superficie haciendo inviable su aplicación al desarrollo de biosensores. Otras emplean reacciones químicas más suaves, como es el caso del tratamiento con plasma de oxígeno. Este tratamiento genera diferentes grupos oxigenados en la superficie de policarbonato, permitiendo el anclaje de sondas modificadas. Sin embargo, presenta el inconveniente de que requiere equipos caros. Además, puede sufrir el llamado efecto edad, que consiste en la pérdida progresiva de la capacidad de anclaje con el paso del tiempo. (Tamarit-López *et al*, 2011).

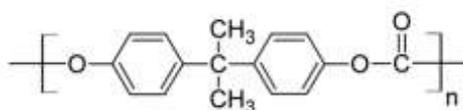


Fig. 9. Unidad de repetición del polímero policarbonato

La activación de la superficie de PC para generar carboxilatos se llevó a cabo mediante tres tratamientos: A) hidrólisis básica en baño con NaOH 1 M a 60 °C, B) irradiación con UV (254 nm), y C) combinación de los tratamientos A y B.

En primer lugar, se valoró la hidrofobicidad de la superficie realizando medidas de ángulo de contacto o de humectancia, añadiendo 10 µl de agua sobre el soporte, y de este modo poder evaluar así la posibilidad de realizar ensayos en formato de micromatriz. El ángulo de contacto del agua sobre la superficie de policarbonato sin tratar fue $88^\circ \pm 2$. En la Tabla 5 se recogen los ángulos de contacto de las superficies tratadas. El tratamiento A produjo una disminución del ángulo de contacto con respecto a la superficie sin tratar. Se observa también que el ángulo de contacto varió de 80° a 60° según el tiempo de duración, indicando que la superficie se convierte más hidrofílica a medida que la duración del tratamiento se prolonga. Sin embargo, cuando se irradia con UV, el ángulo de contacto disminuye drásticamente hasta 18° , generando una superficie muy hidrofílica. Por lo contrario, en caso de combinar ambos tratamientos, es decir, si tras la irradiación UV la superficie se sumerge en una disolución de hidróxido sódico 1 M a 60°C (tratamiento C), el ángulo de contacto obtenido fue 79° . Se observa, además, que no hay una diferencia significativa entre el post-tratamiento durante 15 min ($80^\circ \pm 5$) o 60 min ($72^\circ \pm 1$).

Tabla 5. Ángulo de contacto tras diferentes tratamientos de la superficie de PC. Tratamiento A) hidrólisis básica 1 M a 60°C durante 15, 30 y 60 min, A-15, A-30 y A-60, respectivamente; tratamiento B) irradiación UV durante 10 min, y tratamiento C (irradiación UV durante 10 min e hidrólisis básica (1 M, 60°C) durante 15, 30 y 60 min, C-15, C-30 y C-60, respectivamente.

Tratamiento	Ángulo de contacto (°)
A-15	80 ± 2
A-30	75 ± 5
A-60	60 ± 2
B	18 ± 1
C-15	80 ± 5
C-30	76 ± 1
C-60	72 ± 1

En base a estos resultados, se estudiaron con mayor profundidad los tratamientos A-30, B y C-30. Para valorar la efectividad de estos tratamientos, se realizaron ensayos de inmovilización, utilizando la sonda BEA-8. En este estudio se incluyó un nuevo tratamiento (D), hidrólisis básica 30 min a 60 °C seguido de 10 min de irradiación con UV, para comprobar la influencia del orden de los tratamientos en la eficacia de inmovilización de la sonda.

La Figura 10 muestra las imágenes resultantes de la medida de las matrices en cada superficie obtenidas con la cámara CCD. Las matrices obtenidas de los tratamientos A-30 y C-30 presentan mejor resolución que las de los tratamientos B y D. Las matrices que resultan de estos últimos tratamientos no muestran separación entre los puntos, consecuencia de la elevada hidrofiliencia de la superficie. Con el tratamiento A-30 se obtiene una matriz con puntos bien diferenciados, pero poco homogéneos si se comparan con los puntos de la matriz del tratamiento C-30. Al analizar los datos de fluorescencia, se obtuvo una señal de fluorescencia media, como resultado de la inmovilización de la sonda BEA-8, de 22.290 y 14.650 unidades arbitrarias con el tratamiento C-30 y A-30, respectivamente. A partir de estos resultados se concluye que el mejor tratamiento para anclar sondas aminadas es la irradiación UV de la superficie durante 10 min e hidrólisis básica (1 M, 60°C) durante 30 min (tratamiento C-30).

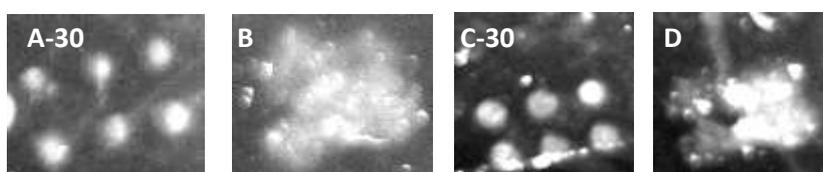


Fig. 10. Imágenes de las matrices impresas resultantes de los diferentes tratamientos

4.2 Inmovilización covalente de sondas aminadas

Los ensayos de optimización de la etapa de inmovilización se realizaron inmovilizando la sonda BEA-8. Las variables objeto de estudio fueron el tiempo de reacción, concentración de sonda y pH del medio de reacción. La detección se realizó utilizando una cámara CCD.

4.2.1. Tiempo de reacción

El tiempo de reacción para la inmovilización de las sondas se optimizó imprimiendo 8 matrices de 4 por 4 puntos cada uno sobre policarbonato transparente cortado en forma de chip (2,5 ×

6,0 cm). Cada columna de la matriz correspondía a una concentración de oligo BEA-8 (12,5; 25; 50; y 100 nM). El chip se dividió en cuatro zonas, en cada una de ellas se incubó la reacción un tiempo diferente: 15, 30, 60 y 120 min.

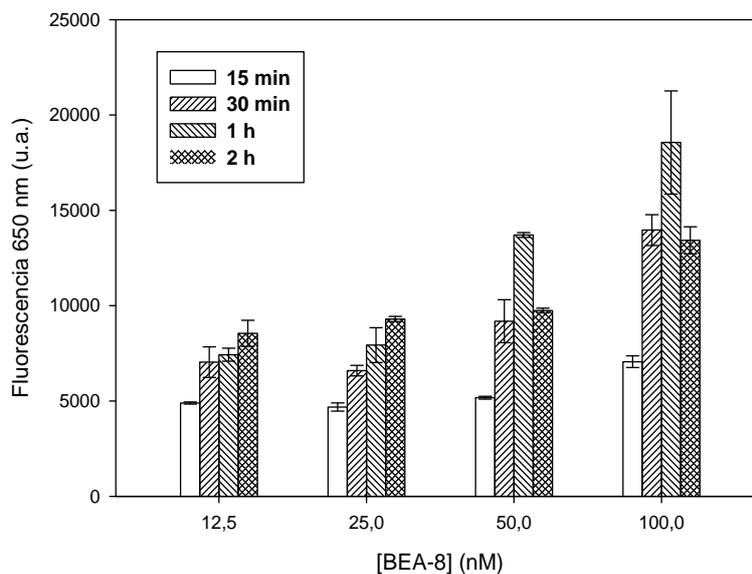


Fig. 11. Representación de las señales de fluorescencia para cada concentración de oligo inmovilizado y diferentes tiempos de reacción

En la Figura 11, se observa que las señales de fluorescencia aumentan a medida que la concentración de oligo inmovilizado es mayor. Las señales obtenidas al incubarse la reacción de inmovilización durante 2 h, sin embargo, no muestran diferencias significativas al aumentar la concentración de sonda anclada de 12,5 nM a 50 nM (Tabla anexos 1). Únicamente, se observan diferencias significativas a altas concentraciones de sonda BEA-8. Al incubarse la reacción durante 1 h, las diferencias entre las señales obtenidas con diferentes concentraciones de sonda inmovilizada sí son significativas. En los ensayos en los que la reacción se incubó durante 15 y 30 minutos, la señal es inferior al resto. Del análisis estadístico se obtiene un *p* valor (probabilidad de que la hipótesis nula sea cierta; si es menor que 0,05, se rechaza la hipótesis nula) inferior a 0,01, lo que validó los resultados observados (Tabla anexos 1). En base a esto, se estableció 1 h como tiempo óptimo para el anclaje de las sondas.

4.2.2. Efecto pH

El efecto del pH del tampón utilizado para la inmovilización de la sonda en la reacción carbodiimida se analizó imprimiendo el oligo BEA-8. Para ello, se prepararon disoluciones del oligo en un intervalo de concentración 0,0625-2,0 μ M en diferentes tampones: 1) MES 0,1 M, pH 5,5; 2) PBS 1 \times pH 6,5; y 3) PBS 1 \times pH 7,5. Las señales de fluorescencia obtenidas se representan en la Figura 12.

De las señales de fluorescencia obtenidas (Fig. 12A) se deduce que estas son mayores cuando las sondas se imprimen en tampón MES 0,1 M, pH 5,5, siendo ésta máxima a una concentración de 1 μ M (señal 30.000 u.a.), mientras que en PBS a pH 6,5 y 7,5 y una concentración de 1 μ M se obtiene una señal relativamente inferior, 10.000 y 5.000 respectivamente. El análisis estadístico confirma la diferencia entre las muestras, ya que la media de las señales de impresión en tampón MES pH 5,5 son significativamente diferentes a la media de las señales en tampón PBS pH 6,5 y PBS 7,5, estas últimas no mostrando

diferencias entre sí. El *p* valor dio un valor inferior a 0,01, confirmando la diferencia entre las muestras (Tabla anexos 2).

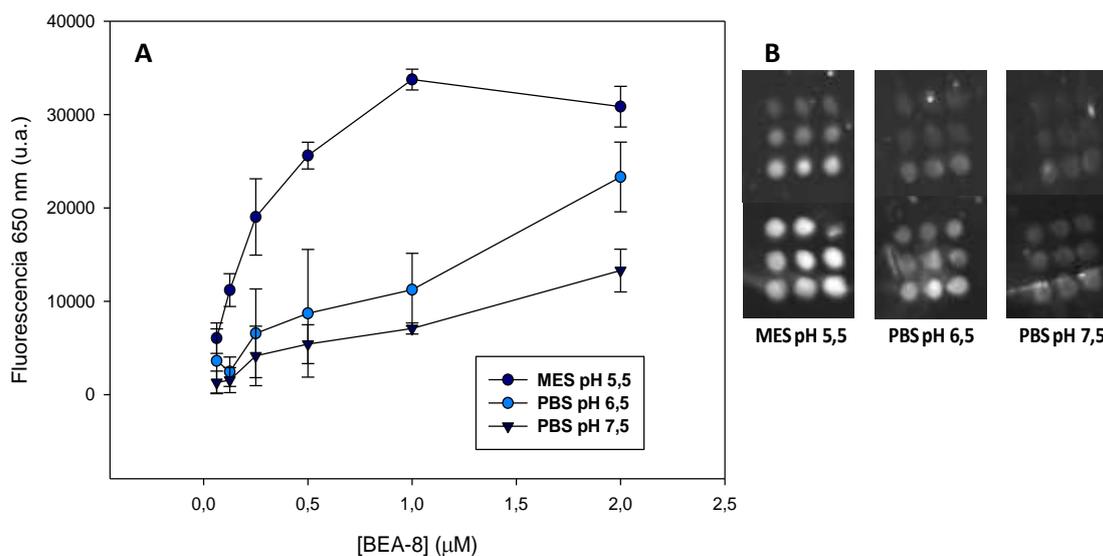


Fig. 12. Efecto del pH del tampón de impresión sobre la inmovilización de la sonda BEA-8. A) Señal de fluorescencia en función de la concentración de sonda; B) Imágenes de los chips. Los puntos de arriba hacia abajo corresponden con concentraciones de BEA-8 de 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 y 2,0 μM.

La Figura 12B recoge unas imágenes de fluorescencia obtenida con la cámara CCD representativas del efecto del pH del tampón de reacción durante la inmovilización de la sonda BEA-8. En estas se observa que los puntos más uniformes y homogéneos son los de las matrices del tampón MES pH 5,5, apreciándose un gradiente entre las diferentes concentraciones de oligo anclado. Esto último no ocurre en las matrices de los tampones PBS pH 6,5 y 7,5. Así, se concluye que el mejor tampón para los ensayos posteriores es el tampón MES 0,1 M, pH 5,5.

4.2.3. Recapitulación

Los ensayos anteriores permitieron obtener las mejores condiciones para la construcción del *microarray*, en cuanto a tratamiento de la superficie de PC, tiempo de reacción y tampón de impresión. El protocolo óptimo establecido consistió en: 1) irradiación UV de la superficie durante 10 min seguido de 30 min de hidrólisis básica a 60 °C; 2) impresión de las sondas en tampón MES 0,1 M, pH 5,5, incubando la reacción durante 1 h a temperatura ambiente. Bajo estas condiciones se estudió la composición elemental de la superficie por XPS (espectroscopía fotoelectrónica de rayos X), para confirmar la formación del enlace amida entre las sondas y la superficie tratada (Tabla 6); y se realizó la recta de calibrado con el oligo BEA-8 para obtener la relación entre concentración de sonda inmovilizada y señal emitida y poder estimar así la densidad de inmovilización. La Figura 13 muestra la recta de calibrado que se calculó con la parte lineal de la curva, en concreto en el intervalo de concentraciones 200-1000 nM de oligo BEA-8 ($r^2 = 0,975$).

En la Tabla 6 se recogen los datos obtenidos del análisis por XPS. La superficie 1 es policarbonato sin tratar y la superficie 4 tratada (C-30) con sondas impresas en ausencia del reactivo EDC. Se puede observar que la superficie tratada con luz ultravioleta (superficie 2) es la que mayor porcentaje de oxígeno presenta, lo que explicaría la elevada hidrofilia de la superficie. La composición de la superficie 1 y de la superficie 4 es, prácticamente, similar.

Estos valores explican que la superficie recupere su hidrofobicidad al tratar con hidrólisis básica tras la irradiación con UV.

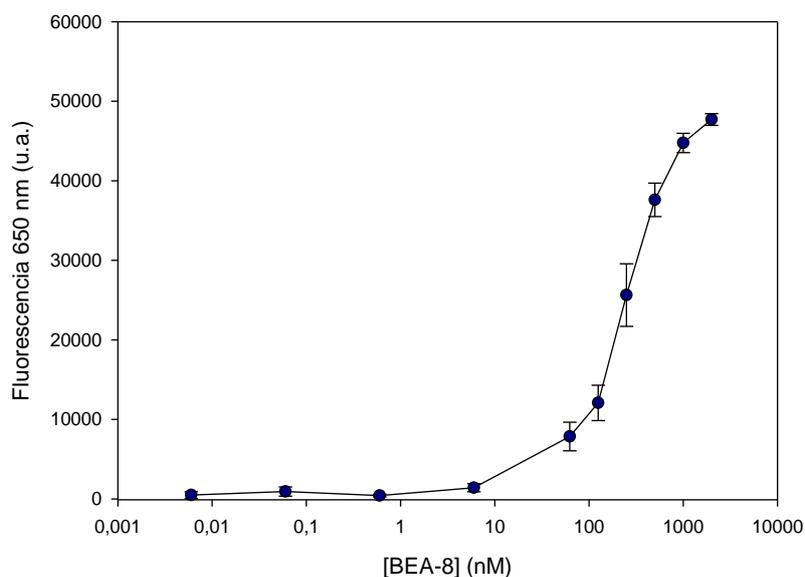


Fig. 13. Recta de calibrado oligo BEA-8

La diferencia entre los grupos carboxilatos de las superficies 1 y 4 es que en la primera estos no son reactivos, mientras que en la segunda sí, puesto que permiten el anclaje de las sondas aminadas en presencia del reactivo EDC, como demuestra la composición elemental de la superficie 3 (PC tratado con UV e hidrólisis básica y sondas aminadas impresas con EDC). En esta se observa, no sólo la presencia de oxígeno y carbono, sino también la de nitrógeno, procedente de los enlaces amida resultado de la química de la carbodiimida.

Tabla 6. Recopilación de los porcentajes de la composición elemental de superficies tratadas de diferente forma. La superficie 1 es PC sin tratar; la superficie 2 es PC tratado con UV; la superficie 3 es PC tratado con UV e hidrólisis básica y sondas aminadas impresas con EDC; la superficie 4 es PC tratado con UV e hidrólisis básica y con sondas aminadas impresas sin EDC.

Superficie	% O	% C	% N
1	13,81	86,19	-----
2	14,44	85,56	-----
3	12,45	84,68	2,87
4	13,47	86,53	-----

La densidad de inmovilización se calculó determinando la cantidad de oligo inmovilizado expresado en moles por unidad de superficie. En primer lugar, se realiza una curva de calibrado de oligo BEA-8 en el intervalo de concentración 6 pM-2,0 μM. Para ello, se dispensan 25 nL de las disoluciones de oligo en la superficie de PC transparente, se dejan secar y se determinó la señal de fluorescencia, siendo estas las máximas señales esperadas. Tras esto, se lava para eliminar el exceso de sonda y se vuelve a medir la señal de fluorescencia. Estas se interpola en la recta de calibrado y así se determina la concentración de sonda inmovilizada. Con este valor de concentración se calcularon los moles de sonda presentes en el punto, multiplicando por el volumen de gota (25 nL). Para calcular la superficie del punto se emplea la ecuación para el cálculo de la superficie de una circunferencia: $S = \pi \cdot r^2$. Por último, para

obtener la densidad de inmovilización se dividen los moles reales de sonda BEA-8 inmovilizados entre la superficie del punto. Así, se obtuvo que para una concentración de sonda impresa de 500 nM, la densidad de inmovilización fue 1,03 pmol/cm² y un rendimiento de inmovilización del 12,5%.

Esta densidad de inmovilización es ligeramente inferior a la descrita por otros autores utilizando soportes de plástico activados por UV-ozono (5 pmol/cm²) (Li *et al.*, 2007) o PMMA aminado (10 pmol/cm²) (Fixe *et al.*, 2004) o vidrios reactivos (11 pmol/cm²) (Gong *et al.*, 2006). Sin embargo, una alta densidad de inmovilización no garantiza ensayos de mayor sensibilidad, ya que puede traducirse en impedimentos estéricos en los ensayos de hibridación de secuencias de ADN complementarias.

4.3 Ensayos de hibridación

La etapa de hibridación se optimizó empleando el oligonucleótido complementario marcado con digoxigenina (BEA-1), siendo la sonda inmovilizada BEA-5 a 500 nM, y con productos de PCR marcados con digoxigenina.

El primer paso para la optimización de la etapa de hibridación fue la elección del tampón de hibridación. Esta se realizó utilizando diferentes tampones de hibridación: PBS 1×, PBS-T, PBS 1× con 20% formamida, SSC 2×, SSC 2× con 20% formamida. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14. En ella se puede observar que el mejor resultado, en cuanto a mayor señal analítica se refiere, se obtiene en ensayos de hibridación con tampón SSC 2× con 20 % de formamida. Con los tampones PBS 1× y PBS 1× con formamida, por el contrario, la señal es 3 veces menor que con el tampón SSC 2× con formamida. Debido a esto, estos dos últimos tampones se descartaron. Los tampones PBS-T y SSC 2×, al igual que los tampones anteriores, generan una señal muy inferior a la obtenida con el tampón SSC 2× con formamida. Por esta razón también se descartaron. Estas diferencias se validaron con el análisis estadístico (*p*-valor < 0,01) (Tabla anexos 3). Así, se seleccionó como tampón de hibridación SSC 2× conteniendo 20% formamida.

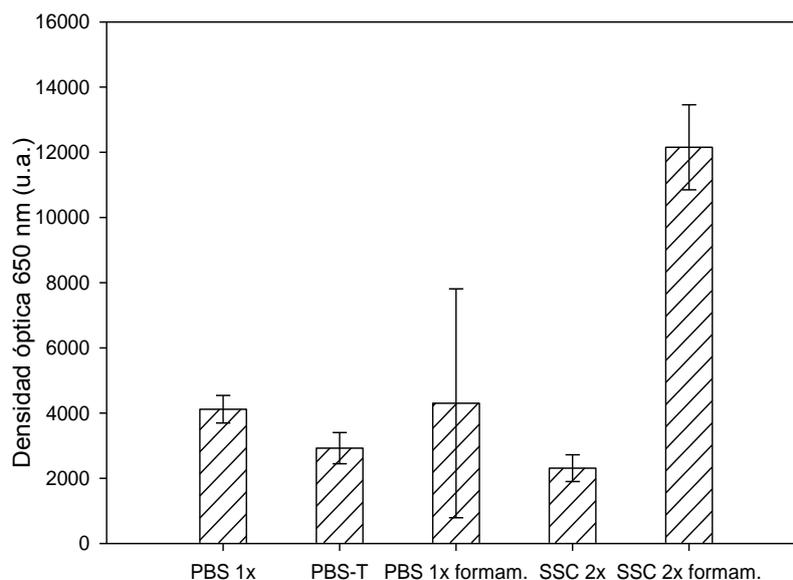


Fig. 14. Efecto de la composición del tampón de hibridación en la señal analítica

La formamida es una amida derivada del ácido fórmico. Esta estabiliza las cadenas de ADN desnaturalizadas (Blake and Delcourt, 1996). Debido a esto, favorece la hibridación específica. La elevada concentración de sonda inmovilizada y la restricción de la formamida a la hibridación de las cadenas hacen que sólo las cadenas 100% complementarias hibriden. Para comprobar el porcentaje óptimo de formamida, se realizó el ensayo de hibridación con productos de PCR en tampón SSC 2× y diferentes porcentajes de esta.

Este estudio mostró diferencias en las señales generadas por cada porcentaje de formamida (Fig. 15). Estas diferencias resultaron significativas, al realizar el análisis estadístico (Tabla anexos 4), entre las muestras con un 10% y un 40% de formamida con las muestras que tan sólo contenían un 20% de formamida (*p valor* de 0,018). Las muestras con 10% y con 20% de formamida, como se puede observar en la Figura 16, presentan la misma tendencia al aumentar la dilución de ADN hibridada. Sin embargo, cuando la concentración de formamida es 40%, la señal generada disminuye en las muestras que contienen mayor concentración de ADN. Esto puede deberse a que la elevada concentración de formamida restringe en exceso la hibridación (Blake and Delcourt, 1996).

En base a los resultados obtenidos, se determinó que la composición óptima del tampón de hibridación era SSC 2× con 20% de formamida.

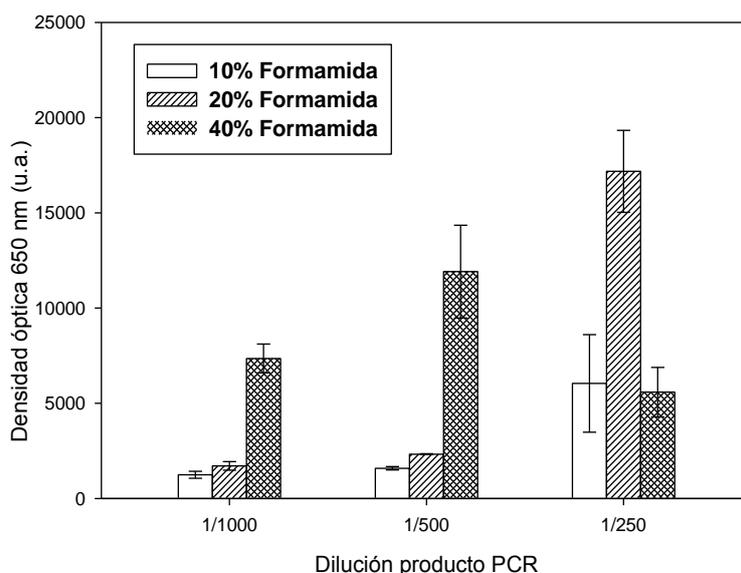


Fig. 15. Efecto de la concentración de formamida en el ensayo de hibridación de productos de PCR

4.3.1. Efecto de la longitud de la sonda inmovilizada

Una vez seleccionado el tampón de hibridación, se estudió el efecto de la longitud de las sondas inmovilizadas en la señal analítica del ensayo. Para ello, se llevó a cabo ensayos de hibridación con la sonda complementaria BEA-2.

Cómo se muestra en la Tabla 3, los oligonucleótidos BEA-4, BEA-5, BEA-6 y BEA-7 presentan la misma secuencia en la región próxima al extremo 3', pero difieren en longitud, , teniendo 26, 38, 50 y 62 nucleótidos, respectivamente. En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos. Se observa que a mayor longitud de oligo inmovilizado, mayor nivel de hibridación de la sonda BEA-2. Entre los oligos BEA-5, BEA-6 y BEA-7 la diferencia es mínima. Sin embargo, al comparar la señal de estos tres oligos con la señal del oligo BEA-4, la diferencia es

significativa, como mostró el análisis estadístico (p valor < 0,05) (Tabla anexos 5). En base a estos resultados, la sonda escogida para realizar ensayos de hibridación fue el oligo BEA-5 con una longitud de 38 nucleótidos.

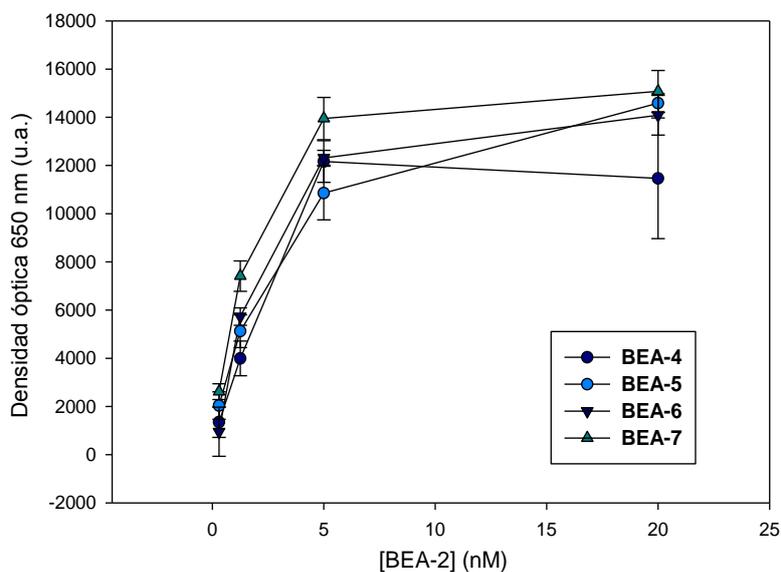


Fig. 16. Efecto de la longitud de la sonda inmovilizada en ensayos de hibridación con oligo complementario

4.3.2. Amplificación de la señal con el sistema tiramida

La detección directa de ADN genómico requiere que el ensayo presente una elevada sensibilidad ya que de partida no se cuenta con la amplificación del producto mediante PCR. Por ello, es necesario implementar un sistema de amplificación de señal que sea eficiente y sencillo, permitiendo la detección de ADN a bajas concentraciones. Así, en primer lugar se evaluó el sistema tiramida como método de amplificación de señal en el ensayo de hibridación con sondas complementarias. La Figura 17 muestra las señales obtenidas al hibridar el oligonucleótido BEA-1 en un intervalo de concentraciones de 0,02-1250 pM en presencia y ausencia de tiramida con la sonda inmovilizada BEA-5 (50 nM). Los datos del análisis estadístico se muestran en los anexos (Tabla anexos 6). Los resultados del ensayo mostraron diferencias entre la señal emitida al hibridar sin amplificar y amplificando con tiramida, hecho que confirmó el análisis estadístico. Así, las medias de las señales obtenidas sin amplificación eran significativamente diferentes a las amplificadas con el sistema tiramida (p valor < 0,01).

La sensibilidad del ensayo se determinó calculando el límite de detección (LD) del mismo. Este se define como la concentración obtenida a partir de la señal del blanco más 3 veces su desviación estándar, correspondiendo a una señal de 2500 unidades arbitrarias. En la Figura 18 se observa que la menor concentración del ensayo sin tiramida que supera la señal correspondiente al LD es 80 pM, mientras que la del ensayo con tiramida es 0,3 pM. Para calcular los valores exactos de sensibilidad de cada ensayo, se interpola entre la menor concentración que supera la señal del LD y la siguiente concentración que queda por debajo de ese valor. Así, se obtuvo que el LD para el ensayo con tiramida fue 0,14 pM y para el ensayo sin tiramida 57 pM. Esto supone un aumento de la sensibilidad de más de 2 órdenes de magnitud del ensayo con tiramida frente al que no incluía la etapa de amplificación de señal.

En comparación con otros estudios, el sistema desarrollado con tiramida es 600 veces más sensible que la aproximación basada en el anclaje covalente de sondas sobre superficie de policarbonato tratada con plasma de oxígeno (Tamarit-López *et al.*, 2011) que alcanza un límite de detección de 200 pM utilizando sondas complementarias.

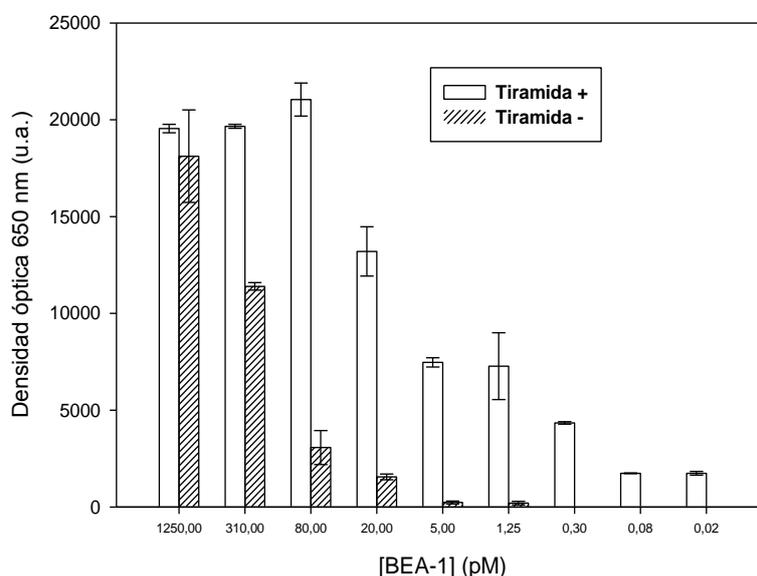


Fig. 17. Sensibilidad de los ensayos de hibridación con oligo complementario en presencia y ausencia del sistema de amplificación con tiramida

4.3.3. Hibridación de productos PCR (*Salmonella spp.*)

El efecto del sistema de amplificación de señal con tiramida se estudió también en ensayos de hibridación con productos de PCR, generados a partir de una concentración de ADN molde de 5,0 ng/μL. Para ello, del producto de amplificación obtenido se realizaron diluciones seriadas decimales y el ensayo de hibridación se efectuó sin amplificar y amplificando con tiramida. Este estudio se llevó a cabo inmovilizando la sonda específica de *Salmonella spp.* (BEA-5), un control positivo y varios controles negativos (Fig. 18A). En la Figura 18B se muestra las imágenes de las matrices obtenidas tras la hibridación y en la Figura 19 se muestran las señales obtenidas tras la hibridación de los productos de PCR. En esta última se observa diferencias entre las señales amplificadas con tiramida y las que no fueron amplificadas. Los resultados se verificaron con el análisis estadístico (Tabla anexo 7), que demostraron que la diferencia entre las medias de las señales obtenidas en presencia y en ausencia de tiramida eran significativas ($p < 0,01$). Además, mostraron que la media de las muestras más diluidas sin tiramida, 10^4 , 10^5 , 10^6 son similares a las muestras más concentradas sin tiramida, 10^3 , 10^4 . Esta diferencia se observa en el LD (concentración cuya señal es de 2500 u.a.), pues sin amplificación la menor concentración que supera la señal del LD es la dilución de amplicón $1/10^3$, mientras que al incluir la etapa de tiramida en el protocolo de hibridación, se detecta hasta una dilución de $1/10^5$. Este resultado corrobora que la estrategia de amplificación con tiramida aumenta en dos órdenes de magnitud la sensibilidad del ensayo de hibridación de productos de PCR.

El ensayo desarrollado permite detectar la dilución $1:10^5$ de una concentración de ADN molde de 5,0 ng/μL. Además, es destacable mencionar que los controles negativos no fueron detectables y la señal del control positivo reproducible entre ensayos ($< 12\%$).

Estimando que 10^4 CFU/mL contienen una concentración de ADN de aproximadamente 2 ng/ μ L, el ensayo con tiramida alcanza una sensibilidad de 0,25 CFU/mL, lo que significa un aumento de 4 veces respecto a otras aproximaciones basadas en la inmovilización covalente de sondas y ensayos de hibridación con sondas complementarias (Tamarit-López *et al.*, 2011).

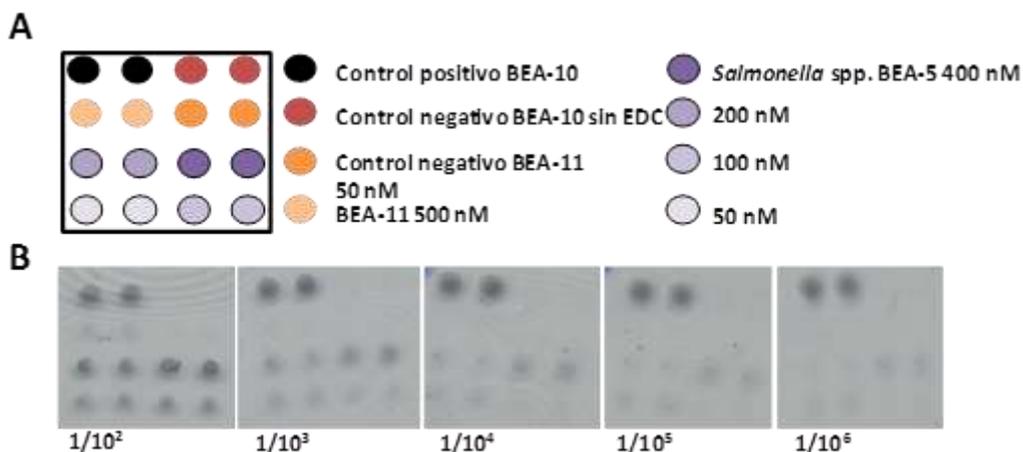


Fig. 18. Ensayo de hibridación con productos de PCR. A) Esquema de impresión; B) Matrices obtenidas al hibridar diferentes concentraciones de productos de PCR amplificando la señal con tiramida.

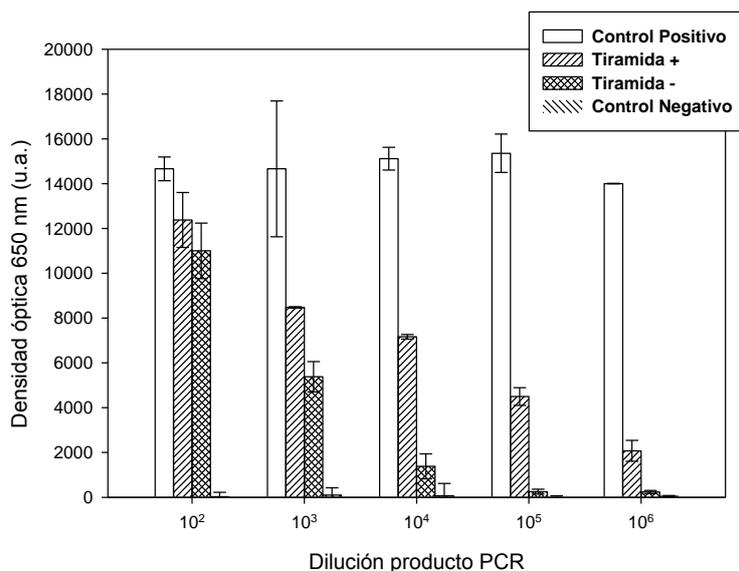


Fig. 19. Sensibilidad de los ensayos de hibridación con productos de PCR en presencia y ausencia del sistema de amplificación con tiramida

Una vez demostrado que la sensibilidad de los ensayos de hibridación con oligo complementario y con productos de PCR era mayor empleando el sistema tiramida, se abordó un estudio para determinar la menor concentración de ADN molde detectable en un ensayo con productos de PCR. Para ello, se prepararon diferentes productos de PCR a partir de concentraciones de ADN molde de 0,02; 0,31 y 1,25 ng/ μ L. En la Figura 20 se recogen las señales obtenidas al hibridar estos productos de PCR a diferentes diluciones (1/25-1/1600), tanto en presencia como en ausencia de tiramida. Por otro lado, la Tabla de anexos 8 muestra los datos del análisis estadístico. Estos revelan que existen diferencias significativas entre los ensayos de hibridación sin tiramida y los realizados con tiramida ($p < 0,01$). En la Figura 20 se puede observar que la sensibilidad del ensayo de hibridación (LD, menor concentración que produce una señal de 2500 u.a.) sin tiramida es de una dilución 1/100 para la muestra de 0,31

ng/μL. Estimando que 10^4 CFU/mL contiene una concentración de ADN de 2 ng/μL), esta aproximación permite detectar una concentración de 15 CFU/mL. Cuando se amplifica la señal con tiramida, se detecta hasta una dilución 1/1600 de la muestra de concentración de ADN molde de 0,02 ng/μL, lo que implica que el ensayo alcanza una sensibilidad de 0,0625 CFU/mL.

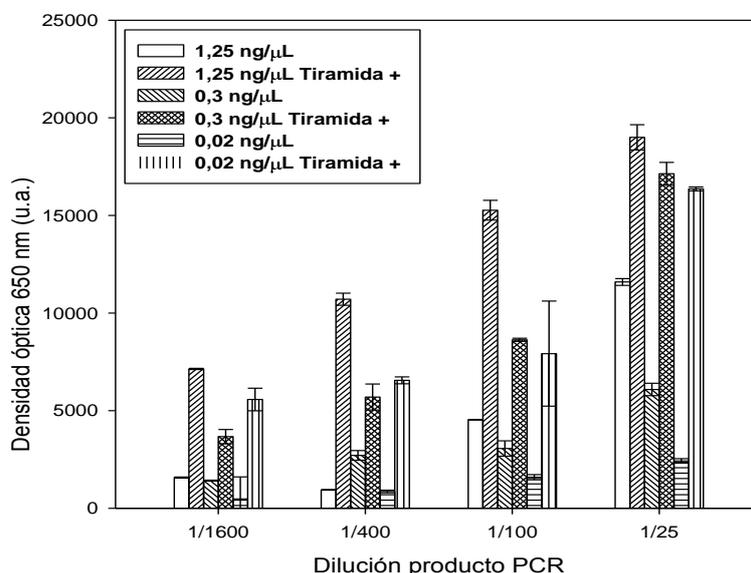


Fig. 20. Sensibilidad de los ensayos de hibridación con productos de PCR obtenidos a partir de diferentes concentraciones de ADN molde

4.4 Detección de ADN genómico

Los resultados obtenidos en los ensayos de hibridación con sondas complementarias y con productos de PCR empleando el sistema tiramida fueron prometedores. Por ello, se abordó el estudio de detección directa de ADN genómico de *Salmonella* spp. sin amplificar por PCR. El ensayo requiere biotilación y fragmentación del ADN genómico antes de incubar las muestras con las matrices impresas.

4.4.1. Fragmentación de ADN genómico: Reacción Fenton

La reacción Fenton es un método químico de fragmentación del ADN, que genera fragmentos al azar. El ADN se fragmenta por daño oxidativo: el complejo Fe(II)-EDTA reduce y rompe el enlace O-O de las moléculas de H₂O₂. Esto hace que se generen radicales -OH que provocan la rotura de las cadenas de ADN en sitios al azar; el ascorbato sódico se encarga de que el proceso anterior sea cíclico, puesto que reduce el complejo Fe(III)-EDTA a Fe(II)-EDTA, permitiendo la reacción del mismo con el H₂O₂. La reacción se para con tiourea y EDTA. La tiourea reduce los peróxidos a grupos diol, evitando que sigan reaccionando con el complejo Fe(II)-EDTA; y el EDTA en exceso hace que la reacción de formación del complejo se desplace a la izquierda, es decir, hace que los complejos Fe(II)-EDTA se disocien y la reacción se enriquezca en Fe(II) y EDTA libre (Hakenberg *et al.*, 2014).

La Figura 21 muestra el gel de electroforesis, realizado para comprobar si la reacción Fenton fragmentaba el ADN genómico de *Salmonella* spp. y para conocer el rango de tamaño de los fragmentos generados. En esta se observa que la combinación de la reacción Fenton y calor (95°C) durante 5-10 min produce la fragmentación del ADN genómico. Con sólo un minuto de

tratamiento (línea 1 Fig. 21) no es suficiente para generar fragmentos de entre 100 y 1000 nucleótidos. En la línea de la muestra tratada durante 10 min (línea 4 Fig. 21) se observa mayor concentración de fragmentos en el rango de 400-1000 nucleótidos, mientras que en la muestra tratada sólo durante 5 min (línea 3 Fig. 21) se obtiene en mayor concentración fragmentos de tamaño igual y superior a 1000 nucleótidos. La muestra tratada sólo con Fenton durante 10 min no mostró fragmentación. También se probó llevar a cabo el tratamiento a 60°C, en lugar de a 95°C, pero tampoco se observó fragmentación (datos no mostrados). Debido a esto, se concluyó que el mejor tratamiento era 10 min de reacción Fenton a 95°C.

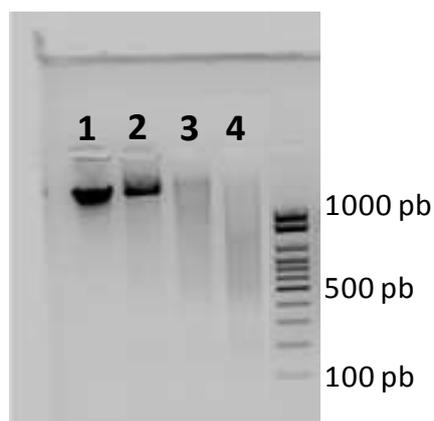


Fig. 21. Imagen del gel de electroforesis de ADN genómico de *Salmonella* spp. La línea 1 corresponde a ADN genómico de *Salmonella* spp. sin fragmentar; la línea 2 es ADN genómico tratado 1 min con la reacción Fenton a 95°C; la línea 3 es ADN genómico tratado 5 min con la reacción Fenton a 95°C; y la línea 4, ADN genómico tratado 10 min con la reacción Fenton a 95°C.

4.4.2. Hibridación de ADN genómico

El ensayo de hibridación con ADN genómico de *Salmonella* spp. se realizó tras la fragmentación y biotilación masiva de ADN genómico. En la Figura 22 se muestran los datos obtenidos. Como se observa la señal resultante del ensayo de hibridación de ADN genómico (dilución 1/10) es detectable, si bien no cuantificable, pues supera ligeramente la señal correspondiente al límite de detección pero no la de cuantificación, 2500 y 5000 u.a., respectivamente. No obstante, si bien estos resultados son preliminares se puede concluir que son muy prometedores, ya que muestran la posibilidad de detectar directamente ADN genómico sin pasar por la etapa de amplificación por PCR.

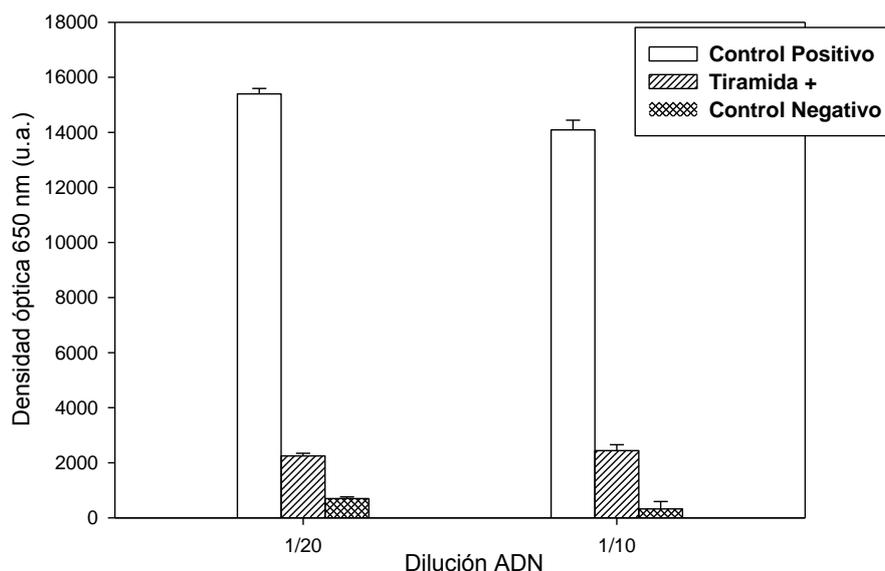


Fig. 22. Detección directa de ADN genómico en ensayos de hibridación empleando el sistema tiramida

4.4.3. Recapitulación

Los ensayos puestos a punto empleando el sistema tiramida demostraron alcanzar una elevada sensibilidad. La metodología propuesta permite la detección de una concentración de 0,3 pM de sonda complementaria, una dilución $1/10^5$ de productos de PCR de ADN molde de 5 ng/ μ L correspondiente a 0,25 CFU/mL, una dilución $1/1600$ de productos de PCR generados a partir de ADN molde de 0,02 ng/ μ L equivalente a la detección de 0,0625 CFU/mL y la detección directa de ADN genómico de *Salmonella* spp. Como se ha comentado, esta metodología mejora casi 1000 veces la sensibilidad en ensayos de hibridación con sondas complementarias en comparación con trabajos anteriores del grupo de investigación y entre 4 y 16 veces (según la concentración de ADN molde) en ensayos de hibridación con productos de PCR.

Para comprobar la especificidad de la sonda inmovilizada BEA-5, se hizo un alineamiento global y local frente al genoma de *E. coli* y de *Campylobacter* spp. En este análisis, se observó que la sonda inmovilizada alineaba con pequeñas regiones del genoma de dichas especies (alineamiento entre 5-20 nucleótidos). Teniendo en cuenta que el ensayo de hibridación tiene lugar en presencia de 20% de formamida, y que la sonda inmovilizada tiene una longitud de 38 nucleótidos, secuencias de ADN (80-100 nucleótidos) con una complementariedad de 5 a 20 nucleótidos no afectan a la selectividad del ensayo (T. Arandis-Chover *et al.*, 2012).

Los fragmentos generados con la química Fenton y calor oscilan entre 100 y 1000 nucleótidos, como se observa en la Figura 21. Sin embargo, esta metodología genera fragmentos al azar cuyo tamaño puede ser inferior al detectado en el gel de electroforesis, es decir, ADN que podría hibridar con un elevado porcentaje de complementariedad. Por otro lado, los fragmentos de mayor tamaño pueden contener en sus extremos regiones complementarias a las sondas inmovilizadas. Si la densidad de inmovilización es baja, no habrá ningún impedimento para que estos fragmentos puedan ser reconocidos por la sonda inmovilizada, a pesar del bajo porcentaje de complementariedad, dando lugar a falsos positivos. Por lo tanto, la selectividad del ensayo es aún un parámetro objeto de una experimentación y estudio más profundo.

5. CONCLUSIONES

De la realización del trabajo se han obtenido las siguientes conclusiones:

- 1) La activación química de policarbonato por irradiación UV e hidrólisis básica es un método rápido y sencillo que permite la inmovilización covalente y directa de sondas aminadas sin alterar las propiedades ópticas y mecánicas de la superficie analítica, alcanzando densidades de inmovilización óptimas para la detección de ADN genómico.
- 2) El uso del sistema de amplificación de señal con tiramida aumenta la sensibilidad del ensayo más de dos órdenes de magnitud, en comparación con los ensayos realizados en su ausencia, tanto en hibridación de sondas complementarias como con productos de PCR.
- 3) El sistema tiramida en ensayos de hibridación con productos de PCR permite la detección de amplicones generados a partir de concentraciones de ADN molde 250 veces menor que la habitualmente utilizada. Este hecho elimina la etapa limitante que supone la concentración de ADN en las muestras de partida.
- 4) La estrategia de fragmentación y biotilación masiva de ADN genómico implementada con el ensayo de hibridación con amplificación con tiramida permite la detección directa de ADN genómico.

En definitiva, se han sentado las bases para la detección directa de ADN genómico en soportes poliméricos, permitiendo obtener una respuesta analítica detectable, una simplificación de la metodología, y reducción del coste en comparación con el ensayo de ADN amplificado, utilizando un termociclador. El ensayo desarrollado en formato de micromatriz sobre un disco compacto es una herramienta analítica de bajo coste, tipo *point-of-care*, que utiliza metodologías de trabajo sencillas (fragmentación de ADN, biotilación, hibridación, etc.) y volúmenes reducidos de muestra y de reactivos y, por lo tanto, con potencial para ser aplicada en el campo clínico, ambiental y alimentario.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ABOYTES, K.; HUMPHREYS, J.; REIS, S.; AND WARD, B. (2003). Slide coating and DNA immobilization chemistries, en: *A Beginner's Guide to Microarrays*. Ed. Springer. Berlín, 1-41.
- AHN, S.; AND WALT, D. R. (2005). Detection of Salmonella spp. using microsphere-based, fiber-optic DNA microarrays. *Analytical Chemistry*, 77(15), 5041–5047.
- ARNANDIS-CHOVER, T.; MORAIS, S.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, M. A.; PUCHADES, R.; AND MAQUIEIRA, A. (2014). High density MicroArrays on Blu-ray discs for massive screening. *Biosensors and Bioelectronics*, 51, 109–114.
- ARNANDIS-CHOVER, T.; MORAIS, S.; TORTAJADA-GENARO, L. A.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, A.; BERGANZA, J.; AND OLABARRIA, G. (2012). Detection of food-borne pathogens with DNA arrays on disk. *Talanta*, 101, 405–412.
- ASIELLO, P. J.; AND BAEUMNER, A. J. (2011). Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review. *Lab on a Chip*, 11(8), 1420–1430.
- BAPTISTA, P. V.; KOZIOL-MONTEWKA, M.; PALUCH-OLEŚ, J.; DORIA, G.; AND FRANCO, R. (2006). Gold-nanoparticle-probe-based assay for rapid and direct detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in clinical samples [5]. *Clinical Chemistry*, 52(7), 1433–1434.
- BERTI, L.; ALESSANDRINI, A.; AND FACCI, P. (2005). DNA-Templated Photoinduced Silver Deposition. *J. Am. Chem. Soc.*, 127(32), 11216–11217.
- BLAKE, R. D.; AND DELCOURT, S. G. (1996). Thermodynamic effects of formamide on DNA stability. *Nucleic Acids Research*, 24(11), 2095–2103.
- BOBROW, M.N.; HARRIS, T.D.; SHAUGHNESSY, K.J.; AND LITT, G.J. (1989). Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification application to immunoassays. *Journal of Immunological Methods*, 125(1-2), 279-285.
- BOPPART, S. A.; AND RICHARDS-KORTUM, R. (2014). Point-of-care and point-of-procedure optical imaging technologies for primary care and global health, 6(253).
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; AND DAVIS, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314–331.
- BUCHWALOW, I. B.; AND BÖCKER, W. (2010). *Immuno- histochemistry: Basics and Methods*. Ed. Springer. Berlín. 153 pp.
- CHIEN, A.; EDGAR, D. B.; AND TRELA, J. M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, 127(3), 1550–1557.
- ERMINI, M. L.; MARIANI, S.; SCARANO, S.; AND MINUNNI, M. (2012). Direct detection of genomic DNA by surface plasmon resonance imaging: An optimized approach. *Biosensors and Bioelectronics*, 40(1), 193–199.
- ESCORIHUELA, J.; BAÑULS, M. J.; GRIJALVO, S.; ERITJA, R.; PUCHADES, R.; AND MAQUIEIRA, A. (2014). Direct covalent attachment of DNA microarrays by rapid thiol-ene “click” chemistry. *Bioconjugate Chemistry*, 25(3), 618–627.
- FIXE, F.; DUFVA, M.; TELLEMAN, P.; AND CHRISTENSEN, C.B.V. (2004). Functionalization of poly(methyl methacrylate) (PMMA) as a substrate for DNA microarrays. *Nucleic Acids Res.*, 32, e9.
- FODOR, S. P.; READ, J. L.; PIRRUNG, M. C.; STRYER, L.; LU, A.T.; AND SOLAS, D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 251(4995), 767–773.
- FRAGA, D.; MEULIA, T.; AND FENSTER, S. (2008). Real-Time PCR, en: *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. Ed. Wiley. EEUU, 10.3.1-10.3.34.
- GAO, X.; GULARI, E.; AND ZHOU, X. (2004). In Situ Synthesis of Oligonucleotide Microarrays. *Biopolymers*, 73(5), 579–596.

GENOMA ESPAÑA / CIBT-FGUAM. (2002). Microarrays y Biochips de ADN, Informe de Vigilancia Tecnológica.

GONG, P.; HARBERS, G.M.; AND GRAINGER, D.W. (2006). Multitechnique comparison of immobilized and hybridized oligonucleotide surface density on commercial amine-reactive microarray slides. *Anal. Chem.*, *78*, 2342-2351.

GOODRICH, T. T.; LEE, H. J.; AND CORN, R. M. (2004). Direct Detection of Genomic DNA by Enzymatically Amplified SPR Imaging Measurements of RNA Microarrays Direct Detection of Genomic DNA by Enzymatically Amplified SPR Imaging Measurements of RNA Microarrays. *Journal of the American Chemical Society*, 4086–4087.

GOPINATH, S. C. B.; AWAZU, K.; FUJIMAKI, M.; SHIMIZU, K.; MIZUTANI, W.; AND TSUKAGOSHI, K. (2012). Surface functionalization chemistries on highly sensitive silica-based sensor chips. *The Analyst*, *137*(15), 3520.

GUDNASON, H.; DUFVA, M.; BANG, D. D.; AND WOLFF, A. (2008). An inexpensive and simple method for thermally stable immobilization of DNA on an unmodified glass surface: UV linking of poly(T) 10-poly(C) 10-tagged DNA probes. *BioTechniques*, *45*(3), 261–271.

HAKENBERG, S.; HÜGLE, M.; MEYER, P.; BEHRMANN, O.; DAME, G.; AND URBAN, G. A. (2014). Fenton fragmentation for faster electrophoretic on chip purification of amplifiable genomic DNA. *Biosensors and Bioelectronics*, *67*, 49–52.

HERMASON, G.T. (2008). *Bioconjugate Techniques*. 2ª Ed. Academic Press. Londres. 1020 pp.

JUNG, Y. L.; JUNG, C.; PARK, J. H.; KIM, M. I.L; AND PARK, H. G. (2013). Direct detection of unamplified genomic DNA based on photo-induced silver ion reduction by DNA molecules. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, *49*(23), 2350–2.

KIDO, H.; MAQUIEIRA, A.; AND HAMMOCK, B. D. (2000). Disc-based immunoassay microarrays. *Analytica Chimica Acta*, *411*(1-2), 1–11.

KIMURA, N. (2006). One-step immobilization of poly(dT)-modified DNA onto non-modified plastic substrates by UV irradiation for microarrays. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *347*(2), 477–484.

LANGER, P.R.; WALDROP, A.A.; AND WARD, D.C. (1981). Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *78*(11), 6633-6637.

LI, Y.; WANG, Z.; OU, L. M. L.; AND YU, H. Z. (2007). DNA detection on plastic: Surface activation protocol to convert polycarbonate substrates to biochip platforms. *Analytical Chemistry*, *79*(2), 426–433.

LIANDRIS, E.; GAZOULI, M.; ANDREADOU, M.; ČOMOR, M.; ABAZOVIC, N.; SECHI, L. A.; AND IKONOMOPOULOS, J. (2009). Direct detection of unamplified DNA from pathogenic mycobacteria using DNA-derivatized gold nanoparticles. *Journal of Microbiological Methods*, *78*(3), 260–264.

MALCOLM, S. (1990). Recent advances in the molecular analysis of inherited disease. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *194*(2), 317–321.

MARIAN, A.J. (1995). Molecular Approaches for Screening of Genetic Diseases. *Impact of Basic Research on Tomorrow's Medicine*, *108*, 255-265.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; AND MONCANY, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *16*(1), 47–51.

MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; AND WAHAB, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *29*(2), 1–16.

MORAIS, S.; MARCO-MOLÉS, R.; PUCHADES, R.; AND MAQUIEIRA, A. (2006). DNA microarraying on compact disc surfaces. Application to the analysis of single nucleotide polymorphisms in Plum pox virus. *Chemical Communications*, (22), 2368–2370.

- MORAIS, S.; CARRASCOSA, J.; MIRA, D.; PUCHADES, R.; AND MAQUIEIRA, A. (2007). Microimmunoanalysis on standard compact discs to determine low abundant compounds. *Anal. Chem.* 79, 7628-7635.
- MORAIS, S.; TORTAJADA, A.; MAQUIEIRA, A. (2014). Array-on-a-disk? How Blu-ray technology can be applied to molecular diagnostics, *14(7)*, 773–775.
- MÜHLEGGGER, K.; BATZ, H.G.; BÖHM, S.; ELTZ, H. VD.; HÖLTKE, H.J.; AND KESSLER, C.H. (1988). Synthesis and use of new digoxigenin-labeled nucleotides in non-radioactive labeling and detection of nucleic acids. *Nucleosides and Nucleotides*, 8, 1161-1163.
- MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; AND ERLICH, H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, 263-273.
- NELSON, B. P.; GRIMSRUD, T. E.; LILES, M. R.; GOODMAN, R. M.; AND CORN, R. M. (2001). Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA and RNA hybridization adsorption onto DNA microarrays. *Analytical Chemistry*, 73(1), 1–7.
- NIMSE, S.; SONG, K.; SONAWANE, M.; SAYYED, D.; AND KIM, T. (2014). Immobilization Techniques for Microarray: Challenges and Applications. *Sensors*, 14(12), 22208–22229.
- PARDUE, M. L.; AND GALL, J. G. (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 64(2), 600–604.
- PARIDA, M.; SANNARANGAIAH, S.; DASH, P.K.; RAO, P.V.; AND MORITA, K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev. Med. Virol.*, 18(6), 407-21.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; AND GRAY, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(9), 2934–2938.
- POLLARD-KNIGHT, D. (1990). Current methods in nonradioactive nucleic acid labeling and detection. *Technique, a Journal of Methods in Cell and Molecular Biology*, 2(3), 113-132.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; AND ERLICH, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-91.
- SAIKRISHNAN, D.; GOYAL, M.; ROSSITER, S.; AND KUKOL, A. (2014). A cellulose-based bioassay for the colorimetric detection of pathogen DNA. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(30), 7887–7898.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; AND COULSON, A R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.
- SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; AND LECA-BOUVIER, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3), 489–511.
- SEO, S.-H.; LEE, Y.-R.; HO JEON, J.; HWANG, Y.-R.; PARK, P.-G.; AHN, D.-R.; ... HONG, K.-J. (2015). Highly sensitive detection of a bio-threat pathogen by gold nanoparticle-based oligonucleotide-linked immunosorbent assay. *Biosensors and Bioelectronics*, 64, 69–73.
- SMITH, H.O.; AND WILCOX, K.W. (1970). A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. *J. Mol. Biol.* 51(379).
- SOBRINO, B.; LAREU, M.; BRION, M.; AND CARRACEDO, A. (2004). SNP genotyping with single base extension-tag microarrays. *International Congress Series*, 1261, 331–333.
- SONG, L.; SHAN, D.; ZHAO, M.; PINK, B. A.; MINNEHAN, K. A.; YORK, L.; ... DUFFY, D. C. (2013). Direct detection of bacterial genomic DNA at sub-femtomolar concentrations using single molecule arrays. *Analytical Chemistry*, 85(3), 1932–1939.

- SOUTHERN, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98(3), 503-508.
- SPEEL, E. J. M.; HOPMAN, A. H. N.; AND KOMMINOTH, P. (2006). Tyramide Signal Amplification for DNA and mRNA *In Situ* Hybridization, en: *Methods in Molecular Biology*, 326, 3^aEd. Humana Press. 33-60.
- STEINBACH O.C.; AND RUPP, R.A. (1999). Quantitative analysis of mRNA levels in *Xenopus* embryos by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Methods Mol. Biol.*, 127, 41-56.
- TAMARIT-LÓPEZ, J.; MORAIS, S.; PUCHADES, R.; AND MAQUIEIRA, A. (2011A). Direct hapten-linked multiplexed immunoassays on polycarbonate surface. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 2694–2698.
- TAMARIT-LÓPEZ, J.; MORAIS, S.; PUCHADES, R.; AND MAQUIEIRA, A. (2011B). Oxygen plasma treated interactive polycarbonate DNA microarraying platform. *Bioconjugate Chemistry*, 22(12), 2573–2580.
- TANG, C. K.; VAZE, A.; AND RUSLING, J. F. (2012). Fabrication of immunosensor microwell arrays from gold compact discs for detection of cancer biomarker proteins. *Lab on a Chip*, 12(2), 281.
- URBAN, P. L. (2015). Universal electronics for miniature and automated chemical assays. *The Analyst*, 140(4), 963–975.
- VADGAMA, P.; AND CRUMP, P.W. (1992). Biosensors: Recent Trends. *Analyst*, 117, 1657-1670.
- WEN, Y.-M.; AND WANG, Y.-X. (2009). Biological features of hepatitis B virus isolates from patients based on full-length genomic analysis. *Reviews in Medical Virology*, 19(1), 57–64.
- ZHANG, Y.; PRINCE, B.D.; TETRADIS, S.; CHAKRABARTIS, S.; MAULIK, G.; AND MAKRIGIORGOS, G.M. (2001). Reproducible and inexpensive probe preparation for oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Research*, 29(13).