

DISEÑO DE NUEVOS MATERIALES DE AFINIDAD UNIVERSAL. APLICACIÓN EN SENSORES

MEMORIA PRESENTADA POR EMANUELA ZACCO
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS



Grup de Sensors & Biosensors
Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona
Bellaterra, diciembre de 2006

La presente tesis doctoral, titulada "*Diseño de Nuevos Materiales de Afinidad Universal. Aplicación en Sensores*", ha sido realizada en los laboratorios del Grup de Sensors i Biosensors del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, bajo la dirección del Profesor Salvador Alegret y de la Doctora María Isabel Pividori

Bellaterra, diciembre de 2006

Salvador Alegret
Catedrático de Química Analítica

María Isabel Pividori
Profesora

Este trabajo de investigación se ha realizado gracias a las siguientes ayudas institucionales:

Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Madrid.

Proyectos: "*Nuevas estrategias para el diseño de biosistemas analíticos integrados. Plataformas universales de afinidad y sistemas de automarcación para biosensores*" (BIO2004-02776) y "*Bioinstrumentación avanzada: Biosistemas analíticos integrados, biosensores y sensores biomiméticos aplicados a los campos medioambiental y alimentario*" (BIO2000-0681-C02-01)

Comisión Europea

Proyecto: "*Robust chemical sensors and biosensors for rapid on-line identification on freshly collected milk*" (ROSEPROMILK). Quality of life and Management Resources (Contract No. QLK1-CT-2001-01617)

Beca de la Generalitat de Catalunya 2003FI, 00455

La defensa pública de la tesis doctoral se llevará a cabo el día 18 de diciembre de 2006 en la Universitat Autònoma de Barcelona.

Me acuerdo el primer día que llegué al GSB, estaba nerviosa... no hablaba casi nada de Castellano y no entendía nada de Catalán, se me habló de sensores y biosensores... todo en aquel momento me pareció "incomprensible".

Antes de todo quiero agradecer mis directores de Tesis Salvador Alegret y Isabel Pividori por la gran posibilidad que me han ofrecido. Gracias por el esfuerzo y la dedicación que les ha supuesto la supervisión de este trabajo y a ambos les agradezco sinceramente, no sólo sus comentarios y aportaciones, sino también su paciencia. Gracias.

Hay mucha gente del GSB de la cual me siempre me acordaré con mucho cariño: Xavi, que miedo que me dabas al principio! has sido un compañero de laboratorio estupendo. Nuría, tus consejos siempre han sido muy valiosos, eres una persona muy capaz y creo que siempre te admiraré por como hablas inglés..jejejeje. Mariona, tu sonrisa consigue tranquilizarme, eres un sol. Anita, siempre me has escuchado y ayudado, mil gracias. Mar, Crt, Alt y ?? Anabel, lastima que no hemos podido trabajar mucho juntas, te irá todo muy bien, estoy segura. María José, no nos conocemos muchos pero eres una persona generosa. Alessandra, la otra Italiana del grupo, buona fortuna per tutto! Samu, suerte a ti también.

...y los chicos del AMRg?? Roger, ¿te acuerdas el primer experimento? Xavi, ¿y ahora las clases de Italiano? Javi, te acordarás del tiburón? Pablo, pero cuanta placas puedes hacer a la vez?? Raquel, para ti un abrazo muy fuerte. Dani, nunca he visto tu poyata...Carma, estás en U.S., Begonia, Mark, espero que os vaya todo muy bien! Pilar, mil gracias por todo, no se si sabes lo que ha representado para mí estar un tiempo con vosotros, muchísimo. Francisco, gracias. Espero que os acordarais de mí no solo por mi tiramisú y mi "salame" de chocolate. Os pensaré en el nuevo laboratorio.

A mi querida amiga Laura, eres una persona realmente especial !!!!

Me voy repetir pero, Mariki sin tu ayuda nunca hubiese acabado, admiro tus capacidades y perseverancia, eres una amiga.

Mi sento in imbarazzo a dare un ordine alle persone che voglio ringraziare, non mi sembra giusto e mi commuovo quando penso a ognuno di voi, quindi saró breve, come sempre di "poche parole".

Papá, Mamma mi avete sempre appoggiato, vi voglio un bene infinito.

Fratellini: Pino, Giovanni la vostra sorellina diventa "dottora" e per la seconda volta!

Paola, Giuditta, un forte abbraccio!

Un abbraccio forte anche al mio nipotino, Massimo!!!

Francesco, sei sempre una fonte di energia. Grazie.

Marco, Paola grazie per il vostro aiuto.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	LA INMUNIDAD	1
1.2	LOS ANTICUERPOS	2
1.2.1	El reconocimiento antigénico	3
1.2.2	Función de los anticuerpos	4
1.3	EL PATRIMONIO GENÉTICO	5
1.4	LA MOLÉCULA DEL DNA	5
1.5	TÉCNICAS CLÁSICAS DE ANÁLISIS INMUNOLÓGICO	9
1.5.1	Inmunoensayos enzimáticos	12
1.5.1.1	Ensayos inmunológicos homogéneos. Inmunoensayo enzimático multiplicado	13
1.5.1.2	Ensayos heterogéneos. Análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas	13
1.6	TÉCNICAS CLÁSICAS DE ANÁLISIS DE DNA	16
1.6.1	Amplificación del DNA. Reacción en cadena de la polimerasa	17
1.6.2	Cuantificación de los productos de la amplificación a tiempo real	20
1.6.3	Cálculo de la eficiencia de amplificación	24
1.6.4	Componentes de la reacción de PCR	26
1.7	ESTRATEGIAS DE INMOVILIZACIÓN DE BIOESPECIES EN SOPORTES SÓLIDOS	27
1.7.1	Adsorción	29
1.7.2	Unión covalente	29

1.7.3 Unión por afinidad _____	30
1.7.3.1 Las proteínas A y G _____	30
1.7.3.2 La unión Biotina-(Estrept)Avidina _____	31
1.8 NUEVAS ESTRATEGIAS DE SEPARACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO _____	32
1.8.1 Las esferas magnéticas _____	33
1.8.2 Estructura y clasificación de las esferas magnéticas _____	34
1.9 NUEVAS METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS BIOLÓGICOS. LOS IMMUNOSENSORES Y LOS BIOSENSORES DE DNA _____	35
1.9.1 Sensores químicos y biosensores _____	36
1.9.2 Biosensores electroquímicos _____	37
1.9.2.1 Técnica amperométrica _____	38
1.9.3 Materiales utilizados como transductores amperométricos. Compósitos y biocompósitos _____	40
1.9.3.1 Materiales conductores clásicos y compósitos _____	40
1.9.3.2 Materiales biocompósitos _____	40
1.9.4 Recuperación de la bioactividad del elemento de biorreconocimiento en biosensores. Las distintas estrategias _____	41
1.9.4.1 Regeneración mediante reactivos químicos _____	41
1.9.4.2 Renovación mediante un biosensor de un sólo uso _____	42
1.9.4.3 Renovación mediante membranas recambiables _____	42
1.9.4.4 Renovación mediante el uso de materiales biocompósitos _____	42
1.9.5 Inmunosensores _____	42
1.9.6 Biosensores de DNA _____	43
1.9.7 Nuevos materiales para biosensores de DNA e inmunosensores electroquímicos. Plataformas de afinidad universal _____	44
1.9.7.1 Biocompósito grafito-epoxi de proteína A _____	44
1.9.7.2 Biocompósito grafito-epoxi de Avidina _____	45
1.9.7.3 Magneto compósito grafito-epoxi _____	45
1.10 APLICACIONES DE LOS BIOSENSORES DE AFINIDAD: IMMUNOSENSORES Y GENOSENSORES _____	45
1.10.1 La problemática alimentaria _____	46
1.10.1.1 Contaminantes y aditivos alimentarios _____	48
1.10.1.2 Pesticidas _____	48
1.10.1.3 Antibióticos _____	48
1.10.1.4 Bacterias patógenas _____	49
1.11 BIBLIOGRAFIA _____	53

2 OBJETIVOS 59

3 EXPERIMENTAL 61

3.1 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE NUEVOS MATERIALES PARA BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS	61
3.1.1 Introducción	61
3.1.2 Equipamiento y reactivos	63
3.1.2.1 Equipamiento	63
3.1.2.2 Reactivos y materiales	63
3.1.3 Construcción de los electrodos de configuración cilíndrica	63
3.1.4 Transductor bioelectroquímico de propiedades mejoradas.	
Biocompósitos grafito-epoxi	64
3.1.4.1 Nueva plataforma electroquímica de afinidad universal.	
Biocompósito de avidina	65
3.1.4.2 Nueva plataforma electroquímica de afinidad inmunológica universal.	
Biocompósito de proteína A	65
3.1.4.3 Plataforma electroquímica de afinidad inmunológica específica.	
Inmunocompósito de especificidad definida	65
3.1.5 Plataforma electroquímica con propiedades magnéticas (m-GEC)	66
3.1.6 Renovación de la superficie	66
3.1.7 Caracterización electroquímica de los electrodos por voltamperometría cíclica	67
3.1.8 Caracterización microscópica de los electrodos	68
3.1.8.1 Microscopía electrónica de barrido	68
3.1.8.2 Microscopía de fluorescencia	68
3.2 ESTRATEGIAS DE INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS E INMUNOESPECIES EN TRANSDUCTORES BIOCOMPÓSITOS	68
3.2.1 Introducción	68
3.2.2 Equipamiento y reactivos	70
3.2.2.1 Equipamiento	70
3.2.2.2 Reactivos y materiales	70
3.2.3 Adsorción de biomaterial en GEC	71
3.2.4 Inmovilización de biomaterial en un biocompósito de avidina	71
3.2.4.1 Estrategias de inmovilización de anticuerpos en un biocompósito de avidina	72
3.2.4.2 Estrategias de inmovilización de enzimas en un biocompósito de avidina	73
3.2.4.3 Estrategia de inmovilización de DNA en un biocompósito de avidina	73

3.2.5	Inmovilización de biomaterial en un biocompuesto de proteína A	75
3.2.6	Inmovilización de anticuerpos de afinidad específica en un inmunocompuesto	75
3.3	ESTRATEGIAS DE INMOVILIZACIÓN DE INMUNOESPECIES EN ESFERAS MAGNÉTICAS	75
3.4	DISEÑO DE BIOSENSORES INMUNOLÓGICOS ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN NUEVOS MATERIALES TRANSDUCTORES	77
3.4.1	Introducción	77
3.4.2	Equipamiento y reactivos	78
3.4.2.1	Equipamiento	78
3.4.2.2	Reactivos y materiales	78
3.4.3	Diseño de un biosensor inmunológico electroquímico basado en biocompuestos como material transductor	78
3.4.4	Diseño de un biosensor inmunológico electroquímico basado en esferas magnéticas y en un magneto sensor	79
3.4.5	Evaluación electroquímica de los biosensores inmunológicos electroquímicos basados en nuevos materiales transductores	81
3.4.6	Diseño de un magneto-enzimoinmuno análisis	83
3.5	DETERMINACIÓN DE ATRAZINA EN MUESTRAS REALES MEDIANTE BIOSENSORES INMUNOLÓGICOS ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN NUEVOS MATERIALES TRANSDUCTORES	84
3.6	DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS EN MUESTRAS REALES MEDIANTE BIOSENSORES INMUNOLÓGICOS ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN NUEVOS MATERIALES TRANSDUCTORES	84
3.7	DISEÑO DE UNA ESTRATEGIA BASADA EN RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> PATÓGENA	85
3.7.1	Introducción	85
3.7.2	Equipamiento y reactivos	85
3.7.2.1	Equipamiento	85
3.7.2.2	Reactivos y materiales	86
3.7.3	Análisis de secuencias del gen eaeA de <i>E. coli</i> patógena	86
3.7.4	Diseño de los primers para un ensayo de RT-PCR	86
3.7.5	Extracción de DNA cromosómico	88
3.7.6	Protocolo de amplificación a tiempo real del gen eaeA	89
3.8	BIBLIOGRAFÍA	91
4.	DISCUSIÓN GLOBAL DE RESULTADOS	93

4.1	INTRODUCCIÓN _____	93
4.2	DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE NUEVOS MATERIALES PARA BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS _____	94
4.2.1	Caracterización electroquímica de los electrodos por voltamperometría cíclica	94
4.2.2	Caracterización microscópica de los electrodos _____	96
4.2.2.1	Microscopía de fluorescencia _____	96
4.2.2.2	Microscopía electrónica de barrido _____	98
4.3	ESTRATEGIAS DE INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS EN TRANSDUCTORES BIOCOPÓSITOS _____	99
4.3.1	Biocompósito de avidina _____	100
4.3.1.1	Inmovilización de anticuerpos en un biocompósito de avidina _____	100
4.3.1.2	Inmovilización de enzimas en un biocompósito de avidina _____	101
4.3.1.3	Inmovilización de DNA en un biocompósito de avidina _____	102
4.3.2	Biocompósito de proteína A _____	103
4.3.3	Biocompósito de anticuerpos de afinidad específica. Inmunocompósitos	105
4.4	ESTRATEGIAS DE INMOVILIZACIÓN DE INMUNOESPECIES EN ESFERAS MAGNÉTICAS _____	106
4.5	DISEÑO DE BIOSENSORES INMUNOLÓGICOS ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN NUEVOS MATERIALES TRANSDUCTORES _____	107
4.5.1	Determinación de atrazina en muestras reales mediante biosensores electroquímicos _____	107
4.5.1.1	Immunoensayo de atrazina basado en biocompósitos (ProtA-GEB y Av-GEB) e inmunocompósitos específicos _____	107
4.5.1.2	Immunoensayo de atrazina basado en esferas magnéticas y en un magneto sensor _____	111
4.5.2	Determinación de sulfonamidas en muestras reales mediante biosensores electroquímicos _____	114
4.6	DISEÑO DE NUEVOS PRIMERS PARA LA AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA DE SECUENCIAS DE <i>ECHERICHIA COLI</i> PATÓGENA _____	116
4.6.1	Cálculo de la eficiencia de la amplificación _____	117
4.6.1.1	Análisis de las curvas de amplificación del gen eaeA de <i>E. coli</i> _____	117
4.7	BIBLIOGRAFÍA _____	122
5.	RESUMEN Y CONCLUSIONES GENERALES. PERSPECTIVAS FUTURAS _____	123

6. PUBLICACIONES

I. Renewable Protein A modified graphite-epoxy composite for electrochemical immunosensing

Zacco E., Pividori M.I., Llopis X., del Valle M., Alegret S. *Journal of Immunological Methods*. 2004, 286: 35–46

II. Electrochemical biosensing based on universal affinity biocomposite platforms

Zacco E., Pividori M.I., Alegret S. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006, 21: 1291–1301

III. Electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of pesticides residues

Zacco E., Pividori M.I., Alegret S., Galve R., M.-P. Marco. *Analytical Chemistry*. 2006, 78: 1780-1788

IV. Electrochemical biosensing of pesticides residues based on biocomposite and immunocomposite platforms

Zacco E., Marco M.-P., Galve R., Alegret S., Pividori M.I. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006. En prensa. Disponible on-line desde el 7 de noviembre de 2006.

V. Electrochemical determination of atrazine in orange juice and bottled water samples based on Protein A biocomposite electrodes

Zacco E., Galve R., Sánchez Baeza F., Marco M.-P. Alegret S., M.I. Pividori, in *Electrochemical Sensor Analysis*. Elsevier. Amsterdam (2007). En prensa.

VI. Electrochemical determination of sulfonamide antibiotics in milk samples using a class-selective antibody

Zacco E., Galve R., Adrian J., Sánchez Baeza F., Marco M.-P., Alegret S., Pividori M.I., in *Electrochemical Sensor Analysis*. Elsevier. Amsterdam (2007). En prensa.

7. ANEXO

I. Electrochemical magneto immunosensing of antibiotic residues in milk

Zacco E., Galve R., Adrian J., Marco M.-P., Alegret S., Pividori M.I. *Biosensors and Bioelectronics*. En prensa.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LA INMUNIDAD

El término inmunidad deriva de la palabra latina *immunitas*, que hace referencia a las exenciones de diversas obligaciones civiles y procesamientos legales ofrecidos a los senadores romanos durante el desempeño de sus cargos. Científicamente el término inmunidad significa protección frente a las enfermedades y, más específicamente, frente a las enfermedades infecciosas. Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmunitario, y la respuesta global coordinada a la introducción en un organismo de sustancias extrañas es la respuesta inmunitaria. La función fisiológica del sistema inmunitario es la defensa frente a microorganismos infecciosos. No obstante, las sustancias extrañas de naturaleza no infecciosa también pueden provocar respuestas inmunitarias. La respuesta inmunitaria puede ser tanto humoral como celular. La inmunidad humoral está mediada por los anticuerpos, y su función fisiológica es la defensa frente a toxinas microbianas y microorganismos. Este tipo de inmunidad contrasta con la otra rama efectora del sistema inmunitario, la inmunidad celular, que está mediada por los linfocitos T y cuya función es erradicar microorganismos que infectan y viven en el interior de las células huésped. La inmunidad humoral frente a toxinas microbianas se descubrió a principios de decenio de 1900 como una forma de inmunidad que podía transferirse de individuos inmunizados a individuos no estimulados. Las moléculas efectoras de la inmunidad humoral son los anticuerpos, su estructura se explica a continuación. ^[1]

1.2 LOS ANTICUERPOS

Los anticuerpos son glicoproteínas cuyo peso molecular aproximado es de 150 kD. Se encuentran en la fracción globulínica del suero sanguíneo.

Basándose en sus características físico-químicas, en su actividad fisiológica y en pequeñas variaciones de la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas, se pueden distinguir cinco clases principales de inmunoglobulinas, cada una designada con una letra.

Las mismas son: IgG, IgA, IgM, IgD y IgE. Las inmunoglobulinas G (IgG) son las más utilizadas en los inmunoensayos.

La estructura básica de los anticuerpos consiste en cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, iguales entre sí y unidas por puentes disulfuro. Como en toda proteína, en cada cadena se distingue un extremo amino terminal (N-terminal) y un extremo carboxilo (C-terminal). La fracción N-terminal se caracteriza por secuencias variables (V) tanto en las cadena ligeras (VL) como en las pesada (VH); el resto de la molécula posee una estructura relativamente constante (C). La estructura básica se muestra en la Figura 1.1.

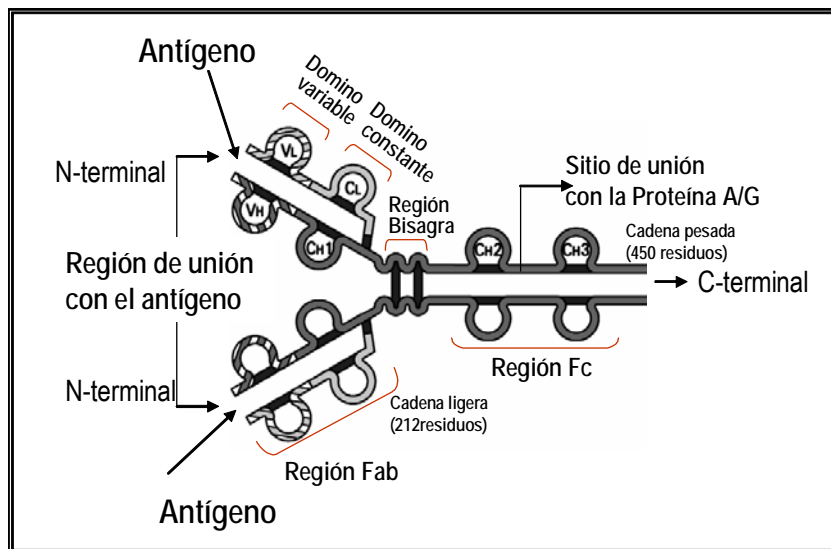


Figura 1.1: Estructura molecular típica de un anticuerpo.

La porción constante de la cadena ligera se denomina región CL. La porción constante de la cadena pesada está dividida en tres regiones estructuralmente discretas: CH1, CH2 y CH3. Estas regiones globulares llamadas “dominios” se estabilizan mediante puentes disulfuros. Los centros de unión del antígeno están localizados en las regiones amino

terminales de ambas cadenas L y H. El fragmento entre los dominios CH1 y CH2, llamada la "región bisagra", confiere al anticuerpo una cierta flexibilidad requerida para la unión con el antígeno.

La acción de enzimas proteolíticas sobre los anticuerpos permite obtener distintos fragmentos. La papaína produce dos fragmentos Fab (del inglés *antigen binding fragment*) idénticos, y un fragmento Fc (del inglés *crystallizable fragment*). La pepsina produce un fragmento F(ab)₂, que consta de dos fragmentos Fab unidos covalentemente. El resto de la molécula se degrada en fracciones menores. Las propiedades biológicas de estos fragmentos son:

1. Fc. Corresponde al extremo C-terminal y está constituido por la región constante de las dos cadenas pesadas. El fragmento Fc es característico para cada clase de inmunoglobulina. De esta región, dependen ciertas funciones tales como la fijación de complemento, la interacción con los receptores celulares de monocitos y macrófagos (responsables de la respuesta inmunitaria celular) y la unión con ciertas proteínas tales como la proteína A del *Staphylococcus aureus* y la Proteína G del *Streptococcus sp.* La región Fc es característica de cada especie.
2. F(ab)₂. Corresponde al extremo N-terminal de las dos cadenas pesadas y de las dos cadenas ligeras. Tiene un reconocimiento divalente con respecto al epítipo o determinante antigénico.
3. Fab. Corresponde al extremo N-terminal de una cadena pesada y de una ligera, unidas entre sí por puentes disulfuros. Tiene reconocimiento monovalente con respecto al epítipo. ^[1]

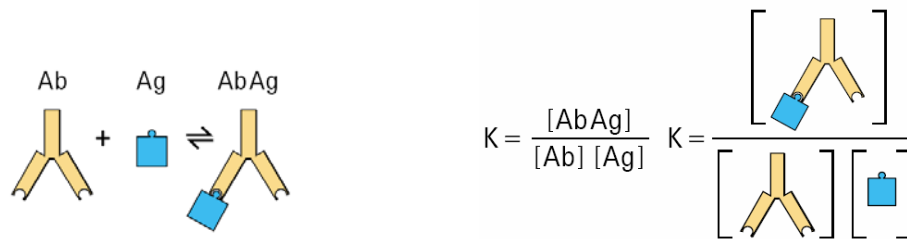
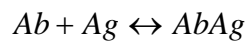
1.2.1 El reconocimiento antigénico

En general los anticuerpos son altamente específicos, siendo capaces de discernir entre pequeñas variaciones del antígeno, tanto de la estructura primaria como de su conformación espacial.

La capacidad de reconocimiento de un anticuerpo por un antígeno radica en las diferentes conformaciones que puede asumir la región Fab, producidas como consecuencia de la variabilidad en las secuencias de sus cadenas proteicas. La zona de enlace de un anticuerpo (paratopo) consta de residuos aminoacídicos que interaccionan con la zona complementaria del antígeno (el epítipo).

Los anticuerpos reconocen al antígeno en su forma nativa. La unión antígeno-anticuerpo se produce entre el determinante antigénico y las porciones hipervariables (Fv) de las regiones variables de los anticuerpos. La elevada afinidad entre el antígeno y el anticuerpo es debida a fuerzas de naturaleza no covalentes, tales como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals, tanto atractivas como repulsivas. La suma de estas fuerzas de atracción y repulsión se conoce como 'afinidad' del anticuerpo por un antígeno. Estas fuerzas son inversamente proporcionales a la distancia entre los grupos interactuantes. Para que la energía de unión sea suficiente para resistir la disrupción termodinámica, el epítipo y el paratopo deben, por tanto, presentar estructuras complementarias. Pequeños cambios en la estructura del epítipo pueden conducir a un elevado cambio en la afinidad de la unión antígeno-anticuerpo. [2;3]

La unión antígeno-anticuerpo es un equilibrio dinámico, representado por la siguiente ecuación:



siendo K la constante de afinidad del complejo.

1.2.2 Función de los anticuerpos

La unión antígeno-anticuerpo pone en marcha diferentes mecanismos biológicos *in vivo*, que actúan con el objeto de eliminar los posibles efectos adversos de una molécula extraña en un organismo. Estos mecanismos son:

- *neutralización* del efecto nocivo, si el antígeno es una toxina,
- *inhibición* de la entrada de agentes extraños en las células, cuando se trata de un virus,
- *facilitación de la captación y la destrucción* de las bacterias mediante las células fagocitarias, e
- *inducción* de la lisis de las bacterias o células a través de la activación del "complemento", que son proteínas presentes normalmente en el plasma sanguíneo dedicadas a la defensa inmunológica.

Las diferentes células participantes en la respuesta inmunológica poseen receptores para la región Fc de los anticuerpos, denominados FcR.

1.3 EL PATRIMONIO GENÉTICO

En el año 1866 Gregor Mendel explicó cuantitativamente las leyes de la herencia [4:5], y describió su unidad funcional, el gen, justificando así la observación de que las características de un individuo se transmitieran a su descendencia siguiendo unas pautas determinadas, mediante reglas estadísticas confiables [6:7]. A finales del siglo XIX y principios del XX, se enunció la teoría cromosómica de la herencia, que establece que: *i)* los genes se encuentran situados en los cromosomas; *ii)* los genes se encuentran dispuestos linealmente sobre los cromosomas, en posiciones determinadas en los mismos (*loci*), *iii)* entre la recombinación de los genes y el intercambio de los segmentos de cromosomas hay una estrecha relación. El grupo completo de instrucciones codificadas necesarias para producir un organismo vivo y para programar sus actividades para toda su vida se denomina genoma (Figura 1.2). Luego de numerosos estudios ha quedado claro que “la molécula de la herencia”, constituyente fundamental del genoma, es el DNA (ácido desoxirribonucleico). El DNA es una molécula muy larga con una capacidad inmensa de información, que se encuentra enrollada y compactada en el núcleo de las células de organismos vivos tan diversos como el hombre, los virus, o las bacterias, tal como se muestra en la Figura 1.2. El DNA contiene codificada la información para la síntesis de proteínas, siendo las proteínas quienes realizan “el trabajo de la vida”. A continuación se describe la estructura del ácido desoxirribonucleico.

1.4 LA MOLÉCULA DEL DNA

La determinación de la estructura del ácido desoxirribonucleico (DNA), fue realizada por medio de la difracción de rayos X por Crick y Watson, en 1953. Por este trabajo recibieron el premio Nobel de Medicina en 1956. [8]

El DNA es un largo polímero no ramificado. Las unidades monoméricas se conocen como nucleótidos y el polímero se denomina polinucleótido. La macromolécula de DNA está constituida por dos cadenas de nucleótidos complementarias.

Los componentes moleculares del polímero son:

- azúcar de 5 átomos de carbono: 2-desoxirribosa,
- bases nitrogenadas: purinas (adenina y guanina) y pirimidinas (timina y citosina),

- grupo monohidrógeno fosfato.

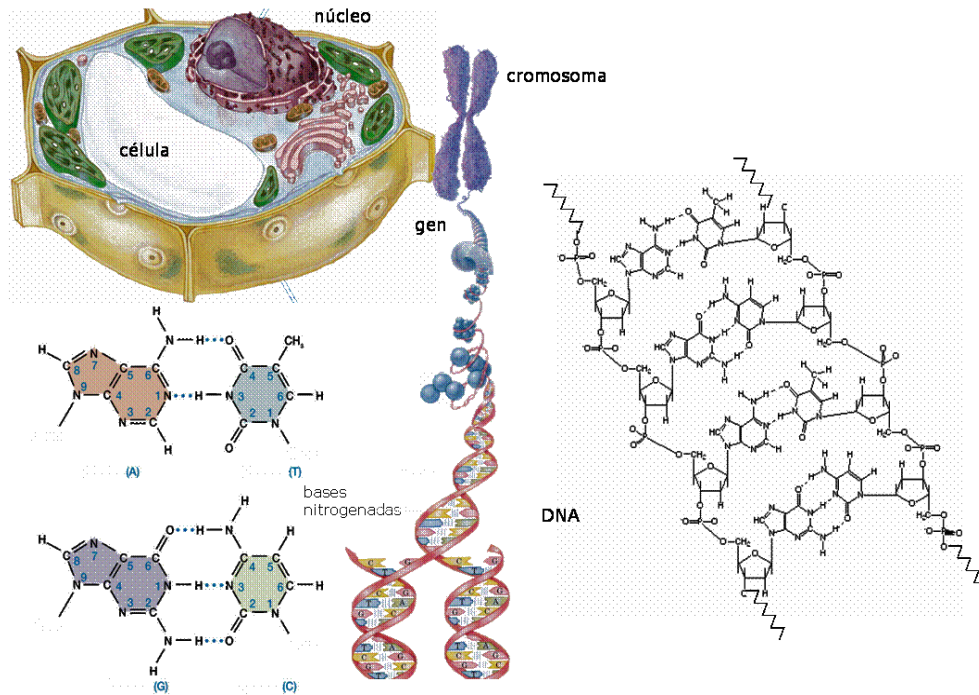


Figura 1.2: El genoma humano a cuatro niveles. Excepto los gametos (células reproductivas) y los eritrocitos maduros, cada célula del cuerpo humano contiene 23 pares de cromosomas, siendo cada uno de ellos un paquete de DNA enrollado y comprimido. Cada hebra de DNA consiste en unidades repetitivas de nucleótidos que a su vez están constituidos por una base nitrogenada, un grupo monohidrógeno fosfato y un azúcar de 5 átomos de carbono. Las bases nitrogenadas son adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C).

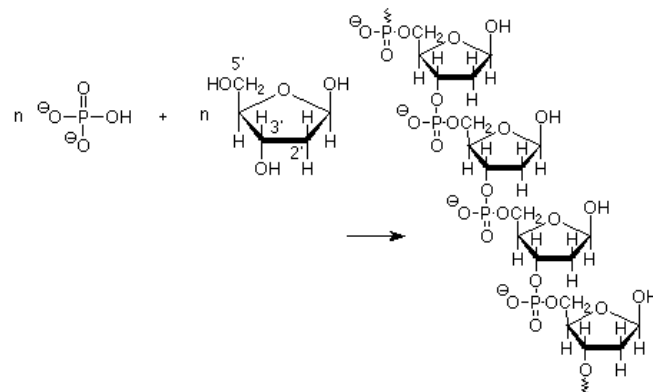


Figura 1.3: Esqueleto del polímero compuesto por unidades repetitivas de fosfato y 2-desoxirribosa.

El polímero lineal monocatenario (polinucleótido), está formado por un esqueleto de unidades repetitivas de moléculas de 2-desoxirribosa que se encuentran unidas entre sí mediante enlaces fosfodiéster. Este enlace une el grupo $-\text{OH}$ en posición 5' de una molécula de azúcar con el $-\text{OH}$ en posición 3' de otra molécula (Figura 1.3).

El grupo fosfato y la desoxirribosa constituyen una suerte de columna vertebral que sirve de sostén a bases nitrogenadas de cuatro tipos diferentes (Figura 1.4). Dos de ellas, la adenina (A) y la guanina (G), son púricas, y presentan una estructura con doble anillo, mientras que las otras dos, la citosina (C) y la timina (T), son pirimídicas, con una estructura de un único anillo.

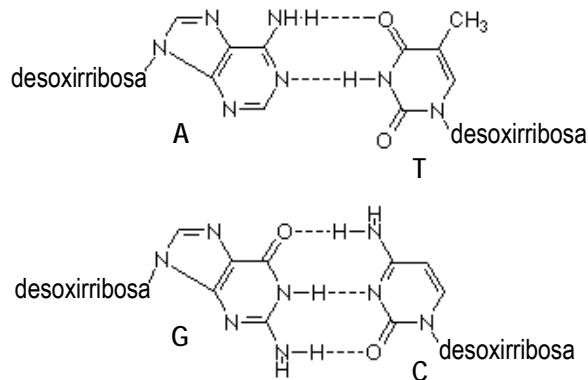


Figura 1.4: Unión entre las bases nitrogenadas púricas: adenina (A) y la guanina (G) y pirimídicas: citosina (C) y la timina (T).

La unión de las bases nitrogenadas al esqueleto fosfato-azúcar se realiza mediante un átomo específico de N de la base al C anomérico de la desoxirribosa, perdiéndose en la reacción un átomo de H de las bases y un grupo –OH del azúcar, en forma de agua.

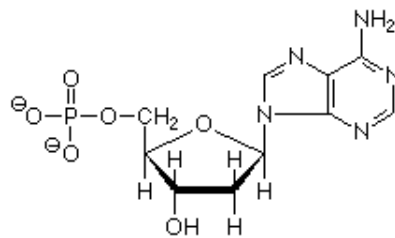


Figura 1.5: La unión del nucleósido (base nitrogenada y el azúcar 2-desoxirribosa) con un fosfato genera desoxiadenosina 5-monofosfato (dAMP), un nucleótido.

El compuesto que se forma de esta manera entre una molécula de desoxirribosa y una base nitrogenada se denomina nucleósido, y si además se esterifica el grupo –OH en posición 5' de la desoxirribosa con un fosfato, se genera un nucleótido (Figura 1.5).

In vivo, la estructura del DNA está constituida por dos cadenas poliméricas o hebras complementarias que se presentan como una doble hélice o espiral determinada por dos hebras que se enrollan en forma paralela alrededor de un eje imaginario a la manera de una

escalera caracol, siendo los "escalones", los pares de bases nitrogenadas -adenina y timina, guanina y citosina- unidas por puentes de hidrógeno. Esta disposición se denomina plectonémica.

Las bases se integran por pares según el principio de la complementariedad (Figura 1.4):

- Adenina (A) se une a timina (T)
- Guanina (G) se une a citosina (C)

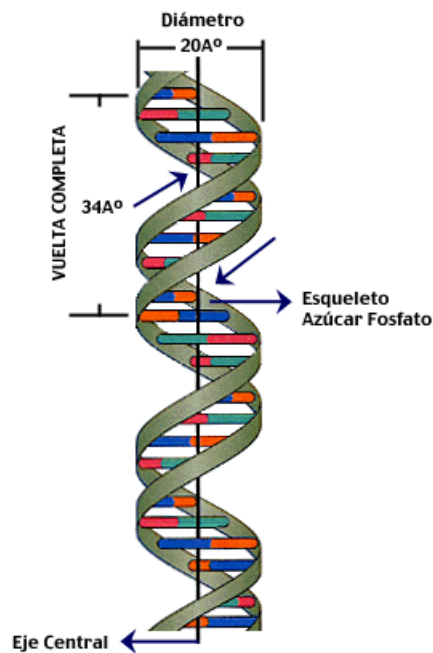


Figura 1.6: Esquema indicativo de la manera en que dos cadenas complementarias de nucleótidos se unen y adoptan la forma de doble hélice típica de la molécula de DNA.

La estructura de las bases es de tal naturaleza que la G sólo se une con la C (lo hace por medio de tres puentes de hidrógeno) y la A con la T (lo hace por medio de dos puentes de hidrógeno). El orden en que se encuentran estas parejas a lo largo de la hélice determina el mensaje genético y es el que controla el desarrollo posterior del individuo. Cada molécula de DNA está constituida por segmentos codificados o genes, que llevan instrucciones hereditarias para producir las proteínas que gobiernan todos los procesos vivos.

Los nucleótidos se unen mediante los fosfatos que conectan el carbono en la posición 5' de una pentosa con el carbono en la posición 3' de la adyacente. Estas uniones 5'-3' determinan la direccionalidad de las cadenas. En la Figura 1.6 puede observarse la presencia de un surco mayor y un surco menor formado por los giros de la espiral plectonémica.

La molécula de DNA puede adoptar una forma lineal o una forma circular cerrada. Gran parte del DNA de las bacterias y de los virus, el DNA mitocondrial y el de los plásmidos, adoptan formas circulares. Aunque en general se acepta que el DNA nuclear de las células eucariotas (células de los seres superiores con núcleos bien definidos) se halla organizado en largas unidades de cadena abierta o lineal.

Las características más importantes de la molécula de DNA son, en resumen:

- Las dos cadenas de DNA son complementarias, ya que su unión –que se denomina hibridación– ocurre de manera específica debido a la complementariedad de A con T y de C con G.
- Las dos cadenas de DNA se extienden en direcciones opuestas: son antiparalelas. Esto quiere decir que en un extremo de la doble hélice habrá un extremo 3' de una cadena y un 5' de la cadena complementaria.
- Las dos cadenas de DNA forman una espiral helicoidal dextrógira de aproximadamente 10 pares de nucleótidos por vuelta de la hélice (1 vuelta de hélice = 35.7 Å), que se enrosca alrededor de un eje. Se generan así surcos principales y secundarios (Figura 1.6).
- El esqueleto de fosfato y pentosas de las dos hebras de DNA se enrosca en el espiral hacia fuera como las barandas de una escalera, mientras que las bases nitrogenadas se encuentran en el interior y se disponen como los peldaños de la misma. Esto se explica porque el esqueleto es hidrofílico y las bases nitrogenadas son hidrofóbicas, siendo esta disposición la más favorable termodinámicamente, teniendo en cuenta las características polares del medio externo biológico.
- Debido a los tamaños de las bases nitrogenadas y su asociación complementaria, la doble hélice de DNA tiene en toda su longitud el mismo diámetro.

1.5 TÉCNICAS CLÁSICAS DE ANÁLISIS INMUNOLÓGICO

La exquisita especificidad de los anticuerpos para unirse a antígenos determina que los anticuerpos sean reactivos muy útiles para su detección, purificación y cuantificación. La detección de cada antígeno requiere la producción de un anticuerpo específico, su aislamiento y en la mayoría de las ocasiones, su purificación. Debido a que pueden producirse anticuerpos frente a prácticamente cualquier tipo de macromolécula o sustancia química pequeña, pueden usarse técnicas basadas en reconocimiento inmunológico – antígenos-anticuerpos- para prácticamente cualquier tipo de molécula sea esta en solución o

en células. Las moléculas que estimula la generación de respuestas inmunitarias se llaman inmunógenos.

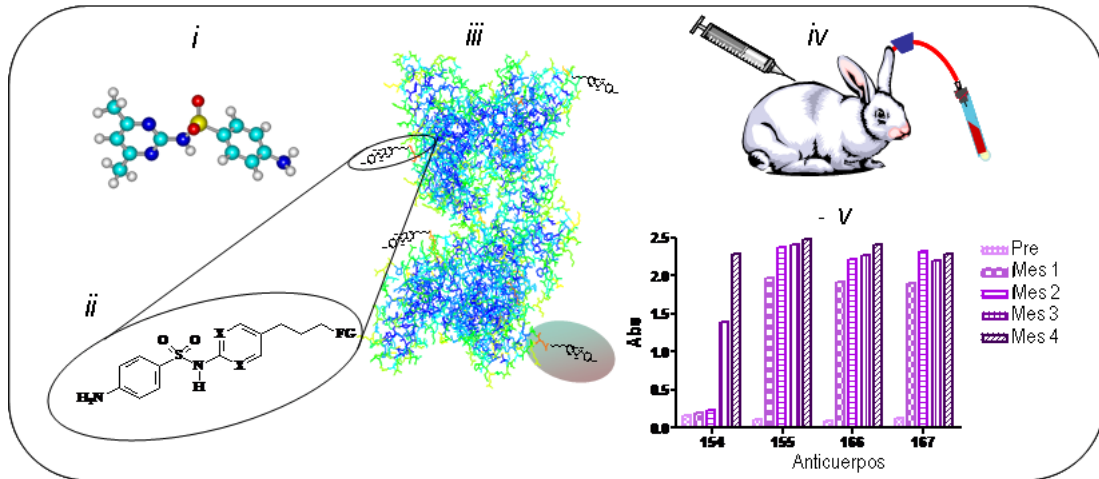


Figura 1.7: Etapas de obtención de un anticuerpo específico contra un determinado antígeno.

Aunque existen moléculas capaces de producir directamente una respuesta inmunológica en un huésped adecuado –normalmente de naturaleza proteica y de alto peso molecular–, existen otras –los haptenos–, que son moléculas orgánicas de bajo peso molecular y que deben previamente conjugarse con una molécula de naturaleza proteica para así poder dar la respuesta inmunológica. En este caso, para conseguir un anticuerpo específico para estas moléculas, se debe proceder a los siguientes pasos, tal como se muestra en la Figura 1.7: *i)* diseño del hapteno, *ii)* síntesis, *iii)* conjugación proteica, *iv)* inmunización del huésped adecuado, *v)* análisis del título de los anticuerpos en el suero sanguíneo a lo largo del tiempo. Mediante esta estrategia se pueden obtener anticuerpos para el reconocimiento específico de prácticamente cualquier molécula orgánica.

La respuesta inmunológica natural del huésped es policlonal, es decir, heterogénea formada por una población numerosa de anticuerpos de diferente especificidad por al antígeno, y por tanto, de diferente afinidad, en cuanto reconocen diferentes regiones del mismo.

En las técnicas inmunológicas pueden utilizarse tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Mientras que los anticuerpos policlonales, como se comentó, son poblaciones complejas de anticuerpos formadas por distintos tipos de anticuerpos, los anticuerpos monoclonales son moléculas idénticas que poseen la misma especificidad. [1]

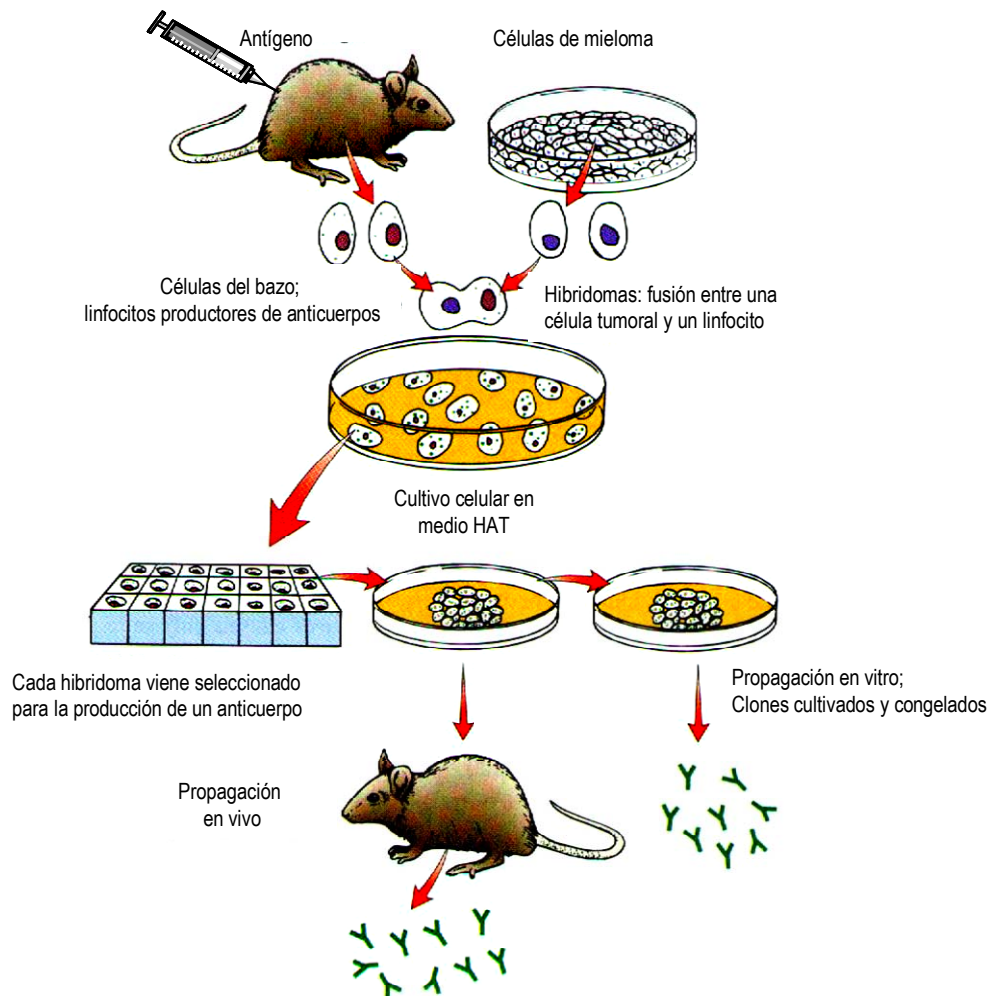


Figura 1.8: Técnica para la producción de anticuerpos monoclonales.

La técnica de producción de cantidades prácticamente ilimitadas de moléculas de anticuerpos idénticas y específicas para una determinada región de un antígeno, ha revolucionado la inmunología y ha tenido un extraordinario impacto sobre la investigación en diferentes campos que requieren anticuerpos como reactivos.

El primer método para la producción de anticuerpos homogéneos o monoclonales fue descrito por Köhler y Milstein en 1975, y se basa en el hecho de que cada linfocito B (células del sistema inmunitario) produce un único tipo de anticuerpo con una única especificidad. Así, aislando una célula e inmortalizándola mediante fusión celular con una célula cancerígena de mieloma, se pueden obtener anticuerpos idénticos e ilimitadamente (Figura 1.8).

Estas líneas celulares derivadas de la fusión, inmortalizadas y productoras de anticuerpos, se denominan hibridomas, y los anticuerpos que producen reciben el nombre de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos policlonales poseen mayor sensibilidad y menor

especificidad que los monoclonales, de modo que en función de qué característica se quiera potenciar en un inmunoensayo, se elegirán unos u otros. Históricamente, muchas de las aplicaciones de los anticuerpos como reactivos dependían de la capacidad para formar inmunocomplejos grandes, o bien en solución, o bien en geles, que se evidenciaban mediante métodos ópticos. En la actualidad estos métodos han sido sustituidos casi por completo por nuevas estrategias que utilizan las inmunoespecies inmovilizadas en soportes sólidos y en el uso de una molécula indicadora. Cuando la molécula indicadora se marca con un radioisótopo, la metodología se llama radioinmunoanálisis (RIA). Si la molécula indicadora se marca covalentemente con una enzima, se llama inmunoensayo enzimático. Aunque los radioinmunoanálisis siguen siendo técnicas muy utilizadas en numerosos laboratorios, la tendencia actual es sustituirlas por métodos no radioactivos. Esto se debe a que las moléculas radioactivas (marcadas con ^{32}P) tienen una vida media corta, el trabajo con este tipo de material requiere laboratorios especializados debido a la peligrosidad que conlleva y existen problemas con los desechos de este tipo de ensayos. Por este motivo, en las próximas secciones se explican con más detalle los inmunoensayos enzimáticos.

1.5.1 Inmunoensayos enzimáticos

Las técnicas de inmunoensayo enzimático (EIA, del inglés *enzyme immunoassay*) se definen como métodos analíticos que utilizan una enzima como marcador para amplificar la reacción primaria entre un antígeno y un anticuerpo. En función del formato empleado, el analito pueden ser tanto el antígeno como el anticuerpo.

Las técnicas basadas en inmunoensayo enzimático permiten la cuantificación de analitos (incluso a niveles traza) sin la necesidad de laboriosos procedimientos de purificación y/o concentración de la muestra, debido fundamentalmente a dos factores: *i)* el extraordinario poder discriminante característico de los anticuerpos, basado en la capacidad del sistema inmunológico de producir virtualmente una variedad casi ilimitada de anticuerpos diferentes, cada uno con una afinidad específica por un agente extraño y *ii)* la elevada actividad catalítica y sensibilidad de las enzimas. Estas técnicas se distinguen por su buena sensibilidad, por el elevado número de aplicaciones y por su gran simplicidad.

Las técnicas de inmunoensayo enzimático se pueden dividir en dos grupos: inmunoensayo enzimático multiplicado EMIT (del inglés *enzyme-mediated immunoassay technique*) y análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas o ELISA (del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*). A continuación se describen brevemente estas técnicas. [2:9:10]

1.5.1.1 Ensayos inmunológicos homogéneos. Inmunoensayo enzimático multiplicado

En un inmunoensayo enzimático multiplicado (EMIT) la reacción inmunológica tiene lugar en un medio líquido. Son ensayos, por tanto, homogéneos. La clave de este tipo de metodología radica en que la actividad del conjugado enzimático está modulada por la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Como ninguno de los inmunoreactivos está inmovilizado en fase sólida, en este caso no hace falta separar el inmunocomplejo –como en el caso de los inmunoensayos heterogéneos– mediante pasos de lavado.

1.5.1.2 Ensayos heterogéneos. Análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas

En el análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas o ELISA, una de las especies inmunológicas (el antígeno o el anticuerpo), se encuentra inmovilizado en la superficie de una fase sólida, normalmente pocillos de poliestireno de una placa de microtitulación. Es, por tanto, un ensayo heterogéneo. El complejo antígeno-anticuerpo formado en la fase sólida se separa de los reactivos libres en solución (y que se encuentran en exceso) antes de proceder a la medición del marcador enzimático mediante la reacción enzimática.

Se pueden diferenciar dos tipos de ELISA: competitivo y no competitivo. ^[11]

Inmunoensayo no competitivo o tipo sándwich

Se utilizan dos tipos distintos de anticuerpos, cada uno capaz de reconocer un determinante antigénico diferente del mismo antígeno, que debe ser polivalente. En el formato más común, un anticuerpo está inmovilizado en la fase sólida (anticuerpo de captura) y el otro está conjugado con una enzima, tal como se muestra en la Figura 1.9 (A). Después de la etapa de incubación, el antígeno analito queda entonces unido entre los dos anticuerpos.

Los dos anticuerpos deben estar en exceso. El primero, para permitir una adsorción completa del antígeno y el segundo, para asegurar la marcación completa del inmunocomplejo. En este caso, la concentración de analito es directamente proporcional a la cantidad de enzima medida mediante la reacción enzimática. Este formato se utiliza cuando se emplean antígenos de alto peso molecular y polivalentes. ^[9;11;12]

Inmunoensayo competitivo

En este formato, el analito (que puede ser un antígeno o un anticuerpo) compite con el antígeno o el anticuerpo (respectivamente) marcado con la enzima, para los limitados sitios

de enlace del inmunoreactivo de captura inmovilizado en el soporte sólido (anticuerpo o antígeno respectivamente). Este formato se utiliza normalmente cuando se emplean antígenos de bajo peso molecular o haptenos, que poseen un único sitio de unión a anticuerpos –monovalentes–.

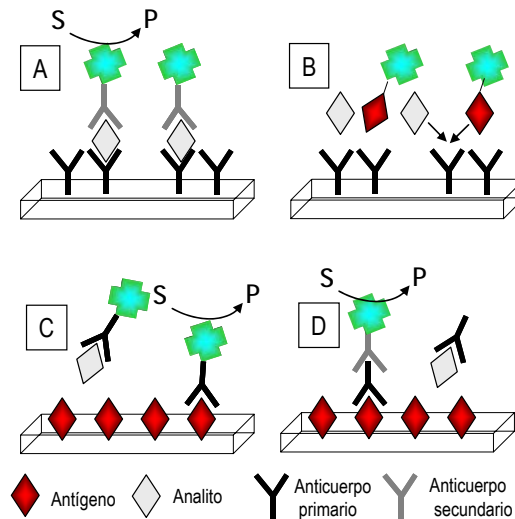


Figura 1.9: Distintos formatos de inmunoensayos. (A) Inmunoensayo no competitivo, (B) inmunoensayo competitivo con antígeno marcado, (C) inmunoensayo competitivo directo, (D) Inmunoensayo competitivo indirecto.

El inmunocomplejo queda entonces marcado con una enzima e inmovilizado en fase sólida. La eliminación de los inmunoreactivos libres y presentes en exceso mediante un simple lavado y la adición del sustrato adecuado para el marcador enzimático permiten medir la actividad enzimática y evaluar el grado de competición.

Un punto fundamental a tener en cuenta es que en un formato competitivo la concentración del analito resulta inversamente proporcional a la señal medida.

Los cuatro formatos de ELISA competitivo son:

- ELISA competitivo con antígeno marcado [Figura 1.9 (B)]. El analito y el antígeno marcado compiten por el anticuerpo fijado en la superficie de la fase sólida. Este formato ha sido ampliamente utilizado en la presente tesis.
- ELISA por desplazamiento. Tiene el mismo formato que el anterior pero, en este caso, previamente se pone un exceso del antígeno marcado que ocupa todos los sitios disponibles. Después se deja reaccionar con la muestra que contiene el analito, y éste desplaza parte del antígeno marcado. Dicho desplazamiento depende de la concentración del analito, ya que la unión analito-anticuerpo es una reacción de equilibrio dinámico. ^[13]
- ELISA competitivo directo [Figura 1.9 (C)]. En este caso la enzima marca directamente el anticuerpo primario.

- ELISA competitivo indirecto [Figura 1.9 (D)]. Analito y antígeno (inmovilizado en la fase sólida) compiten por el sitio de enlace con el anticuerpo. El complejo reacciona con un segundo anticuerpo marcado.

Los resultados de un ensayo inmunológico competitivo se ajustan a una curva de forma sigmoidea, según a la siguiente ecuación: ^[14]

$$y = (A-B) / [1 + (x / C)^D] + B \quad \text{Ecuación 1.1}$$

El parámetro A se corresponde a la señal máxima; B es la señal mínima; C es la concentración que corresponde al 50% de la señal máxima (IC_{50}) y D es la pendiente en el punto de inflexión de la curva.

La curva de competición permite caracterizar el ensayo en cuanto a sensibilidad y detectabilidad (LOD). La sensibilidad y la detectabilidad son parámetros que determinan la capacidad de análisis de un sistema analítico.

La definición de detectabilidad es un aspecto bastante controvertido. La mayoría de los criterios coinciden en que el límite de detección se define a partir de la más pequeña cantidad detectable de un analito por encima del ruido de un procedimiento y dentro del límite declarado de aceptación. En el caso de un ensayo inmunológico competitivo por límite de detección se entiende la cantidad de analito que determina una inhibición del 10% de la unión del analito marcado (competidor) al anticuerpo, es decir la concentración del analito que corresponde al 90% de la señal máxima (véase Figura 1.10).

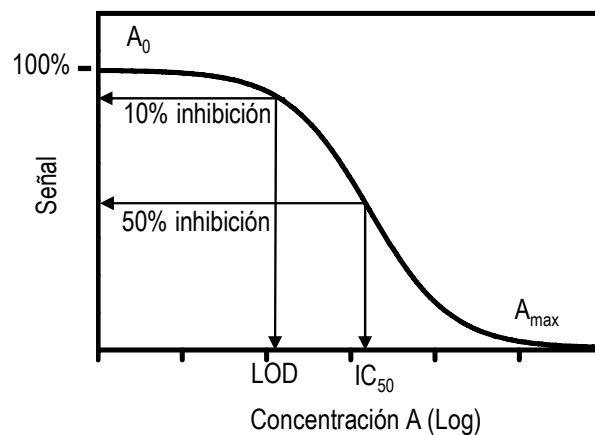


Figura 1.10: Típica curva dosis-respuesta para un inmunoensayo competitivo. El LOD y IC_{50} corresponden al 90% y al 50% respectivamente de la señal máxima en ausencia de analito (A_0)

De otra forma el límite de detección se puede calcular a partir de la desviación estándar del blanco. La probabilidad que la más pequeña señal analítica discernible (Y_L) puede ser medida y no corresponde a una fluctuación aleatoria de la medida del blanco (Y_B) depende de a cuantas unidades de desviación estándar del blanco (S_B) está Y_L de Y_B (promedio de las medidas del blanco). Si la diferencia entre Y_B e Y_L es $3S_B$ la probabilidad que la medida de Y_L sea una fluctuación del blanco es menor que el 0,13% (si el número de medidas del blanco es superior a 25).

Para determinar la concentración límite, X_L , IUPAC define que:

$$Y_L = \overline{Y_B} + KS_B \quad \text{Ecuación 1.2}$$

donde K es un valor que se elige de acuerdo al nivel de confianza que se desee, generalmente 3.

La sensibilidad es una medida del factor de respuesta del sistema analítico en función de la variación de concentración del analito.

1.6 TÉCNICAS CLÁSICAS DE ANÁLISIS DE DNA

Las técnicas de análisis clásicas de DNA pueden clasificarse y sistematizarse en estrategias de secuenciación y estrategias de hibridación, siendo estas últimas las más usadas una vez que se conoce la secuencia que se pretende investigar. ^[15]

Básicamente, hay tres tipos de metodologías de hibridación entre un gen (secuencia analítica de interés) y la sonda (su secuencia complementaria) en función de la localización de las partes intervinientes en la reacción de hibridación.

Las tres técnicas generales que se utilizan son:

- Hibridación en solución u homogénea: cuando tanto la sonda como la secuencia a analizar se encuentran en solución y, por lo tanto, la reacción de hibridación ocurre en este medio,
- Hibridación en membranas o filtros: cuando una de las secuencias (que puede ser la sonda o el gen a investigar, según el formato del análisis) se encuentra inmovilizada en un soporte sólido o membrana,
- Hibridación *in situ*: cuando la secuencia analítica de interés está en una célula o tejido (preparación citológica). ^[16]

La hibridación *in situ* aporta datos que no pueden conocerse con las otras dos metodologías, su importancia ha ido en aumento, convirtiéndose en una herramienta

importante en biología celular y molecular. La principal diferencia entre las hibridaciones convencionales (en solución o en membranas) y la hibridación *in situ*, consiste en que en las primeras se aíslan los ácidos nucleicos de una población de células y, por lo tanto, se promedia la información de cada célula individual respecto a la contribución total de la población celular, mientras que en la segunda se estudia la información molecular de cada célula individual en un tejido o en una población de células.

Las técnicas de hibridación en solución u homogénea han ido ganando uso debido a la aparición de estrategias de amplificación del material genético con detección en solución y a tiempo real. La importancia de estas metodologías ha ido en aumento por la posibilidad de cuantificar en tiempo real los productos de la amplificación sin necesidad de inmovilizar el DNA en un soporte sólido (§ 1.6.2).

A continuación se describen brevemente estas técnicas.

1.6.1 Amplificación del DNA. Reacción en cadena de la polimerasa

En 1983, Kary Mullis (Premio Nobel de Química, 1993) ideó una metodología para duplicar hebras de DNA de manera artificial, que ha cambiado el curso de biología molecular y de la química bioanalítica. ^[17-19] El concepto de la amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) es muy simple, pero su impacto ha sido extraordinario por ser una metodología rápida, económica, y un medio sencillo para la obtención de microgramos de DNA a partir de cantidades indetectables por los métodos utilizados hasta el momento.

Gracias a la PCR, las cantidades ínfimas (y antes insuficientes) de DNA dejaron de ser una limitación para procedimientos de diagnóstico e investigación del DNA.

La PCR es una técnica de síntesis enzimática (*in vitro*) de secuencias definidas de DNA por la extensión simultánea de cebadores (en inglés, *primers*) complementarios a las hebras de DNA de la muestra. La reacción utiliza dos oligonucleótidos (cebadores), que se hibridan a las cadenas complementarias de DNA de manera que flanquean la secuencia de DNA que se desea amplificar. La elongación de los cebadores es catalizada por una enzima llamada Taq DNA polimerasa, cuya principal peculiaridad es ser estable al calor. Se aísla de una bacteria termófila (*Thermus aquaticum*). En general, la DNA polimerasa lleva a cabo la síntesis de una cadena complementaria de DNA en la dirección 5'→3' usando una hebra simple de molde, pero comenzando su polimerización desde una región de doble hebra, donde se ha hibridado el cebador complementario a esa región. Esta es la reacción de

extensión del cebador. El resultado es la síntesis *de novo* de la región de DNA flanqueada por los dos cebadores.

La PCR es, entonces, una metodología analítica que se realiza por repetición de un ciclo que involucra tres pasos:

- la separación de las dos hebras complementarias de DNA analito que sirve de molde;
- la hibridación de los cebadores;
- la extensión de los mismos por la Taq DNA polimerasa.

Los pasos de cada ciclo se consiguen simplemente variando la temperatura de la mezcla de reacción. Esto resulta en la acumulación del fragmento específico de DNA que se desea amplificar.

Debido a que el producto -generado por extensión de los cebadores- durante un ciclo determinado puede servir como molde en el próximo ciclo, el número de copias de la secuencia de interés aproximadamente se dobla durante cada ciclo. Por lo tanto, 20 ciclos de PCR rinden cerca de 1 millón de copias del DNA analito de la muestra original.

A continuación se explica con más detalles en que consiste cada ciclo de la reacción:

1- Desnaturalización. Calentamiento a 95 °C

Permite que las dos hebras complementarias de DNA que sirven de molde, se separen (o se deshíbriden). Es importante que el DNA de la muestra se separe completamente en la primera deshíbrida, y debido a su longitud, es conveniente que la primera vez se mantengan los 95 °C durante unos cinco minutos. Si al comienzo de la PCR el DNA se separa sólo parcialmente, tiene tendencia a rehibridarse en el paso posterior dificultándose, por lo tanto, la reacción de cada hebra con los cebadores. Para la deshíbrida durante el resto de los ciclos de PCR, es suficiente mantener esta temperatura de 20 a 30 segundos.

2- Hibridación. Enfriamiento a 37 °C

Esta fase se denomina también fase de "*annealing*". Una vez que el DNA está desnaturalizado se disminuye la temperatura entre los 40 y los 60 °C (dependiendo de la secuencia de los primers) para que se pueda producir la unión de los *primers* a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar. Para la mayoría de los propósitos, la temperatura de hibridación de los cebadores debe optimizarse empíricamente, ya que es el factor más crítico en cuanto a la especificidad de la reacción. Además, es una temperatura de compromiso. Si la temperatura es demasiado alta, la tendencia es a la deshíbrida y no a la hibridación, pero si la misma existe, es muy específica a alta

temperaturas. La temperatura de fusión o *annealing* (T_m , del inglés *melting temperature*) depende de varios factores y es relativamente específica para cada *primer*.

La longitud de los *primers* y la secuencia son críticas en la designación de los parámetros de una amplificación, una fórmula simple para calcular la T_m es la siguiente:

$$T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$$

No obstante, cada *primer* exige una serie de estudios experimentales para determinar su temperatura de *annealing* o hibridación ya que si la temperatura es muy baja, la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta, no se producirá una unión completa.

3- Extensión. Calentamiento a 72 °C

Durante este paso, la Taq polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer utilizando como molde la cadena de DNA previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72 °C ya que es la temperatura a la que la Taq DNA polimerasa alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pb, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2Kb. La Taq polimerasa puede adicionar 60 bases/seg a 72 °C.

Cada ciclo (pasos 1, 2 y 3) puede repetirse tantas veces como DNA se quiera obtener, existiendo un número de ciclos óptimos para la reacción (de 25 a 40 ciclos).

4- Extensión final

Usualmente, después del último ciclo, los tubos de reacción se mantienen a 72 °C de 5 a 15 minutos, con el objeto de que se completen productos con extensiones parciales.

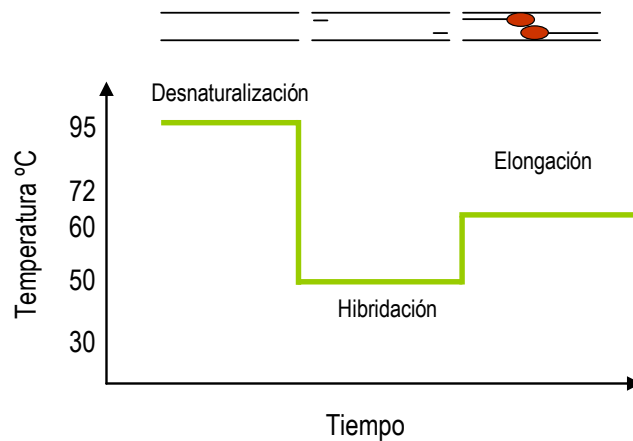


Figura 1.11: Ciclos de temperatura de la PCR. Desnaturalización (95 °C), hibridación con los primers (50 °C) aproximadamente, elongación a través de la Taq DNA Polimerasa entre 60 y 72 °C.

Los requerimientos de la reacción son muy simples: *i)* DNA muestra; *ii)* cebadores; *iii)* desoxirribonucleótidos trifosfatos: dan la energía y el sustrato para la reacción; *iv)* DNA polimerasa termorresistente; *v)* solución amortiguadora que contenga iones Mg^{+2} , que es el catión necesario para que la enzima funcione.

Tanto los cebadores como desoxirribonucleótidos trifosfatos se encuentran en franco exceso. El equipamiento necesario para la reacción es un termociclador, que permite obtener las temperaturas deseadas rápidamente, de manera reproducible y precisa. La velocidad de calentamiento/enfriamiento de estos equipos es de 1 °C por segundo.

1.6.2 Cuantificación de los productos de la amplificación a tiempo real

Un avance importante en la PCR lo constituye la posibilidad de cuantificación a tiempo real del producto amplificado. La estrategia de amplificación y de cuantificación simultánea se denomina Q-PCR (del inglés *quantitative-PCR*) o RT-PCR (del inglés *real-time PCR*). Esto ha sido posible mediante la utilización de moléculas fluorescentes que permiten monitorizar la amplificación del fragmento de interés a cada ciclo de amplificación.

La estrategia más económica y fácil consiste en la incorporación de moléculas orgánicas fluorescentes denominadas intercaladores. Estas moléculas poseen sistemas con anillos aromáticos planos que se incorporan entre los pares de bases nitrogenadas de la doble hélice del producto generado mediante PCR. Este fenómeno de intercalación provoca una diferencia en la λ emisión de la molécula fluorescente intercalada de la no intercalada, permitiendo, por tanto, cuantificar (véase figura 1.12).

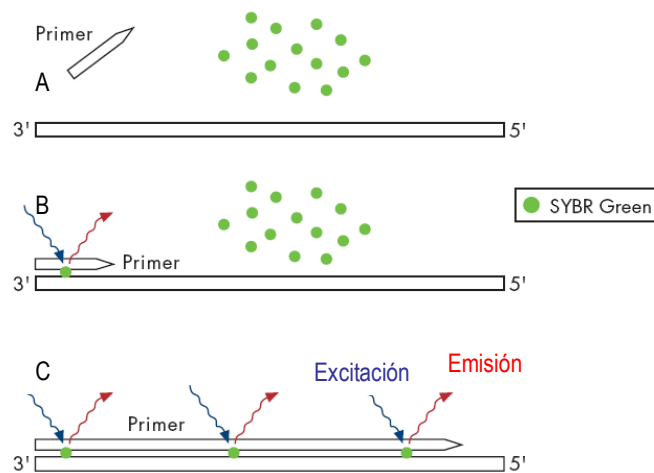


Figura 1.12: Representación esquemática del mecanismo de intercalación de una molécula fluorescente. (A) hibridación de los primers a la secuencia molde, (B) fases de extensión con intercalación de la molécula fluorescente, (C) productos de PCR generados y emisión de fluorescencia.

Los indicadores intercalantes fluorescentes pueden unirse de manera específica al producto de la PCR así como de manera inespecífica, a complejos tipo dímeros de *primers* (*primers* unidos entre sí inespecíficamente). Este inconveniente puede obviarse mediante el uso de una tercera sonda, capaz de reconocer específicamente una secuencia interna (y diferente a la del los *primers*) del DNA a amplificar. La tercera sonda puede tener diferentes conformaciones. Las más conocidas son las sondas de TaqMan™ (o de hidrólisis), las sondas FRET y los *beacons*.

La tecnología de sondas Taqman™ está basada en la actividad 5'→3' exo-nucleasa de la Taq DNA Polimerasa y en la utilización de una sonda de fluorescencia doblemente marcada (Figura 1.13). Dicha sonda consiste en un oligonucleótido complementario al analito en una región delimitada por los *primers*, que lleva unido un grupo emisor de fluorescencia a su extremo 5' y un grupo apantallador a su extremo 3'. Cuando la sonda está intacta, presenta una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET, del inglés *Fluorescence Resonance Energy Transfer*).

Un incremento de la fluorescencia indica que la sonda se ha hibridado con su secuencia complementaria del analito y ha sido degradada por la actividad exonucleasa 5'→3' de la Taq Polimerasa en su avance para generar productos amplificados. El aumento de la emisión está en relación directa con la aparición de producto amplificado específico.

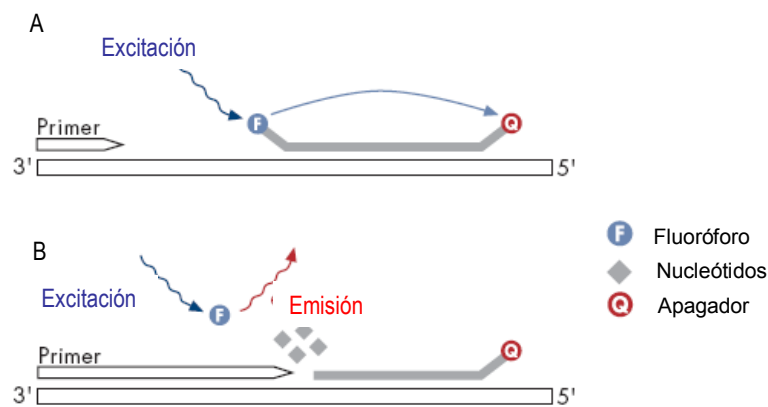


Figura 1.13: Principios de las sondas Taqman en RT-PCR. (A) La sonda Taqman y los primers se hibridan a la secuencia target, (B) la emisión de fluorescencia ocurre durante la fase de extensión cuando la actividad exonucleasa de la Taq DNA Polimerasa separa el fluoróforo de la sonda y hace que se aleje de la molécula apagadora.

La tecnología de sondas FRET utiliza dos pares de *primers* y dos sondas conjugadas respectivamente con fluoróforos en sus extremos 3' y 5'. Cuando las sondas se hibridan a la secuencia del analito, los dos fluoróforos se encuentran uno al lado del otro. Esto determina una transferencia energética entre el fluoróforo donador y el fluoróforo receptor que permite detectar la fase de hibridación.

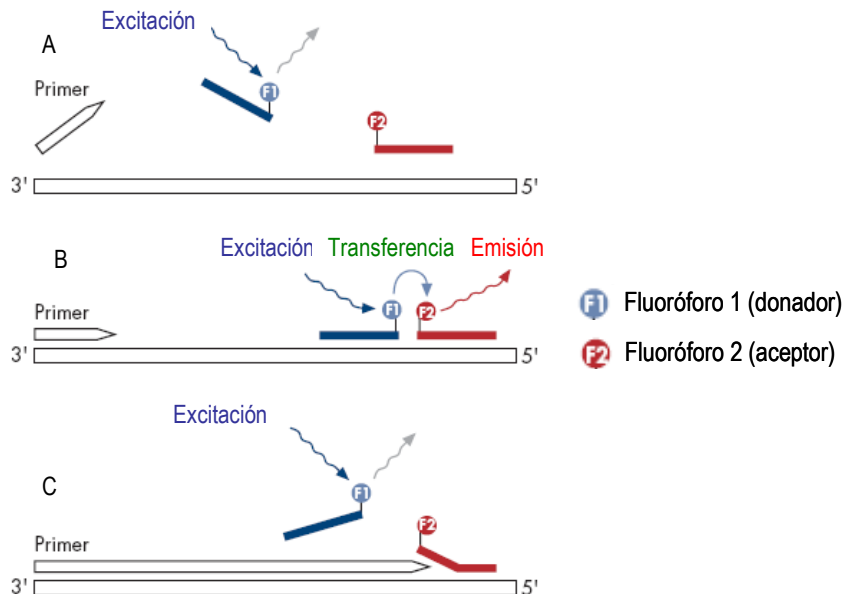


Figura 1.14: Principios de las sondas FRET. (A) Cuando las sondas no están hibridadas a la secuencia complementaria del DNA analito, no se observa emisión de fluorescencia; (B) la fase de hibridación se caracteriza por emisión de fluorescencia mediada por el segundo fluoróforo (aceptor), (C) la fase de elongación se caracteriza por no emitir fluorescencia debido a la separación de los dos fluoróforos.

El aumento de la emisión de fluorescencia será evidente durante la fase de hibridación de las sondas y será proporcional a la cantidad de producto generado (Figura 1.14).

La sonda *beacon* (Figura 1.15) de forma similar a la estrategia de la sonda Taqman™ consisten en una sonda doblemente marcada en su extremo 5' con un fluoróforo y en su extremo 3' con una molécula apagadora. La sonda está diseñada de forma que los dos extremos sean complementarios. Cuando la sonda está intacta, y en forma de horquilla, la transferencia energética de fluorescencia por resonancia hace que no se genere fluorescencia en cuanto los dos grupos (F-Q) se encuentran el uno al lado del otro. La emisión de fluorescencia ocurre en la fase de hibridación, cuando la sonda *beacon* se une a la secuencia complementaria del DNA analito y, por tanto, los dos extremos se abren y fluoróforo y molécula apagadora se separan.

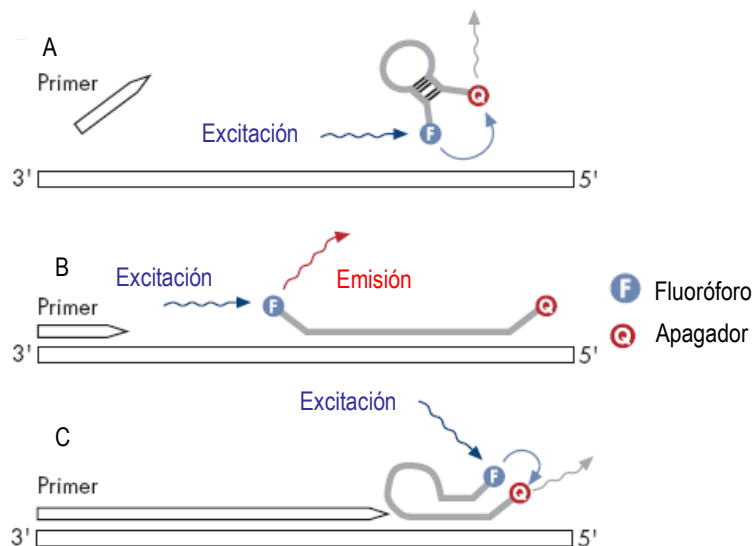


Figura 1.15: Principios de las sondas beacons. (A) La sonda en solución se presenta en forma de horquilla, (B) durante la fase de hibridación la sonda se abre y se genera fluorescencia proporcional a la cantidad de producto de PCR que se formado, (C) durante la fase de elongación la sonda se separa del DNA analito, pudiendo reciclarse para el siguiente ciclo.

De forma similar a la estrategia beacons el primer D-LUX™ (Figura 1.16) consiste en una sonda marcada pero esta vez con solo un fluoróforo. La sonda es, a la misma vez, un primer de la reacción. La misma secuencia de la sonda –complementaria entre si- hace que, en solución, la sonda / primer posea una conformación a horquilla que impide la emisión de fluorescencia. La emisión de fluorescencia se genera durante la fase de hibridación, cuando el primer se abre y se une a la secuencia flanqueante del fragmento que se va a amplificar.

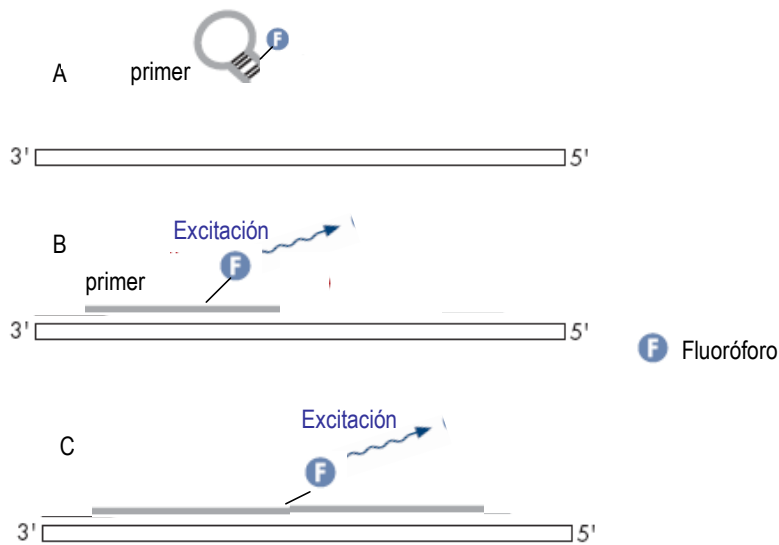


Figura 1.16: Principio de la sonda Lumix. (A) La sonda/primer en solución se presenta en forma de horquilla, (B) durante la fase de hibridación, el primer se abre y el fluoróforo emite fluorescencia proporcional al producto de PCR que formado, (C) fase de elongación del producto de PCR.

1.6.3 Cálculo de la eficiencia de amplificación

La curva de amplificación en RT-PCR se construye graficando en la abscisa el número de ciclos y en la ordenada la señal de fluorescencia. La forma de la curva es sigmoidea, en ella se pueden distinguir cuatro fases diferentes (véase Figura 1.17):

- Fase I. Línea de base.
- Fase II. Fase exponencial en donde ocurre la duplicación del fragmento a cada ciclo de amplificación (asumiendo una eficiencia del 100%). Durante esta fase la reacción es específica y precisa.
- Fase III. Fase lineal. Durante esta fase la reacción es más lenta y los productos empiezan a degradarse ya que los componentes de la reacción empiezan a ser un factor limitante
- Fase IV. Plateau. Durante esta fase no hay más formación del producto.

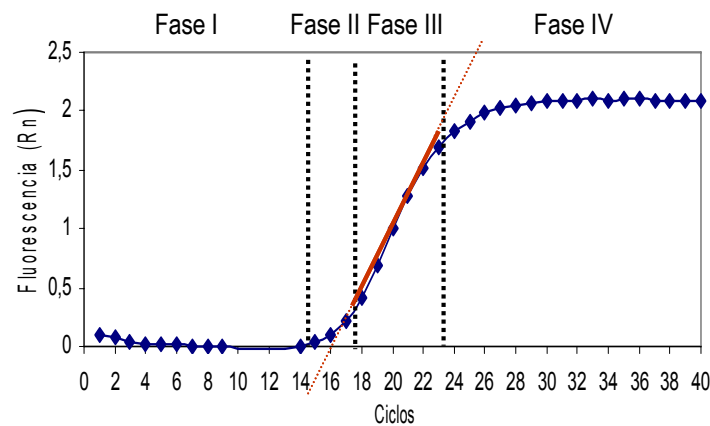


Figura 1.17: Descripción de las fases en una curva de amplificación de RT-PCR típica.

La ecuación general que describe esta gráfica de amplificación es:

$$N_c = N_0(E + 1)^c \quad \text{Ecuación 1.3}$$

siendo c el número de ciclos, E la eficiencia de la amplificación, N_0 número de copias de material genético al empezar la reacción, N_c el número de copias de material genético al ciclo 'c'. De la ecuación 1.3 derivan la siguientes ecuaciones:

$$N_0 = N_c / (E + 1)^c \quad \text{Ecuación 1.4}$$

$$N_0 = N_t / (E + 1)^{C_t} \quad \text{Ecuación 1.5}$$

siendo N_t el número de copias de material genético al ciclo 't' y siendo C_t (del inglés *threshold cycle*) el ciclo de amplificación al cual es posible detectar un incremento estadísticamente significativo de la fluorescencia. El ciclo C_t se puede calcular trazando una línea paralela a la abscisa, llamada umbral (del inglés *threshold*), de esa forma -la perpendicular en la abscisa trazada a la intersección entre de la curva de amplificación y el umbral- determina su valor. [20]

La eficiencia de amplificación en un experimento de RT-PCR es la velocidad con la cual se generan los productos de reacción y normalmente se expresa en porcentaje. Si los productos se doblan a cada ciclo, la eficiencia es del 100%. Matemáticamente, la eficiencia de la reacción se obtiene del logaritmo de la Ecuación 1.5.

$$\log N_0 = -\log(E + 1) \times C_t + \log(N_t) \quad \text{Ecuación 1.6}$$

Graficando el $\log N_0$ (concentración inicial de DNA) y el valor de C_t correspondiente a cada dilución de la muestra, se obtiene una recta (Ecuación 1.6); la eficiencia de amplificación

se calcula de su pendiente. Una pendiente de -3.32 indica una reacción con una eficiencia del 100%; curvas con pendientes inferiores indican una eficiencia inferior, mientras pendiente mayor de -3.32 (ej. -2.5) indica una eficiencia superior al 100% que representa problemas en la calidad de la muestra o errores metodológicos (ej. dilución de la muestra).

1.6.4 Componentes de la reacción de PCR

Los componentes principales de una reacción de RT-PCR son el DNA molde que se pretende amplificar, los *primers* y un buffer que contiene *i)* la enzima Taq DNA Polimerasa, *ii)* cofactores (iones Mg y KCl) y *iii)* desoxinucleótidos trifosfatos.

A continuación se describirán brevemente los componentes principales:

1. La Taq DNA Polimerasa: es la enzima responsable de la elongación de los productos de PCR. La velocidad de generar la copia complementaria del DNA molde normalmente es de 50-60 nucleótidos por segundo a 72 °C y posee una vida media de una hora y media a 95 °C.

2. Los búferes de PCR: que se utilizan contienen normalmente iones mono y bivalentes: KCl, MgCl₂ y Tris. El MgCl₂ es el componente que más influye en la especificidad y rendimiento de la reacción ya que son necesarios para la actividad de la Taq polimerasa, actuando como cofactores de la polimerasa.

3. Los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs): La concentración de dNTPs y de MgCl₂ va relacionadas ya que el Mg²⁺ se une a los dNTPs con lo que concentraciones elevadas de dNTPs inhibirían la reacción, al no disponer la Taq DNA polimerasa iones Mg²⁺ para incorporar dNTPs.

4. AmpErase UNG: es una enzima que se añade al buffer de reacción para degradar productos generados por amplificaciones anteriores y evitar así falsos positivos. Los buffer de PCR suelen sustituir al dTTP por un nucleótido no estándar dUTP. La AmpErase UNG actúa de forma selectiva degradando los productos que contienen este nucleótidos. [21;22]

5. Referencia pasiva: consiste en una molécula fluorescente que permite normalizar la señal del fluoróforo reporter respecto a cambios de volúmenes o concentración en el volumen de reacción. Actúa como un patrón interno.

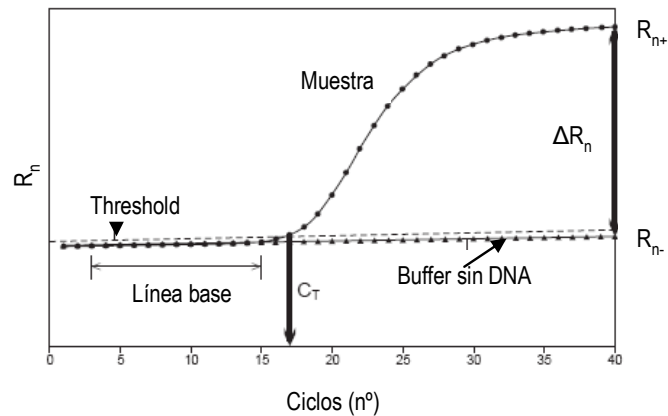


Figura 1.18: Curva de amplificación típica de una reacción de RT-PCR. La figura muestra los parámetros clave de la curva: Threshold, línea base, señal neta de fluorescencia y C_T .

La normalización (ΔR_n) es obtenida restando a la señal de la molécula reporter (R_{n^+}) la señal generada por la referencia pasiva o de la muestra sin DNA (R_{n^-}) como muestra la Figura 1.18. Este valor es obtenido a los primeros ciclos de la PCR cuando no es posible detectar un incremento significativo de fluorescencia.

$$\Delta R_n = (R_{n^+}) - (R_{n^-})$$

Ecuación 1.7

1.7 ESTRATEGIAS DE INMOVILIZACIÓN DE BIOESPECIES EN SOPORTES SÓLIDOS

A pesar de que en la actualidad se están desarrollando estrategias de detección en fase homogénea de bioespecies —es decir, que no necesitan estar inmovilizadas para poder ser detectadas— (véase como ejemplo § 1.6.2), la inmensa mayoría de las técnicas biológicas implican la inmovilización de las moléculas biológicas en soportes sólidos. La inmovilización permite llevar a cabo el ensayo biológico, favoreciendo el lavado eficaz de los reactivos que se agregaron en franco exceso con el objeto de desplazar la reacción biológica a la derecha. La inmovilización de un elemento de reconocimiento a un soporte sólido es, por tanto, una etapa clave en el diseño de estrategias para la detección de bioespecies.

Las técnicas de inmovilización más empleadas son (Figura 1.19):

- *Adsorción física.* Implica la unión del elemento de reconocimiento mediante interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógenos y fuerzas de Van der Waals.
- *Atrapamiento.* Consiste en retención física en el interior de membranas permeables, o matrices poliméricas tales como como ágaros o geles, poliuretanos (PU) o poli(vinil-alcohol) (PVAL). [23]
- *Entrecruzamiento* (del inglés *cross-linking*). Consiste en la unión irreversible de los elementos de reconocimiento entre si mediante agentes bifuncionales (tal como el glutaraldehído o la polietilenimina).
- *Enlace covalente.* Implica la formación de uniones covalentes entre el elemento de bioconocimiento con grupos químicos activados del soporte sólido.
- *Unión mediante moléculas de afinidad.* Consiste en el uso de moléculas tales como la avidina o la proteína A para inmovilizar biomoléculas mediante reacciones de afinidad.

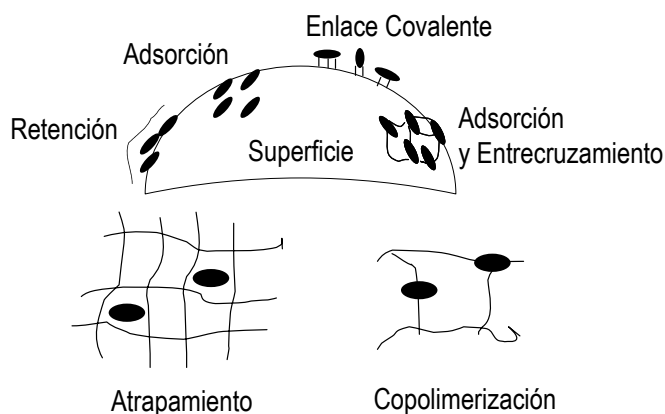


Figura 1.19: Representación esquemática de las diferentes técnicas de inmovilización de biomoléculas en una superficie sólida.

La elección de uno u otro procedimiento depende principalmente de la naturaleza del elemento biológico y del tipo de soporte sólido. Por lo que concierne a la biomolécula, hay que tener en cuenta las propiedades físico-químicas (dimensiones, composición, dominios hidrofílicos e hidrofóbicos) así como también la composición química.

El objetivo más importante de la técnica de inmovilización es mantener la actividad biológica y favorecer (o al menos no alterar) la cinética de la reacción biológica.

A continuación se describen las principales estrategias de inmovilización de bioespecies a superficies sólidas, utilizadas en la presente tesis.

1.7.1 Adsorción

La metodología más simple de inmovilización de biomoléculas es la adsorción, puesto que no son necesarios reactivos especiales ni modificaciones complejas. En este caso, la biomolécula (una enzima, un anticuerpo, un oligonucleótido o una molécula de DNA) se deposita en la superficie del soporte sólido. Las fases sólidas más usualmente utilizadas son de poliestireno o membranas de diferente naturaleza, tales como nylon o nitrocelulosa.

La adsorción puede llevarse a cabo en condiciones más o menos drásticas. Una adsorción irreversible puede obtenerse en ausencia de agua y en condiciones estáticas. Una adsorción menos drástica se consigue mediante reacción en solución del analito con el soporte sólido y en agitación. El producto así adsorbido conserva las moléculas de hidratación, que pueden jugar un rol importante en la estabilización del producto adsorbido.

Las desventajas reportadas de la técnica de adsorción son *i)* la posible desorción de la molécula biológica y *ii)* la aleatoriedad de la inmovilización con respecto a los grupos funcionales implicados en la biorreacción.

1.7.2 Unión covalente

El enlace covalente es generalmente irreversible y se basa en una reacción entre grupos reactivos de la molécula biológica a inmovilizar (no importantes para la actividad biológica) y grupos reactivos de la superficie sólida.

En el caso por ejemplo de enzimas o proteínas los grupos funcionales se encuentran en las cadenas aminoacídicas, tales como: *i)* grupos ϵ -amino de los residuos de lisina; *ii)* grupos carboxilo de los residuos de aspartato y glutamato; *iii)* grupos sulfhidrilo de los residuos de la cisteína y *iv)* grupos fenol de los residuos de tirosina.

Las ventajas de la inmovilización covalente son *i)* la baja pérdida de material biológico y *ii)* la elevada estabilidad de la molécula. Como desventajas se puede decir que es una técnica que requiere una activación previa del soporte sólido y procesos a menudo complicados y laboriosos. Además, no garantiza una correcta orientación de las moléculas biológicas.

1.7.3 Unión por afinidad

Debido a la importancia que posee la orientación de las bioespecies en cuanto a la sensibilidad y selectividad de un bioensayo, se han desarrollado diferentes metodologías de inmovilización que favorecen la correcta orientación de las biomoléculas con respecto a su aplicación biológica. Entre ellas, son de particular importancia aquellas que utilizan la proteína A o G (principalmente para la inmovilización de anticuerpos) y la unión biotina-estreptavidina.

1.7.3.1 Las proteínas A y G

La proteína A es una proteína monomérica de 42000 Daltons que se encuentra como componente de la pared celular en el 90% de las cepas de *Staphylococcus aureus* y es capaz de unirse a las regiones constantes segunda y tercera de la cadena pesada (Fc Cy2-Cy3). La afinidad de la proteína A depende de las regiones Fc del anticuerpo, que depende de la subclase. La proteína A tiene alta afinidad por los anticuerpos humanos, y de especies animales como el burro, conejo, perro, cerdo y cobaya, y menor afinidad –pero aún útil para inmovilizar– anticuerpos de ratón, vaca o caballo. La afinidad de la proteína A, sin embargo, es baja –y por tanto poco útil– para unirse a anticuerpos de oveja, cabra, rata o gallina. En este último caso, se suele emplear un anticuerpo puente de una especie por la que tenga alta afinidad. [24-27] La unión implica la formación de un conjunto de enlaces de naturaleza no-covalente entre los aminoácidos de la región Fc y la proteína A tales como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrófobas y fuerzas de Van der Waals. Estos enlaces son débiles si se consideran individualmente, pero sin embargo la totalidad de las interacciones producen una energía de unión que equivale o supera a un enlace de naturaleza covalente.

Una molécula de proteína A es capaz de unir hasta dos moléculas de IgG simultáneamente. La proteína A puede ser acoplada a diferentes moléculas incluyendo fluoróforos, enzimas o biotina sin que esto afecte a los sitios de enlace con los anticuerpos. Alternativamente, puede ser inmovilizada en la superficie de un soporte sólido para facilitar la purificación y la recuperación, tanto de anticuerpos monoclonales como de policlonales. [28] Otras propiedades de la proteína A que la hacen muy útil en métodos inmunológicos implican: *i)* debido a que la región de unión con el anticuerpo reside en la región Fc, la unión a proteína A no altera la capacidad del anticuerpo de unirse a su antígeno, *ii)* incluso una proteína A desnaturalizada, es capaz de renaturalizar fácil y rápidamente recuperando su capacidad de unión *iii)* aunque la afinidad de la proteína A por el anticuerpo es elevada, contrariamente la

unión antígeno/anticuerpo se puede romper con facilidad reduciendo el pH. Esto permitiría recuperar la capacidad de unión por el antígeno manteniendo los anticuerpos inmovilizados mediante la proteína A.

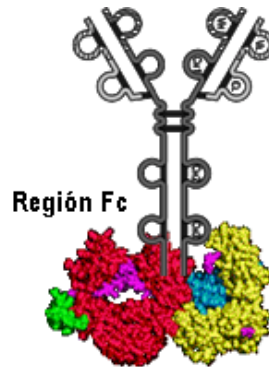


Figura 1.20: Figura esquemática de la unión de los anticuerpos en su región Fc y la proteína A.

De características similares a la proteína A, la proteína G es una proteína monomérica entre 30000 y 35000 Daltons aislada de la pared celular del *Streptococcus* beta-hemolítico de las cepas C o G capaz de unir la fracción Fc de los anticuerpos. [29-34] El interés de ésta y otras proteínas de pared celular bacteriana son sus características de afinidad que difieren de las de la proteína A. La proteína G difiere de la proteína A en su capacidad de reconocimiento de anticuerpos, siendo capaz de reconocer las cuatro clases de IgG incluyendo la IgG3, pero sin capacidad de unión para las IgM e IgA. [34] Uno de los inconvenientes de la proteína G es que presenta un segundo lugar de unión a la albúmina. Actualmente y mediante métodos recombinantes se ha eliminado ese segundo lugar de unión lo que ha supuesto un incremento de la utilidad de la proteína G.

1.7.3.2 La unión biotina-(estrept)avidina

La unión biotina-(estrept)avidina se ha convertido en los últimos años en una técnica ampliamente utilizada en un gran número de aplicaciones biológicas para facilitar la localización, identificación e inmovilización de moléculas biológicas. [35-38]

La estreptavidina es una proteína aislada de la bacteria *Streptomyces avidinii* mientras que la avidina es una proteína glicosidada (posee un 7% de carbohidratos) con carga positiva (pI ~10.5) aislada de la clara del huevo. La estreptavidina y la avidina poseen la capacidad de unir hasta cuatro moléculas de la vitamina biotina con la misma afinidad aproximadamente, ($K_a \sim 10^{15}$) [39] y con una fuerza de unión comparable a un enlace de tipo covalente. No

obstante la baja homología en la secuencia (~35 %), las dos proteínas poseen la misma estructura terciaria y cuaternaria y una misma combinación de aminoácidos en la región de unión con la biotina.

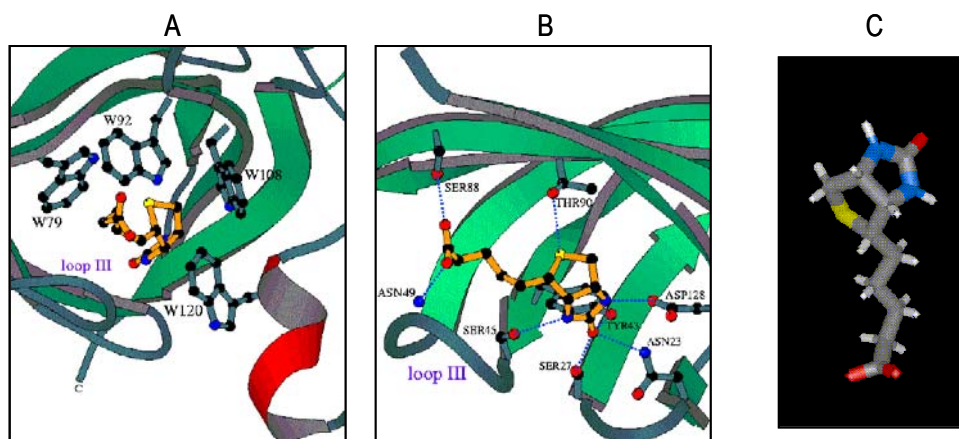


Figura 1.21: (A) La estreptavidina es una molécula tetramérica, (B) cada monómero puede interactuar con una molécula de biotina a través de cuatro residuos aminoácidos del triptófano. La interacción estreptavidina-biotina se establece a través de puentes de hidrógeno, (C) detalles estructurales de la molécula de biotina.

El enlace biotina-(estrept)avidina posee una elevada estabilidad a cambios de pH, temperaturas y a un amplio abanico de moléculas químicas tales como detergentes y moléculas con efecto desnaturizantes, un aspecto muy importante para su aplicación en técnicas bioanalíticas. [40]

Hay que remarcar que la inmovilización de biomoléculas que se basa en el enlace biotina-(estrept)avidina preserva con más efectividad la función biológica de las moléculas inmovilizadas con respecto a otras técnicas comúnmente utilizadas. [41-43]

Una gran variedad de moléculas como proteínas [44], enzimas, polisacáridos, ácidos nucleicos y oligonucleótidos pueden fácilmente ser modificados con biotina sin variar su funcionalidad biológica.

1.8 NUEVAS ESTRATEGIAS DE SEPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

La necesidad de llevar a cabo determinaciones analíticas de manera rápida, selectiva y con elevada sensibilidad ha dado lugar al desarrollo de nuevas técnicas de separación del material biológico de una matriz compleja. La gran variedad de soportes sólidos para separaciones cromatográficas proporcionan un gran abanico de materiales de diferente

naturaleza para conseguir separaciones biológicas basadas en distintas propiedades físico-químicas de las biomoléculas a separar. El desarrollo, en las últimas décadas, de esferas constituidas en el interior por un núcleo magnético ha abierto nuevas perspectivas de aplicaciones a cualquier análisis con soporte sólidos, especialmente en sistemas automáticos. [45] Su campo de aplicación es muy amplio, incluyendo el bioanálisis, la biomedicina [46], el análisis de productos alimentarios [47] y medioambientales [48-51]. El tamaño de las esferas puede compararse con el de las células, proteínas u oligonucleótidos. [45;52]

La principal ventaja de las esferas magnéticas respecto a otras esferas normalmente usadas tales como las de agarosa, es la posibilidad de separar la fase sólida de forma más simple y rápida, a través de la aplicación de un campo magnético externo. A continuación se describen con más detalle las propiedades de este material.

1.8.1 Las esferas magnéticas

En 1979, John Ugelstad consiguió obtener, por primera vez, esferas magnéticas recubiertas de poliestireno, de formas y dimensiones reproducibles. [53] La particularidad de estas esferas es que son paramagnéticas, es decir, sólo muestran comportamiento magnético en presencia de un campo magnético. Si el mismo se retira, el magnetismo desaparece.

Las esferas magnéticas representan un gran avance respecto a las técnicas de separación en bioanalítica. Constituidas de un núcleo de material magnético encapsulado en un polímero inerte, ofrecen una alternativa a los soportes sólidos tradicionales no magnéticos. La superficie polimérica (funcionalizada por grupos químicos o directamente por moléculas biológicas), permite el enlace de diferentes tipos de biomoléculas [54], tales como anticuerpos para el desarrollo de inmunoensayos [50;55], u oligonucleótidos para análisis de DNA [56].

Hoy en día existen un gran número de compañías que comercializan esferas magnéticas activadas por grupos químicos reactivos que facilitan la unión con material biológico hasta esferas con material biológico directamente inmovilizado.

Son numerosas las ventajas que ofrece el uso de esferas magnéticas en los procesos de bioseparación. Para citar algunas: fácil manipulación, posibilidad de poder trabajar con sistemas limitados por la reversibilidad del mecanismo de reconocimiento, tales como procesos automatizados de flujo [57;58], capacidad de reutilización, escasa formación de agregados, y buena dispersión en solución acuosa, entre otras.

Las reacciones con esferas magnéticas se caracterizan por su elevada sensibilidad, una elevada cinética de reacción, una buena reproducibilidad, y por la ampliación del rango

de trabajo para un determinado analito obtenido mediante la modulación de la cantidad de esferas utilizadas como fase sólida. Pero sin duda, sus características más importantes son la capacidad de concentrar la biomolécula, y la minimización del efecto matriz de la muestra.

1.8.2 Estructura y clasificación de las esferas magnéticas

Las esferas magnéticas se pueden distinguir por el tamaño, la naturaleza del polímero de recubrimiento superficial y los grupos funcionales, que pueden ser de naturaleza química o biológica.

Los tamaños comercialmente disponibles varían entre pocos nanómetros a pocos micrómetros. Las esferas magnéticas están formadas por una dispersión de material súper paramagnético ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ y Fe_3O_4) recubierto de poliestireno, un polímero que encapsula este material magnético que le proporciona una superficie definida y evita la interacción del material biológico con el hierro que forma parte del núcleo de las esferas.

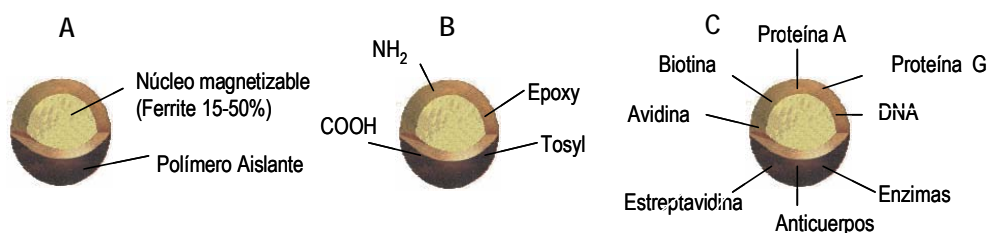
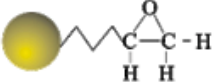
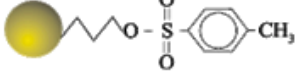
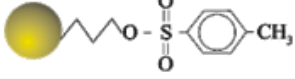
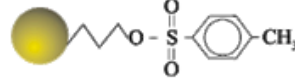





Figura 1.22: Representación esquemática de esferas magnéticas (A), activadas por grupos químicos (B), y modificadas con moléculas biológicas (C).

Cuando se elige una tipología de esferas para un determinado tipo de bioseparación hay que tener en cuenta diferentes factores: *i)* la dimensión de la esferas, *ii)* el área superficial, *iii)* los grupos químicos reactivos, *iv)* la hidrofobicidad o hidrofiliidad, y *v)* la carga superficial.

En general, una superficie hidrofílica favorece un enlace que afecta menos las propiedades nativas de biomoléculas, ya que los grupos funcionales de enzimas o proteínas se quedan intactos después de la inmovilización. La hidrofobicidad favorece una buena dispersión en suspensión y una baja absorción no específica.

Tabla 1.1: Clasificación de esferas magnéticas según sus superficies hidrofóbicas y hidrofílicas.

Esfera magnéticas comerciales	Dimensión	Grupos funcionales
Esferas hidrofóbicas		
M-450 Epoxi	4.5 μm	
M-450 Tosil	4.5 μm	
M-280 Tosil	2.8 μm	
Esferas hidrofílicas		
M-500	4.5 μm	
M-270 Epoxi	2.8 μm	
M-270 Carboxilo	2.8 μm	
M-270 Amina	2.8 μm	

Las esferas magnéticas modificadas con moléculas biológicas tales como estreptavidina o proteína A o G representan una plataforma de afinidad universal para la inmovilización de moléculas biotiniladas de diferentes naturaleza y anticuerpos de diferente especificidad, respectivamente.

1.9 NUEVAS METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS BIOLÓGICOS. LOS IMMUNOSENSORES Y LOS BIOSENSORES DE DNA

La necesidad de análisis biológicos en áreas cada vez más diversas –tales como la industria– con dispositivos cuya utilización no requiera la supervisión profesional, cuyo manejo sea sencillo y cuyo coste sea menor facilitó el desarrollo de los biosensores como metodología alternativa a los métodos de bioanálisis clásicos. Los métodos tradicionales de análisis microbiológicos por ejemplo, no tienen la sensibilidad suficiente para llegar a detectar los niveles fijados por las nuevas regulaciones y los métodos químicos clásicos como la cromatografía o la espectrometría de masas implican laboriosos protocolos de preparación de la muestra, elevado coste y personal especializado. Los requerimientos de mayor simplicidad, selectividad y bajos costes de análisis para muestras en matrices complejas llevó a

complementar las ventajas que ofrecen los sensores químicos con la gran especificidad que ofrecen los métodos clásicos de análisis biológicos. Esta conjugación multidisciplinar ha tenido como resultado numerosos trabajos de investigación dirigidos al desarrollo de biosensores como alternativa de análisis. [59-64]

Se puede decir que un inmunosensor es un sensor químico con una especie inmunológica como elemento de reconocimiento, o lo que es lo mismo, un biosensor inmunológico. Los genosensores (o biosensores de DNA) son dispositivos capaces de dar una señal analítica a partir del evento de hibridación. Combinan una simple hebra de DNA llamada sonda que confiere selectividad, con un transductor, que confiere sensibilidad y que convierte el evento de reconocimiento en una señal electrónica amplificada. Antes de desarrollar el tema de biosensores inmunológicos en sí y biosensores de DNA, se explicará brevemente la configuración de un sensor químico y de un biosensor (§1.9.1), haciendo énfasis en la transducción amperométrica (§1.9.2.1), que es la metodología utilizada en el presente trabajo.

1.9.1 Sensores químicos y biosensores

Un sensor químico es un dispositivo analítico que transforma la información química en una señal analíticamente útil y es capaz de dar la concentración de un componente específico de una muestra. Un sensor se caracteriza por su robustez, facilidad de utilizar y capacidad de suministrar información continua de manera fiable. Los sensores químicos usualmente contienen dos componentes básicos conectados en serie: un sistema de reconocimiento molecular –el receptor–, y un transductor. [65]

Se define como biosensor al dispositivo analítico que incorpora un elemento biológico de reconocimiento selectivo (o específico de clase) –denominado bioreceptor–, en íntimo contacto con un transductor capaz de detectar el evento de reconocimiento molecular entre el analito y la biomolécula y transformarlo en una señal analítica, usualmente de tipo eléctrica (véase Figura 1.23). [66;67]

El material biológico es el que otorga, por lo tanto, la selectividad del biosensor, mientras que el transductor es el que da la sensibilidad. De ahí la importancia de seleccionar un transductor adecuado.

Las etapas básicas de funcionamiento de un biosensor son las siguientes:

- Interacción específica del analito de la muestra con el material biológico inmovilizado sobre el transductor;
- Detección, por parte del transductor, de la variación de alguna propiedad física o química del sistema, provocada por la reacción de reconocimiento selectivo;
- Procesamiento de la señal y obtención de resultados.

El material biológico que se puede utilizar es muy variado [68]: enzimas, células [69], tejidos, cofactores, orgánulos, receptores, anticuerpos, microorganismos, agentes inmunológicos, DNA. Los biosensores se pueden clasificar en función de la propiedad física que mida el transductor. Los transductores más ampliamente utilizados son ópticos, electroquímicos y piezoeléctricos. [68]

Tradicionalmente, el biorreceptor se inmoviliza en la superficie del transductor mediante técnicas tales como adsorción, entrecruzamiento, enlace covalente o retención en membranas o geles, tal como se explicó en § 1.7.

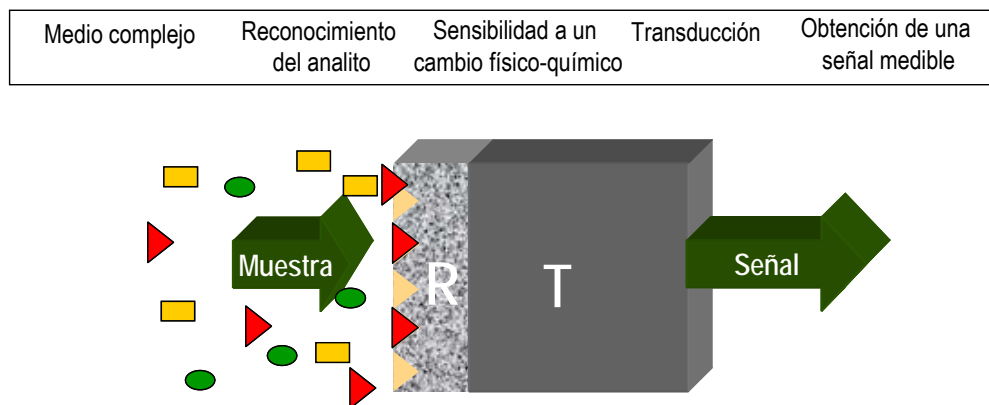


Figura 1.23: Principio de funcionamiento de un biosensor. 1) Interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento específico (R); 2) Transductor (T) sensible a un cambio físico-químico y 3) Obtención de una señal analítica proporcional a la cantidad de analito en la muestra.

1.9.2 Biosensores electroquímicos

Los biosensores basados en transductores electroquímicos pueden ser amperométricos [70;71], potenciométricos [72;73], conductimétricos, o de efecto de campo (ISFET) [71].

A continuación se describe la técnica amperométrica por ser la metodología de transducción que se ha utilizado principalmente en este trabajo.

1.9.2.1 Técnica amperométrica

Los biosensores amperométricos se basan en la medición de la intensidad de corriente resultante de la oxidación o reducción de una especie electroactiva sobre la superficie de un electrodo que se ha sometido a un potencial constante. [70] La elección adecuada de este potencial aporta una cierta selectividad electroquímica, ya que produce la descarga de unas o de otras especies químicas. A menudo esta selectividad es insuficiente, por lo cual se debe modificar la superficie de los electrodos (químicamente o biológicamente) para aumentar la selectividad y la sensibilidad de la detección.

Para realizar medidas de señal amperométrica se utilizan sistemas de tres electrodos. El electrodo de trabajo es aquel sobre el cual se mide el paso de corriente una vez se ha fijado una diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar, actuando este último como un contraelectrodo para cerrar el circuito eléctrico. Se necesita también un potencióstato el cual, mediante el electrodo de referencia, mantiene constante el potencial aplicado sobre el electrodo de trabajo. El electrodo de referencia acostumbra ser de Ag/AgCl, mientras que tanto el de trabajo como el auxiliar suelen ser de materiales conductores e inertes, como metales nobles, derivados de carbono y polímeros conductores.

La intensidad de la corriente obtenida es la medida directa de la velocidad de la reacción electroquímica descrita por la Ley de Faraday:

$$I = nF \frac{dc}{dt}$$

donde dc/dt es la velocidad de oxidación o de reducción en mol/s, n es el número de electrones por molécula implicados en la reacción y F es la constante de Faraday (96.485 C/mol electrones). Como se deriva de la ecuación, la corriente es directamente proporcional a la velocidad de transformación del analito en la superficie del electrodo. Sin embargo, una vez que las moléculas en la superficie se han electrolizado, se transfieren nuevas moléculas desde la solución a la superficie del electrodo. Así, la corriente también depende de manera crítica de la velocidad del transporte de masa del analito desde la solución a la superficie del electrodo. [74] Este último parámetro depende de la concentración del analito en la solución, del área del electrodo y de las condiciones de migración, convección y de difusión. [65] La migración, que se debe al transporte del analito por un gradiente eléctrico, generalmente se elimina adicionando un electrolito soporte en la celda. La convección, que se debe al transporte del analito impulsada por un movimiento de la solución –por ejemplo, mediante agitación–, puede controlarse simplemente si no se aplica agitación a la solución o si se aplica una agitación constante. La difusión, que se debe al transporte del analito debido al

gradiente de concentración del mismo, depende del tiempo, hecho que limita este tipo de experimentos.

Si la respuesta de los electrodos se mide en una solución estática, la corriente I decrece con el tiempo, según la ecuación descrita por Cottrell [74]:

$$I = nFA \left(\sqrt{\frac{D}{t\pi}} \right) C$$

en donde C es la concentración de la especie electroactiva en la solución, A el área del electrodo y D el coeficiente de difusión de la especie electroactiva en la solución. Debido a la dependencia del tiempo como se evidencia en la ecuación de Cottrell, en estas condiciones la corriente debería de disminuir hasta cero después de un período de tiempo, pero en realidad se obtienen intensidades de corrientes bajas. [75]

Una posibilidad es utilizar técnicas hidrodinámicas en las cuales se fuerza la convección, por ejemplo, agitando la solución o utilizando un electrodo de trabajo de disco rotatorio. El transporte de masa en estos experimentos –que es más rápido– es una combinación de la convección y la difusión. De esta manera, se forma una capa de difusión estática en la superficie del electrodo de un grosor L que depende de la velocidad de agitación. [76] Así se consigue que el transporte de masa a la superficie del electrodo nada más esté determinado por la difusión en esta capa. Se obtiene entonces un estado estacionario en un tiempo relativamente breve, en el que el transporte de masa es estable y el valor final de la intensidad depende de la concentración del analito. Esta relación puede expresarse mediante la ecuación:

$$I = nFA \left(\frac{D}{L} \right) C_s$$

donde C_s es la concentración del analito en solución. Esta ecuación puede simplificarse como:

$$I = KC_s$$

donde K es la constante que incluye la constante de Faraday, el área del electrodo y el coeficiente de difusión, entre otros. Para la utilización de esta ecuación se asume que la distribución del analito en la solución es uniforme hasta la capa de difusión, y que en la superficie del electrodo la concentración del analito es cero. [77]

1.9.3 Materiales utilizados como transductores amperométricos. Compósitos y biocompósitos

1.9.3.1 Materiales conductores clásicos y compósitos

Una de las ventajas de la amperometría es que los materiales utilizados en la construcción de sensores amperométricos son simples y accesibles. Su principal requerimiento es que sean materiales conductores. Pueden utilizarse materiales simples ^[78] (metales como platino y oro o derivados del grafito como carbono vitrificado o grafito pirolítico), o materiales compuestos (los denominados compósitos).

Un compósito resulta de la combinación de diferentes componentes que confieren sus cualidades básicas, pero generando un material con características propias. Consisten en una dispersión de un material sólido conductor (platino, oro, grafito), en una matriz polimérica de características aislantes. Los primeros transductores electroquímicos basados en compósitos descritos en la bibliografía fueron los de pasta de carbono ^[79]. Debido a inconvenientes de tipo físico-mecánico ^[80] (resistencia del material), se han desarrollado compósitos rígidos ^[81].

Los compósitos rígidos, especialmente los basados en resinas epoxi, han sido ampliamente utilizados en nuestros laboratorios. ^[82,83] Estos materiales se construyen combinando el polímero epoxi no conductor con el polvo de grafito que actúa como fase conductora, resultando en un compósito grafito-epoxi (GEC). Antes del curado de la resina, estos materiales son moldeables, permitiendo la construcción de sensores de varias formas y tamaños. Sin embargo, después del curado los materiales GEC son rígidos y muy resistentes desde el punto de vista físico-mecánico.

En cualquiera de este tipo de materiales, la modificación del transductor con el elemento de reconocimiento biológico se realiza en la superficie.

1.9.3.2 Materiales biocompósitos

Un biocompósito se obtiene cuando se adiciona un material biológico a la formulación del compósito. En este caso, el transductor está biológicamente modificado en volumen, representando un claro ejemplo de un sistema analítico integrado. Los biocompósitos presentan numerosas ventajas respecto a los biosensores cuyos transductores están modificados superficialmente. El biocompósito actúa no sólo como transductor, sino también como un reservorio del material biológico. Así, los biocompósitos pueden ser pulidos después de su uso exponiendo una nueva superficie con material biológico fresco y activo. Además,

como la mayoría de las reacciones biológicas pueden considerarse irreversibles, los biosensores modificados superficialmente requieren, posteriormente a su uso, una nueva modificación de la superficie. En los biocompuestos este hecho se solventa mediante un simple pulido.

Además, la preparación de estos materiales implica procedimientos de “química seca” a diferencia de los dispositivos modificados superficialmente.

Su preparación es, por tanto, muy sencilla al no requerir personal especializado, incrementando las potencialidades comerciales de estos materiales y facilitando la transferencia de su construcción a gran escala. Además la renovación de la superficie a través un simple pulido (§ 1.9.4.4) proporciona una nueva superficie para el siguiente análisis.

1.9.4 Recuperación de la bioactividad del elemento de biorreconocimiento en biosensores. Las distintas estrategias

Una característica deseable en un biosensor es la regeneración sin pérdida de sensibilidad de la superficie donde sucede la interacción del elemento de biorreconocimiento o receptor con el compuesto de interés analítico. La regeneración de la superficie permite evitar los inconvenientes debido a señales residuos de memoria de análisis anteriores, efectos de desnaturalización o pérdida del material biológico y la pasivación de la superficie del transductor. En general, se pueden describir dos estrategias de recuperación de la bioactividad en un dispositivo biosensor, que se basan en *i)* la regeneración química (§ 1.9.4.1) y, *ii)* la renovación de la superficie con un material fresco que no haya estado en contacto con la muestra (§§ 1.9.4.2, 1.9.4.3, y 1.9.4.4). Para tal fin, es necesario que haya receptores (o elementos de reconocimiento) libres capaces de unirse a nuevas moléculas de analito tras la primera determinación. Esto hecho permitiría realizar numerosos análisis consecutivamente. A continuación se explican estas estrategias de renovación del elemento de reconocimiento.

1.9.4.1 Regeneración mediante reactivos químicos

Consiste en la recuperación de la bioactividad mediante variaciones de pH y fuerza iónica elevada ^[84]: ácido cítrico/HCl 100 mM, HCl 10 mM, glicina/HCl 100 mM a pH 2, urea 8 M, cloruro de guanidina 6 M a pH 1.5, NaOH 100 mM con acetonitrilo, pepsina; proteinasas a pH 1.0; o mediante la utilización de reactivos específicos que consiguen desplazar el analito del centro activo del elemento biológico. Lo que se intenta es conservar la capacidad de

reconocimiento del material biológico inmovilizado y las características sensoras del transductor. [85]

1.9.4.2 Renovación mediante un biosensor de un sólo uso

Consiste en la posibilidad de utilizar biosensores descartables de un sólo uso de conformación planar, fabricados mediante técnicas de producción masiva (*thin film* y *thick film*). Estas técnicas –especialmente las de *thick film*– permiten la construcción de sensores de un sólo uso con una buena reproducibilidad entre los diferentes sensores de un mismo lote de fabricación.

1.9.4.3 Renovación mediante membranas recambiables

El material biológico se inmoviliza mediante una membrana sintética recambiable fácilmente manipulable y adaptable a la superficie del transductor. Después de cada análisis, la membrana antigua se quita y se substituye con una nueva.

1.9.4.4 Renovación mediante el uso de materiales biocompuestos

Es una de las metodologías utilizadas en la presente tesis. Como se ha explicado en detalle en § 1.9.3.2, un biocompuesto es un transductor biológicamente modificado en volumen. Su construcción resulta bastante sencilla, ya que las moléculas biológicas que hacen parte de las reacciones se introducen en la matriz que compone el electrodo. Una de las ventajas más importantes de estos dispositivos es la posibilidad que poseen de recuperar la bioactividad mediante un simple pulido y de proporcionar una nueva superficie después de cada análisis. Si todos los componentes de la pasta se encuentran uniformemente dispersos en el material conductor, cada nueva superficie proporciona resultados altamente reproducibles.

1.9.5 Inmunosensores

Los inmunosensores son dispositivos capaces de dar una señal analítica a partir del evento de formación del complejo inmunológico. [86] Combinan un agente de reconocimiento inmunológico (un antígeno, o bien un anticuerpo) que confiere selectividad, con un

transductor, que confiere sensibilidad y que convierte el evento de reconocimiento inmunológico en una señal electrónica amplificada.

Respecto a las técnicas clásicas de análisis, la principal ventaja de los inmunosensores deviene de la proximidad entre el material biológico y el transductor, hecho que permite detectar cambios de manera más sensible en la interficie con el elemento de reconocimiento biológico. Otra ventaja consiste en su capacidad de: *i)* generar directamente una señal medible, en un período corto de tiempo, *ii)* simplificar el procedimiento de análisis reduciendo el número de etapas, *iii)* desarrollar los ensayos en condiciones diferentes a las del laboratorio, *iv)* su posible regeneración y *v)* la posibilidad de miniaturización de la instrumentación asociada.

La especificidad y afinidad de la interacción antígeno-anticuerpo determinan la selectividad y la sensibilidad del inmunosensor así como la posibilidad de regeneración. En la práctica, para alcanzar una sensibilidad adecuada se necesita que el complejo tenga una afinidad alta, siendo difícil su disociación posterior para la regeneración, por lo que suelen ser sistemas de un sólo uso. No obstante, el anticuerpo puede regenerarse por disociación de los complejos mediante la aplicación de distintos agentes que cambian las condiciones del medio y favorecen esta disociación, aunque estas condiciones suelen dañar la estructura del anticuerpo.

1.9.6 Biosensores de DNA

Los genosensores (o biosensores de DNA) son dispositivos capaces de dar una señal analítica a partir del evento de hibridación, es decir, la unión de una cadena de DNA con su cadena complementaria.

La principal ventaja de los genosensores respecto a las técnicas clásicas de análisis de DNA deviene de la proximidad entre el material biológico y el transductor, hecho que permite detectar cambios de manera más sensible en la interficie con el elemento de reconocimiento biológico. La especificidad que el DNA confiere al análisis y la sensibilidad que confiere el transductor, convierte el evento de reconocimiento en una señal electrónica amplificada. De esta manera se pueden realizar medidas no destructivas con poco material genético.

A diferencia de los anticuerpos y las enzimas, las sondas de DNA u oligonuclótido se pueden obtener mediante síntesis química, por lo tanto una sonda de DNA es un reactivo económico debido a que no requiere procedimientos de purificación complejos. Además, debido a la posibilidad de amplificación sintética (por PCR) de este tipo de material, se

pueden obtener 1 millón de copias (marcadas o no) a partir de una sola secuencia original, en pocas horas (§1.6.1). Esto disminuye aún más los costes de los reactivos, incluyendo el de las sondas marcadas. El DNA es un material (a diferencia de las proteínas) muy resistente a los solventes orgánicos y a cambios de la fuerza iónica y de la temperatura. Se pueden esperar mayores tiempos de vida de un genosensor, respecto a un sensor enzimático o a un inmunosensor.

Una vez que se ha realizado la hibridación, se utilizan marcas específicas que se unen a las secuencias hibridadas, como marcas fluorescentes o enzimáticas. Pueden acoplarse a sistemas con diferente transducción: ópticos, gravimétricos o electroquímicos.

La inmovilización ideal de DNA sobre una superficie es a través de un único punto de unión de la molécula del extremo 3' o 5'. De esta forma se obtiene mayor eficiencia en la reacción de hibridación, situación próxima a lo que ocurre en disolución, a diferencia de la inmovilización a través de sitios múltiples, que provoca que la reacción de hibridación sea más lenta.

1.9.7 Nuevos materiales para biosensores de DNA e inmunosensores electroquímicos. Plataformas de afinidad universal

Un hecho fundamental en el diseño de un biosensor es la elección de la estrategia de inmovilización más adecuada de las biomoléculas en un soporte sólido de manera de no modificar sus grupos funcionales ni alterar su actividad biológica. Además, de cara a su aplicabilidad en gran escala, otro importante objetivo es el diseño de dispositivos flexibles en su utilización capaces de adecuarse a las necesidades de análisis de analitos de variada naturaleza en diferentes tipos de muestras. A continuación se presentan los nuevos materiales de afinidad universal desarrollados en el presente trabajo.

1.9.7.1 Biocompósito grafito-epoxi de proteína A

Como ya se ha descrito en §1.7.3.1, los anticuerpos inmovilizados en la región Fc a través la proteína A (o G), preservan la región Fab libre y orientada para el enlace con el antígeno. Un biocompósito de proteína A se obtiene adicionando la proteína A a la formulación del compósito. En este caso, el transductor está biológicamente modificado en volumen transformándose en un dispositivo de afinidad muy versátil para la inmovilización de anticuerpos de diferentes especificidades [véase Zacco et al. (I), (II) y (IV)].^[87-89] Después de cada análisis, mediante un simple pulido (§1.9.4.4), el sensor proporciona una nueva

superficie disponible para una otra medición. Los biocompósitos de proteína A como lo de avidina (§1.9.7.2) poseen propiedades mejoradas respecto a sensores compósitos no modificados en cuanto a capacidad de inmovilización de biomoléculas en su superficie.

1.9.7.2 Biocompósito grafito-epoxi de avidina

Un biocompósito de avidina se obtiene adicionando la proteína avidina a la formulación del compósito. En este caso, se obtiene un transductor biológicamente modificado en volumen, capaz de inmovilizar cualquier molécula modificada con biotina (§1.7.3.2) sea esta un anticuerpo, una enzima o un oligonucleótido [véase Zacco et al. (II) y (IV)].^[87:89]

1.9.7.3 Magneto compósito grafito-epoxi

Si durante la fase de construcción del sensor grafito-epoxi se incorpora entre dos capas de material conductor grafito-epoxi un pequeño imán se obtiene un sensor electroquímico con propiedades magnéticas capaz de inmovilizar en la superficie esferas magnéticas modificadas. Este nuevo material combina la posibilidad de capturar, de forma rápida y sencilla, esferas magnéticas modificadas (véase § 1.8.1) con las excelentes propiedades electroquímicas del transductor grafito-epoxi.^[80] Las esferas magnéticas modificadas pueden eliminarse fácilmente de la superficie del transductor mediante una simple etapa de pulido, para poder reutilizarlo posteriormente, con el mismo tipo de esferas magnéticas o con otro tipo, para otra aplicación analítica.

1.10 APLICACIONES DE LOS BIOSENSORES DE AFINIDAD: INMUNOSENSORES Y GENOSENSORES

La necesidad de análisis de diferentes componentes a tiempo real en áreas cada vez más diversas ha promovido en estos últimos años que los esfuerzos realizados en el desarrollo de instrumentación analítica se dirijan hacia la construcción de dispositivos cuya utilización no requiera la supervisión profesional, cuyo manejo sea sencillo y cuyo coste sea menor. Como resultado de esta demanda de información relacionada con el análisis de forma rápida, fiable y descentralizada se ha favorecido el desarrollo de sensores químicos y biosensores como alternativa de análisis a la instrumentación analítica convencional.

Los sensores químicos –especialmente el de pH, y los electrodos selectivos a iones– se conocen muy bien por su uso cotidiano en el laboratorio. Los biosensores, de aparición

más reciente, constituyen un campo multidisciplinario de I+D y un mercado muy atractivo. Los biosensores han encontrado su principal aplicación en el ámbito clínico, cuyo mejor exponente es el biosensor para la determinación y control –fuera del ámbito del laboratorio– de glucosa en pacientes diabéticos. Sin embargo, sus aplicaciones se han ido ampliando a áreas cada vez más diversas y fuera del ámbito hospitalario. [90;91]

En el análisis medioambiental existe una creciente demanda de este tipo de dispositivo respecto a otras metodologías. A la industria en general, y a la alimentaria en particular, le es necesario controlar de manera confiable los productos en matrices muy complejas. [92]

Los biosensores, por tanto, ofrecen una alternativa interesante a los métodos clásicos debido a la respuesta rápida y a tiempo real que son esenciales para la detección de diferentes parámetros en alimentos. Su configuración tan simple, que integra el reconocimiento molecular y la transducción es la que ha permitido el diseño de una instrumentación con características prácticas e innovadoras en el campo del análisis. Mediante este esquema analítico tan sencillo es posible eliminar numerosas etapas necesarias en un proceso analítico convencional tales como el tratamiento de la muestra o la separación del componente que se quiere determinar del resto de la muestra, que complican un procedimiento clásico de análisis basado en equipamiento analítico tradicional.

A continuación se detallan las problemáticas que se han abordado en la presente tesis mediante biosensores.

1.10.1 La problemática alimentaria

El concepto de seguridad alimentaria implica garantizar la producción y comercialización de alimentos que no supongan un riesgo potencial para la salud del consumidor.

La innovación y el desarrollo de la industria agroalimentaria pasan de forma general por dos ejes fundamentales: la seguridad y la calidad de los alimentos. La cada vez mayor complejidad de la cadena alimentaria exige, por otra parte, el desarrollo de eficaces sistemas de trazabilidad que aseguren la solidez de todos los eslabones.

Tanto el VI Programa Marco de la Unión Europea a través de su Prioridad temática de Calidad y Seguridad de los alimentos, como el Plan Nacional de Ciencia y Tecnología 2004-2007 a través de sus programas nacionales de Biotecnología y Recursos y Tecnologías Agroalimentarias, recogen la necesidad de desarrollar e implantar sistemas de control

encaminados a aumentar la seguridad y la calidad de los alimentos y a mejorar los sistemas de trazabilidad, que se define como la capacidad de rastrear un alimento, desde sus orígenes hasta al consumidor, dando lugar a una identificación fiable de sus componentes, un control sanitario y un seguimiento del alimento en toda la cadena de producción.

Las metodologías de análisis de residuos en alimentos deben ser capaces de llegar a detectar concentraciones en el orden de $\mu\text{g}/\text{kg}$ o inferiores. Los métodos analíticos instrumentales convencionales consisten en HPLC, cromatografía de gases y electroforesis capilar y se basan en las siguientes etapas: *i)* toma de muestra; *ii)* tratamiento; *iii)* extracción; *iv)* clean-up; *v)* análisis cromatográfico y, *vi)* obtención de resultados. Además de métodos instrumentales de análisis, en el caso de antibióticos en leche o carne se pueden llevar a cabo ensayo microbiológicos que se basan en la de inhibición del crecimiento bacteriano debida a la presencia del antibiótico. ^[93]

Los ensayos inmunológicos representan una alternativa de *screening* rápida y fiable (véase § 1.5). En este contexto, y para garantizar de forma más efectiva y rápida la seguridad alimentaria, se han establecido una serie de puntos de control mediante un sistema preventivo de Análisis de Riesgos y Puntos de Control Críticos (del inglés *Hazard Analysis Critical Control Point*, HACCP).

Para poder cumplir con estos programas preventivos, se establece como prioridad el desarrollo de métodos de detección, de análisis y diagnóstico que sean rápidos, de alta sensibilidad y que permitan el análisis automatizado de un amplio espectro de agentes que amenazan la seguridad alimentaria. ^[94] Debido a sus características, los biosensores se constituyen en los principales candidatos y herramientas de análisis con numerosas aplicaciones en la industria agroalimentaria.

Las características más destacables de estos dispositivos que los convierten en opciones altamente atractivas para competir en el mercado agroalimentario son: *i)* su especificidad, *ii)* alta sensibilidad, *iii)* corto tiempo de análisis, *iv)* capacidad de inclusión en sistemas integrados, *v)* facilidad de automatización, *vi)* capacidad de trabajar en tiempo real, *vii)* versatilidad, que permite el diseño de dispositivos a la carta, y su bajo coste: *viii)* no destructivos, lo que permite el control de procesos *in situ*, *viii)* no contaminantes, amigables con el medioambiente.

Las aplicaciones actuales de los biosensores en el ámbito agroalimentario se orientan hacia las siguientes áreas principales: *i)* la seguridad alimentaria, *ii)* la calidad alimentaria y *iii)* el control de procesos industriales.

1.10.1.1 Contaminantes y aditivos alimentarios

Se definen con el término de “contaminantes” aquellas sustancias o agentes que no son intencionalmente añadidos al alimento sino que entran en contacto accidentalmente durante, por ejemplo, el cultivo, la preparación o el almacenamiento. Se entiende por aditivos aquellas sustancias químicas añadidas intencionalmente al alimento en la fase de transformación del producto para mejorar cualidades y propiedades tales como su estructura, aroma, color, estabilidad en el tiempo, entre otras.

Aunque la contaminación microbiana es una problemática de gran interés, hoy en día la preocupación está más bien dirigida hacia los residuos como pesticidas, metales tóxicos, medicamentos de uso veterinario, y aditivos tales como colorantes y aromatizantes, por sus efectos nocivos agudos o crónicos o a largo plazo, sobre todo en grupos vulnerables.

1.10.1.2 Pesticidas

Los pesticidas se usan para prevenir, destruir o reducir plagas tales como insectos, plantas y ciertos microorganismos. Pueden ser clasificados en base al mecanismo y su acción en: *i)* insecticidas, *ii)* herbicidas, *iii)* fungicidas, *iv)* acaricidas, *v)* nematocidas, y *vi)* raticidas. Mientras algunos son selectivos en cuanto a su acción, otros poseen un amplio espectro de toxicidad. Algunos plaguicidas tienen la capacidad de acumularse en el tejido graso animal mientras que otros pueden contaminar el medioambiente, incluyendo los acuíferos subterráneos. La presencia de residuos de plaguicidas y fertilizantes en productos frescos o procesados destinados al consumo humano representa un gran problema para la salud pública debido a su toxicidad elevada. Sus efectos demostrados mediante estudio sobre animales demuestran ser cancerígenos y causar trastornos endocrinos. ^[95] De aquí la importancia en su control.

1.10.1.3 Antibióticos

Los antibióticos que aparecen en productos alimenticios vienen normalmente de los residuos de medicamentos suministrados a animales con infecciones. Suelen ser habituales, por ejemplo, en tratamientos de mastitis en el ganado. Dependiendo del tipo y el grado de la infección, pueden llegar incluso a administrarse directamente en la glándula mamaria.

Los antibióticos más detectados son de la familia de los beta-lactámicos. Los problemas relacionados a la presencia de antibióticos son de dos tipos: *i)* *seguridad alimentaria*, si llegan al consumidor pueden llegar a ser tóxicos en gran cantidad, y *ii)*

tecnológicos, en la industria de transformación de la leche. Trazas de antibióticos impiden la coagulación en la elaboración del queso, ya que pueden inhibir la actuación de los fermentos iniciadores utilizados principalmente para disminuir el pH y también puede quedar inhibida la fermentación en la obtención del yogur u otras leches fermentadas. Además, la presencia de antibióticos en la leche, provoca que los alimentos se hagan termoresistentes de manera que los tratamientos térmicos posteriores no funcionen y sean insuficientes para eliminar los microorganismos. [96;97]

1.10.1.4 Bacterias patógenas

Las bacterias que pueden causar infecciones alimentarias son fundamentalmente *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, y *Bacillus cereus*. Estas bacterias se pueden amplificar rápidamente en ambientes húmedos y cálidos, y en alimentos ricos en proteínas, tales como carne, pescado, y huevos. Algunos organismos infecciosos como *Salmonella* y *C. perfringens* pueden multiplicarse en el tracto digestivo y causar enfermedad por invasión celular o producción de toxinas. Otras bacterias son capaces de producir enterotoxinas (*S. aureus*, *E. coli* y *B. cereus*), o neurotoxinas (*C. botulinum*), en el alimento durante su crecimiento y metabolismo.

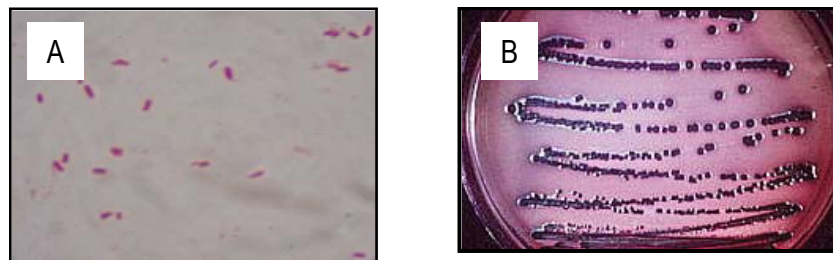


Figura 1.24: (A) Imagen de *E. coli* a través un microscopio convencional (aproximadamente 1000X aumentos; las dimensiones son $1\mu\text{m}$ de ancho y $2\text{-}4\mu\text{m}$ de longitud). (B) Colonias de *E. coli* en EMB Agar, las colonias se muestran de color violáceo.

La presencia de *Escherichia coli* patógenas como agentes etiológico relacionado a diarrea, ha cobrado mucha importancia en los últimos años, recomendándose en muchos laboratorios de referencia la vigilancia epidemiológica de este patógenos. *E. coli* es una bacteria de la familia de las *Enterobacteriaceae*. Las *Enterobacteriaceae* están ampliamente distribuidas en los vegetales y en el suelo, en el agua y en el contenido intestinal del hombre y animales (de donde toman el nombre). Tanto la nomenclatura como la clasificación de los miembros de esta familia han sido siempre cuestiones muy confusas. Hasta épocas muy

recientes, géneros y especies se definían mediante análisis bioquímico y antigénico. En la actualidad, técnicas como la hibridación y secuenciación de ácidos nucleicos, han permitido definir mucho mejor las interrelaciones de todos los miembros. En base a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en cinco grupos desde un tipo de diarrea benigna, a un tipo de diarrea semejante al cólera: *E. coli* enterotoxigénico (ECET) produce enterotoxinas tipo colérico que son la causa de una diarrea acuosa profusa; *E. coli* enteropatógeno (ECEP) es la causa principal de diarrea infantil; *E. coli* enteroinvasivo (ECEI), invade el epitelio intestinal y produce un tipo de disentería; *E. coli* enterohemorrágico (ECEH) constituye una subpoblación productor de toxinas, y *E. coli* enteroagregativo (ECEAgg), que constituye el grupo de *E. coli* diarreagénico más recientemente descrito.

Muchos factores han contribuido a las recientes emergencias alimentarias. La cadena de producción de alimentos es cada vez más compleja debido a la masificación en la producción de alimentos. Además, las prácticas intensivas en granjas contribuyen también a la infección de un número masivo de animales. El hecho de que animales sanos puedan ser portadores de patógenos causales de enfermedades en humanos, como es el caso de *E. coli* y *Salmonella* spp., entre otros, complica el control en estas granjas. Los animales pueden infectarse a través de la alimentación, de otros animales o del medioambiente.

Para afrontar este problema, las agencias alimentarias han establecidos programas de control estrictos para evitar que los patógenos irruman en la cadena alimentaria. Así, la seguridad alimentaria puede ser sólo asegurada a través de sistemas de estricto control de calidad a través de toda la cadena de producción alimentaria, tanto en la producción en las granjas como en la elaboración de los alimentos así también como en los puntos de comercialización y venta.

Los métodos clásicos y basados en cultivos para la identificación de una bacteria o patógeno bacteriano incluyen la evaluación morfológica y su habilidad para crecer en diferentes medios y en una variedad de condiciones. Incluyen los siguientes pasos: *i)* pre-enriquecimiento; *ii)* enriquecimiento selectivo; *iii)* pruebas bioquímicas; *iv)* confirmación serológica.

Los métodos microbiológicos clásicos son capaces de permitir la detección de una única bacteria, aunque se requiere la amplificación de la señal mediante el crecimiento de la célula a una colonia. Aunque los métodos clásicos de cultivo son muy sensibles y específicos, están restringidos por el tiempo que lleva realizarlos y la complejidad de los laboratorios microbiológicos.

Para certificar la seguridad alimentaria, los laboratorios de control oficiales deberían ser capaces de procesar un gran número de muestras en un período corto de tiempo. De acuerdo con estos requerimientos, es de importancia el desarrollo de nuevas técnicas rápidas, económicas, sensibles y capaces de realizar medidas de campo, cuyo resultado pueda ser usado como alarma para la detección rápida del 'riesgo' de contaminación bacteriana.

Los métodos rápidos desarrollados últimamente se basan en varios principios de detección, tales como la cromatografía, la espectroscopia infrarrojo o de fluorescencia, la bioluminiscencia o la citometría. De entre todos ellos, los métodos basados en la conductimetría e impedancia son los más usados en muchos laboratorios y se basan en el hecho de que cuando hay crecimiento, debido al metabolismo bacteriano, la conductancia de la muestra se modifica. Cualquiera de estos métodos instrumentales está centralizado en laboratorios con instrumentación compleja y requieren personal especializado para el análisis, lo que limita las medidas de campo.

En las últimas décadas, la detección inmunológica de bacterias, células y esporas, virus y toxinas, ha comenzado a ser cada vez más sensible, específica, y reproducible. Así, cada vez se encuentran en el mercado más *kits* basados en la detección inmunológica. Los avances en la producción de anticuerpos específicos de manera cada vez más rápida y económica han sido decisivos para el desarrollo de estas pruebas.

La detección de ácido nucleicos es cada vez más específica y sensible que los métodos inmunológicos. El desarrollo de técnicas de amplificación *in vitro* del DNA –tal como es la PCR, § 1.6.1– ha contribuido de manera decisiva a aumentar la sensibilidad y selectividad de los ensayos basados en ácidos nucleicos. Estos métodos tienen ventajas distintivas sobre los métodos de cultivo e inmunológicos tales como una mayor especificidad, la sensibilidad, la rapidez y la capacidad de detectar pequeñas cantidades de ácido nucleico en una muestra. Además son capaces de detectar varios patógenos simultáneamente en un único ensayo. Un problema asociado es que el DNA puede permanecer intacto en alimentos procesados, en forma libre o presente en bacterias muertas pudiendo dar su amplificación y posterior detección resultando falsos positivos. Este método requiere, por tanto, un período de enriquecimiento que retrasa los resultados pero que asegura la sensibilidad al orden de 3 UFC por 25 g de alimento. [98-100]

Los biosensores que existen para detectar microorganismos patógenos en alimentos pueden dividirse dependiendo del método de transducción de la señal en: ópticos, másicos, electroquímicos y térmicos. Los transductores ópticos han demostrado ser particularmente atractivos porque permiten la detección de bacterias sin marcación y a tiempo real. Sistemas

biosensores basados en el fenómeno de plasmones de resonancia superficial (SPR) ya se han comercializado con éxito (BIAcore™). Sin embargo, la detección electroquímica es más robusta, y los equipos asociados fáciles de utilizar, económicos y portátiles. Además pueden operar en medios turbios típicos de matrices alimentarias. Respecto a los elementos de reconocimiento molecular usados para la detección de patógenos en biosensores, los más usados son receptores inmunológicos, así como ácidos nucleicos. [62:101-106]

1.11 BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas A.K., Lichtman A.H. Inmunología celular y molecular, quinta edición. Eslevier ed. 2004.
2. Wyatt G.N., Inmunoassay for Food poisoning bacteria and bacterial Toxins. Chapman & Hall ed. 1992.
3. Daniel W., Inmunoassay a practical guide. Academic Press. ed. 1987.
4. Hartl D.L., Orel V. *Genetics*. 1992,131: 253.
6. Voet D., Voet J.G., Bioquímica. Omega: Barcelona ed. 1992.
7. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., Biología molecular de la célula, 2da ed., Omega: Barcelona ed. 1994.
8. Watson J.D., Crick F.H.C. Molecular structure of nucleic acids a structure for deoxypentose nucleic acids. *Nature*, 1953. 171:737-8.
9. Gosling J.P., Inmunoassay a practical approach. Oxford University Press: Oxford ed. 2000.
10. Roitt I.M., Delves P.J. Inmunología: fundamentos. Editorial Médica Panamericana ed. 2003.
11. Mikai K., Prince C.P., D J.N. Principles and practices of inmunoassay. In: Eds. M.stockon Press: Basingstoke GB, editor. 1991, 246-264.
12. Hoffman K.L. *J Clin. Immun.* 1985, 8: 237.
13. Santandreu i Vilsjosana M. Treball de recerca. Universitat Autònoma de Barcelona 1996.
14. Oubiña A., Ballesteros B., Carrasco P.B., Galve R., Gascón J., Iglesias F. et al. Inmunoassay for enviromental analysis. In: Sample handling and trace analysis of pollutants: Techniques, applications and quality assurance. D. Barceló Elsevier B.V: 1999, 287-339.
15. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger principios de bioquímica, cuarta edición. Omega ed. 2005.
16. Kricka L.J. Nonisotopic DNA Probe Techniques. In: Academic Press Inc. San Diego ed. 1992.
17. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F. et al. *Science*. 1985, 230,1350-4.
18. Mc Pherson M.J., Quirze P., Taylor G.R. PCR 1. A practical approach. In: Oxford University Press: Oxford ed. 1996.
19. Valasek M.A., Repa J.J. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.* 2005, 29:159.
20. Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M. et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006, 27:95-125.
21. Kwok S., Higuchi R. Avoiding False Positives with PCR. *Nature*. 1989, 339:237-8.
22. Longo M.C., Berninger M.S., Hartley J.L. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain-reactions. *Gene*. 1990, 93:125-8.

23. Cosnier S. Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. *Biosensors and Bioelectronics*. 1999, 14:443-56.
24. Palmer S. Protein A and G spin column kits for rapid, convenient, and high-performance antibody purification. *American Biotechnology Laboratory*. 2002, 20:58-60.
25. Charcosset C., Su Z., Karoor S., Daun G., Colton C.K. Protein A immunoaffinity hollow fiber membranes for immunoglobulin G purification: experimental characterization. *Biotechnology and Bioengineering*. 1995; 48:415-27.
26. Karoor S., Seshadri R., Klein E., Colton C.K. Adsorption of IgG with protein A immunoaffinity membranes: Relative performance of modules with widely different properties. *Polymeric Materials Science and Engineering*. 1993, 70:338.
27. Holschuh K., Schwammle A. Preparative purification of antibodies with protein A—an alternative to conventional chromatography. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2005, 293:345-8.
28. Sjoquist J., Meloun B., Hjelm H.E. *J Biochemistry*. 1972, 29:572-8.
29. Larsson A. An ELISA procedure for the determination of protein G-binding antibodies. *Journal of Immunological Methods*. 1990, 135:273-5.
30. Lu B., Smyth M.R., O'Kennedy R. Immunological activities of IgG antibody on pre-coated Fc receptor surfaces. *Analytica Chimica Acta*. 1996, 331:97-102.
31. Akerstrom B., Bjock L. A physicochemical study of protein G a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties. *The Journal of Biological Chemistry*. 1986, 261:10240-7.
32. Janis L.J., Regnier F.E. Dual-column immunoassays using protein G affinity chromatography. *Analytical Chemistry*. 1989, 61:1901-6.
33. Bjorck L. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol*. 1984, 133:969-74.
34. Zatta P.F. A new bioluminescent assay for studies of protein G and protein A binding to IgG and IgM. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 1996, 32:7-13.
35. Wilchek M., Bayer E.A. The avidin biotin complex in bioanalytical applications. *Analytical Biochemistry*. 1988, 171:1-32.
36. Wilchek M., Bayer E.A. Applications of avidin-biotin technology. *Literature survey. Methods Enzymol*. 1990, 184:14-45.
37. Wilchek M, Bayer E.A., Livnah O. Essentials of biorecognition: The (strept)avidin-biotin system as a model for protein-protein and protein-ligand interaction. *Immunology Letters*. 2006, 103:27-32.
38. Orth R.N., Clark T.G., Craighead H.G. Avidin-biotin micropatterning methods for biosensors application. *Biomedical microdevices*. 2003, 5:29-34.
39. Green N.M. Avidin and Streptavidin. *Methods Enzymol*. 1990, 51-67.
40. Jones M.L., Kurzban G.P. Non cooperatives of biotin binding to tetrameric streptavidin. *Biochemistry*. 1995, 34:11750-6.
41. Park S.U., Shim Y.B. Disposable amperometric immunosensor system for rabbit IgG using a conducting polymer modified screen-printed electrode. *Biosensor and Bioelectronics*. 2003, 18:773-80.

42. Limoges B., Savéant J.M., Yazidi D. Quantitative analysis of catalysis and inhibition at horseradish peroxidase monolayers immobilized on an electrode surface. *J Am Chem Soc.* 2003, 125:9192-203.
43. Da Silva S., Grosjean L., Ternan N., Mailley P., Livache T., Cosnier S. Biotinylated polypyrrole films: an easy electrochemical approach for the reagentless immobilization of bacteria on electrode surfaces. *Bioelectrochemistry.* 2004, 63:297-301.
44. Snejdarkova M., Rehak M., Otto M. Design of a glucose minisensor based on streptavidin glucose-oxidase complex coupling with self-assembled biotinylated phospholipid membrane on solid support. *Analytical Chemistry.* 1993, 65:665-8.
45. Solé S., Merkoci A., Alegret S. New materials for electrochemical sensing III. Beads. *Trends Anal Chem.* 2001, 20:102-10.
46. Gupta A.K., Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.* 2005, 26:3995-4021.
47. Alefantis T., Grewal P., Ashton J., Khan A.S., Valdes J.J., Del Vecchio V.G. A rapid and sensitive magnetic bead-based immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B for high-through put screening. *Molecular and Cellular Probes.* 2004, 18:379-82.
48. Centi S., Laschi S., Franek M., Mascini M. A disposable immunomagnetic electrochemical sensor based on functionalised magnetic beads and carbon-based screen-printed electrodes (SPCEs) for the detection of polychlorinated biphenyls (PCBs). *Analytica Chimica Acta.* 2005, 538:205-12.
49. Hayes M.C., Jourdan S.W., Herzog D.P. Determination of atrazine in water by magnetic particle immunoassay: collaborative study. *Journal of AOAC International.* 1996, 79:529-37.
50. Lawruk T.S., Gueco A.M., Mihaliak C.A. et al. Development of a Magnetic Particle-Based Enzyme Immunoassay for the Quantitation of Chlorpyrifos in Water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1996, 44:2913-8.
51. Lawruk T.S., Gueco A.M., Jourdan SW et al. Determination of chlorothalonil in water and agricultural products by a magnetic particle-based enzyme immunoassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1995, 43:1413-9.
52. Larsson K., Kriz K., Kriz D. Magnetic transducers in biosensors and bioassays. *Analisis.* 1999, 27:617-21.
53. www.dynal.no. 2006.
54. Koneracká M., Kopcanský P., Timko M., Ramchand C.N., de Sequeira A., Trevand M. Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 2002, 18:13-8.
55. Richardson J., Hawkins P., Luxton R. The use of coated paramagnetic particles as a physical label in a magneto-immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics.* 2001, 16:989-93.
56. Merkoçi A., Aldavert M., Marin S., Alegret S. New materials for electrochemical sensing V: Nanoparticles for DNA labeling. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2005, 24:341-9.
57. Gijs M.A.M. Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications. *Microfluid Nanofluid.* 2004, 1: 22-40.
58. Lim C.T., Zhang Y. Bead-based microfluidic immunoassays: The next generation. *Biosensors and Bioelectronics* In Press, Corrected Proof.

59. Gooding J.J. Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends. *Analytica Chimica Acta*. 2006, 559:137-51.
60. Wilson G.S., Gifford R. Biosensors for real-time in vivo measurements. *Biosensors and Bioelectronics*. 2005, 20:2388-403.
61. Deisingh A.K., Thompson M. Biosensors for the detection of bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 2004, 50:69-77.
62. Terry L.A., White S.F., Tigwell L.J. The application of biosensors to fresh produce and the wider food industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53:1309-16.
63. Tothill I.E. Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector. *Computers and Electronics in Agriculture*. 2001, 30:205-18.
64. Mello L.D., Kubota L.T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*. 2002, 77:237-56.
65. Thévenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S. Electrochemical biosensor: recommended definitions and classification. *Biosensor and Bioelectronics*. 2001, 16:121-31.
66. Alegret S. Industria farmacéutica (Noviembre-Diciembre). 1990, 33-42.
67. Powner E.T., Alcinkaya F.Y. *Sensor review*. 1997, 17:107-16.
68. Vo-Dinh T., Cullum B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 2000, 366:540-51.
69. Ziegler C. Cell-based biosensors. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 2000, 366:552-9.
70. E.A.H. Biosensors. Open University press. Biotechnology series Buckingham ed. 1990.
71. Santandreu i Vilajosana M. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona 1998.
72. Pearson J. E., Gill A., Vadgama P. Analytical aspects of biosensors. *Ann Clin Biochemistry*. 2000, 37:119-45.
73. Jurkiewicz M., Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona 1989.
74. Bott A.W. *Curr Sep*s. 1996, 14:104-10.
75. Álvarez Icaza M., V.Bilitewski. *Analytical Chemistry*. 1993, 65:525A-33A.
76. Albery J. Electrode Kinetics. In. Oxford University Press: Oxford, 1975.
77. Martorell D. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. 1995.
78. Zhang S., Wright G., Yang Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosensors and Bioelectronics*. 2000, 15:273-82.
79. Gilmartin M.A.T., Hart J.P. Sensing with chemically and biologically modified carbon electrodes. *Analyst*. 1995, 120:1029-45.
80. Céspedes F., Martínez-Fàbregas E., Alegret S. New materials for electrochemical sensing I. Rigid conducting composites. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1996, 15:296-304.
81. Alegret S. *Analyst*. 1996, 120:1029-45.

82. Alegret S., Fàbregas E., Céspedes F., Merkoçi A., Solé S., Albareda M., and Pividori M.I. The strategy of biosensor surface renewal: past, present and future. *Química Analítica* 18 (Supp. 1). 1999, 23-29.
83. Alegret S. Rigid carbon-polymer biocomposites for electrochemical sensing. A review. *Analyst* 1996; 121:1751-8.
84. Piehler J., Brecht A., Geckeler K.E., Gauglitz G. Surface modification for direct immunoprobes. *Biosensors and Bioelectronics*. 1996, 11:579-90.
85. Takruni I.A., Almuaibed A.M., Townshend A. Flow-Injection Study of Inhibition and Reactivation of Immobilized Acetylcholinesterase. Determination of the Pesticides Paraoxon and Carbamoylcholine. *Analytica Chimica Acta*. 1993, 282:307-12.
86. Santandreu M., Céspedes F., Alegret S., Martínez-Fàbregas E. Amperometric immunosensors based on rigid conducting immunocomposites. *Analytical chemistry*. 1997, 69:2080-5.
87. Zacco E., Marco M.-P., Galve R., Alegret S., Pividori M.I. Electrochemical biosensing of pesticides residues based on affinity biocomposite platforms. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006. En prensa.
88. Zacco E., Pividori M.I., Llopis X., del Valle M., Alegret S. Renewable Protein A modified graphite-epoxy composite for electrochemical immunosensing. *Journal of Immunological Methods*. 2004, 286:35-46.
89. Zacco E., Pividori M.I., Alegret S. Electrochemical biosensing based on universal affinity biocomposite platforms. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006, 21:1291-301.
90. Velasco-Garcia M.N., Mottram T. Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystems Engineering*. 2003, 84:1-12.
91. Patel P.D. (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2002, 21:96-115.
92. Roberts D. Food poisoning. Classification. In: Benjamin C, editor. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Oxford: Academic Press. 2003, 2654-2658.
93. Bergwerff A.A., Schloesser J. Antibiotics and drugs residue. Determination. In: Benjamin C, editor. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Oxford: Academic Press. 2003, 254-261.
94. Tecnología Molecular de trazabilidad alimentaria. Informe de vigilancia tecnológica. Genoma España/CIBT-FQUAM. 2003.
95. Winter C.K. Pesticides and herbicides. Toxicology. In: Benjamin C, editor. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Oxford: Academic Press. 2003, 4494-4501.
96. Woodward K.N. Antibiotics and drugs. Uses in Food Production. In: Benjamin C, editor. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Oxford: Academic Press. 2003, 249-254.
97. Klawe J.J., Tafil-Klawe M. Antibiotic-resistant bacteria. In: Benjamin C, editor. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Oxford: Academic Press. 2003, 247-249.
98. Leonard P., Hearty S., Brennan J. et al. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003, 32:3-13.

99. Luk J.M., Kongmuang U., Tsang R.S.W., Lindberg A.A. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect PCR products of the rfbS gene from serogroup D *Salmonellae*: A rapid screening prototype. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997, 35:714-8.
100. Wan J., King K., Craven H., McAuley C., Tan S.E., Coventry M.J., ProbeliaTM PCR system for rapid detection of *Salmonella* in milk powder and ricotta cheese. *Letters in Applied Microbiology*. 2000, 30:267-71.
101. Ivnitski D., Bel-Hamid I., Atanasov P., Wilkins E., Stricker S. Application of electrochemical biosensors for detection of food pathogenic bacteria. *Electroanalysis*. 2000, 12:317-25.
102. Gehring A.G., Gerald Crawford C., Mazenko R.S., Van Houten L.J., Brewster J.D. Enzyme-linked immunomagnetic electrochemical detection of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Immunological Methods*. 1996, 195:15-25.
103. Croci L., Delibato E., Volpe G., Palleschi G. A rapid electrochemical ELISA for the detection of *Salmonella* in meat samples. *Analytical Letters*. 2001, 34:2597-607.
104. Croci L., Delibato E., Volpe G., De Medici D., Palleschi G. Comparison of PCR, electrochemical enzyme-linked immunosorbent assays, and the standard culture method for detecting *Salmonella* in meat products. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, 70:1393-6.
105. Baeumner A.J. Biosensors for environmental pollutants and food contaminants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003, 377:434-45.
106. Nakamura H., Karube I. Current research activity in biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003, 377:446-68.

2 OBJETIVOS

El principal objetivo en el que se centra esta tesis doctoral consiste en desarrollar nuevos dispositivos analíticos de características mejoradas, basados en elementos de reconocimiento biológico, cuya tecnología de fabricación sea compatible con la producción masiva, aptos para análisis de muestras alimentarias y medioambientales.

- Los objetivos concretos que se persiguen y que serán desarrollados durante la tesis se enumeran a continuación:

1- Preparar y evaluar diferentes materiales biocompuestos, tanto de afinidad universal como específica, para la inmovilización de moléculas de variada naturaleza.

2- Construir y evaluar un transductor de propiedades electroquímicas mejoradas con un elemento magnético integrado.

3- Desarrollar diferentes estrategias de inmovilización de bioespecies, tales como oligonucleótidos, DNA o enzimas, sobre los biocompuestos construidos y sobre partículas magnéticas comerciales.

4- Evaluar electroquímicamente los materiales modificados biológicamente y los protocolos desarrollados mediante ensayos modelos.

5- Aplicar los dispositivos analíticos resultantes en la resolución de muestras reales del ámbito alimentario y medioambiental.

3 EXPERIMENTAL

3.1 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE NUEVOS MATERIALES PARA BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS

3.1.1 Introducción

La necesidad de llevar a cabo determinaciones bioanalíticas no sólo en el ámbito de la salud y el análisis clínico, sino también en la industria alimentaria o en el control medioambiental, ha favorecido el desarrollo de biosensores como alternativa analítica.

El diseño de un biosensor y el proceso de medida implica los siguientes pasos: ^[1]

- selección y/o modificación de un transductor,
- selección de un biorreceptor,
- inmovilización en la superficie del transductor,
- transducción del evento de biorreconocimiento,
- análisis de la información obtenida.

En esta sección se describe la construcción y la evaluación electroquímica de nuevos transductores amperométricos con el objetivo final de inmovilizar, de manera óptima, biomoléculas sobre sus superficies activas. En esta sección, por lo tanto, se pondrá énfasis en el primer paso de los especificados anteriormente, pero sin perder de vista el objetivo final que consiste en la detección de bioespecies mediante un dispositivo biosensor electroquímico.

Hay dos aspectos fundamentales a tener en cuenta respecto a la selección de un material transductor electroquímico para implementar en un sistema biosensor: *i)* su comportamiento electroquímico y *ii)* su capacidad de inmovilizar un biorreceptor –preservando su estructura nativa y su actividad biológica–, con una elevada estabilidad.

En el presente trabajo, se ha seleccionado como transductores electroquímicos compósitos rígidos basados en polímeros en los que se agregó, como material conductor, polvo de grafito. Este tipo de material ha sido utilizado repetidamente en la construcción de biosensores amperométricos en los laboratorios donde se ha realizado la presente tesis doctoral. [2-4] La rigidez del compósito otorga ventajas de tipo físico-mecánicas y aumenta la robustez del dispositivo. En cuanto a sus propiedades electroquímicas, el carácter dual de la superficie del compósito, compuesta de partículas de grafito en un medio polimérico circundante, augura unos fenómenos de transferencias de masa más ricos en comparación con lo que acontece con superficies continuas de materiales conductores, tales como grafito, oro o polipirrol. Esto se puede explicar por el comportamiento de microelectrodos que presenta la superficie de los compósitos. En efecto, si la superficie de un macroelectrodo se reduce, la señal y el ruido asociado disminuyen. [1;5] El comportamiento de haces de microelectrodos separados por una matriz aislante y conectados en paralelo consigue aumentar la señal total del dispositivo –que sería igual a la suma de las señales de cada microelectrodo–, pero no aumenta de igual manera el ruido asociado lográndose una relación señal/ruido con la calidad de un microelectrodo. Otro aspecto importante a resaltar de un compósito es su facilidad de preparación y de modificación en volumen y, por tanto, del control de los componentes biológicos que se reponen en la superficie.

Con este fin, se realizó la construcción y evaluación de los siguientes nuevos transductores basados en compósitos rígidos, y modificados con moléculas de afinidad tanto específica como universal (avidina, proteína A y anticuerpos anti-atrazina):

- biocompósito grafito-epoxi-avidina (Av-GEB)
- biocompósito grafito-epoxi-proteína A (ProtA-GEB)
- inmunocompósito grafito-epoxi (Ab-GEB)

En cuanto a la evaluación de los transductores modificados, se realizaron tanto caracterizaciones electroquímicas como microscópicas, mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal de fluorescencia.

Además, en esta sección se describe la construcción de un nuevo transductor basado en un compósito rígido al que se le integró un imán de neodimio. Esta nueva plataforma electroquímica con propiedades magnéticas (m-GEC) fue utilizada para inmovilizar esferas magnéticas modificadas en su superficie, y evaluar la respuesta electroquímica de las mismas.

3.1.2 Equipamiento y reactivos

3.1.2.1 Equipamiento

Las voltamperometrías cíclicas se realizaron con el Autolab PGSTAT20 (Eco Chemie, Holanda). La señal amperométrica se midió en todos los casos con una unidad amperométrica LC-4C de la firma comercial BAS (Bioanalytical Systems Inc, USA). El electrodo de referencia utilizado fue un electrodo de doble unión Ag/AgCl (ORION 900200), y su solución de referencia interna fue suministrada por la misma firma. Como solución de referencia externa se utilizó KCl 0.1 M. El electrodo auxiliar fue un electrodo de platino (CRISON 52-67 1). Las imágenes de microscopía electrónica de barrido han sido obtenidas con un microscopio modelo Hitachi S-570, Japón. Las imágenes de microscopía de fluorescencia han sido obtenidas con un microscopio confocal modelo LEICA TCS 4D.

3.1.2.2 Reactivos y materiales

Los compósitos y biocompósitos se prepararon con grafito en polvo de tamaño de partículas de 50 μm (BDH) y resina epoxi Epo-Tek H77 (Epoxy Technology, USA).

Las modificaciones de los compósitos se realizaron con avidina (Sigma), proteína A (Sigma) y anticuerpos anti-atrazina obtenidos como se explica en Zacco et al. (III).^[6]

Los pulidos de la superficie de los compósitos se realizaron con papel de alúmina de 3 μm (polishing strips 301044-001, Orion). El resto de los reactivos utilizado fue de calidad proanálisis o similar. Las soluciones acuosas se prepararon con agua bidestilada.

3.1.3 Construcción de los electrodos de configuración cilíndrica

Para la construcción del cuerpo de los electrodos se utilizó una conexión hembra de 2 mm de diámetro (véase la Figura 3.1) al que se le acopló una rosca metálica (ii)^[7]. En su extremo se soldó una lámina de cobre circular (iii), de la cual se eliminó mediante una solución de HNO_3 al 5% la capa de óxido que podría tener. Esta capa de óxido, de no eliminarse, podría aumentar la resistencia al paso de la corriente y, por lo tanto, disminuir la conductividad eléctrica del transductor. Esta conexión se introdujo en un tubo cilíndrico de PVC de 6 mm de diámetro interno, de 8 mm de diámetro externo y de 20 mm de longitud (iv). La rosca metálica que posee la conexión permitió que esta última quede bien fijada en un extremo del tubo de

PVC, mientras que en el otro extremo quedó una cavidad virtual de 3 mm de profundidad. En esta cavidad posteriormente se introdujo el compuesto o biocompuesto preparado (v).

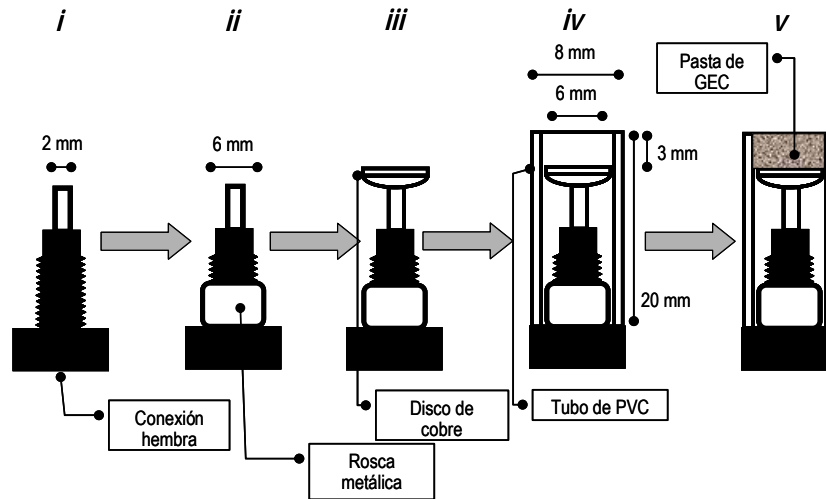


Figura 3.1: Representación esquemática de la construcción de electrodos cilíndricos para su uso con compósitos rígidos. La figura se tomó de "Electrochemical sensor analysis"^[8] con el permiso de los autores.

3.1.4 Transductor bioelectroquímico de propiedades mejoradas. (Bio)compósitos grafito-epoxi

Los compósitos grafito-epoxi se prepararon mezclando las dos partes que constituyen la resina epoxi (resina y catalizador en una proporción en peso de 20:3, respectivamente). Luego de la homogenización de la resina, se agregó grafito en polvo en una proporción del 20 %. El material resultante fue nuevamente homogeneizado con la ayuda de una espátula e incorporado en el cuerpo del transductor amperométrico. Los sensores basados en compósitos grafito-epoxi (GEC), sin material biológico, fueron curados durante 6 días a 42 °C, aunque es viable aumentar la temperatura, disminuyendo así el curado.

Los biocompositos grafito-epoxi (GEB) se han preparado adicionando 1, 2 o 4 % del elemento de biorreconocimiento: *i)* proteína A, *ii)* avidina, *iii)* anticuerpos específicos, a la formulación descrita anteriormente para los sensores GEC y tal como se describe en la Tabla 3.1. Esta pasta fue introducida en la cavidad de los sensores y curada durante 6 días a 42 °C. Los sensores y biosensores así obtenidos fueron luego almacenados a 4 °C.

Tabla 3.1: Composición de los biocompuestos de proteína A (ProtA-GEB), Avidina (Av-GEB) e inmunocompuestos (Ab-GEB).

Biorreceptor (%)	Resina parte A (mg)	Resina parte B (mg)	Grafito (mg)	Biorreceptor (mg)
1%	217	33	58,9	3,1
2%	217	33	55,8	6,2
4%	217	33	49,6	12,4

En este caso, el transductor está biológicamente modificado en volumen, transformándose en un dispositivo de afinidad universal o específica para la inmovilización de biorreceptores de diferente naturaleza. En la preparación de la pasta de los electrodos es especialmente crítica la correcta homogeneización de la formulación a fin de asegurar la distribución uniforme de la biomolécula, y así obtener superficies de biorreconocimiento reproducibles luego de cada pulido. A continuación se explica la preparación de cada uno en detalle.

3.1.4.1 Nueva plataforma electroquímica de afinidad universal. Biocompuesto de avidina

En el caso de los biocompuestos de Avidina (Av-GEB) se prepararon transductores con el 1 y 2 % en peso de avidina (ver Tabla 3.1). Los sensores fueron preparados y almacenados como se describió en § 3.1.4. [9]

3.1.4.2 Nueva plataforma electroquímica de afinidad inmunológica universal. Biocompuesto de proteína A

En el caso de los biocompuestos de proteína A (protA-GEB) se prepararon sensores con el 1, 2 y 4 % de proteína A (ver Tabla 3.1). [9-11] Los sensores han sido preparados y almacenados como se ha descrito en § 3.1.4.

3.1.4.3 Plataforma electroquímica de afinidad inmunológica específica. Inmunocompuesto de especificidad definida

En el caso del inmunocompuestos de afinidad inmunológica específica (Ab-GEB) se prepararon transductores modificados en volumen con el 1% del anticuerpo específico contra el pesticida atrazina, purificado como se explica en Zacco et al. (III).

El protocolo de purificación consistió en: *i*) precipitación de los anticuerpos a 4 °C mediante una solución saturada de sulfato de amonio, *ii*) diálisis en PBS 0.5 mM (4 x 5 L) y

agua milli Q (1 x 5 L) a 6 °C, *iii*) liofilización, *iv*) purificación en columnas HiTrap de proteína A, *v*) diálisis y, *vi*) liofilización. [6] Los sensores han sido preparados y almacenados como se ha descrito en § 3.1.4.

3.1.5 Plataforma electroquímica con propiedades magnéticas (m-GEC)

La construcción del magneto-sensor m-GEB, se describe en la Figura 3.2. Los pasos de construcción de estos sensores es idénticos a los descritos en la § 3.1.3 y Figura 3.1 hasta el paso v, con la diferencia que se hicieron en tubos de PVC de 215 mm, dejando una cavidad virtual de 4.5 mm.

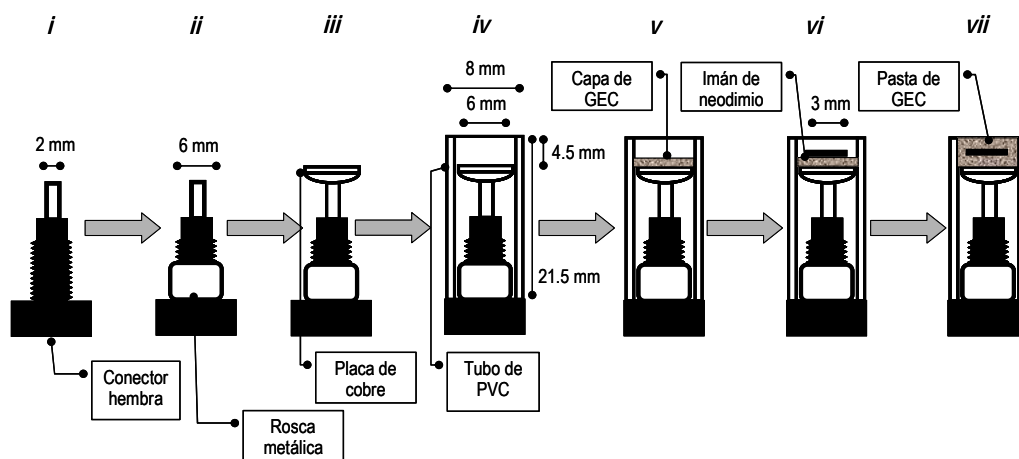


Figura 3.2: Representación esquemática de la construcción de magneto-electrodos cilíndricos basados en compósitos rígidos. La figura se tomó de "Electrochemical sensor analysis" [8] con el permiso de los autores.

Si durante la fase de construcción del sensor grafito-epoxi se incorpora entre dos capas de material conductor (*v*) un pequeño imán se obtiene un nuevo magneto sensor compuesto (*vii*).

El magneto-compósito combina la posibilidad de capturar de forma rápida y sencilla esferas magnéticas modificadas con las excelentes propiedades de transducción electroquímica del material grafito-epoxi. [2]

3.1.6 Renovación de la superficie

En todos los casos (biocompósitos y magneto compósitos), una vez utilizados, los electrodos se pulieron mediante el uso sucesivo de los siguientes papeles abrasivos de rugosidad menor: 1) papel de vidrio (N ° 600), 2) papel de vidrio (N ° 800), 3) papel de

alúmina de 3 mm. En todos los casos, el pulido se realizó con la superficie del sensor humectada con agua bidestilada.

3.1.7 Caracterización electroquímica de los electrodos por voltamperometría cíclica

La caracterización de los transductores electroquímicos se llevó a cabo mediante la técnica electroquímica de voltamperometría cíclica utilizando sustancias de referencia con comportamiento redox reversible. Esta técnica permite conocer de manera rápida el comportamiento redox de las especies químicas en un amplio rango de potenciales. [12] La voltamperometría cíclica consiste en variar linealmente con el tiempo el potencial aplicado al electrodo de trabajo, realizando un barrido desde un potencial inicial hasta un potencial determinado, y seguidamente invertir la dirección de barrido hasta llegar al potencial de partida. Se consiguen así voltamperogramas cíclicos característicos para cada sistema redox.

En los voltamperogramas se observa en el eje de abscisas los potenciales aplicados y en el eje de ordenadas la intensidad de corriente medida en el electrodo de trabajo. La voltamperometría cíclica proporciona información de tipo cualitativo y cuantitativo, de la que pueden sacarse conclusiones respecto a parámetros como potenciales de oxidación y reducción, los aspectos cinéticos de transferencia electrónica y de masa sobre la superficie del transductor, la evolución de éstas respecto a una señal de excitación como es el potencial, y aspectos interfaciales como la adsorción de sustancias electroactivas. De ahí radica la importancia de caracterizar mediante esta metodología el comportamiento electroquímico de los biocompuestos construidos.

La celda electrolítica consta del sistema de tres electrodos descritos en § 3.1.2.1 sumergidos en 20 ml de solución de fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7. La agitación se consiguió mediante un imán teflonado y se interrumpe durante las medidas. La velocidad de barrido fue de 50 mV/s.

La caracterización electroquímica de los distintos transductores fueron realizados utilizando el sistema redox hidroquinona / benzoquinona.

La selección de hidroquinona, que se adicionó en una concentración de 1.8 mM, se debió a que posteriormente fue utilizada como mediador electroquímico en los sensores modificados con el marcador enzimático peroxidasa. Como mediador, la hidroquinona es la encargada de transferir electrones desde la superficie del electrodo hasta los centros electroactivos de la enzima. [13;14]

Como electrodos de trabajo se utilizaron los electrodos preparados: los compósitos GEC y los biocompósitos GEB modificados en superficie [véase Zacco et al. (I, II y IV)]^[9-11] así como los magneto-compósitos [Zacco et al. (III) y anexo (I)].^[6]

3.1.8 Caracterización microscópica de los electrodos

3.1.8.1 Microscopía electrónica de barrido

El objeto de este experimento consiste en identificar con más detalles los cambios microscópicos estructurales que pueda producir la incorporación del biomaterial. Para tal fin, se comparó el aspecto del compósito (GEC) respecto a los compósitos modificados en volumen con proteína A (ProtA-GEB). Para tal fin, los transductores GEC y ProtA(4%)-GEB antes y después de ser sometidos a un tratamiento con ultrasonidos durante 1 minuto, fueron observados con microscopía electrónica de barrido. Para este estudio se utilizó un voltaje de aceleración de 10 KV y una resolución variable de 10 a 100 μm .^[10]

3.1.8.2 Microscopía de fluorescencia

Con el fin de estudiar la distribución de la proteína A y de la avidina en la superficie de los biocompósitos, los transductores ProtA(4%)-GEB y Av-GEB fueron modificados con conjugados fluorescentes: (estreptavidina-rodamina para el caso del biocompósito de Proteína A y biotina –fluoresceína para el caso del biocompósito de avidina y finalmente fueron observados por microscopía láser confocal de fluorescencia.

El protocolo analítico utilizado para ProtA-GEB consiste en las etapas descritas en Zacco et al. (I), mientras para el caso del Av-GEB se describe en Zacco et al. (II). La excitación del láser fue de 568 nm y la radiación emitida fue recogida mediante un fotomultiplicador confocal. El voltaje utilizado fue de 352 V.^[9]

3.2 ESTRATEGIAS DE INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS E INMUNOESPECIES EN TRANSDUCTORES BIOCOPÓSITOS

3.2.1 Introducción

Un buen transductor electroquímico debe reunir las siguientes propiedades para ser usados en biosensores: *i)* preservar la estructura nativa y la actividad biológica de la biomolécula que va a ser inmovilizada, *ii)* ser estable respecto a la pérdida del reactivo

inmovilizado, *iii*) ser suficientemente inerte respecto a la adsorción inespecífica de otros reactivos en su superficie, *iv*) exponer los sitios de biorreconocimiento de manera que la superficie proporcione un reconocimiento rápido y eficaz.

La adsorción física es el método de inmovilización de biomaterial en transductores más ampliamente utilizado, por ser fácil de realizar y económico, al no requerir reactivos especiales. Las proteínas se adsorben fácilmente sobre superficies de variada naturaleza, sobre todo en aquellas que tienen carácter hidrofóbico, como es el caso del poliestireno. El DNA también es capaz de adsorberse en soportes de la más variada naturaleza, siendo los más comunes las membranas de nitrocelulosa o nylon. La principal desventaja de la adsorción es la posibilidad de desorción y la desnaturalización de los reactivos. Además, la inmovilización se realiza de manera aleatoria, pudiendo no exponerse correctamente los sitios de biorreconocimiento.

Tabla 3.2: Métodos covalentes y no covalentes que favorecen una correcta orientación de los anticuerpos.

Grupos funcionales en los anticuerpos	Grupos funcionales en la fase sólida	Tipología del enlace
Carbohidratos oxidados (región Fc)	Hidrazida, base de Schiff	Covalente
Grupos tiol libres de la región Fab	Maleimida, aziridina, haloacetil	Covalente
Región Fc	Proteína A, proteína G, anticuerpos contra la región Fc	No covalente (afinidad)
Biotina	Estreptavidina	No covalente (afinidad)

Para el caso de la inmovilización covalente, se utilizan superficies activadas por diferentes grupos químicos, siendo los más frecuentemente utilizados los grupos amino, tiol, carboxilo, hidroxilo y aldehído. Las moléculas biológicas se inmovilizan a través de los grupos amino libres de los residuos de lisina. Normalmente, la inmovilización covalente orienta mejor los grupos biorreactivos que la adsorción (véase § 1.7). Sin embargo, puesto que estos grupos están distribuidos en toda la estructura proteica, el enlace podría establecerse en residuos cercanos al grupo funcional de la molécula, disminuyendo así la capacidad de unión y la actividad biológica.

Aunque la bibliografía describe diferentes metodologías de inmovilización que favorecen la correcta orientación de los anticuerpos, existe la necesidad de desarrollo de nuevas estrategias para inmovilizarlos de manera óptima en materiales transductores con propiedades electroquímicas mejoradas. Como se explicó en §§ 3.1.4, 3.1.4.1 y 3.1.4.2, el presente trabajo se basa en la construcción de nuevos biomateriales que usan algunas de estas estrategias de reconocimiento bioselectivos para la inmovilización de anticuerpos

específicos: la proteína A o G y la unión estrept(avidina)-biotina. Otra estrategia consiste en la modificación directa del transductor con los anticuerpos específicos.

Para el caso de enzimas o DNA, la inmovilización se llevará a cabo mediante la unión avidina-biotina como se describe en el § 3.1.4.1.

3.2.2 Equipamiento y reactivos

3.2.2.1 Equipamiento

Las modificaciones se realizaron en agitación termostatzada usando un Thermomixer modelo 5436.

3.2.2.2 Reactivos y materiales

La proteína A, el anticuerpo RlgG, el anticuerpo anti-RlgG de oveja, el anticuerpo anti-RlgG de oveja biotinilado, el anticuerpo anti-RlgG de oveja marcado con HRP, proteína G biotinilada, glucosa oxidasa biotinilada (biotina-Gox), peroxidasa biotinilada (biotina-HRP), fluoresceína biotinilada (biotina-4-fluoresceína) y atrazina fueron suministrados por Sigma. El conjugado fluorescente estreptavidina-rodamina fue suministrado por Molecular Probes. BiotinTag™ fue adquirido en Sigma, así como reactivos utilizados, tales como seroalbúminabovina (BSA), tween 20 y hidroquinona. El reactivo de Bradford (Bio-Rad) fue suministrado por los laboratorios Bio-Rad GMGH.

El conjugado estreptavidina-peroxidasa (HRP, 1.11.1.7) y antiDig-HRP fueron suministrados por Roche Biochemicals Diagnostics. Los oligonucleotidos cuyas secuencias se muestran a continuación, fueron adquiridos en TIB MOLBIOL:

- Sonda de captura mecA: biotin-3'-GTC GTT TAC CCT TGA GAT TA-5',
- Secuencia del gen mecA relacionada a la resistencia de *S. aureus* a la meticilina (MRSA): 5'-CAG CAA ATG GGA ACT CTA ATG GAG ATT TTT CCA AAC AAA ATA TAG ATA TT-3',
- Sonda mecA conjugada con digoxigenina, 3'-GGT TTG TTT TAT ATC TAT AA-5'-Dig,
- Sonda interferente mecA conjugada con digoxigenina, 3'-GGT TTG TCT TAT AGC TAT AA-5'-Dig.

El alcohol polivinílico fue suministrado por Aldrich. El peróxido de hidrógeno fue adquirido en Merck. El resto de los reactivos utilizados fueron de calidad proanálisis o similar. Las soluciones acuosas se prepararon con agua bidestilada o agua bidestilada filtrada (MilliQ).

3.2.3 Adsorción de biomaterial en GEC

El método más simple de los utilizados en el presente trabajo consiste en adsorción del elemento de biorreconocimiento en el transductor electroquímico grafito-epoxi. Los compósitos fueron preparados como se describe en § 3.1.3. En este caso, los sensores GEC fueron modificados superficialmente con proteína A, ^[10] anticuerpos específicos ^[11], o Proteína G ^[9] mediante adsorción en seco y en condiciones estáticas [véase Zacco et al. (I, II y IV)]. ^[15]

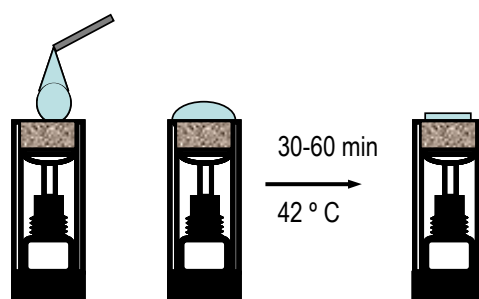


Figura 3.3: Representación esquemática de la metodología de inmovilización por adsorción en seco y en condiciones estáticas de moléculas biológicas en la superficie de los compósitos grafito-epoxi (GEC).

En todos los casos se adicionaron 20 μl de una solución proteica a la superficie del transductor y se procedió a la inmovilización por adsorción a 42 °C durante 30 min-1 hora, resultando un sensor ProtA/GEC, Ab/GEC o ProtG/GEC, respectivamente. La Figura 3.3 muestra esquemáticamente cómo se realiza este procedimiento.

3.2.4 Inmovilización de biomaterial en un biocompósito de avidina

La avidina puede considerarse una molécula de afinidad universal capaz de inmovilizar moléculas biotiniladas de diferente naturaleza, tales como anticuerpos, oligonucleótidos o enzimas. La fuerza del enlace tiene una constante de afinidad de 10^{15} y posee una elevada estabilidad a cambios de pH, temperaturas y a un amplio abanico de moléculas químicas tales como detergentes y moléculas con efecto desnaturalizantes, un aspecto muy importante

para su aplicación en técnicas bioanalíticas. [16-19] A continuación se describe cada uno de estos procedimientos.

3.2.4.1 Estrategias de inmovilización de anticuerpos en un biocompuesto de avidina

Los biocompuestos fueron preparados como se describe en § 3.1.4. La inmovilización de anticuerpos en el transductor modificado en volumen con avidina, se puede conseguir a través de dos estrategias: *i)* unión de anticuerpos biotinilados directamente en la superficie de los biocompuestos, *ii)* unión de los anticuerpos a través de un puente constituido por proteína G biotinilada previamente inmovilizada por su unión a la avidina confinada en el transductor.

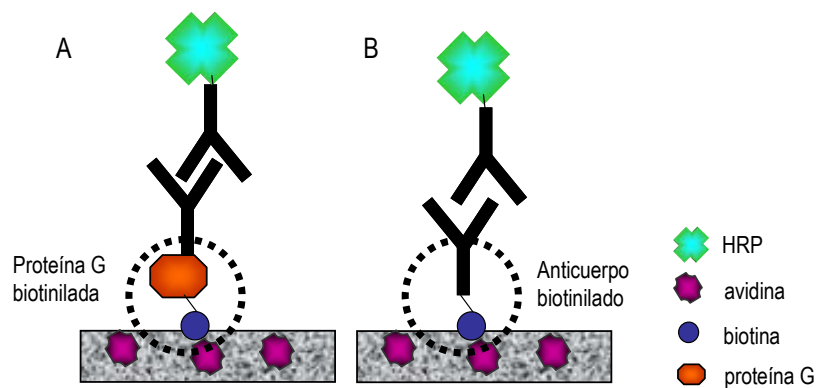


Figura 3.4: Estrategias de inmovilización de anticuerpos en biocomposito Av-GEB: (A) mediante un puente de proteína G biotinilada y (B) con anticuerpos biotinilados.

La proteína G, al igual que la proteína A, se une a la fracción Fc de los anticuerpos con diferentes especificidades. [20-22] En este caso, la ventaja es que no es necesario modificar con biotina los anticuerpos que van a ser inmovilizados, tal como se muestra en la Figura 3.4. Como se describe en la parte experimental de Zacco et al. (II), esta estrategia de inmovilización de anticuerpos mediada por proteína G en un biocompuesto de avidina se puede realizar *i)* en dos etapas consecutivas (unión de la proteína G biotinilada y posteriormente, la reacción inmunológica) o; *ii)* en una sola etapa, donde todos los reactivos (proteína G biotinilada y anticuerpos) se incuban simultáneamente en un único paso.

3.2.4.2 Estrategias de inmovilización de enzimas en un biocompuesto de avidina

Para demostrar que el transductor Av-GEB representa una plataforma universal para la inmovilización no tan sólo de anticuerpos, si no de cualquier molécula biotinilada, ha sido evaluada la inmovilización de dos enzimas biotiniladas, y sus comportamientos electroquímicos para sensor el sustrato de la enzima.

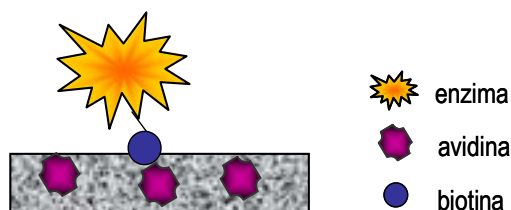


Figura 3.5: Esquema de funcionamiento de un biocompuesto Av-GEB para la inmovilización de enzimas biotinilados.

Las enzimas escogidas fueron: *i*) biotina-HRP (peroxidasa de rábano picante), para la detección de H_2O_2 y *ii*) biotina-GOX (glucosa dehidrogenasa) para la detección de glucosa. Los detalles experimentales se describen en la parte experimental de Zacco et al. (II).^[9] La Figura 3.5 muestra esquemáticamente la inmovilización de las enzimas mediante esta estrategia.

3.2.4.3 Estrategia de inmovilización de DNA en un biocompuesto de avidina

Para demostrar la eficacia de inmovilización de un oligonucleotido en la superficie de un sensor Av-GEB se eligió una secuencia relacionada con la resistencia de *Staphylococcus aureus* (MRSA) a la meticilina: el gen *mecA*.

El formato del análisis es de tipo sándwich, y consta de la hibridación del DNA target con una sonda de captura biotinilada –para la inmovilización–, y con otra segunda sonda marcada con digoxigenina, –para la marcación enzimática con antiDig-HRP. Ambas hibridaciones se realizan en un único paso, junto con la inmovilización del dúplex en el transductor biotinilado, tal como se muestra en la Figura 3.6. Para las secuencias de los oligonucleótidos y los detalles experimentales véase la parte experimental de Zacco et al. (II).^[9]

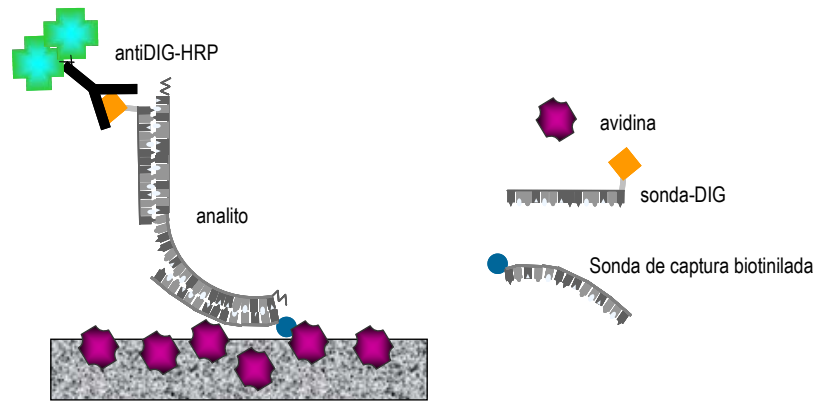


Figura 3.6: Esquema del funcionamiento de un sensor Av-GEB para la inmovilización de oligonucleótidos biotinilados.

3.2.5 Inmovilización de biomaterial en un biocompuesto de proteína A

La proteína A es una proteína monomérica de 42000 Daltons que se encuentra como componente de la pared celular en el 90 % de las cepas de *Staphilococcus aureus* y es capaz de unirse a las segunda y tercera porciones de las regiones constantes de la cadena pesada (Fc Cy2-Cy3). La unión implica la formación de un conjunto de enlaces de naturaleza no-covalente entre los aminoácidos de la región Fc y la proteína A, tales como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrófobas y fuerzas de Van der Waals (§ 1.7.3.1). [23;24]

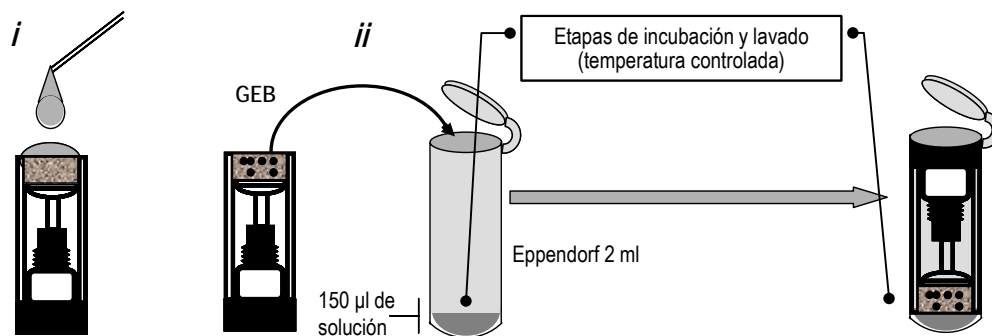


Figura 3.7: Representación esquemática de las distintas metodologías de inmovilización de moléculas biológicas en la superficie del sensor GEC: (i) adsorción en seco y en condiciones estáticas, (ii) inmersión de los electrodos en un eppendorf que contiene la solución de incubación. La figura se tomó de "Electrochemical sensor analysis" [8] con el permiso de los autores.

Las estrategias utilizadas para la inmovilización de inmunoespecies en la superficie de los transductores ProtA-GEB consiste en i) la incubación de los anticuerpos en solución y en

condiciones de agitación; *ii*) la incubación ‘en seco’ y en condiciones estáticas, como explicado en § 3.2.3. Para los detalles experimentales véase Zacco et al. (I, II y IV).^[9-11]

3.2.6 Inmovilización de anticuerpos de afinidad específica en un inmunocompósito

Se prepararon inmunocompósitos modificados en volumen con anticuerpos de especificidad definida contra una determinada molécula o familia de moléculas. En este caso, no se requiere un paso de inmovilización del anticuerpo específico (como ocurre en los biocompósitos de proteína A y avidina) sino que el anticuerpo se encuentra retenido dentro del transductor inmunocompósito como se explica en el § 3.1.4.3.


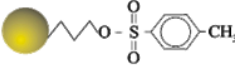
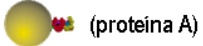
Como se ha descrito en la parte experimental de Zacco et al. (IV), se escogió construir inmunocompósitos con anticuerpos específicos contra el pesticida atrazina.^[11]

3.3 ESTRATEGIAS DE INMOVILIZACIÓN DE INMUNOESPECIES EN ESFERAS MAGNÉTICAS

Las esferas magnéticas representan una alternativa muy interesante para la realización de bioensayos heterogéneos frente a los soportes sólidos tradicionales, como son por ejemplo las placas de microtitulación de poliestireno, en cuanto a la inmovilización de material biológico.

Hoy en día, existe un gran número de casas comerciales que venden esferas magnéticas activadas por grupos químicos reactivos y que favorecen la unión con material biológico, así como esferas con material biológico previamente inmovilizado.

Tabla 3.3: Características y grupos químicos de las esferas magnéticas utilizadas en el presente trabajo.

Esferas magnéticas	Tamaño (µm)	Grupos químicos funcionales	Superficie activa	Estrategia de inmovilización	Activación de la superficie
MP-COOH	0.196	0,155 mmol/g		Enlace covalente	EDCI/NHS
MB-Tosil	2.8	0.1-0.2 mmol/g		Enlace covalente	No requerida
MB-ProtA	2.8	Variable según la especie	 (proteína A)	Unión por afinidad	No requerida

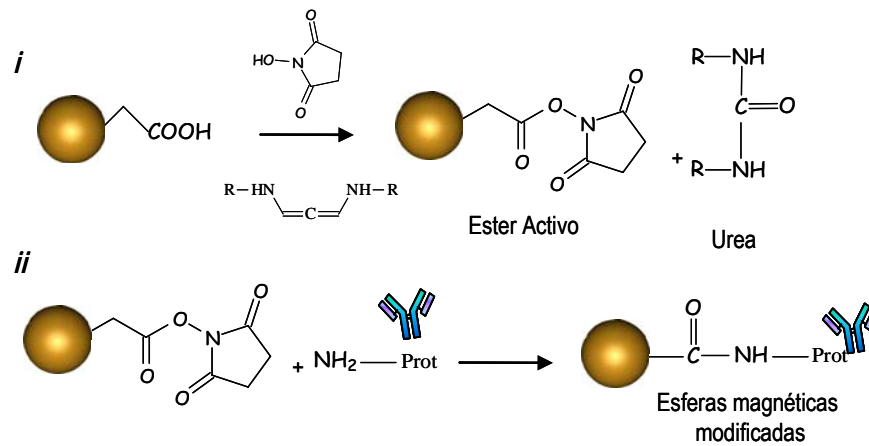


Figura 3.8: Inmovilización de anticuerpos a través esferas magnéticas con grupos carboxilo. (i) Activación previa con carbodiimida y (ii) formación de un enlace amida.

En el presente trabajo se han estudiado tres diferentes esferas magnéticas que difieren entre sí por su tamaño (de 0.196 y 2.8 μm) y, por su superficie activa (grupos químicos reactivos –carboxilo o tosil–, o biológicos – proteína A (véase Tabla 3.3).

Las estrategias de inmovilización de los anticuerpos se basan en un caso en la reactividad entre los grupos químicos (carboxilo o tosil) de las esferas y los grupos ϵ -amino de los anticuerpos (inmovilización covalente), y en el otro se basa en el biorreconocimiento entre la fracción Fc de los anticuerpos y la proteína A inmovilizada en la superficie de las esferas.

Como se puede observar en la Figura 3.8, en el caso de esferas magnéticas modificadas por grupos carboxilo (MP-COOH) la inmovilización se consiguió a través de un enlace amida y una activación previa con una carbodiimida soluble.

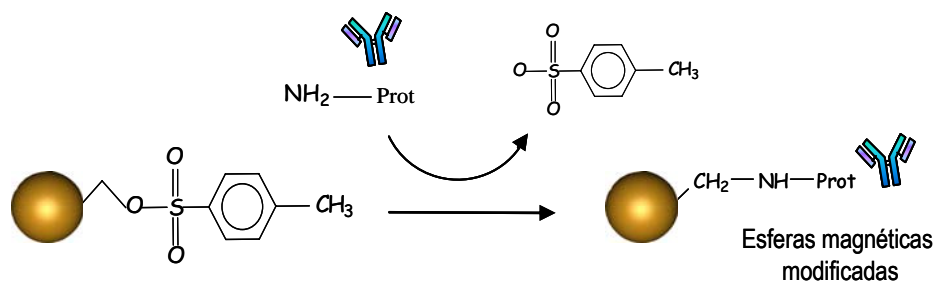


Figura 3.9: Inmovilización de anticuerpos a través de esferas magnéticas con grupos tosil a través de la formación de un enlace amida.

En la Figura 3.9 se puede observar la estrategia en la que se basa la inmovilización directa de los anticuerpos a esferas magnéticas recubiertas por grupos tosil a través la

formación de un enlace amida. En este caso no se requiere una activación previa de las esferas magnéticas. Además, al ser la región Fc de los anticuerpos generalmente más hidrofóbica que las regiones Fab, facilita la orientación de los anticuerpos al ser el reconocimiento tosil de características hidrofóbicas.

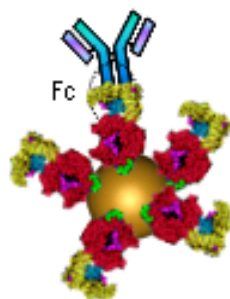


Figura 3.10: Inmovilización de anticuerpos en la superficie de esferas magnéticas recubiertas de proteína A a través de su región constante Fc (véase § 1.7.3.1).

La Figura 3.10 muestra la inmovilización de anticuerpos a las esferas magnéticas por afinidad entre la región constante (Fc) de los anticuerpos y la proteína A.

Sea cual fuese la estrategia elegida, todas las inmovilizaciones se llevaron a cabo en tubos eppendorf en condición de agitación para facilitar la interacción entre los anticuerpos y las esferas magnéticas. Las etapas de lavado se llevaron a cabo como se describe en § 3.4.4. La estimación de la eficiencia de la inmovilización de los anticuerpos se consiguió mediante el cálculo del contenido proteico de la solución sobrenadante antes y después de la inmovilización mediante un ensayo colorimétrico (test de Bradford).

Los protocolos de inmovilización de los anticuerpos se pueden encontrar detalladamente descritos en Zacco et al. (III y V). [6,25]

3.4 DISEÑO DE BIOSENSORES INMUNOLÓGICOS ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN NUEVOS MATERIALES TRANSDUCTORES

3.4.1 Introducción

Los biosensores electroquímicos –especialmente aquellos basados en biocompuestos como material transductor– reúnen numerosas ventajas respecto a los métodos tradicionales de análisis inmunológicos. Son dispositivos muy flexibles en su utilización. Los biocompuestos de grafito-epoxi proporcionan superficies con propiedades de bioafinidad, probadas características mejoradas de transducción electroquímica y renovables para un nuevo ensayo

luego de cada utilización. Además, la flexibilidad en su construcción permite el desarrollo de diferentes estrategias de inmovilización.

3.4.2 Equipamiento y reactivos

3.4.2.1 Equipamiento

Las incubaciones a temperatura controlada se realizaron en el eppendorf Thermomixer modelo 5436. Las etapas de lavado de las esferas magnéticas se llevaron a cabo con un separador magnético MPC-S de la casa comercial Dynal Biotech (Product N° 120.20).

3.4.2.2 Reactivos y materiales

Las esferas magnéticas modificadas con grupos tosil (Dynabeads M-280 Product N° 142.03) y con proteína A (Dynabeads Protein A Product N° 100.01) fueron adquiridos de Dynal Biotech ASA (Oslo, Noruega). Las esferas magnéticas modificadas con grupos carboxilo fueron adquiridas por Estapor, Merck (Product N° 00-39).

El resto de los reactivos utilizado fue de calidad proanálisis o similar. Las soluciones acuosas se prepararon con agua bidestilada filtrada (MillQ).

3.4.3 Diseño de un biosensor inmunológico electroquímico basado en biocompósitos como material transductor

Sea cual fuese el transductor biocompósito utilizado (ProtA-GEB, ProtA/GEC, Av-GEB, Ab-GEB) el protocolo de incubación consistió en dos o tres etapas según el tipo de electrodo de trabajo o de la estrategia elegida.

Se han desarrollado dos tipos de biosensores inmunológicos electroquímicos, basados en un formato competitivo y sándwich.

Para la estrategia basada en ensayos inmunológicos competitivos, se realizan los siguientes pasos:

1. Inmovilización del anticuerpo específico (etapa obviada en el caso del transductor basado en un inmunocompósito específico Ab-GEB, en el cual el anticuerpo se encuentra retenido en el volumen del compósito como se ha descrito en § 3.2.6),
2. Etapa de reacción inmunológica competitiva, que implica la competición entre el analito y el antígeno marcado con HRP, por el anticuerpo inmovilizado en el transductor.

Los detalles experimentales se describen en Zacco et al. (II y IV). [9;11]

Para la estrategia basada en biosensores inmunológicos tipo sándwich, se realizan los siguientes pasos:

1. Inmovilización del anticuerpo específico.
2. Incubación inmunológica del transductor modificado con anti-anticuerpo biotinilado.
3. Marcación enzimática del inmunocomplejo con el conjugado enzimático (HRP-estreptavidina).

Los detalles experimentales se encuentran ampliamente descritos en Zacco et al. (I) [10]

En todos los casos, la última etapa consiste en la evaluación de la actividad enzimática como se explica en § 3.4.5.

Cada paso de modificación se realizó en diferentes tubos eppendorf que contienen 150 μ l de solución inmunológica bloqueante, tal como se muestra en la Figura 3.7.

Como previamente se ha reportado [1], la adsorción inespecífica de biomoléculas de variada naturaleza como DNA o proteínas es insignificante en el compuesto grafito-epoxi, por este motivo no se realizaron pretratamientos de bloqueo de la superficie del transductor.

Con el objeto de evaluar la adsorción inespecífica sobre el biosensor basado en el biocompuesto, en cada ensayo se realizaron paralelamente diferentes ensayos blanco y controles: *i*) uso de GEC como transductor en lugar del biocompuesto GEB con el objetivo de probar la eficacia del biorreconocimiento de las biomoléculas en el biocompuesto, *ii*) GEB modificados con anticuerpos preimmune, o sea no específico, con el objetivo de probar la especificidad de unión antígeno-anticuerpo o *iii*) GEB excluyendo el anticuerpo específico en la primera incubación.

Por cada lote se procesaron normalmente triplicados de los biosensores y de los blancos.

3.4.4 Diseño de un biosensor inmunológico electroquímico basado en esferas magnéticas y en un magneto sensor

Para la estrategia basada en esferas magnéticas y en un magneto-sensor, se ha llevado a cabo un formato competitivo. Como se parte de las esferas magnéticas modificadas con anticuerpos específicos mediante distintas estrategias, tal como se explica en § 3.3, el protocolo consiste en los siguientes pasos:

1. Etapa de reacción inmunológica competitiva, que implica la competición entre el analito y el antígeno marcado con HRP, por el anticuerpo inmovilizado en las esferas magnéticas.

2. Captura de las esferas magnéticas modificadas por el magneto sensor m-GEC.

En todos los casos, la última etapa consiste en la evaluación de la actividad enzimática como se explica en § 3.4.5.

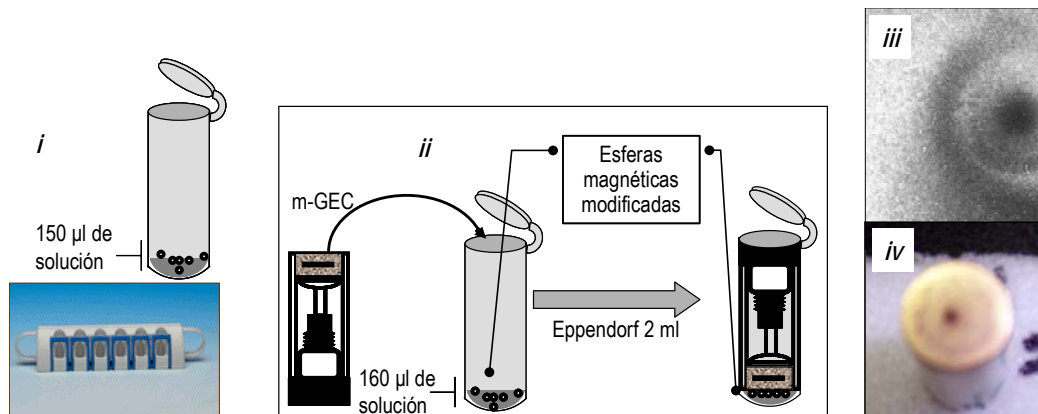


Figura 3.11: Representación esquemática de cómo se manipularon las esferas magnéticas: i) una vez modificadas en tubos eppendorf, las partículas magnéticas se separaron a través de un separador magnético que consigue capturar las partículas en la pared del tubo, ii) captura de las esferas magnéticas a través del sensor m-GEC, iii) imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la superficie de un sensor m-GEC modificados con esferas magnética, iv) imagen de un sensor recubierto de una película de oro antes de ser sometido a técnica SEM (iv).

Cada paso de modificación se explica en detalle en Zacco et al. (III y V). Brevemente, el ensayo inmunológico competitivo (§ 1.5.1.2) basado en esferas magnéticas se realizó en tubos eppendorf de 2 mL, en agitación y a temperatura ambiente durante 30 minutos, conteniendo 50 µl respectivamente de las esferas magnéticas modificadas con el anticuerpo, de muestra con el antígeno analito y conjugado enzimático, a las concentraciones de reactivos optimizados para obtener una respuesta electroquímica del orden de microamperios.

Una vez modificadas, las esferas magnéticas se realizan los pasos de lavados de las esferas magnéticas usando un separador magnético [véase, Figura 3.11 (i)], que permite agrupar las esferas magnéticas a la pared del tubo y así eliminar el sobrenadante de manera eficaz, rápida y sencilla. [6;25]

Después de una etapa final de lavado, las esferas se resuspenden en un volumen de 160 µl, y finalmente se capturan por el magneto-sensor m-GEC simplemente colocando el sensor dentro del tubo de incubación como se muestra en la Figura 3.12 (ii) para su evaluación electroquímica, como se explica en § 3.4.5.

Con el objetivo de evaluar la adsorción no específica sobre las esferas magnéticas en cada ensayo se realizaron paralelamente ensayos blancos en los cuales se utilizaron esferas magnéticas modificadas con anticuerpos preinmunes, o sea no específicos para el analito de interés. Por cada ensayo se procesan normalmente triplicados de los biosensores y de los blancos.

3.4.5 Evaluación electroquímica de los biosensores inmunológicos electroquímicos basados en nuevos materiales transductores

En las técnicas clásicas de inmunoensayo, las enzimas más frecuentemente utilizadas como marcadores son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina.

Los factores que influyen en la elección de una enzima para un inmunoensayo incluyen su elevado turnover, la presencia de grupos reactivos para el acoplamiento con el anticuerpo o el analito, una elevada estabilidad en el tiempo y una elevada actividad después del acoplamiento. [5]

La selección de la peroxidasa (HRP) en el presente trabajo como agente marcador del evento inmunológico debe a diferentes factores:

- su facilidad de conjugación con otras moléculas, que permite acoplarla a formatos de marcación tanto directos como compuestos (tal como el sistema biotina-estreptavidina),
- su posibilidad de manipulación, tanto de la propia enzima como de algunos de sus substratos,
- su elevada actividad y afinidad por el correspondiente substrato,
- su elevada estabilidad.

La peroxidasa es una glicoproteína de 44 KDa que contiene cuatro residuos de lisina que permiten su conjugación con diferentes moléculas (fluoróforos, biotina, etc) sin pérdida de actividad enzimática. Su substrato, el peróxido de hidrógeno, en el caso de una detección óptica induce la oxidación de un segundo substrato que genera un derivado que puede ser coloreado, fluorescente o luminiscente. En el caso de una detección amperométrica, el peróxido de hidrógeno se reduce, produciendo la oxidación de los centros catalíticos de la enzima. La enzima oxidada se regenera por el mediador hidroquinona (HQ), que se oxida a benzoquinona (BQ). La detección amperométrica se basa en la aplicación del potencial de reducción de la benzoquinona, y en registrar la intensidad de corriente, que será, por tanto, proporcional a la cantidad de marcador enzimático, y proporcional a la cantidad de analito inmovilizado en el complejo inmunológico en la superficie del biocompuesto.

La Figura 3.12 muestra el esquema de la reacción electroquímica que se genera en la superficie de un biosensor grafito-epoxi en el caso de un biocompósito y de un magnetocompósito. La evaluación de los biosensores se realiza basándose en la señal generada por la enzima peroxidasa que se utilizó en todos los casos como marcador. La señal analítica amperométrica está relacionada con la cantidad de enzima HRP que se haya unido al transductor, directamente o en su proximidad a través de las esferas magnéticas. Para la evaluación electroquímica de los biosensores, se agregó directamente una alícuota de sustrato enzimático (H_2O_2) al medio de medida (fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0) tal que con una adición se consiga la saturación de la enzima. [1]

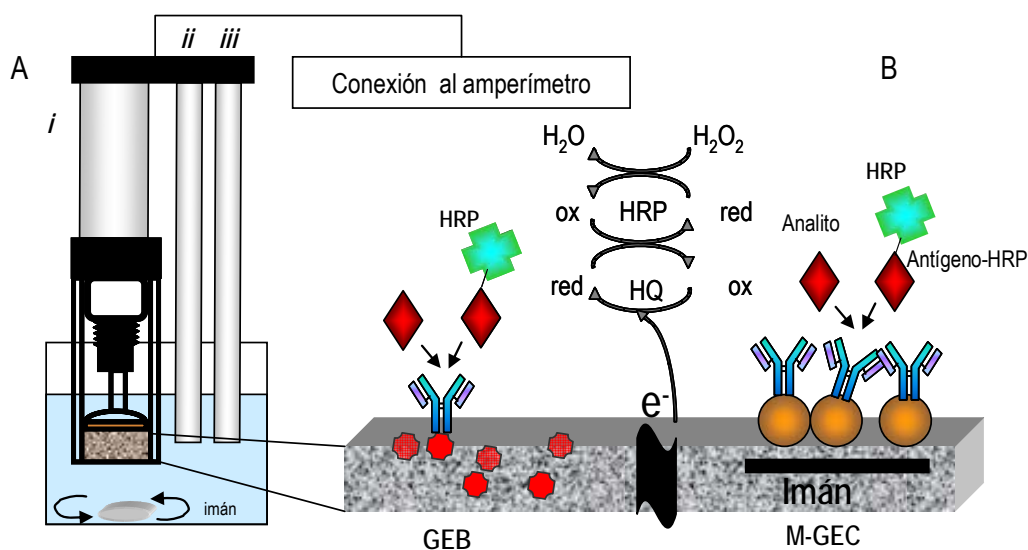
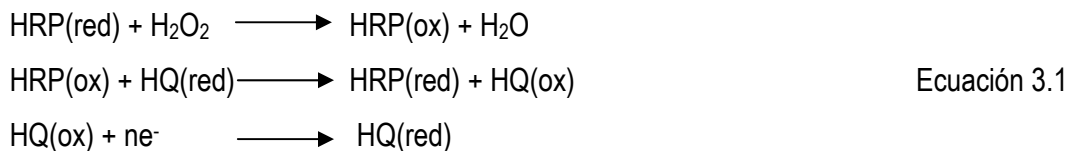


Figura 3.12: Representación esquemática de la evaluación de los sensores electroquímicos. (A) Los sensores se sumergen en la celda electroquímica de 25 ml. El sistema consta de tres electrodos: electrodo de trabajo (i), referencia (ii) y auxiliar (iii) (§ 3.1.2.1). (B) Detección electroquímica de las inmunoespecies en la superficie del transductor. Después de la reacción inmunológica, la evaluación de la actividad enzimática de la peroxidasa se ha llevado a cabo después de la adición de H_2O_2 y del mediador hidroquinona (HQ) aplicando el potencial de reducción del mediador HQ oxidado (vs Ag/AgCl).

La ecuación 3.1 muestra el esquema de la reacción en presencia del mediador benzoquinona a una concentración de 1.8 mM. A este sistema se le aplicó el potencial de reducción de la hidroquinona en un rango comprendido entre -0.1 y -0.2 V vs Ag/AgCl dependiendo del material transductor, que fue optimizado mediante voltamperometría cíclica.

De esta forma, la información analítica que se obtuvo –en general por triplicado– fue correspondiente a la $I_{m\acute{a}x}$, la cual es proporcional a la actividad enzimática de los controles de

adsorción no-específica y de los biosensores. El tiempo de respuesta para la obtención de la lectura correspondiente a la $I_{m\acute{a}x}$ fue de 30 segundos.



Sólo en el caso del procedimiento inmunológico competitivo, los resultados obtenidos se ajustaron según la ecuación 1.1 descrita en § 1. 5.1.2

3.4.6 Diseño de un enzimoimmuno análisis magnético

Con el objeto de comparar las señales electroquímicas con la metodología inmunológica de referencia –el ELISA–, se diseñó una estrategia en la cual se realizó la detección de la actividad de la enzima peroxidasa mediante la producción de un producto coloreado capaz de ser detectado mediante espectrofotometría.

La modificación de las partículas magnéticas se realizó como en § 3.4.4 pero, en este caso, las concentraciones de los inmunoreactivos fueron optimizadas de manera de obtener una absorbancia entre 0.7 y 1 en 30 minutos a una λ de 450 nm [véase Zacco et al. (III)]. [6]

Las etapas de separación y de lavado se llevaron a cabo a través un imán posicionado por debajo de las placas, como se ilustra esquemáticamente en la Figura 3.13.

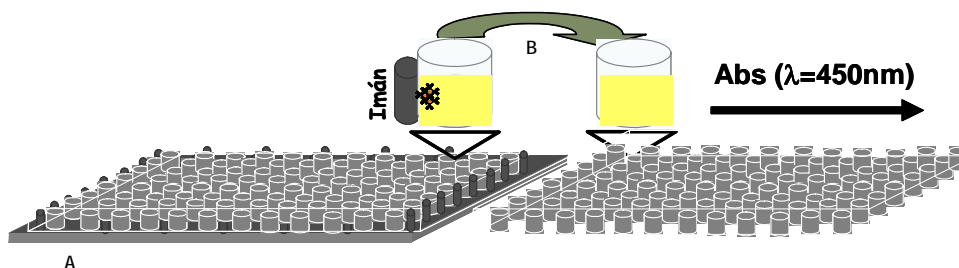


Figura 3.13: Representación esquemática de la determinación de la actividad enzimática de esferas magnéticas basada en detección óptica. (A) Separación de las esferas magnéticas mediante un imán de placa y (B) transferencia del sobrenadante coloreado a otra placa para la lectura de la absorbancia a 450 nm.

Después de la etapas de lavado se añadieron en cada pocillo 100 μl de una solución 0.004 % v/v de peróxido de hidrógeno y 0.01 % w/v de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina en

tampón citrato 0.04 M e incubadas por 30 minutos en oscuridad. Luego se adicionaron 50 μ L de H₂SO₄ 4 M para interrumpir la actividad enzimática. La solución final se separa de las esferas y se adicionó a una nueva placa para la lectura de absorbancia a 450 nm.

Los datos obtenidos en caso de reacción competitiva se ajustaron a una curva como se explicó en § 3.4.5.

3.5 DETERMINACIÓN DE ATRAZINA EN MUESTRAS REALES MEDIANTE BIOSENSORES INMUNOLÓGICOS ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN NUEVOS MATERIALES TRANSDUCTORES

El ensayo para la determinación de atrazina en muestras reales se llevó a cabo a través un material transductor biocompuesto o magneto-compósito (m-GEC).

En el caso de los materiales biocompuestos Av-GEB (véase § 3.2.4.1) y protA-GEB (véase § 3.2.5) los anticuerpos fueron inmovilizados como se describe en Zacco et al. (IV) [11]. En el caso de m-GEC los anticuerpos específicos anti-atrazina se inmovilizaron en la superficie de esferas magnéticas (véase Zacco et al. III). La determinación de la actividad enzimática fue, en todos los casos, como se describió en § 3.4.5. [6]

Para la determinación de atrazina en muestras reales se eligió agua de consumo y zumo de naranja embotellados adquiridos en comercios locales que fueron caracterizados respecto al pH y a la conductibilidad.

El zumo de naranja fue ajustado a pH de 7.5, diluido cinco veces en PBST y filtrado con un filtro de 0.22 μ m antes de cada ensayo.

El efecto matriz fue evaluado comparando las curvas estándar obtenidas en PBST con curvas obtenidas con la muestra.

3.6 DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS EN MUESTRAS REALES MEDIANTE BIOSENSORES INMUNOLÓGICOS ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN NUEVOS MATERIALES TRANSDUCTORES

En este caso, el ensayo para la determinación de sulfonamidas en muestras reales se realizó con anticuerpos inmovilizados en partículas magnéticas tosil activadas. Las esferas fueron modificadas como se describe en el anexo (I). [25]

Para la determinación de sulfonamida en muestra reales, fueron compradas en comercios locales: leche pasteurizada entera, semidesnatada y desnatada como leche fresca entera. La

leche pasteurizada fue liofilizada y almacenada a -20°C mientras que la leche fresca se almacenó a 4 °C. Todas las muestras fueron caracterizadas en pH y conductibilidad.

El inmunoensayo elegido para la determinación de las sulfonamidas en leche se basó en esferas magnéticas, un magneto-sensor y sistema de detección electroquímico.

Para cada tipo de muestras han sido construidas curvas de competición de leche diluida en PBST y curvas estándar de sulfonamidas en PBST. Los detalles experimentales se muestran en el anexo (I). [25]

3.7 DISEÑO DE UNA ESTRATEGIA BASADA EN RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* PATÓGENA

3.7.1 Introducción

El grupo de *Escherichia coli* patógenas se caracterizan principalmente por poseer genes relacionados con su patogenicidad. Los genes más característicos son el gen que codifica a una potente toxina denominada “toxina shiga” y el gen *eaeA* o ‘intimina’. La toxina shiga actúa inhibiendo la síntesis proteica y produciendo daño celular severo, mientras que el gen *eaeA* está asociado a la adherencia de las bacterias a los enterocitos y destrucción de microvellosidades intestinales.

En esta sección se describe un estudio de la secuencia genética de numerosas cepas de *E. coli* patógenas con el objeto de encontrar un fragmento del gen *eaeA* característico para ser usado con fines analíticos. Una vez identificado dicho gen, se pretende diseñar una metodología de detección de cepas patógenas mediante RT-PCR para en un futuro desarrollar una estrategia de amplificación de dicho gen con detección electroquímica basada en un genosensor.

3.7.2 Equipamiento y reactivos

3.7.2.1 Equipamiento

Los experimentos se llevaron a cabo mediante un equipo de PCR ‘real time’ modelo 5700 de firma comercial Applied Biosystems.

3.7.2.2 Reactivos y materiales

El buffer master Mix (catalogo N°. 4304437) fue suministrado por Applied Biosystems (U.S.). El buffer supermix UDG (catalogo N°. 117300-17) fue suministrados por Invitrogen (U.S.). RNase (10 mg/ml), Proteinasa K (20 mg/ml), Lisozima (catalogo N°. R1810M) fueron suministrado por Epicentro Biotechnology. Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico,(catalogo N°. P2069-400ML) fue suministrado por Sigma, cloroformo-isoamílico-alcohol (catalogo N°. X205-450ML) fue suministrado por Amresco. Las cepas de *E.coli* fueron proporcionadas por U.S.D.A. (United States Department of Agricultural) Albany, California (véase § 3.7.5). Los tubos de PCR fueron suministrados por Applied Biosystems. El resto de los reactivos utilizados fueron de calidad para PCR.

3.7.3 Análisis de secuencias del gen *eaeA* de *E. coli* patógena

El procedimiento constó del estudio y el análisis de las secuencias genéticas del gen *eaeA*, relacionado con la patogenicidad, para el diseño de nuevos *primers* que amplificaran DNA proveniente de diferentes grupos de *E. coli* patógenas.

Para este propósito se utilizó el recurso informático GenBank [26] para obtener la secuencia del gen *eaeA* de diferentes cepas de *E. coli* patógenas.

Se obtuvieron 64 secuencias, tal como se muestra en la Tabla 3.4, que se compararon entre ellas con un programa de análisis de secuencias de DNA [27] que permitió confrontar las bases nucleotídicas con el fin de evaluar las discrepancias entre ellas. Del programa se obtuvo una secuencia única y de esa se eligió un fragmento lo más similar posible entre las diferentes secuencias evaluadas.

3.7.4 Diseño de los *primers* para un ensayo de RT-PCR

Con este fin se usaron herramientas informáticas comerciales para evaluar y prever el rendimiento [28] o evaluar la especificidad de los *primers* respecto a la amplificación del solo fragmento de interés [26]. A la hora de elegir unos *primers* para amplificar un determinado fragmento de DNA hay una serie de reglas a seguir:

- La longitud de cada uno de los *primers* debe estar comprendida entre 18 y 24 bases ya que se ha comprobado que *primers* de mayor longitud (30-35 bases) no aumentan el rendimiento y los *primers* más cortos no poseen suficiente especificidad,

- Ambos *primers* deben tener una Tm similar (como mucho la diferencia entre ambas temperaturas debe ser de 5°C),
- La relación bases púricas y bases pirimidínicas debe ser 1:1 (como mucho 40-60%),
- La secuencia de los *primers* debe comenzar y terminar con 1-2 bases púricas,
- Para evitar la formación de dímeros de *primers* es necesario comprobar que los *primers* no contengan secuencias complementarias entre sí.

Una vez elegida una secuencia (469 pb), el diseño de los *primers* lo realizaron dos casas comerciales. Se obtuvieron así dos sets diferentes de *primers*.

El primero se basa en la técnica de amplificación Taqman, mientras el segundo en la D-LUX™, como se describió en § 1.6.3.

Tabla 3.4: Serotipo y número de identificación para cada secuencia del gen *eaeA* de *E. coli* analizada. *E. coli* "attaching and effacing" (AEEC), *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), *E. coli* enteropatogénico (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico (STEC). Las cepas evidenciadas se encontraron definidas como "variantes".

AEEC	EHEC	EPEC	ECO	STEC
AJ 715408 (IH 2664b)	Z11541 (69...2873)	AJ 875027 (152-1)	AJ 308550 (ECO308550) (353...3199)	AJ705051-AJ582912 (B49)
AJ 876648 (IH 2997f)	X60439 (206...3013)	AJ 879900 (FV 5114)	AJ 271407 (26484...29303)	
AJ 744865 (IH 3979a)		AJ 879899 (FV 5113-4115/2)	AJ 298279 (359...3175)	
H03		AJ 879898 (FV 5109-4113/1)	AY 255520 (ECO 97/241.6) (35...2854)	
AJ 876652 (H03_53199a)		AJ 781125 (EC 74699)	AF453441(27447...30266)	
AJ 876654 (H03_34136b)		AM 180621 (IH 2475B)	AF 081187 (DEC12a beta)	
AJ 876653 (H03_42584a)		AJ 715407 (FV359) var.	AF 065628 (328...3147)	
AJ 876651 (H03_37159a)		AJ 715409 (68.4)	AF 022236 (24849...27668)	
AJ 876650 (H03_32410a)		AJ705049 (373var)	U66102 (271...3093)	
AJ 876649 (H03_31923a)			M 58154-M34051(1591...4463)	
AJ 748083 (K227a)			AJ 277443 (26484...29303)	
AJ 748082 (K226 a)			AF081184	
AJ 876647(IH 1301a)			AF081182	
AJ 748084 (M17Oa)			AF081186	
AJ705050 (IH 1229a)			AF081183	
			AF081185	
			AJ 303141 (74551...77397)	
			AJ 308552 (382...3201)	
			AJ 308551 (341...3154)	
			AE 005174 (1586...4390)	
			AB 040740 (383...3193)	
			AY520905 (084.H-)	
			AY520904 (0156.H-)	
			AF043226 (7...2893)	
			AY223510	
			AY255520 (35...2854)	
			AY186750	
			AF479581	
			AF449419	
			AF449415	
			AF449414 (555...3362)	
variantes			AF253560 (569...3388)	
			AF200363 (25380...28199)	
			ECU59502 (2335...5154)	
			AF253561 (26...496)	

3.7.5 Extracción de DNA cromosómico

Para la extracción de DNA, todas las cepas seleccionadas fueron sometidas a una lisis mediante la adición de lisozima y proteinasa K. La purificación de los ácidos nucleicos se realizó con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, para finalmente precipitar el DNA con etanol absoluto y resuspenderlo en agua estéril tridesdilatada. A continuación se describe el protocolo utilizado:

- Se cultivaron las bacterias una noche en 50 ml de medio de cultivo LB (Luria Bertoni). El centrifugado del cultivo se resuspende en 10 mL de Tris buffer, y se añaden 3 µl de lisozima y 10 µl de RNAsa. Se incubó 15 min. a temperatura ambiente y 15 min. en hielo.
- Se añadieron 300 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) en buffer STEP y se incubó 1h a 55 °C.
- Se añadieron 3.6 ml de acetato amónico 7.5 M y 12 mL de fenol-cloroformo. Se centrifugó a 15 rpm durante 10 min.
- A la fase acuosa se añadieron 5 ml de mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y 5 ml de TE buffer, se centrifugó por 10 min., recuperándose nuevamente la fase acuosa, a la que se le añadió 10 ml de cloroformo y se centrifugó otra vez (10 min).
- Se recuperó nuevamente la fase acuosa en tubos de polipropileno, se agregaron dos volúmenes de etanol al 95 % frío y se mezcló suavemente. Se centrifugó a 3,000 rpm por 5 min y se eliminó el etanol.
- Se añadieron 10 ml de etanol al 70% y se agitó suavemente, se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 min para eliminar el etanol.
- Se dejaron secar los pellets recuperados para eliminar el etanol residual.
- Se añadieron 500 µl de agua y se dejaron las muestras en el refrigerador.

Este protocolo de extracción fue utilizado para todas las bacterias que figuran en la tabla a continuación. Después de la extracción de DNA, fue calculada la concentración de cada muestra con un espectrofotómetro (A_{260}/A_{280}). Parte del DNA se congeló a -20°C y se prepararon diluciones seriadas de 10 ng/µl hasta 0.01 fg/µl que fueron utilizadas directamente en experimentos de RT-PCR.

Tabla 3.5: Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Cepas			Descripción
Patogénicas			
<i>Escherichia coli</i>	O157:H7	96A13466	aislada de sidra
	O157:H7	EDL933	aislada de hamburguesa
	O157:H7	20779	aislada de hamburguesa
	O157:H7	SEA 13B88	aislada de sidra
	O137:H41	88A5333	aislada de cuadros clínicos de colitis enterohemorrágicas
	O157:H7	G5858683	aislada de cuadros clínicos, vegetales
	O157:Neg	1292W	aislada de bovino
	O128:H47	13E	aislada de cuadros clínicos de diarrea
	O29:NM		EIEC; enteroinvasivo
	O25:NM	E2539	ETEC; enterotoxigenico
	O111:NM		EPEC
No-patogénica			
<i>Escherichia coli</i>	O137:H47	MW421	aislada de vegetales
	O?:H8,23,41	MW424	aislada de vegetales
	O13	MW416	aislada de vegetales
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	3937		

3.7.6 Protocolo de amplificación a tiempo real del gen *eaeA*

El DNA de 15 cepas, 11 de *E. coli* patógenos, 3 de *E. coli* no patógenos, 1 de *Erwinia chrysanthemi* se diluyó hasta conseguir diluciones seriadas de 10 ng/μl hasta 0.1 fg/μl.

El ensayo de RT-PCR consistió en mezclar los diferentes reactivos de reacción en tubos de PCR de 200 μl en las proporciones descritas en las Tabla 3.6 para la estrategia Taqman® y en la Tabla 3.7 para la estrategia Lumix®, la mismas tablas muestran también la rampa de temperatura utilizadas. Los buffers de reacción consistieron en una mezcla optimizadas de reactivos de PCR (§ 1.6.4), *primers* y DNAs o agua en el caso de controles negativos.

Tabla 3.6: Protocolo para la reacción de hibridación (Taqman®). Volumen de reacción, concentración de los reactivos y rampa de temperatura del ensayo.

Protocolo RT-PCR Taqman			
Componentes de reacción	Volumen / tubo (μl)	Tiempo	Temperatura
Buffer Taqman	10	Set up	
20 X primer	1 (900 nM)	2 min	50 °C
DNA	9	10 min	95 °C
Tot	20 μl	40 Ciclos	
		15 sec.	95 °C
		1 min.	62 °C

Después de haber optimizado los parámetros de la reacción de amplificación tales como la concentración de los *primers* y temperatura de hibridación, los protocolos finales se describen en las Tabla 3.6 y 3.7.

Tabla 3.7: Protocolo para la reacción de hibridación (Lumix). Volumen de reacción, concentración de los reactivos y rampa de temperatura del ensayo.

Protocolo RT-PCR Lux			
Componentes de reacción	Volumen / tubo (μ l)	Tiempo	Temperatura
Super Mix UDG 2X	10	Set up	
<i>Primers delantero</i> (10 μ M)	0,4 (200 nM)	2 min	50 °C
Primers reverso (10 μ M)	0,4 (200 nM)	2 min	95 °C
Rox	0,2	40 Ciclos	
DNA	9	15 sec.	95 °C
Tot	20 μ l	1 min.	60 °C

3.8 BIBLIOGRAFÍA

1. Pividori M. I. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. 2002.
2. Céspedes F., Martínez-Fabregas E., Alegret S. New materials for electrochemical sensing I. Rigid conducting composites. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1996, 15:296-304.
3. Alegret S. Rigid carbon-polymer biocomposites for electrochemical sensing. A review. *Analyst*. 1996, 121:1751-8.
4. Santandreu i Vilajosana M. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona 1998.
5. Pividori M.I., Alegret S. Electrochemical DNA Biosensors. *Analytical Letters*. 2005, 15:2541-65.
6. Zacco E, Pividori MI, Alegret S. Electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of pesticides residues. *Analytical Chemistry*. 2006, 78:1780-8.
7. Salvador A., Céspedes F., Martínez Fabregas E., Martorell D., Morales A., Centelles E., Muñoz J., Carbon-polymer biocomposites for amperometric sensing. *Biosensors and Bioelectronics*. 1996, 1-2:35-44
8. Pividori M.I., Campoy S, Barbé J, Alegret S. Electrochemical determination of Salmonella spp based on GEC electrodes In: *Electrochemical Sensor Analysis*. Elsevier. Amsterdam (2007). En prensa.
9. Zacco E., Pividori M.I., Alegret S. Electrochemical biosensing based on universal affinity biocomposite platforms. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006, 21:1291-301.
10. Zacco E., Pividori M.I., Llopis X., del Valle M., Alegret S. Renewable protein A modified graphite-epoxy composite for electrochemical immunosensing. *Journal of Immunological Methods*. 2004, 286:35-46.
11. Zacco E., Marco M.-P, Galve R., Alegret S., Pividori M.I. Electrochemical biosensing of pesticides residues based on affinity biocomposite platforms. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006. En prensa.
12. Wang J., *Analytical Electrochemistry*. VCH Publishers, New York, 1994.
13. Ohgaru T, Tatsumi H, Kano K, Ikeda T. Approximate and empirical expression of the steady-state catalytic current of mediated bioelectrocatalysis to evaluate enzyme kinetics. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2001, 496:37-43.
14. Pandey P.C., Upadhyay S., Upadhyay B. Peroxide Biosensors and Mediated Electrochemical Regeneration of Redox Enzymes. *Analytical Biochemistry*. 1997, 252:136-42.
15. Pividori M.I., Merkoçi A., Alegret S. Graphite-epoxy composites as a new transducing material for electrochemical genosensing. *Biosensors and Bioelectronics*. 2003, 473-84.
16. Green N.M. Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol*. 1990, 51-67.
17. Jones M.L., Kurzban G.P. Non cooperatives of biotin binding to tetrameric streptavidin. *Biochemistry*. 1995, 34:11750-6.

18. Wilchek M., Bayer E.A. The avidin biotin complex in bioanalytical applications. *Analytical Biochemistry*. 1988, 171:1-32.
19. Wilchek M., Bayer E.A. Applications of avidin-biotin technology. *Literature survey. Methods Enzymol.* 1990, 184:14-45.
20. Akerstrom B., Bjock L. A physicochemical study of protein G a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties. *The Journal of Biological Chemistry*. 1986, 261:10240-7.
21. Lu B., Smyth M.R., O'Kennedy R. Immunological activities of IgG antibody on pre-coated Fc receptor surfaces. *Analytica Chimica Acta*. 1996, 331:97-102.
22. Larsson A. An ELISA procedure for the determination of protein G-binding antibodies. *Journal of Immunological Methods*. 1990, 135:273-5.
23. Palmer S. Protein A and G spin column kits for rapid, convenient, and high-performance antibody purification. *American Biotechnology Laboratory*. 2002, 20: 58-60.
24. Charcosset C., Su Z., Karoor S., Daun G., Colton CK. Protein A immunoaffinity hollow fiber membranes for immunoglobulin G purification: experimental characterization. *Biotechnology and Bioengineering*. 1995, 48:415-27.
25. Zacco E., Galve R., Adrian J., Marco M.-P., Alegret S., Pividori M.I. Electrochemical magneto immunosensing of antibiotic residues in milk. *Biosensors and Bioelectronics*. En prensa
26. GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>. 2006.
27. DNA*DNASar II. (Lasergene, DNASTAR Inc.USA). 2006.
28. <http://www.premierbiosoft.com/>. 2006.

4 DISCUSIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS

4.1 INTRODUCCIÓN

En esta tesis se presenta el diseño de nuevos sistemas analíticos basados en biosensores electroquímicos para el análisis rápido de muestras alimentarias, medioambientales o clínicas.

El trabajo se desarrolla en dos ejes principales: por un lado, *i)* la evaluación de ensayos biológicos que usan biosensores cuyos transductores son unos nuevos materiales biocompuestos de afinidad específica o universal basados en un material compuesto grafito-epoxi (GEC) de propiedades electroquímicas mejoradas, y por el otro lado, *ii)* la evaluación de ensayos inmunológicos basados en esferas magnéticas como soporte sólido para biomoléculas y un sistema de detección electroquímica basado en magneto-compósitos grafito-epoxi (m-GEC).

Además, se presenta un estudio previo al desarrollo de un biosensor de DNA para la determinación electroquímica a tiempo real de la amplificación de un gen característico de patogenicidad de la bacteria *E. coli*.

Los materiales biocompuestos han sido caracterizados y evaluados bajo diferentes puntos de vista: sus propiedades de transducción electroquímica y de superficie, así como la capacidad de inmovilización de diferentes moléculas biológicas (anticuerpos, oligonucleótidos y enzimas) mediante diferentes estrategias.

Por otro lado, han sido también evaluadas diferentes metodologías de inmovilización de anticuerpos en partículas magnéticas en base a los grupos funcionales de las mismas.

Finalmente se han establecido protocolos de análisis en muestras reales para el pesticida atrazina en agua y zumo de naranja y antibióticos de la familia de las sulfonamidas en leche.

En los siguientes apartados se evidenciarán los resultados más relevantes obtenidos en cuanto a inmovilización de biomoléculas y al desarrollo de inmunoensayos en biocompuestos así como para los inmunoensayos desarrollados con partículas magnéticas y en un magneto-sensor.

4.2 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE NUEVOS MATERIALES PARA BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS

4.2.1 Caracterización electroquímica de los electrodos por voltamperometría cíclica

En nuestro grupo de trabajo, previamente se demostró que el compuesto grafito-epoxi (GEC), compuesto de partículas conductoras dispersas en una matriz polimérica, presenta unos fenómenos de superficie más ricos en comparación con superficies continuas de materiales conductores clásicamente utilizados, tales como grafito, oro u otros materiales conductores. Experimentalmente, se vio que el GEC muestra las mismas propiedades electroquímicas que un arreglo de microelectrodos: una mejor relación señal/ruido y, por tanto, menores límites de detección respecto al carbono vitrificado. [1]

Sin embargo, la introducción de una biomolécula en la formulación del compuesto grafito-epoxi puede modificar las propiedades electroquímicas del biocompuesto resultante. Por esta razón, se evaluaron biocompuestos de proteína A (ProtA-GEB) de diferente composición (con 1, 2 y 4 % de proteína A), mediante voltamperometría cíclica y los resultados se compararon con un sensor GEC sin la adición de proteína A, véase Zacco et al. (1). [2]

La voltamperometría cíclica otorga información cualitativa sobre el efecto de la proteína A en el comportamiento electroquímico de los biocompuestos. Se utilizó la hidroquinona (HQ) para caracterizar los biocompuestos debido a que los resultados también son útiles para determinar el potencial de reducción de la hidroquinona oxidada (benzoquinona, BQ), producto de la acción como mediador de la HQ cuando se usa la enzima peroxidasa como marcador. Mediante la aplicación del potencial de reducción, se pretende regenerar el agente mediador, que fuera oxidado por la enzima marcadora.

Es importante también evaluar si la modificación superficial del biocompuesto ProtA-GEB con anticuerpos produce un incremento de la separación de los picos de oxidación/reducción del par HQ/BQ.

Finalmente, se evaluó también el comportamiento electroquímico de sensores GEC modificados superficialmente con una capa de proteína A adsorbida.

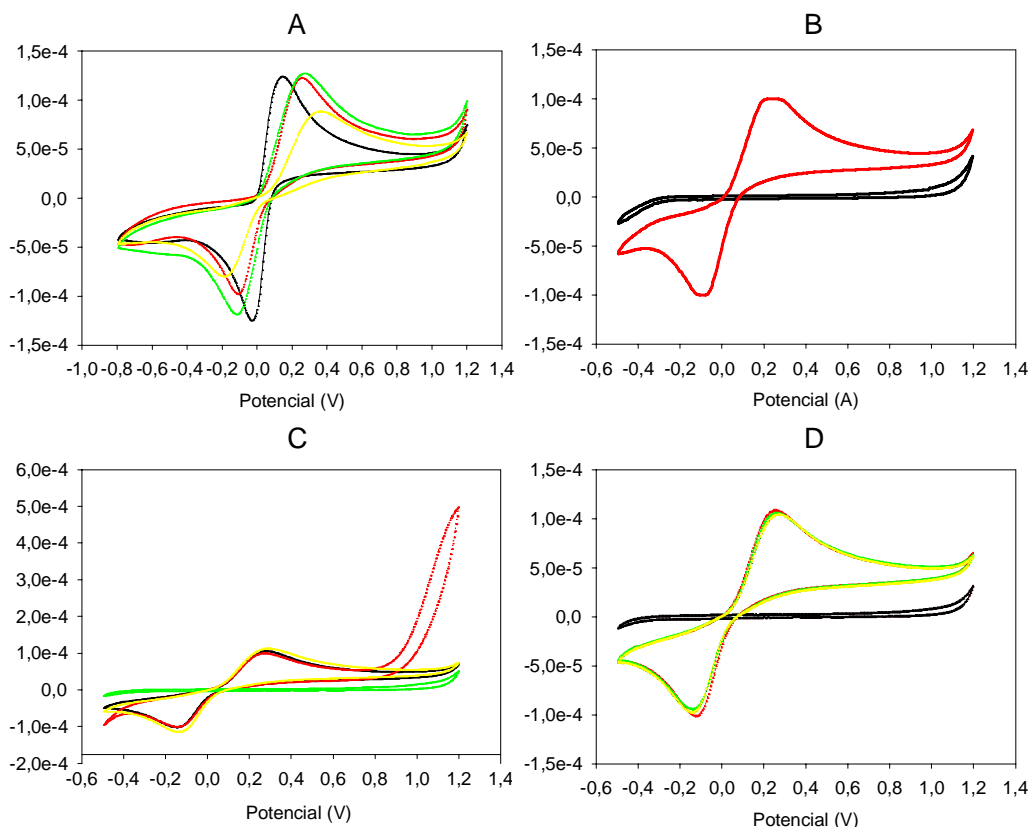


Figura 4.1: Voltamperogramas cíclicos utilizando como electrodo de trabajo: (A) ProtA(4%)-GEB (amarillo), ProtA(2%)-GEB (verde), ProtA(1%)-GEB (rojo), GEC (negro). (B) ProtA/GEC (rojo) y su correspondiente línea de base (negro), (C) ProtA(2%)-GEB modificado con 10 pmoles de RlgG, 2 pmoles de anti-RlgG, 50 μg de estraptavidina-HRP (negro) y su correspondiente línea de base (verde), en presencia de H_2O_2 2.12 mM (rojo) y ProtA(2%)-GEB sin modificar (amarillo). (D) Reproducibilidad del pulido para un mismo biocomposite ProtA(2%)-GEB, $n=3$. En todos los casos, el medio es fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Excepto en las líneas de base, los experimentos se realizaron en presencia de hidroquinona (HQ) 1.81 mM y de H_2O_2 2.12 mM. $V=50 \text{ mV s}^{-1}$

En la Figura 4.1 (A-D) se muestra la actividad redox de la hidroquinona, cuando se utilizan los transductores GEC, ProtA-GEB (1, 2 y 4 %) y ProtA/GEC. En la Figura 4.1 (A) el voltamperograma del sensor GEC evidencia un pico de reducción de -0,025 V y un pico de oxidación de + 0,15 V. En los biocompuestos de proteína A (ProtA-GEB), al aumentar el contenido de proteína A desde 0 (GEC) hasta 4 %, se observa un desplazamiento hacia

potenciales más negativos del pico de reducción de la BQ, una disminución de la intensidad medida y un incremento de la separación de los picos de oxidación/reducción del par HQ/BQ.

Los biocompuestos ProtA(1%)-GEB y ProtA(2%)-GEB presentan el pico de reducción de la BQ a $-0,1$ V, mientras que el ProtA(4%)-GEB, a $-0,2$ V. Los picos de oxidación de la HQ se encuentran a $0,28$ y $0,35$ V, respectivamente. La Figura 4.1 (B) muestra que la adsorción de proteína A sobre la superficie de un sensor GEC produce un desplazamiento del potencial de oxidación de la benzoquinona BQ de -0.1 V respecto al GEC sin proteína A adsorbida. Sin embargo, los potenciales redox del par HQ/BQ son idénticos a los obtenidos con los biocompuestos ProtA-GEB (1% y 2%).

La Figura 4.1 (C) muestra que el electrodo ProtA(2%)-GEB sometido al inmunoensayo y, por tanto, modificado en su superficie con los anticuerpos y el conjugado enzimático no muestra diferencia significativa en los potenciales redox del par HQ/BQ respecto al biocompuesto sin modificar. Estos resultados son los esperados, teniendo en cuenta que sólo el 2 % de la superficie del biocompuesto ProtA(2%)-GEB expone proteína A disponible para el inmunoensayo.

Los resultados que se muestran en la Figura 4.1 (D) corroboran la excelente reproducibilidad de las superficies obtenidas mediante el procedimiento de pulido.

De estos resultados puede concluirse que la proteína A afecta a las propiedades electroquímicas de los biocompuestos, probablemente por el aumento de la separación entre las partículas de grafito, produciendo un material menos conductor a medida que se incrementa su contenido en la formulación del biocompuesto. También queda demostrado que las modificaciones superficiales producidas durante el inmunoensayo no modifican las propiedades electroquímicas de estos materiales.

4.2.2 Caracterización microscópica de los electrodos

4.2.2.1 Microscopía de fluorescencia

La distribución tanto de la proteína A como de la avidina en la superficie del biocompuesto fue estudiada a través de microscopía láser confocal, mediante el uso de marcadores fluorescentes conjugados: rodamina en el caso de la proteína A y fluoresceína para la molécula de avidina.

La marcación fluorescente de los biocompuestos de proteína A se llevó a cabo mediante un sándwich que se consiguió a través de *i)* la inmovilización de RIgG al biocompuesto a través de la proteína A, *ii)* la posterior reacción inmunológica de la RIgG con

un conjugado biotinilado anti-RIgG, y, finalmente, *iii*) la reacción con el conjugado fluorescente rodamina-estreptavidina. El sándwich inmunológico formado en la superficie del transductor puede, entonces, representarse como ProtA/RIgG/anti-RIgG biotinilada/rodamina-estreptavidina y permitió individualizar la distribución de la proteína A en la superficie del biocompuesto, biorreconocida a través de la reacción inmunológica. En el caso del biocompuesto de avidina, la marcación se llevó a cabo a través de la reacción directa de la avidina con el conjugado fluorescente estreptavidina-fluoresceína.

La Figura 4.2 (A) evidencia una intensa fluorescencia (áreas en rojo) debida a la presencia del sándwich ProtA/RIgG/anti-RIgG biotinilada/rodamina-estreptavidina en los sitios de unión de transductor determinados por la proteína A. La Figura 4.2 (B) representa el control de adsorción inespecífica, es decir, sin RIgG, en el cual no se observan áreas rojas debidas a la presencia del sándwich fluorescente. Las áreas verdes son debidas a la reflexión del material grafito-epoxi y presenta el mismo patrón para ambos casos.

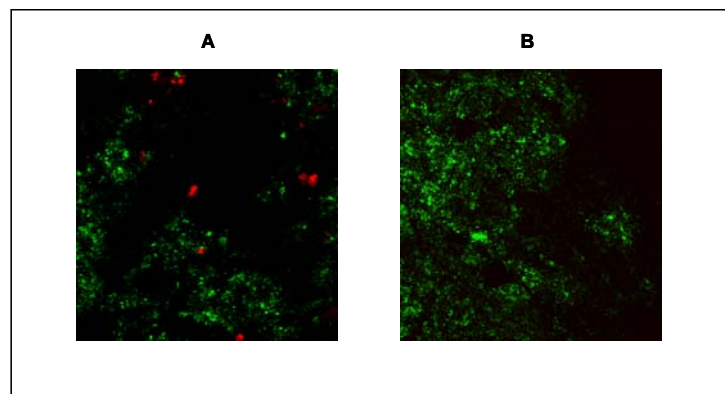


Figura 4.2: Microscopía láser confocal de ProtA(4%)-GEB modificado con (A) 10 pmoles de RIGG, 2 pmoles anti-RIGG biotinilado y 50 µg de rodamina-estreptavidina y (B) control de la adsorción inespecífica, llevado a cabo sin RIGG.

La microscopía de fluorescencia confirma que los biocompuestos poseen moléculas de proteína A disponibles en la superficie para la reacción inmunológica, convirtiéndose así en una plataforma de afinidad para el enlace de anticuerpos con diferente especificidad [véase Zacco et al. (I, II y IV)].^[2-4]

La Figura 4.3 (A) es relativa a los biocompuestos de avidina. En este caso es evidente una intensa fluorescencia (en verde) que corresponde a los sitios específicos de unión avidina/biotina-fluoresceína. La Figura 4.3 (B) representa el control de adsorción inespecífica, que se ha obtenido utilizando una molécula de fluoresceína no conjugada. Como se puede observar, la adsorción no específica es insignificante con respecto a la específica,

demostrando la presencia de sitios bioespecíficos para la unión con la biotina. Por otro lado, la naturaleza porosa del material compuesto grafito-epoxi hace posible que el conjugado biotina-fluoresceína cuyo tamaño es pequeño, acceda a sitios bioactivos menos disponibles que para complejos inmunológicos de mayor peso molecular [véase Zacco et al. (II)]. [3:5] Es importante destacar que la interacción con las biomoléculas confinadas en el material conductor puede limitarse por procesos de difusión.

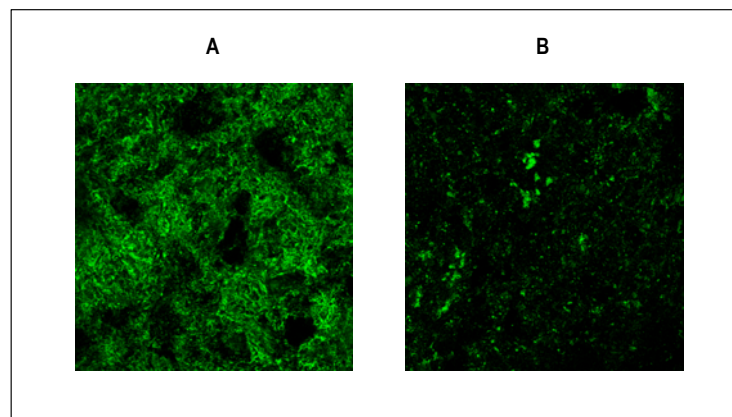


Figura 4.3: Microscopía láser confocal de (A) Av-GEV modificado con 80 pmol de fluoresceína conjugada y (B) control de la adsorción inespecífica realizado con fluoresceína no conjugada. La λ de excitación del láser es de 568 nm. Voltaje: 352 V.

4.2.2.2 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido proporciona información cualitativa sobre las propiedades superficiales de un material. En particular, si el material estudiado es un compuesto, aporta información sobre la estructura, dimensión y distribución de las microzonas de grafito dentro de la matriz polimérica. Las superficies de electrodos GEC y ProtA(4%)-GEB fueron observados por microscopía electrónica de barrido (Figura 4.4).

Como puede observarse, la superficie del GEC [Figura 4.4, (A y C)] es heterogénea y rugosa. Las zonas claras se pueden atribuir a la resina epoxi y las zonas oscuras a las áreas de material conductor (grafito). La superficie del biocompuesto ProtA(4%)-GEB (Figura 4.4 B y D) parece tener material acumulado (grafito) en amplias microzonas distanciadas. Esta diferencia estructural sugiere que la introducción de proteína A en la formulación del compuesto modifica la polimerización de la resina. Además, las imágenes sugieren una mayor resistencia del biomaterial debido a la presencia de la proteína A.

Esta técnica no permite distinguir la distribución de la proteína A sobre la superficie. La molécula es demasiado pequeña para la resolución máxima permitida por esta técnica.

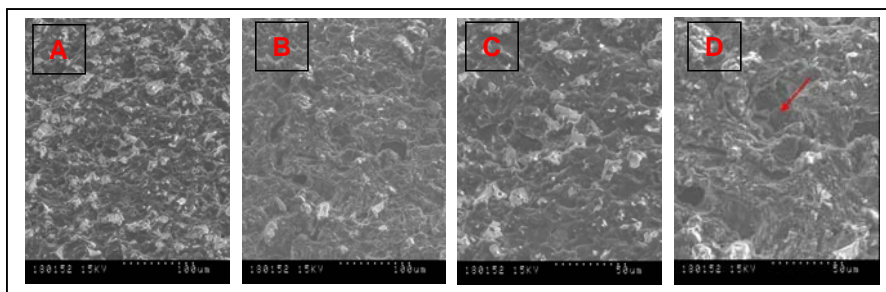


Figura 4.4: Microscopía electrónica de barrido de la superficie de un electrodo GEC (A y C) y ProtA(4%)-GEB (B y D). Las superficies fueron pulidas y sometidas a ultrasonido durante 1 minuto. Las microfotografías A y B fueron tomadas con la misma resolución (100 μm), mientras que en C y D la resolución fue de 50 μm . En todos los casos, el potencial de barrido fue de 10 KV.

4.3 ESTRATEGÍAS DE INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS EN TRANSDUCTORES BIOCOMPÓSITOS

Como ya se comentó, un compuesto es un material de naturaleza mixta que permite la interacción de las proteínas directamente con el grafito mediante uniones de tipo electrostáticas [6;7], mientras que, la matriz polimérica de tipo epoxi –de naturaleza fundamentalmente no polar– también podría estabilizar a la proteína por interacciones hidrofóbicas. Estas interacciones estabilizadoras son inespecíficas e involucran toda la molécula sin excepción de sus grupos funcionales. De ahí que los grupos biorreactivos de la proteína puedan alterarse cuando se usa la adsorción como estrategia de inmovilización.

La necesidad de mejorar las estrategias de inmovilización para favorecer una correcta orientación de las moléculas biológicas, así como el requerimiento de dispositivos mucho más flexibles en su utilización, ha llevado al desarrollo de nuevas metodologías de inmovilización: los materiales biocompuestos. En este caso, el transductor biológicamente modificado en volumen, actúa no sólo como transductor electroquímico, si no también como un reservorio del material biológico. La gran flexibilidad de este biomaterial viene dada por el hecho de que las moléculas escogidas son capaces de reconocer numerosos analitos modificados. A continuación se describen cada uno de ellos.

4.3.1 Biocompósito de avidina

El biocompósito de avidina ha demostrado ser una plataforma de afinidad universal para la detección electroquímica de diferentes especies biológicas biotiniladas, tales como anticuerpos, oligonuclótidos y enzimas. A continuación se muestran los principales resultados en la inmovilización de dichas biomoléculas en biocompuestos de avidina.

4.3.1.1 Inmovilización de anticuerpos en un biocompósito de avidina

Los anticuerpos pueden inmovilizarse superficialmente en Av-GEB si son previamente biotinilados, o bien mediante un puente con la proteína G biotinilada capaz de unirse a su vez con la región Fc de los anticuerpos sin modificar, según se muestra en la Figura 3.4 y § 3.2.4.1.

La proteína G, como la A, son proteínas capaces de capturar por afinidad los anticuerpos en sus fracción constante Fc. La principal diferencia entre las dos proteínas radica en la fuerza de enlace con la inmunoglobulinas que resulta específica de especie (§ 1.7.3.1).

Se evaluaron dos diferentes estrategias de inmovilización de los anticuerpos: *i)* en solución y agitación *ii)* por adsorción ‘a la gota’ en condiciones estáticas y hasta sequedad (véase § 3.2.5). En el caso de la inmovilización ‘a la gota’ en la superficie del sensor, como la solución de la biomolécula se deja secar en la superficie del biocompósito o del compuesto GEC, se forma una capa que actúa como una membrana difusional.

La Figura 4.5 muestra comparativamente los resultados obtenidos para un transductor GEC modificado por adsorción a la gota con proteína G [Figura 4.5 (A)] y un biocompósito Av-GEB modificado superficialmente con proteína G biotinilada [Figura 4.5 (B)].

En cualquiera de los casos, los resultados demuestran la eficacia de la inmovilización de las inmunoglobulinas a través de la proteína G en cuanto a la orientación de los anticuerpos, obteniéndose señales en el orden de los 20 microamperios y señales inespecíficas siempre en el orden de los pocos microamperios. Sin embargo, las señales son más grandes cuando la inmovilización de la proteína G se realiza a través del anclaje en un punto –mediante la reacción biotina/avidina– que cuando la proteína G se adsorbe aleatoriamente al transductor, confirmando una mejor exposición de los sitios de afinidad mediante el enlace de las biomoléculas en un único punto de su estructura.

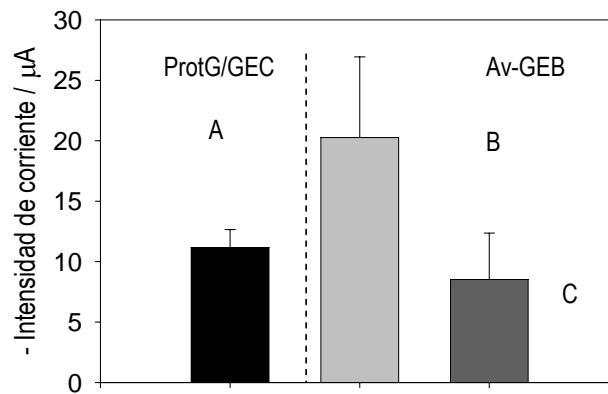


Figura 4.5: Resultados obtenidos para la inmovilización de la proteína G mediante adsorción en la superficie de un transductor grafito-epoxi (ProtG/GEC) (A) y a través de la reacción biotina-proteína G en la superficie de un transductor biocompósito Av-GEB en un protocolo de incubación en dos (B) o una etapa (C). En todos los casos, la adsorción inespecífica se evaluó omitiendo el paso de incubación con el anticuerpo RlgG. (A) Proteína G 1.5 pmol, (B y C) proteína G biotinilada 1.5 pmol. (A, B y C) RlgG 3 pmol, anti-RlgG–HRP 5 pmol. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1, pH 7.0. Substrato: H_2O_2 2,12 M. Mediador: hidroquinona 1.81 mM. Potencial -0.2 V (vs Ag/AgCl). $n=3$.

Si se consideran comparativamente los resultados de la Figura 4.5 (B y C), en los cuales se muestran los resultados de la inmovilización de anticuerpos a través de la proteína G biotinilada en una estrategia a una y dos etapas, respectivamente, se concluye que una mejor inmovilización de los anticuerpos se consigue a través la unión avidina/biotina-proteína G un ensayo inmunológico llevado a cabo en dos etapas, cuyos detalles experimentales se explican en Zacco et al. (II).^[3] Un ensayo en dos etapas brevemente consiste en modificar el biocompósito Av-GEB con la proteína G biotinilada en una primera etapa, y en una etapa ulterior, se realiza la modificación con los anticuerpos. Esta diferencia puede estar relacionada con el hecho de que los complejos inmunológicos más grandes acceden más difícilmente a los sitios de unión del biocompósito Av-GEB.

4.3.1.2 Inmovilización de enzimas en un biocompósito de avidina

Los biosensores enzimáticos, en particular los de glucosa, son los más estudiados por su gran número de aplicaciones en el ámbito clínico como alimentario y por la elevada estabilidad de la enzima utilizada, la glucosa oxidasa.

La Figura 4.6 (A-B) muestra los resultados obtenidos cuando las enzimas se inmovilizan al transductor electroquímico a través del enlace entre la avidina confinada en un biocompósito (Av-GEB) y la biotina conjugada a la enzima. Los experimentos muestran los

calibrados obtenidos por dos diferentes sistemas enzimáticos: glucosa oxidasa [Figura 4.6 (A)] y peroxidasa [Figura 4.6 (B)] y sus correspondientes sustratos.

Los biosensores enzimáticos basados en Av-GEB muestran excelentes límites de detección que en el caso de la glucosa son de 0.05 mM [Figura 4.6 (A)] confirmando la elevada sensibilidad de los materiales biocompuestos y sus posibles aplicaciones en muestra reales oportunamente diluidas. Asimismo, se obtiene una respuesta lineal para la detección de H_2O_2 . Para mayores detalles experimentales véase Zacco et al. (II). [3]

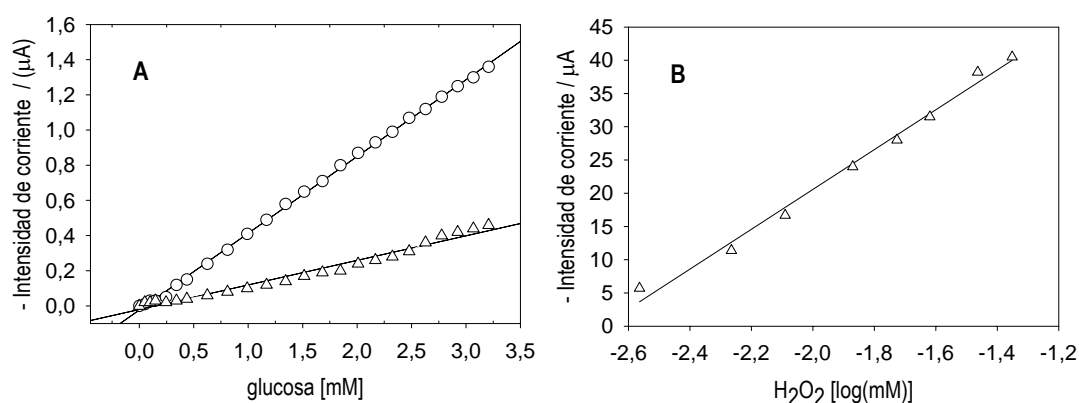


Figura 4.6: (A) Detección de glucosa a través de Av-GEB (1%) modificado con 100 pmol (O) y 25 pmol (Δ) de glucosa oxidasa biotilada (biotina-GOx) y (B) detección de H_2O_2 a través de Av-GEB (1%) con 25 pmol de peroxidasa biotilada (biotina-HRP).

4.3.1.3 Inmovilización de DNA en un biocompuesto de avidina

El objetivo de estos experimentos consiste en demostrar la utilidad de los biocompuestos de avidina para la inmovilización de secuencias cortas de DNA y la detección del evento de hibridación basada en marcación enzimática. Para tal fin, se utilizó como modelo la secuencia del gen *mecA* relacionado con la resistencia de *Staphylococcus aureus* a la meticilina (MRSA).

La Figura 4.7 muestra los resultados obtenidos cuando se usa una estrategia de inmovilización e hibridación de la sonda de captura biotilada y de la sonda marcada con digoxigenina, en una única etapa [véase § 3.2.4.3. y Zacco et al. (II) para mayores detalles experimentales]. [3] Los resultados en la Figura 4.7 muestran además que el ensayo es muy selectivo, capaz de discernir entre fragmentos que difieren en sólo una base, pudiéndose aplicar para la detección de SNPs (del inglés 'single nucleotide polymorphism').

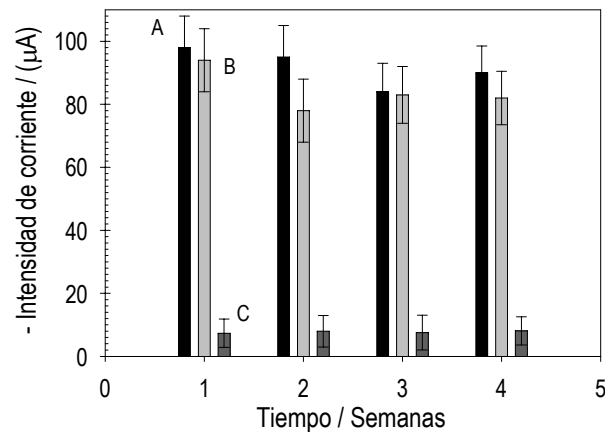


Figura 4.7: Sensor de DNA para detectar el gen *mecA* de *S. aureus* en un formato sándwich a una etapa. A) hibridación con el complementario perfecto, B) hibridación en presencia de interferentes con SNPs, y C) adsorción inespecífica sin target. En todos los casos, el target, las sondas biotiniladas, las sondas modificadas con digoxigenina y las sondas interferentes, 150 nmol; antiDig-HRP: 124.5 μg. En todos los casos n=4. Potencial aplicado: -250mV (vs. Ag/AgCl) Los detalles experimentales se describen en Zacco et al. (11). [3]

4.3.2 Biocompósito de proteína A

En este apartado se evalúa no sólo la capacidad de la proteína A para la inmovilización de anticuerpos, sino también la efectividad de dicha inmovilización cuando se utilizan diferentes estrategias de modificaciones de los electrodos con proteína A. Los primeros experimentos se llevaron a cabo utilizando un sistema inmunológico sándwich modelo, caracterizado por la unión ProtA/RIgG/anti RIG-HRP.

Con este propósito, se construyeron los siguientes biosensores: i) GEC modificados superficialmente con una capa de proteína A mediante adsorción "a la gota" (ProtA/GEC) y, ii) biocompuestos modificados en volumen con proteína A (ProtA-GEB). Además, se utilizaron como controles sensores GEC modificados superficialmente por adsorción con anticuerpos RIGG (IgG/GEC).

Los resultados se muestran comparativamente en la Figura 4.8 (A). Las barras en negro representan la señal específica debida a la reacción inmunológica entre los anticuerpos (IgG) (véase § 3.7) inmovilizados en la superficie del transductor mediante distintas estrategias y el conjugado enzimático (anti-IgG-HRP). Las barras grises representan la adsorción inespecífica. En todos los casos, la señal específica de los biosensores (ProtA-GEB; ProtA/GEC e IgG/GEC) es significativamente más alta que la correspondiente señal inespecífica. En el caso de ProtA-GEB y ProtA/GEC, la inmovilización de los anticuerpos

ocurre a través de la proteína A, en el primer caso cuando se halla confinada en el volumen del biocompósito y, en el segundo, cuando se halla adsorbida en la superficie del transductor GEC. Los resultados comparativos de la Figura A demuestran que la proteína A orienta la región Fab de los anticuerpos hacia la unión con su analito. Además, la señal obtenida utilizando un material biocompósito es más alta respecto a utilizar un GEC modificado superficialmente con proteína A. Este hecho se puede atribuir al posible efecto negativo en la transferencia de los electrones en el caso de ProtA/GEC, ya que la modificación superficial por absorción genera una capa difusional en la superficie del transductor que afecta tanto la reacción inmunológica como la conducción electrónica.

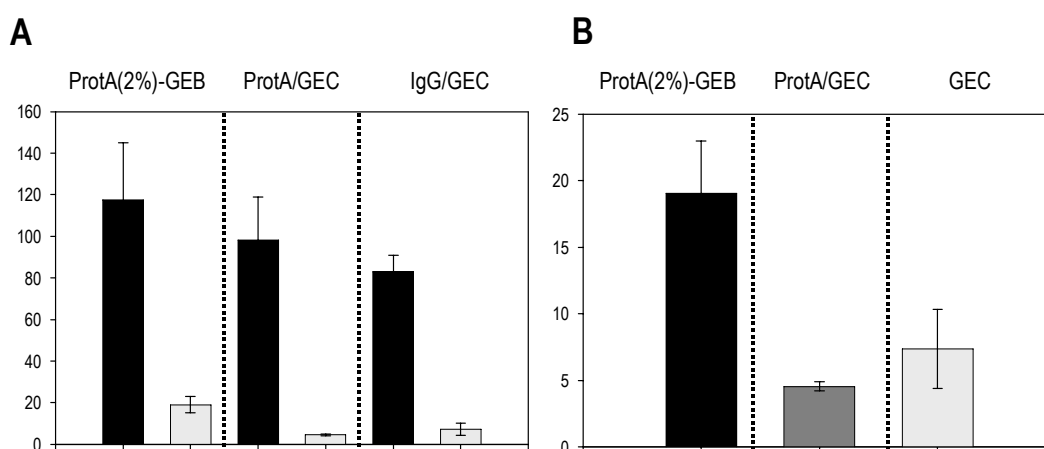


Figura 4.8: (A) Evaluación de las diferentes estrategias de inmovilización de anticuerpos en compositos GEC y biocompositos de proteína A: ProtA(2%)-GEB, ProtA/GEC e IgG/GEC. La adsorción inespecífica, obtenida sin IgG, se representa por las barras en gris. (B) Detalle del valor de la adsorción inespecífica del complejo anti-RlgG/HRP en los diferentes transductores: ProtA(2%)-GEB, ProtA/GEC y GEC respectivamente. Los detalles experimentales se describen en Zacco et al. (1).^[2] En todos los casos, n=3.

La Figura 4.8 (A) muestra también los resultados obtenidos en el caso de GEC directamente modificado por absorción con anticuerpos (IgG/GEC) (véase § 3.2.3). Los resultados demuestran las excelentes propiedades del material grafito-epoxi tanto en la inmovilización de biomoléculas como en sus propiedades electroquímicas. Por otro lado, la señal electroquímica resulta inferior que en el caso de la inmovilización mediada por la proteína A, ya que los anticuerpos están inmovilizados de manera aleatoria en la superficie de sensor y parte de ellos no están disponibles para el enlace con el antígeno.

La Figura 4.8 (B) muestra comparativamente la señal electroquímica generada por adsorción inespecífica del conjugado enzimático en las diferentes superficies. Los resultados confirman estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio que demostraron que la adsorción inespecífica sobre el material grafito-epoxi (GEC) es insignificante comparando con

la señal obtenida con el material biocompósito ProtA(2%)-GEB debido a la naturaleza hidrofóbica del material GEC. [8:9] Como se observa, la señal electroquímica en el caso de un sensor ProtA/GEC es inferior pese a que toda la superficie está modificada por una capa de proteína A, comparativamente al biocompósito ProtA-(2%)-GEB donde sólo el 2% de la superficie está modificada. Para mayores detalles experimentales, véase Zacco et al. (I). [2]

4.3.3 Biocompósito de anticuerpos de afinidad específica. Inmunocompósitos

El biocompósito Ab-GEC es, en realidad, un inmunocompósito, ya que los anticuerpos están directamente incluidos en la formulación del transductor electroquímico.

Como se ha descrito en Zacco et al. (IV) [4], se construyeron inmunocompósitos específicos para la atrazina (Ab-GEB).

La Figura 4.9 muestra la señal amperométrica obtenida para el sensor Ab-GEB a medida que se incrementa la concentración de conjugado enzimático atrazina-HRP. Los resultados demuestran que los anticuerpos están disponibles para el enlace con su antígeno y que la señal amperométrica aumenta a medida que se incrementa la concentración del antígeno, obteniéndose un *plateau* con 0.250 µg del trazador enzimático que indica la saturación de la superficie. La Figura 4.9 muestra, además, la adsorción inespecífica que, como en el caso de otros biocompósitos, es insignificante y se mantiene constante a lo largo de todas las concentraciones evaluadas.

A pesar de la utilidad de este material transductor, la elevada irreproducibilidad entre medidas evaluada a través de la desviación estándar, sugiere nuevamente la importancia de la orientación de la fracción Fab de los anticuerpos para la unión con el antígeno. En un inmunocompósito, los anticuerpos se encuentran distribuidos de manera aleatoria en la pasta conductora, y el inmunosensor descubre, después de cada pulido, una nueva superficie no lo suficientemente reproducible para un análisis cuantitativo fiable.

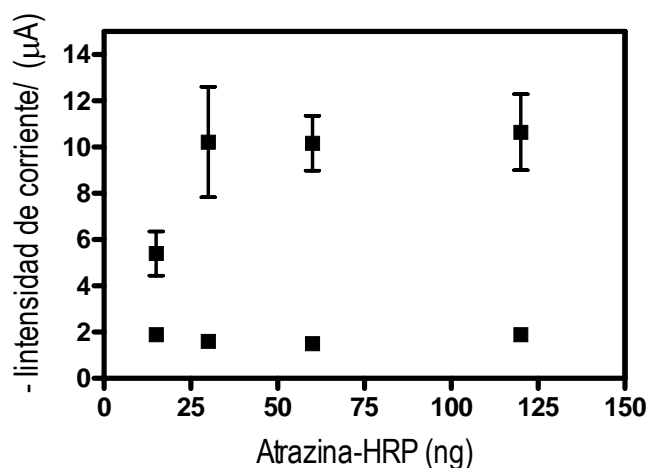


Figura 4.9: Evaluación de un inmunocompósito Ab(anti-atrazina1%)-GEB para el análisis de atrazina. Los biosensores fueron incubados con cantidades crecientes del conjugado atrazina-HRP (de 0 a 0.120 µg). Los puntos experimentales sin barra de error corresponden a mediciones con sensores GEC (con los que se evalúa la adsorción inespecífica). Los detalles experimentales se muestran en Zacco et al. (IV)^[4]. En todos los casos n=3.

4.4 ESTRATEGIA DE INMOVILIZACIÓN DE INMUNOESPECIES EN ESFERAS MAGNÉTICAS

Las esferas magnéticas han demostrado ser una poderosa y versátil estrategia para la bioseparación. Además, se han desarrollado numerosos tipos de esferas magnéticas capaces de inmovilizar biomoléculas de variada naturaleza.

Se evaluaron distintas estrategias de inmovilización de anticuerpos anti-atrazina en esferas magnéticas. Para tal fin, se utilizaron tres tipologías de esferas magnéticas, que difieren entre sí por tamaño y grupos químicos presentes en su superficie: MP-COOH, MB-Tosil y MB-ProtA. La inmovilización de los anticuerpos se basó en un enlace covalente en los dos primeros casos, o bien por la unión debida a la afinidad por la proteína A (§ 1.7.3.1).

Específicamente, en el caso de esferas magnéticas modificadas por grupos carboxilo (MP-COOH), la inmovilización se consiguió a través de un enlace amida y una activación previa con una carbodiimida soluble, mientras que en el caso de grupos tosil, la inmovilización no requiere un paso previo de activación y ocurre mediante un enlace directo entre los grupos amino de los anticuerpos y los grupos funcionales de las esferas magnéticas (véase § 3.3). En el caso de MB-ProtA, la unión se basa en el enlace por afinidad entre la región Fc de los anticuerpos y la proteína A que se encuentra inmovilizada en la superficie de las partículas.

Tabla 4.1: Comparación de las características técnicas y la eficacia de inmovilización de los anticuerpos anti-atrazina. 1 No pudo ser determinada. Los detalles experimentales están descritos en Zacco et al. (III).^[10]

Esferas magnéticas	Grupos químicos funcionales	Activación	Eficiencia de enlace (%)
MP-COOH	0,155 mmol/g	EDCI/NHS	39
MB-Tosil	0.1-0.2 mmol/g	No necesaria	92
MB-ProtA	Variable según la especie	No necesaria	N.D. ¹

La Tabla 4.1 muestra comparativamente las características de las partículas magnéticas y la eficacia obtenida para la inmovilización de los anticuerpos anti-atrazina. Dicha eficacia de inmovilización se obtuvo mediante el análisis del contenido proteico del sobrenadante antes y después de la etapa de inmovilización mediante el test de Bradford.^[11] Como puede observarse, la estrategia de inmovilización con la que mejores resultados se obtuvieron fueron con las partículas modificadas con grupos tosíl. Para mayores detalles experimentales véase § 3.3 y Zacco et al. (III).^[10]

4.5 DISEÑO DE BIOCENSORES INMUNOLÓGICOS ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN NUEVOS MATERIALES TRANSDUCTORES

4.5.1 Determinación de atrazina en muestras reales mediante biosensores electroquímicos

4.5.1.1 Inmunoensayo de atrazina basado en biocompuestos (ProtA-GEB y Av-GEB) e inmunocompuestos específicos

Después de comprobar la eficiencia de los nuevos materiales biocompuestos para llevar a cabo inmunoensayos con detección electroquímica, el trabajo se dirigió hacia la aplicación de estos materiales transductores en el análisis de muestras reales, tal como la detección del pesticida atrazina en diferentes matrices alimentarias.

En una primera instancia, los ensayos se llevaron a cabo con los distintos biocompuestos 'sin competencia' es decir, enfrentando los anticuerpos específicos anti-atrazina directamente con el conjugado atrazina-HRP.

La Figura 4.10 (A-D) muestra comparativamente los resultados obtenidos utilizando como electrodos de trabajo biocompuestos de proteína A (2-4%) y GEC para el control de la

adsorción inespecífica. Asimismo, se evaluaron diferentes estrategias de inmovilización de los anticuerpos específicos anti-atrazina en el biocompósito ProtA-GEB: *i*) en solución y agitación *ii*) por adsorción 'a la gota' en condiciones estáticas y hasta sequedad (véase § 3.2.5).

La Figura 4.10 (A) muestra los resultados obtenidos en el caso de utilizar una estrategia de inmovilización en solución y agitación. Los resultados (a, b, c) muestran claramente que los anticuerpos específicos anti-atrazina se inmovilizan y se orientan a través del enlace con la proteína A y no por una interacción inespecífica con la matriz polimérica del biocompósito. Además, la señal de la adsorción inespecífica es principalmente debida a la adsorción inespecífica del conjugado enzimático (d).

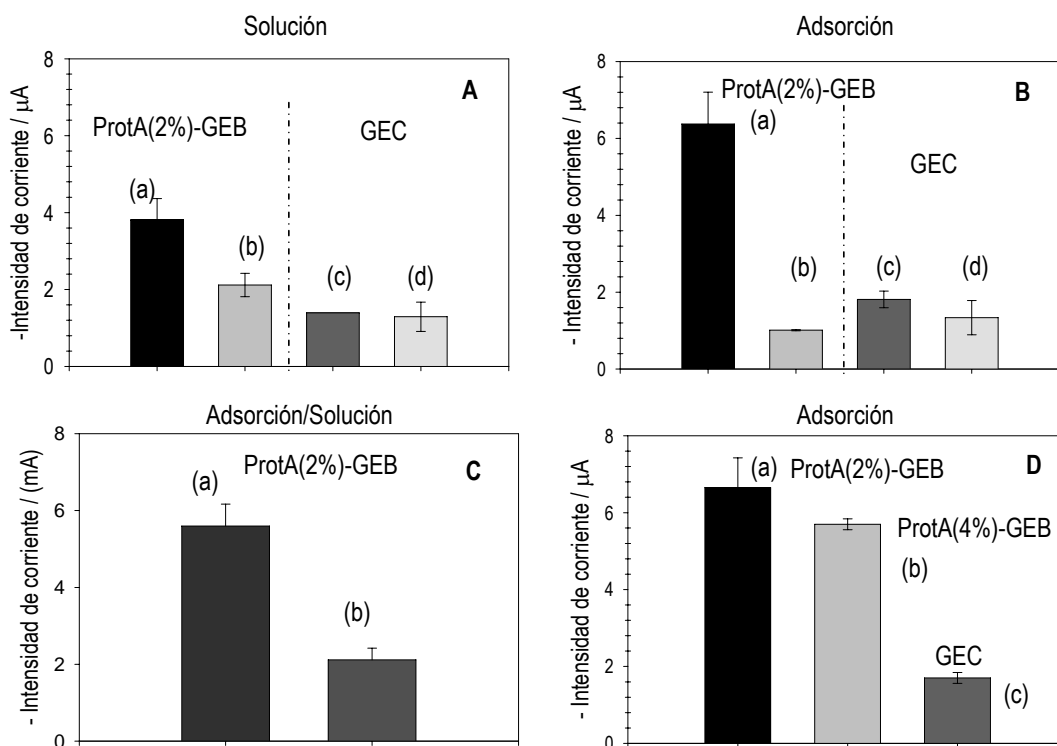


Figura 4.10: Evaluación de las distintas estrategias para la inmovilización de anticuerpos anti-atrazina en biocompuestos de proteína A. (A) Inmovilización en solución y agitación: biocompósito ProtA(2%)-GEB modificado con anticuerpos anti-atrazina (a) y anticuerpos preimmune (b); GEC modificado con anticuerpos anti-atrazina (c) y GEC modificado tan sólo con conjugado enzimático (d). (B) Inmovilización por adsorción a la gota en condiciones estáticas: biocompósito ProtA(2%)-GEB modificado con anticuerpos anti-atrazina (a) y anticuerpos preimmune (b); GEC modificado con anticuerpos anti-atrazina (c) y anticuerpos preimmune (d). (C) Señal neta de la inmovilización por adsorción a la gota en condiciones estáticas (a) vs la inmovilización en solución y agitación (b). (D) Inmovilización por adsorción a la gota en condiciones estáticas: biocompósito ProtA(2%)-GEB (a), ProtA(4%)-GEB (b) y GEC (c). En todos los casos, sea cual fuere la metodología de inmovilización del anticuerpo específico antiatrazina, se incubó posteriormente con el conjugado enzimático atrazina-HRP. Otros detalles experimentales se describen en Zacco et al. (IV).^[4] En todos los casos, $n=3$.

La Figura 4.10 (B) muestra los resultados obtenidos en el caso de utilizar una estrategia de inmovilización 'a la gota' en condiciones estáticas y hasta sequedad. En este caso, tanto el biocompósito protA-GEB como el sensor GEC se modificaron por una capa de anticuerpos específicos anti-atrazina (a y c) y mediante anticuerpos provenientes del suero preinmune (b y d) o sea, procedente de animales no inmunizados que no presentan por tanto el anticuerpo específico en el suero.

Como ya se explicó, en el caso de la inmovilización 'a la gota' en la superficie del sensor, se forma una capa de material biológico que actúa como una membrana difusional. La señal electroquímica que se obtiene es inferior que en el caso de los biocompósitos, excepto para el biocompósito ProtA-GEB modificado con el anticuerpo específico, ya que en este caso la señal se ve incrementada. Esta capa continua puede reducir la transferencia electrónica y la señal electroquímica, como ya se demostró también para otras biomoléculas (tales como el DNA) adsorbida en el transductor GEC. [5]

A pesar de esto, la inmovilización en seco y 'a la gota' de las inmunoespecies en la superficie del biocompósito de proteína A parece favorecer de manera notable tanto la inmovilización como la orientación de los anticuerpos respecto a una inmovilización en solución, si se comparan las señales de las Figura 4.10 [A y B (a)] y Figura 4.10 (C). La naturaleza de las fuerzas que regulan un enlace de tipo no covalente son tanto de naturaleza hidrofílica (puentes de hidrogeno, fuerzas electrostáticas y de Van der Waals) e hidrofóbica. En el caso de la proteína A, la unión de los anticuerpos parece basarse en un enlace de tipo no covalente mediado principalmente por fuerzas de naturaleza hidrofóbica, debido a que la exclusión del agua durante la inmovilización favorece claramente el enlace y estabiliza el complejo inmunológico puesto que la región Fc es de naturaleza esencialmente hidrofóbica.

El ensayo para la determinación de atrazina se llevó a cabo también a través biocompósitos de avidina (Av-GEB). En este caso la inmovilización de los anticuerpos se consigue a través la elevada afinidad ($K_a \sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$) entre de la avidina confinada en el material biocompósito y la biotina que modifica los anticuerpos específicos. Para este propósito, se biotinizaron los anticuerpos específicos anti-atrazina obteniéndose así un complejo anti-atrazina/biotina. Para mayores detalles experimentales véase Zacco et al. (IV).

[4]

Como para el caso de la proteína A, se quiso comparar el efecto de una inmovilización de los anticuerpos *i)* en solución y agitación y *ii)* 'a la gota' en un biocompósito de Avidina, Av-GEB (§ 4.3.1). La Figura 4.11 muestra que en este caso, y a diferencia de los biocompósitos de proteína A, la señal neta obtenida por los biocompósitos de avidina no parece estar

influenciada por la estrategia de inmovilización de los anticuerpos, probablemente debido a que las fuerzas de naturaleza hidrofóbicas no tienen un rol fundamental en la interacción avidina-biotina, o debido a la alta constante de afinidad del complejo, casi similar a la de un enlace covalente.

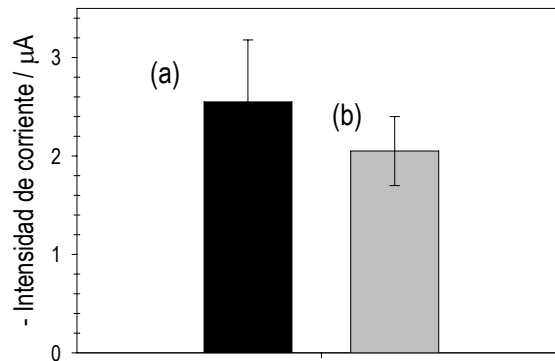


Figura 4.11: Estrategias de inmovilización de anticuerpos biotina/anti-atrazina en Av(1%)-GEB. Inmovilización de 0.14 µg, por absorción 'a la gota' hasta sequedad en condiciones estáticas (a) y en solución en agitación (b). Todos los sensores fueron modificados con atrazina-HRP (0.01 µg). Más detalles experimentales se describen en Zacco et al. (IV) ^[4]. En todo caso n=3

Además de las plataformas de afinidad universal (los biocompuestos ProtA-GEB y Av-GEB), también se evaluaron inmunocompuestos de afinidad específica anti-atrazina, tal como se describió en § 4.3.3.

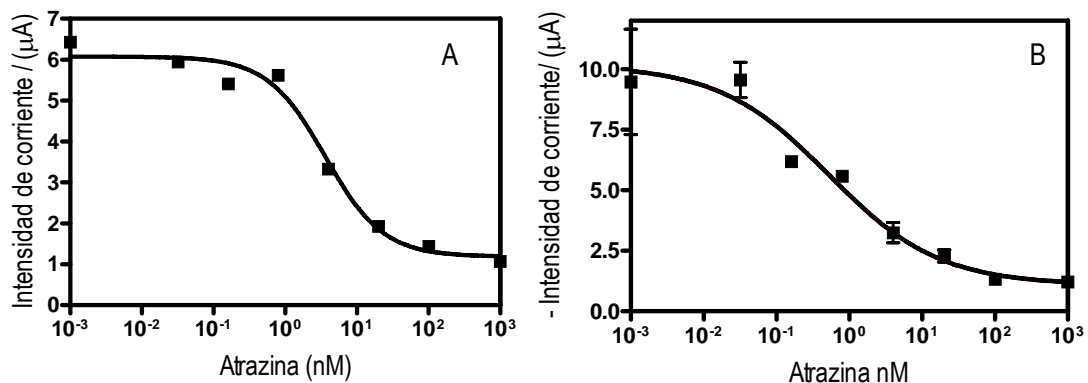


Figura 4.12: Ensayo competitivo para la determinación de la atrazina en buffer (A) y en zumo de naranja (B) basado en la adsorción en seco de anticuerpos en ProtA(2%)-GEB. Los biosensores fueron incubados con la atrazina y 0.02 µg de atrazina-HRP. Más detalles experimentales se describen en Zacco et al. (IV) ^[4]. En todo caso n=3.

El análisis cuantitativo de atrazina se basó en un ensayo inmunológico competitivo –tal como se explica en el apartado § 1.5.1.2–, y los biocompuestos ProtA-GEB. De todas las estrategias y materiales transductores, se escogió aquella que demostró tener mejores

resultados, es decir, la basada en biocompuestos ProtA-GEB por no requerir la biotilación previa de los anticuerpos específicos, y la adsorción 'a la gota', en condiciones estáticas y hasta sequedad, por la mayor eficiencia y estabilidad conseguida en la inmovilización. Para mayores detalles experimentales véase Zacco et al. (IV). [4]

La Figura 4.12 muestra los resultados del ensayo inmunológico competitivo en PBST (A) y en zumo de naranja filtrado y diluido cinco veces en PBST.

Los límites de detección para zumo de naranja fueron de 0.175 nM de acuerdo con los límites de detección requeridos por la Comunidad Europea tanto para aguas como para alimentos ($0.1 \mu\text{g L}^{-1}$). Como se explicará a continuación (§ 4.5.1.2), estos resultados son comparables con los valores que se obtuvieron en el ensayo inmunológico competitivo basado en esferas magnética y un magneto-sensor (m-GEC).

4.5.1.2 Inmunoensayo de atrazina basado en esferas magnéticas y en un magneto-sensor

En el caso del ensayo inmunológico para la atrazina basado en esferas magnéticas y en un magneto sensor electroquímico, se utilizaron las esferas magnéticas MP-COOH, MB-Tosil y MB-ProtA previamente descritas en el apartado § 3.3.

La figura 4.13 (A-B) muestra comparativamente las curvas de competición obtenidas (A) con el sistema magneto ELISA y detección óptica y (B) con el magneto sensor y detección electroquímica, para un rango de concentraciones de atrazina de entre 10^3 y 10^{-3} nM en PBST. En un ensayo competitivo, la señal resulta inversamente proporcional a la concentración del analito en la muestra. La Tabla 4.2 (A-B) resume los parámetros de las curvas ajustando los resultados a la Ecuación 3.2 descrita en el apartado § 3.4.5.

A pesar de ser diferentes estrategias de inmovilización de anticuerpos, los resultados obtenidos resultan comparables: *i*) para una detección óptica, IC_{50} entre 0.16 a $0.25 \mu\text{g L}^{-1}$ (véase § 3.4.6) y límites de detección (LOD) entre 6 y $20 \times 10^{-3} \mu\text{g L}^{-1}$, y *ii*) en el caso de la detección electroquímica, IC_{50} de 0.06 a $0.29 \mu\text{g L}^{-1}$ y LOD entre 4 y $6 \times 10^{-3} \mu\text{g L}^{-1}$. Para mayores detalles experimentales véase Zacco et al. (III). [10]

Aunque todas las estrategias evaluadas fueron satisfactorias, las esferas magnéticas modificadas con grupos tosil demostraron una mejor estabilidad a lo largo del tiempo.

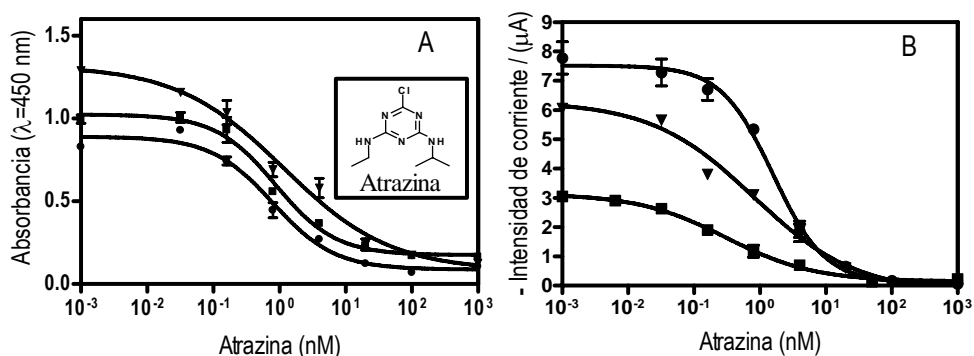


Figura 4.13: Ensayo competitivo para la determinación de atrazina en buffer PBST llevado a cabo con un sistema magneto-ELISA (A) y con el magneto-sensor con detección electroquímica (B) cada gráfica muestra las curvas de competición relativa a cada tipo de esfera magnética. (■) MP-COOH, (●) MB-Tosil, (▼) MB-ProtA. Los detalles experimentales están descritos en Zacco et al. (III).^[10] En todos los casos, $n=3$.

Tabla 4.2: Parámetros de la curva de inhibición obtenida en buffer PBST con Magneto-ELISA (A) y magneto sensor (B). Los resultados se refieren a todos los tipos de esferas magnéticas utilizadas.

A	$\mu\text{g MB}$	A_{max}	A_{min}	IC_{50} (nmol L^{-1}) ψ	Rango linear (nmol L^{-1})	LOD (nmol L^{-1}) ¥
MP-COOH	10	1.025	0.175	0.74 ± 0.39	0.23-4.08	0.11 ± 0.01
MB-ProtA	4	1.319	0.081	1.16 ± 0.38	0.11-1.59	0.04 ± 0.02
MB-tosil	2.5	0.890	0.087	0.80 ± 0.44	0.14-3.74	0.03 ± 0.02

ψIC_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$): MP-COOH= 0.16; MB-ProtA= 0.25; MB-tosil= 0.17

¥ LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$): MP-COOH= 20×10^{-3} ; MB-ProtA= 9×10^{-3} ; MB-tosil= 6×10^{-3}

B	$\mu\text{g MB}$	I_{max}	I_{min}	IC_{50} (nmol L^{-1}) ψ	Rango linear (nmol L^{-1})	LOD (nmol L^{-1}) ¥
MP-COOH	25	3.004	0.177	0.30 ± 0.01	0.04-2,87	0.02 ± 0.01
MB-ProtA	12	6.174	0.206	0.80 ± 0.40	0.38-5,43	0.03 ± 0.03
MB-tosil	10	7.152	0.110	1.34 ± 0.24	0.08-7.7	0.03 ± 0.07

ψIC_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$): MP-COOH = 0.06; MB-ProtA=0.17; MB-tosil= 0.29

¥ LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$): MP-COOH = 4×10^{-3} ; MB-ProtA= 6×10^{-3} ; MB-tosil= 6×10^{-3}

Como para el caso de los biosensores basados en biocompuestos de proteína A (véase § 4.5.1.1), con el objetivo de verificar el rendimiento del ensayo competitivo en muestras reales, pero esta vez basado en esferas magnéticas y en magneto-sensores, se evaluó tanto agua de consumo como zumo de naranja.

La Figura 4.14 muestra los resultados obtenidos para la detección electroquímica para agua embotellada comercial (A) y zumo en brick (B) y las correspondientes curvas obtenidas en PBST.

En el caso del agua embotellada no se observó efecto matriz, al superponerse casi perfectamente las dos curvas de competición y, por tanto, no hubo necesidad de ningún tipo de tratamiento previo de la muestra. Idénticos resultados se obtuvieron con la estrategia de detección óptica (resultados no mostrados). En el caso del zumo de naranja, estudios previos demostraron una disminución de la señal tanto en el magneto-ELISA como en la estrategia basada en esferas magnéticas y en el magneto-sensor. Así, se elaboró un tratamiento de la muestra para minimizar el efecto matriz, consistente en ajustar el pH a 7.5 (el pH original era de 3.5), filtrar la muestra con un filtro de 0.2 μm y finalmente diluirla 5 veces en PBST.

Tal como muestra la Figura 4.14 (B), de este modo se consiguió eliminar completamente las interferencias y llevar a cabo análisis cuantitativo. Los límites de detección conseguidos fueron de $25 \times 10^{-3} \mu\text{g L}^{-1}$, inferior a los $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ permitidos por la legislación Europea.

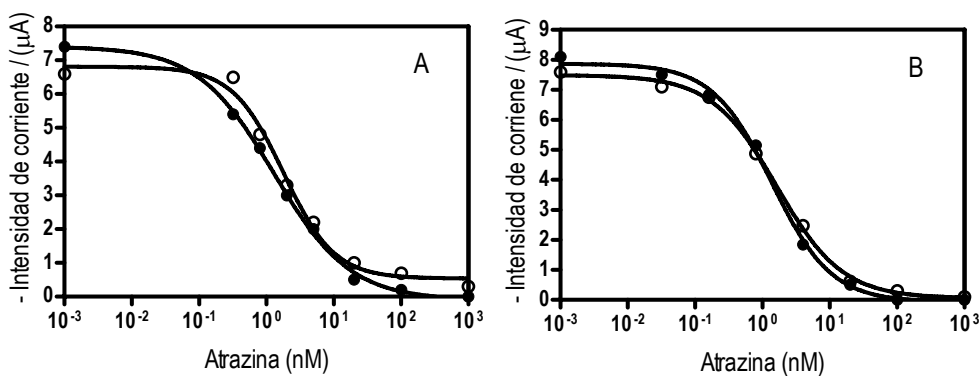


Figura 4.14: Curvas de inhibición, obtenidas con esferas magnéticas y detección electroquímica basada en el magneto-sensor, de muestras reales: A) agua y B) zumo de naranja. En cada gráfica se muestra simultáneamente la curva de inhibición obtenida en PBST (●) y la que se refiere a la muestra (○). Los detalles experimentales están descritos en Zacco et al. (III).^[10] En todo caso $n=3$

A pesar de una ligera sobrestimación, tal como se muestra en la Tabla 4.3, respecto a los valores de las muestras dopadas con atrazina, el protocolo analítico desarrollado permite análisis cuantitativos de muestras reales con unos excelentes límites de detección.

Tabla 4.3: Ensayos de recuperación de atrazina en PBST y zumo de naranja obtenido con MB-Tosil y una estrategia de detección electroquímica.

Buffer PBST			Zum de naranja		
Concentración (nmol L ⁻¹)	Recuperación (nmol L ⁻¹)	Recuperación (%)	Concentración (nmol L ⁻¹)	Recuperación (nmol L ⁻¹)	Recuperación (%)
0.5	0.79	159.2	0	1.48	—
1	1.59	159.4	10	16.12	161
2	2.36	118.3	20	27.98	139.9
4	4.25	106.45	50	58.66	117.32

4.5.2 Determinación de sulfonamidas en muestras reales mediante biosensores electroquímicos

Debido a los resultados obtenidos previamente para otros analitos como la atrazina, el inmunoensayo de sulfonamidas en leche se llevó a cabo con esferas magnéticas modificadas con el grupo tosil pero con anticuerpos específicos de clase anti-sulfonamidas, basándose en la estrategia electroquímica del magneto-sensor. Se eligieron estas partículas debido a que resultaron ser las más estables a lo largo del tiempo y demostraron tener una mejor relación señal/ruido. Después de estudios previos en PBST, se llevaron a cabo análisis en leche UHT reconstituida y leche fresca entera [véase, anexo (I) para los detalles experimentales].^[12]

La Figura 4.15 (A-C) muestra los resultados obtenidos para la cuantificación de sulfonamidas con un magneto-sensor y detección electroquímica, en leche UHT reconstituida (desnatada, semi desnatada y entera) -sin ningún tratamiento previo de la muestra- comparada con las curvas en PBST. A lo largo de todos los experimentos (dos meses) la señal amperométrica se mantuvo constante ($\sim 3 \mu\text{A}$) con una excelente relación señal/ruido. Como muestra la Figura 4.15 (C), sólo la leche entera demostró un leve efecto matriz a niveles elevados de antibióticos.

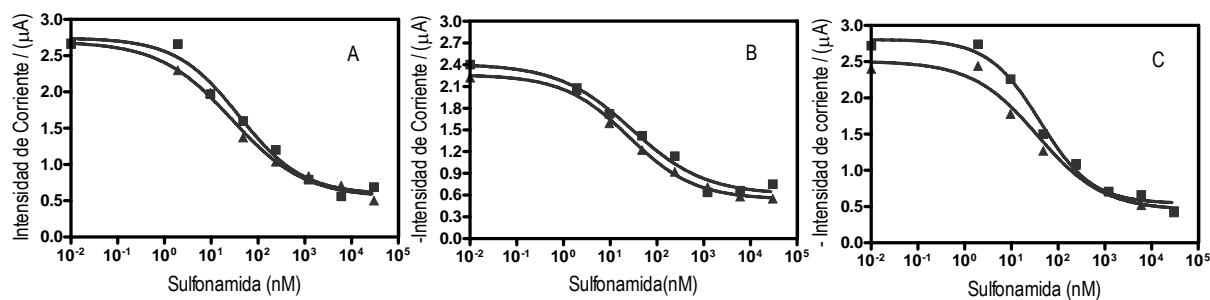


Figura 4.15: Ensayo competitivo de sulfonamidas obtenido con detección electroquímica en leche UHT desnatada (A), semi-desnatada (B) y entera (C). En cada grafica muestra la curva de inhibición obtenida en PBST (■) y la que se refiere a la muestra (▲). Los detalles experimentales están descritos en el anexo (I)^[12]. En todos los casos, $n=3$.

La Figura 4.16 (A-B) muestra los resultados para leche fresca entera diluida obtenidos comparativamente con la estrategia basada en partículas magnéticas y magneto-sensores electroquímicos (A) y el magneto ELISA con medidas ópticas (B), respectivamente. Bajo las mismas condiciones experimentales, se obtuvieron resultados excelentes y comparables (IC_{50} $9.8 \mu\text{g/L}^{-1}$ y LOD de $0.36 \mu\text{g/L}^{-1}$ obtenidos de la Figura 4.16 (A) para la estrategia basada en partículas magnéticas y magneto sensores electroquímicos e IC_{50} de $6.37 \mu\text{g/L}^{-1}$ y LOD de $0.23 \mu\text{g/L}^{-1}$ obtenidos de la Figura 4.16 (B) para la estrategia basada en el magneto ELISA con medidas ópticas. Aunque se observa una mayor variabilidad entre medidas para el caso la estrategia con detección óptica, los resultados demuestran que en ambos casos se pueden detectar cantidades de sulfonamidas muy por debajo de los límites permitidos por la Comunidad Económica Europea ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$ / ppb) en todo tipo de leche, como establecen las directivas. Para mayores detalles experimentales véase anexo (I). [12]

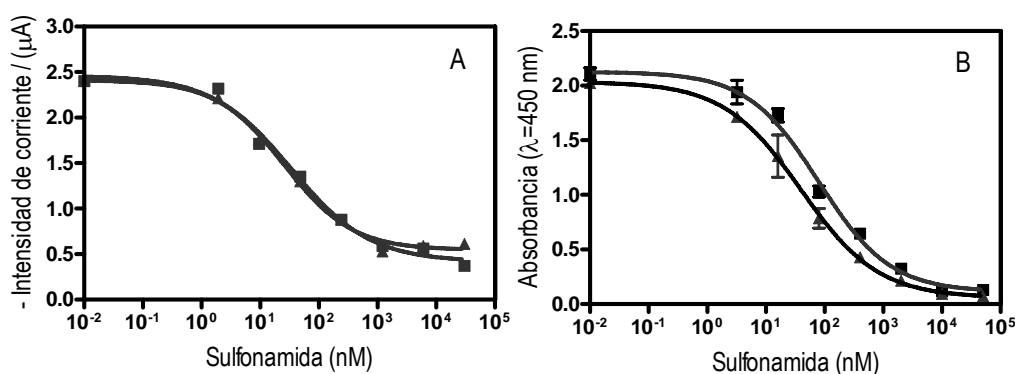


Figura 4.16: Ensayo competitivo de sulfonamidas en leche obtenidos con detección electroquímica (A) y óptica (B). En cada gráfica se muestra la curva de inhibición obtenida en PBST (■) y la que se refiere a la muestra diluida 1:4 en PBST (▲). Los detalles experimentales están descritos en el Anexo (I) [12]. En todos los casos, $n=3$.

Tabla 4.4: Recuperación de sulfonamidas en leche fresca entera diluida 1:4 basadas en un ensayo electroquímico con MB-tosil. Los detalles experimentales se describen en el anexo (I). [12]

<i>Leche entera diluida 1:4 en PBST</i>		
<i>Concentración (nmol L⁻¹)</i>	<i>Recuperación (nmol L⁻¹)</i>	<i>Recuperación (%)</i>
0	0.164	----
2000	2424	121.2
800	848	106
400	584	146

La Tabla 4.4 muestra el resultado de los ensayos de recuperación para 4 muestras de leche entera diluida. A pesar de una ligera sobreestimación de los resultados, los valores encontrados son muy cercanos a la cantidad añadida de sulfonamida.

4.6 DISEÑO DE NUEVOS *PRIMERS* PARA LA AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA DE SECUENCIAS DE *ECHERICHIA COLI* PATÓGENA

El diseño de los *primers* para un ensayo de RT-PCR representa la etapa clave para el buen funcionamiento de la reacción. Después de la selección de la secuencia del fragmento del gen *eaeA* de *E. coli* patógena de 469 pb (§ 3.7.3), a partir de la misma se encargó el diseño de *primers* a dos casas comerciales: Invitrogen y Applied Biosystems, con el fin de obtener el mejor rendimiento y especificidad en la RT-PCR.

La Figura 4.17 muestra la posición de los *primers* y de la sonda interna en el caso de utilizarse la estrategia Taqman de Applied Biosystems, mientras que la Figura 4.18 muestra la posición de los *primers* para el caso de una amplificación que se basa en la estrategia D-Lux™ recomendada por Invitrogen. Ambas estrategias de amplificación se encuentran descritas en § 1.6.2.

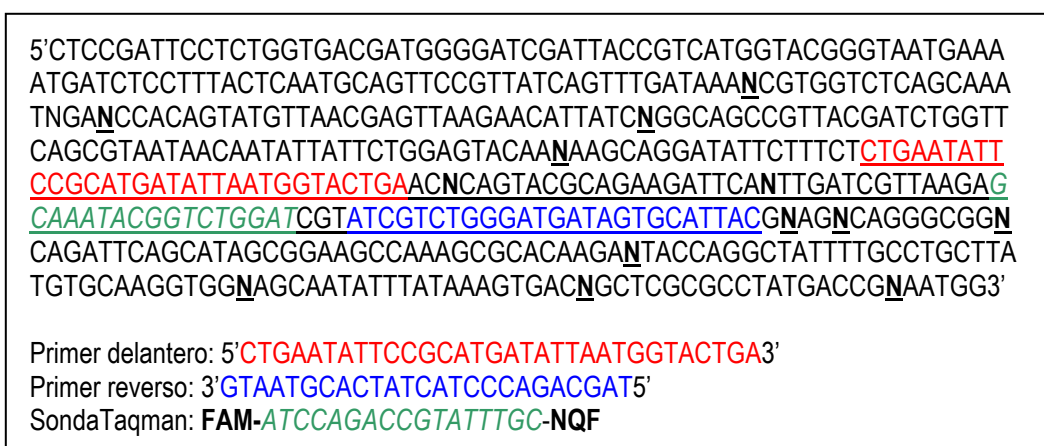


Figura 4.17: Posición de los *primers* en la estrategia Taqman en el fragmento de 469 pb del gen *eaeA*. En color rojo se representa el primer delantero, el color azul el primer reverso y en verde la sonda. Para la sonda, el marcador fluorescente es FAM (excitación 492 nm-emisión 515 nm), siendo NQF la molécula apagadora.

Las bases indicadas con la letra “N” (Figura 4.17) representan bases que han mostrado una elevada variabilidad entre las secuencias analizadas y que por lo tanto se intenta evitar en el diseño de los *primers*. En el caso de la estrategia Taqman, el fragmento que se pretende amplificar durante la reacción de RT-PCR (amplicon) es de 112 pb:

5'CTGAATATTCCGCATGATATTAATGGTACTGAACNCAGTACGCAGAAGATTCANTTGAT
CGTTAAGAGCAAATACGGTCTGGATCGTATCGTCTGGGATGATAGTGCATTAC3'.

La Figura 4.18 muestra la posición de los *primers* en el caso de la estrategia Lux.



Figura 4.18: Posición de los *primers* en la estrategia Lux en el fragmento de 469 pb del gen *eaeA*. El color rojo representa el primer delantero que se encuentra en forma de horquilla en solución § 1.6.1, el color azul el primer reverso. En este caso, FAM también es el marcador fluorescente.

En este caso, para un adecuado diseño de los *primers* no se pudieron evitar las bases "N" de alta variabilidad, si no que se eligió para cada posición la base nitrogenada que con más frecuencia se encuentra en esa posición. En el caso de la estrategia Lux, el fragmento que se pretende amplificar durante la reacción de RT-PCR (amplicon) es de 61 pb:

5'TCTCCTTTACTCAATGCAGTTCGTTATCAGTTTGATAAATCGTGGTCTCAGCAAATCG
AG3

Como puede observarse, los dos amplicones difieren tanto en longitud como en posición dentro del fragmento del gen *eaeA*. Además, mientras en la estrategia Lux se obtiene un producto que incluye en su estructura la molécula fluorescente (§ 1.6.2, Figura 1.14), en el caso de la estrategia Taqman (§ 1.6.2, Figura 1.11) la actividad exonucleasa 5'→3' de la Taq DNA Polimerasa en su avance para generar el producto de la amplificación degrada la sonda, liberando la molécula fluorescente al buffer de reacción.

4.6.1 Cálculo de la eficiencia de la amplificación

4.6.1.1 Análisis de las curvas de amplificación del gen *eaeA* de *E. coli*

Para cada DNA bacteriano (véase Tabla 4.6) extraído como se describió en § 3.7.5, se evaluó la capacidad de ambos tipos de *primer* para amplificar el gen seleccionado, así como

la eficiencia de la reacción de RT-PCR, calculada como se explica en § 1.6.3 [13] La composición del buffer de reacción y de los protocolos de amplificación se describen en § 3.7.5.2.

La Figura 4.19 (A-B) muestra las curvas de amplificación para diluciones seriadas de DNA de *Escherichia coli* EPEC O111:NM (véase Tabla 4.6). En la abscisa se observan los números de ciclos y en la ordenada el correspondiente valor de fluorescencia generada por amplificación del DNA y obtenida con la estrategia Lux (A) y Taqman (B), respectivamente.

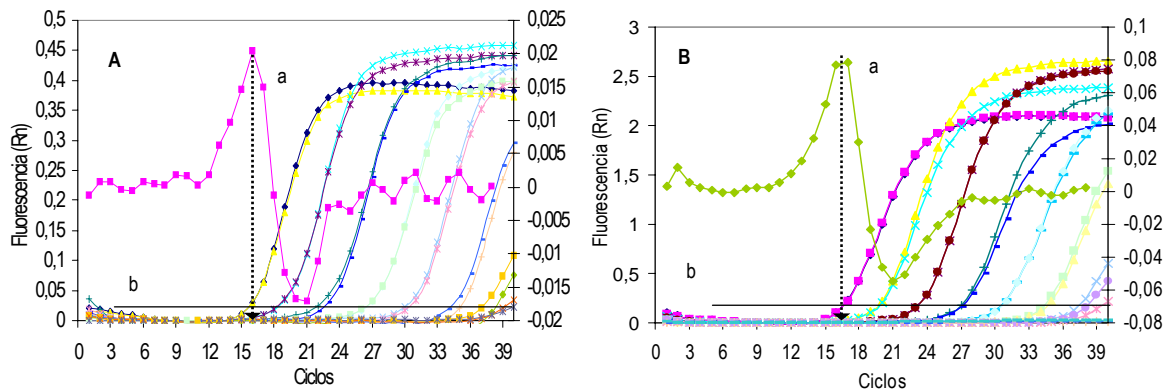


Figura 4.19: Curvas de amplificación de *E. coli* EPEC O111:NM obtenidas con las estrategias Lux (A) y Taqman (B). La curva (a) muestra la derivada segunda de la curva de amplificación a la primera concentración mostrada ($4.5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), y el valor de la abscisa del máximo se corresponde con la el valor de C_t característico a esa concentración. Asimismo, se grafica también la línea del umbral o threshold (b). Para cada dilución $n=3$.

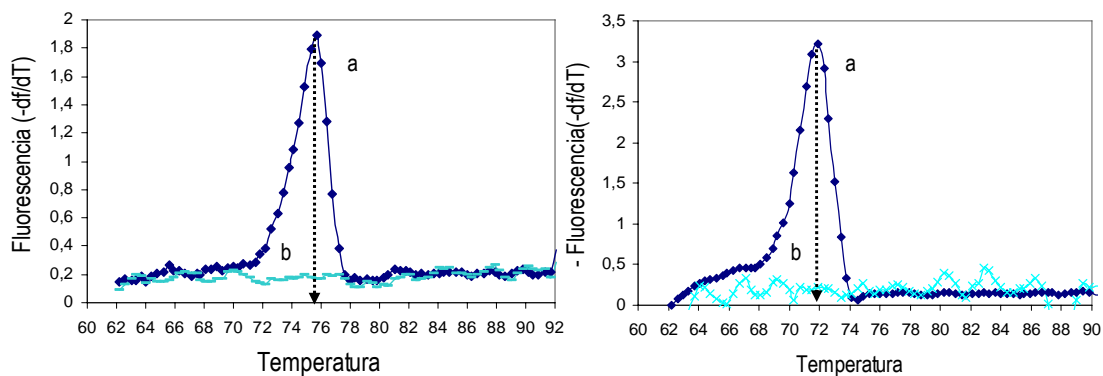


Figura 4.20: Curva de disociación del fragmento de *E. coli* EPEC O111:NM generado por RT-PCR para la estrategia Lux (A) y Taqman (B). En ordenada la derivada de la intensidad de fluorescencia ($-df/dT$) y en abscisa la temperatura. El valor de la abscisa que se corresponde al máximo de la curva (a) indica la T_m (temperatura de melting). La curva (b) es el control negativo sin la presencia de DNA.

La Figura 4.20 muestra los perfiles de disociación térmica de los productos obtenidos mediante ambas estrategias. En el caso de la amplificación por Taqman, para evidenciarla se agregó el marcador intercalante Syber Green una molécula fluorescente con capacidad de intercalarse de forma inespecífica en estructuras de doble hélice. Los perfiles térmicos son característicos de la secuencia y de la longitud del amplicón, y en los que se observan en la Figura 4.20, coinciden con los previstos.

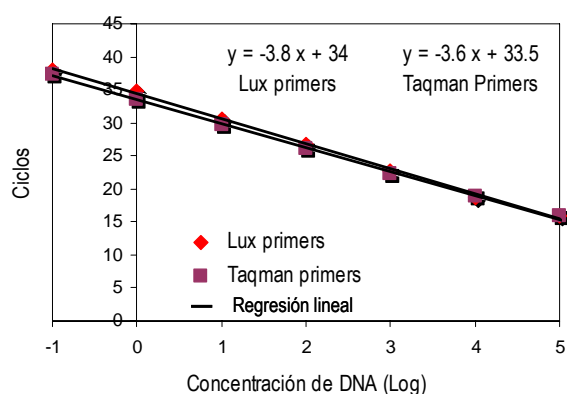


Figura 4.21: Gráfica semi-logarítmica de la concentración de DNA respecto a los valores C_t obtenidos para la amplificación de *E. coli* EPEC O111:NM. Cada punto representa la media de los valores de C_t obtenidos para réplicas de cada concentración. $n=3$.

En base a la ecuación 1.6 descrita en § 1.6.3, la eficiencia de la reacción de PCR se calcula mediante la pendiente de la recta obtenida graficando los valores C_t (threshold cycles), para cada concentración de DNA, respecto al logaritmo de la concentración. La Figura 4.21 y la Tabla 4.5 muestran los resultados obtenidos en el caso de la amplificación de *E. coli* EPEC O111:NM.

Como se puede observar, tanto la eficiencia (del orden de 83-88 %), como los límites de detección (90 fg) son comparables para ambas estrategias.

Tabla 4.5: Eficiencia (E) de la reacción de PCR para Lux y Taqman probe para *E. coli* EPEC O111:NM.

Eficiencia	pendiente	b	(-1/pendiente)	E	E (%)
Taqman	-3,62	33,48	0,28	1,89	88,90
Lux	-3,8	34,43	0,26	1,83	83,30

El mismo análisis se llevó a cabo para todas las muestra de DNA. La Tabla 4.6 muestra comparativamente la eficiencia de la reacción para Taqman y Lux. Los resultados obtenidos son, en todos los casos, similares. Sin embargo, los resultados para DNA inespecífico procedente de *E. coli* no patógena (controles negativos) no se amplificaron por ninguna de las dos estrategias. También es importante destacar que dos cepas de *E. coli* patógenas (*E. coli* O128:H47 y *E. coli* O137:H41) no se consiguieron amplificar por ninguna de las dos estrategias de forma eficiente.

Tabla 4.6: Comparación de la eficiencia de reacción de amplificación para Taqman y Lux para las distintas cepas bacterianas estudiadas.

Cepas			Eficiencia	
Patogéna			Taqman	Lumix
<i>Escherichia coli</i>	O157:H7	96A13466	81,3	81,86
	O157:H7	EDL933	67,77	74,28
	O157:H7	20779	52,46	52,46
	O157:H7	SEA 13B88	69,78	80,74
	O137:H41	88A5333	X	X
	O157:H7	G5858683	91,82	104,43
	O128:H47	13E	X	X
	O157:Neg	1292W	70,4	105,82
	O29:NM		69,69	49,66
	O25:NM	E2539	98,03	103,76
	O111:NM		88,9	83,29
No patogéna				
<i>Escherichia coli</i>	O137:H41	MW421	X	X
	O?:H8,23,41	MW424	X	X
	O13	MW416	X	X
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	3937		X	X

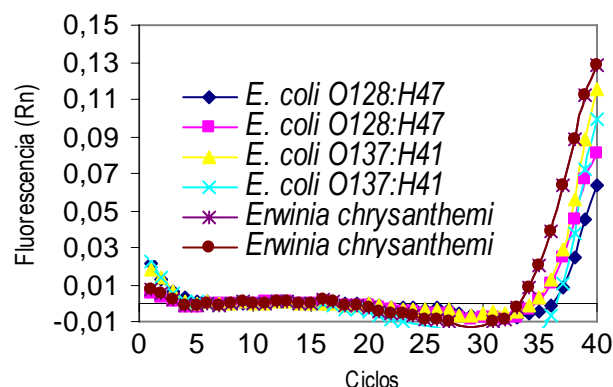


Figura 4.22: Curvas de amplificación de *E. coli* 128:H4, *E. coli* O137:H41 y *Erwinia chrysanthemi* con la estrategia Lux. $n=2$

Como se puede observar, en este caso, concentraciones elevadas de DNA generan una señal pero a ciclos elevados de amplificación.

Aunque no se haya observado una amplificación específica del gen *eaeA* para *E. coli* O128:H47 y O137:H41 y *Erwinia chrysanthemi*, la Figura 4.22 muestra los resultados de la amplificación de DNA a concentración de $10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ obtenidas por amplificación con la estrategia Lux.

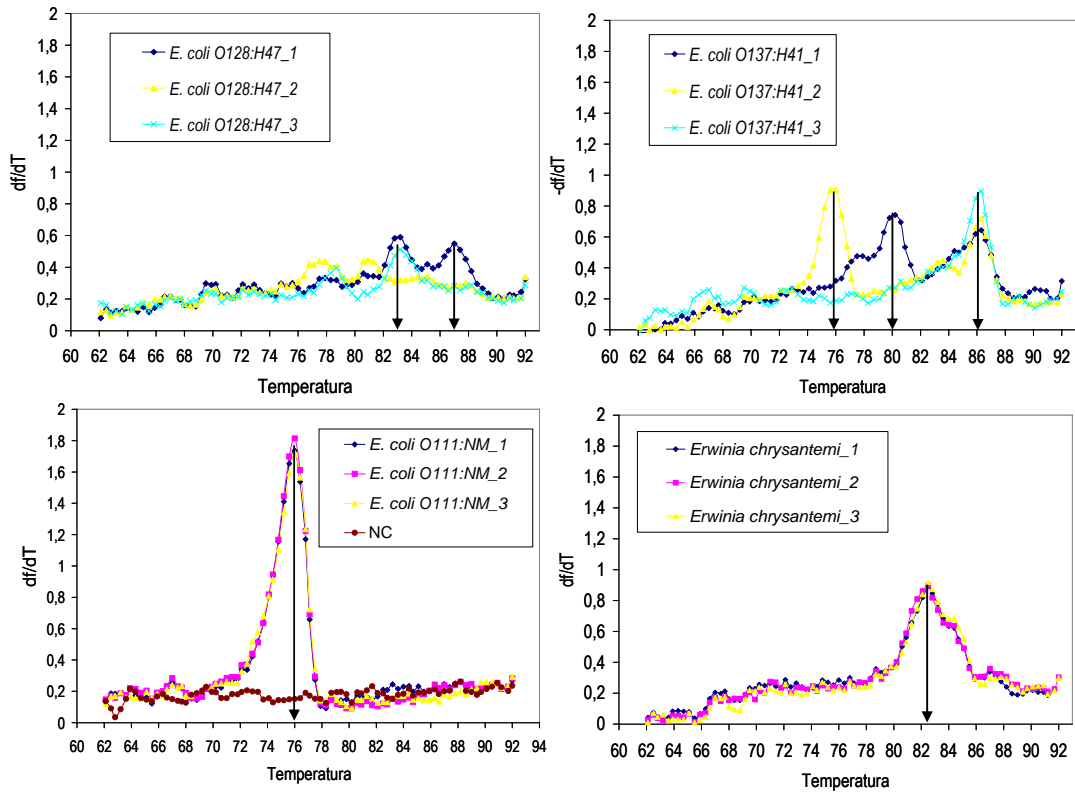


Figura 4.23: Curvas de disociación de *E. coli*: O148:H47(A), O137:H41(B), O111:NM (C) y *Erwinia chrysanthemi* (D). Para cada cepa $n=3$.

Además como muestran las curvas de disociación de la Figura 4.23 (A-C), los fragmentos amplificados no son específicos, ya que muestran temperaturas de melting diferentes respecto al fragmento específico [Figura 4.23 (C)]. Al mismo tiempo, en la Figura 4.23 (A-B) se evidencia como diferentes réplicas de la misma muestra (*E. coli* O128:H47 y *E. coli* O137:H41) no producen la amplificación del mismo fragmento, confirmando que la reacción, en este caso, no es específica.

4.7 BIBLIOGRAFIA

1. Alegret S. Rigid carbon-polymer biocomposites for electrochemical sensing. A review. *Analyst*. 1996, 121:1751-8.
2. Zacco E., Pividori M.I., Llopis X., del Valle M., Alegret S. Renewable protein A modified graphite-epoxy composite for electrochemical immunosensing. *Journal of Immunological Methods*. 2004, 286:35-46.
3. Zacco E., Pividori M.I., Alegret S. Electrochemical biosensing based on universal affinity biocomposite platforms. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006, 21:1291-301.
4. Zacco E., Marco M.-P., Galve R., Alegret S., Pividori M.I. Electrochemical biosensing of pesticides residues based on affinity biocomposite platforms. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006. en prensa.
5. Pividori M.I., Merkoçi A., Alegret S. Graphite-epoxy composites as a new transducing material for electrochemical genosensing. *Biosensors and Bioelectronics*. 2003, 19:473-84.
6. Céspedes F., Martínez-Fàbregas E., Alegret S. New materials for electrochemical sensing I. Rigid conducting composites. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1996, 15:296-304.
7. Alegret S., Céspedes F., Martínez-Fàbregas E. et al. Carbon-polymer biocomposites for amperometric sensing. *Biosensors and Bioelectronics*. 1996, 11:35-44.
8. Pividori M.I., Merkoçi A., Alegret S. Graphite-epoxy composites as a new transducing material for electrochemical genosensing. *Biosensors and bioelectronics*. 2003, 473-84.
9. Pividori M.I., Alegret S. Graphite-Epoxy Platforms for Electrochemical Genosensing. *Analytical Letters*. 2003, 36:1669-95.
10. Zacco E., Pividori M.I., Alegret S. Electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of pesticides residues. *Analytical Chemistry*. 2006, 78:1780-8.
11. Bradford M. *Anal Biochem*. 1976, 72:248-54.
12. Zacco E., Galve R., Adrian J., Marco M.-P., Alegret S., Pividori M.I. Electrochemical magneto immunosensing of antibiotic residues in milk. *Biosensors and Bioelectronics*. En prensa.
13. Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson M. et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006, 27:95-125.

4 RESUMEN Y CONCLUSIONES GENERALES. PERSPECTIVAS FUTURAS

La creciente demanda de metodologías analíticas simples, selectivas y de bajo coste para el análisis cuantitativo o semicuantitativo de analitos de variada naturaleza en muestras complejas ha favorecido el desarrollo de alternativas analíticas a los métodos clásicos de análisis que usan instrumentación convencional, tal como la cromatografía o la espectroscopía. En este contexto, en la presente tesis se ha planteado como objetivo la construcción de biosensores robustos y económicos y cuya utilización no requiera supervisión profesional, para la detección descentralizada y fiable de compuestos de interés en la seguridad alimentaria y en el control medioambiental.

Debido a la experiencia de nuestro grupo de trabajo y a las demostradas ventajas del material grafito-epoxi (GEC) como transductor electroquímico, se dirigieron los esfuerzos hacia la construcción de nuevos transductores basados en compósitos rígidos grafito-epoxi. Así, se abordaron dos líneas distintas de investigación: la primera, dirigida hacia la construcción de transductores biocompósitos grafito-epoxi (GEB) modificados en volumen con biomoléculas de afinidad universal, para la inmovilización de enzimas, anticuerpos, u oligonucleótidos y, la segunda, en el desarrollo de nuevos protocolos para la detección electroquímica de biomoléculas inmovilizadas en partículas magnéticas, mediante el diseño de un sensor con propiedades magnéticas, m-GEC.

A. Abordando el primer eje de esta tesis, se estudiaron diferentes moléculas de afinidad universal para la preparación de biocompósitos, tales como la proteína A y la proteína G (para la inmovilización de anticuerpos de diferentes especificidades a través del Fc) y la estrept(avidina), para la inmovilización de prácticamente cualquier analito biotinilado, sea este enzimas, oligonucleótidos o anticuerpos. Así, se construyeron exitosamente

biocompuestos de avidina (Av-GEB) capaces de inmovilizar con una excelente orientación, oligonucleótidos, enzimas y anticuerpos. En particular, se consiguieron diseñar, basados en estas plataformas electroquímicas de afinidad universal Av-GEB, biosensores enzimáticos para la detección de glucosa y de peróxido, biosensores de DNA para la detección de SNPs del gen *mecA* relacionado con cepas de *S. aureus* resistentes a la metilina, así como inmunosensores para la inmovilización de anticuerpos. Del mismo modo se diseñaron y construyeron plataformas universales para la inmovilización de anticuerpos basados en biocompuestos grafito-epoxi de proteína A (ProtA-GEB). Usando esta plataforma se consiguieron inmovilizar anticuerpos de las más variada naturaleza a través de su fracción constante para la detección de diferentes analitos como, por ejemplo, atrazina en zumo de naranja o en aguas embotelladas, alcanzando límites de detección por debajo del límite de $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ fijado por la Unión Europea.

Además de estas plataformas electroquímicas de afinidad universal, se construyeron con éxito inmunocompuestos grafito-epoxi de afinidad específica (Ab-GEB), en concreto inmunocompuestos anti-atrazina para la determinación de este analito en muestras reales con una alta sensibilidad. La principal ventaja de estas plataformas respecto a las anteriores es que no requieren un paso de modificación con el anticuerpo específico, debido a que el mismo ya se encuentra incluido en el transductor. Sin embargo, esta ventaja va en detrimento de la orientación de los anticuerpos y de la reproducibilidad de los ensayos.

La principal ventaja de estos materiales biocompuestos es que el mismo transductor actúa como reservorio de las biomoléculas, permitiendo una renovación muy sencilla de la superficie del biosensor y solventando uno de los principales problemas reportados en los biosensores: la estabilidad del elemento de biorreconocimiento en el transductor y la renovación del material biológico. Además, estos materiales basados en compósitos grafito epoxi demostraron tener unas propiedades adsorptivas diferenciales en función de cómo se realice la adsorción. En condiciones de agitación y en presencia de agua, la adsorción es prácticamente nula, una ventaja que permite el desarrollo de protocolos sin necesidad de utilizar pasos de bloqueo de la superficie del transductor, controlando la adsorción inespecífica. Sin embargo, la adsorción en seco y a la gota en condiciones estáticas es prácticamente irreversible, permitiendo obtener capas compactas y bioactivas de material biológico en la superficie del transductor GEC de una manera simple, económica y fácil de automatizar. Mediante esta estrategia, se demostró además que los anticuerpos quedan más firmemente unidos y orientados en el biocompuesto ProtA-GEB, ya que en estas condiciones, al excluir el agua, parecen favorecerse las interacciones hidrofóbicas.

Aunque todos los materiales biocompuestos desarrollados (Av-GEB, ProtA-GEB, Ab-GEB) demostraron su utilidad en el desarrollo de biosensores electroquímicos para la detección de inmunoespecies, se comprobó que la mejor estrategia de inmovilización de anticuerpos es a través del biocompuesto de proteína A. Los prototipos desarrollados basados en esta plataforma de afinidad inmunológica aportan numerosas ventajas frente a los métodos tradicionales de análisis de muestras alimentarias o medioambientales: cortos tiempos de análisis, muy simples pretratamientos de las muestras y posibilidad de miniaturización para la construcción de dispositivos portátiles para el análisis descentralizado. Además, y debido a sus propiedades mecánicas y químicas, una de las principales ventajas que posee este material es la versatilidad tanto en su construcción a través de procedimientos de química seca como en la modificación, con lo cual el mismo sensor puede servir para la inmovilización de diferentes anticuerpos.

Por último, la fabricación de estos materiales es compatible con la miniaturización y construcción masiva que abre posibilidades para el desarrollo de *biokits* y análisis de campo. Se espera utilizar este tipo de material para fabricar biosensores con procedimientos planares de fabricación masiva, lo que aumentaría más sus perspectivas comerciales. Además, los biosensores pueden medirse satisfactoriamente con equipamiento amperométrico portátil. La autonomía de la fuente de alimentación, su escaso peso y dimensiones reducidas posibilitan el uso de los biosensores para medidas de campo. Este tipo de equipo permite la conexión en paralelo de varios de ellos (los que se quiera) para el control simultáneo de numerosos electrodos de manera independiente, utilizándose la misma celda. Así, se podría en un futuro construir arreglos de biosensores multiparamétricos.

B. Resultados muy prometedores se han obtenido también con el segundo eje de la presente tesis, mediante ensayos llevados a cabo con un nuevo sensor magnético basado en compuesto grafito-epoxi (m-GEC) y esferas magnéticas modificadas con bioespecies. Las partículas magnéticas representan una nueva estrategia para bioanálisis que aportan numerosas ventajas adicionales. Además de una elevada superficie de reacción, las mismas se pueden manipular muy fácilmente y separar a través la aplicación de un campo magnético externo, consiguiéndose así eficaces etapas de lavado fundamentales para la eliminación del efecto matriz de una muestra compleja.

Después de un estudio exhaustivo de la inmovilización de biomoléculas sobre diferentes tipologías de esferas magnéticas funcionalizadas por diferentes grupos químicos (tosil y carboxilo) o moléculas biológicas (proteína A), se consiguió inmovilizar con éxito anticuerpos para la determinación de una familia de antibióticos (sulfonamidas) en muestras

alimentarias y de anticuerpos para la determinación de atrazina en muestras alimentarias y medioambientales. Mediante la modificación de esferas magnéticas y la estrategia de detección electroquímica basada en el sensor m-GEC, se consiguió detectar atrazina en muestras tales como agua de consumo y zumo de naranja, y sulfonamidas en leche fresca o UHT entera, desnatada y semidesnatada. En este último caso, se ha conseguido rebajar en un factor de 100 los límites de detección fijados por la Unión Europea en todas las matrices con un simple pretratamiento de la muestra mediante dilución 1:4 en buffer fosfato. En conclusión se puede afirmar que la combinación de las ventajas aportadas por las partículas magnéticas y la sensibilidad electroquímica del transductor grafito-epoxi consigue obtener un dispositivo extremadamente flexible y sensible apto para análisis inmunológicos en muestras complejas, y capaz de ser acoplados en sistemas de análisis en continuo.

Por último, y para concluir, con el objetivo final de desarrollar en un futuro un sistema de detección de DNA a tiempo real en una estrategia de RT-PCR usando m-GEC y detección electroquímica, para la aplicación en seguridad alimentaria en cuanto a bacterias patógenas, se ha desarrollado un sistema de *primers* específicos capaces de detectar cepas de *E. coli* patógenas con un límite de detección de 0.1 pg/ μ l.

Los nuevos prototipos que se han desarrollado, cumplen con todos los requerimientos que se habían planteado en los objetivos: son dispositivos robustos, sensibles, de bajo coste, capaz de ser miniaturizados y construidos en distintas configuraciones, su uso es sencillo y su respuesta es rápida, siendo viable su implementación en *kits* para el análisis descentralizado. Además, pueden aplicarse a diversas situaciones analíticas –sólo se debe inmovilizar el biorreceptor adecuado en el biocompósito de afinidad universal o en las partículas magnéticas–, en campos de análisis tan variados como medicina, biotecnología y biología molecular, en determinaciones medioambientales y, principalmente, en la industria alimentaria para el análisis en puntos críticos de control.

Publicaciones

Renewable Protein A modified graphite-epoxy composite for electrochemical immunosensing

Zacco E., Pividori M.I., Llopis X., del Valle M., Alegret S. *Journal of Immunological Methods*.
2004, 286: 35-46

Research Paper

Renewable Protein A modified graphite-epoxy composite for electrochemical immunosensing

E. Zacco, M.I. Pividori¹, X. Llopis, M. del Valle, S. Alegret*

Grup de Sensors i Biosensors, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

Received 14 August 2003; received in revised form 23 October 2003; accepted 6 November 2003

Abstract

A novel rigid and renewable transducing material for electrochemical immunosensing, based on Protein A bulk-modified graphite-epoxy biocomposite (ProtA-GEB) is reported. Protein A is able to bind to the Fc region of antibodies and provide an affinity matrix for antibody immobilisation onto the transducer. The rigid conducting biocomposite acts not only as a transducer, but also as a reservoir for protein A. After use, the electrode surface can be renewed by a simple polishing procedure, highlighting a clear advantage of this new approach with respect to classical immunoassays.

The performance of ProtA-GEB transducers was compared with surface-modified transducers based on a simple dry adsorption procedure, where both Protein A and directly the antibody were adsorbed onto the surface of graphite-epoxy composite (ProtA/GEC and IgG/GEC, respectively). The application of the new biocomposite material in electrochemical immunosensing was studied using a model competitive immunoassay. The immunological reaction was detected using an enzymatic-labeling procedure together with the amperometric detection through a suitable substrate (H₂O₂) for the enzyme (HRP). The enzymatic labelling was performed using a two-step procedure based on the biotin/streptavidin interaction as well as a one-step procedure using an antibody labelled with the enzyme. Electrochemical and microscopic characterisation of ProtA-GEB transducer, optimisation of the immunosensor design as well as the stability of this material are also reported.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Graphite-epoxy composite; Protein A; Enzyme label; Electrochemical immunosensor; Immunoassay; Biocomposite

1. Introduction

Enzyme-linked immunoassay (ELISA) has become one of the most powerful methods for the quantification of immunological moieties in clinical samples due to its high selectivity and sensitivity (Tijssen,

1985; Van Emon and Lopez-Avila, 1992). However, the development of new, rapid, simple and low cost immunoassays for the determination of industrial samples is one of the key problems for research laboratories today. Electrochemical immunosensors can meet these demands.

Immunosensors are devices that combine a biological recognition agent (in this case, immunological species) with a transducer. The former provides selectivity while the latter provides sensitivity converting the recognition event into a measurable electronic signal.

* Corresponding author. Tel.: +34-935-812-118; fax: +34-93-581-2379.

E-mail address: salegret@gsb.uab.es (S. Alegret).

¹ Permanent address: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Graphite epoxy composite (GEC), widely studied by our research group, shows excellent transducing features in addition to flexibility when used for electrochemical biosensing. GECs are conveniently bulk-modified through the incorporation of different biological recognition materials, such as different enzymes (Martorell et al., 1994; Alegret et al., 1996), antibodies (Santandreu et al., 1997) and streptavidin for immobilising biotinylated oligonucleotides (Williams et al., 2003) resulting in biocomposites for electrochemical biosensing (Cespedes et al., 1996). These materials may be readily prepared using dry chemistry techniques, avoiding tedious, expensive and time-consuming immobilisation procedures. Additionally, the surface can be renewed by a simple polishing procedure. Consequently, a graphite-epoxy biocomposite (GEB) acts not only as a transducer but also as a reservoir for the biomaterial allowing the development of a biosensor for multiple uses (Alegret, 1996).

Protein A, produced by *Staphylococcus aureus*, is a highly stable receptor capable of binding to the Fc region of immunoglobulins, such as IgG, from a large number of species (Sjoquist et al., 1972). Because of these binding characteristics, Protein A can be used as an affinity matrix in classical immunoassays (ELISA) as well as in immunosensing devices (De Alwis and Wilson, 1987; Palmer et al., 1992a,b; Killard et al., 1999; Lu et al., 2000; Liu et al., 2000; Valat et al., 2000). The Fab binding sites of the antibodies are thus oriented away from the solid phase. Studies of the interactions between Protein A and IgG classes and subclasses have progressed to a state where much is known and understood regarding the stoichiometry and physicochemical interactions (Compton et al., 1989).

A new renewable transducing material for amperometric immunosensing is reported here. It is based on a graphite-epoxy biocomposite prepared by bulk-modification with Protein A (ProtA-GEB).

The ProtA-GEB surface was characterised by scanning electron and fluorescence microscopy as well as by electrochemical techniques. The utility of ProtA-GEB based immunosensors has been demonstrated using a competitive format with model reagents. The rapid binding kinetics between Protein A and Rabbit IgG permitted the immobilisation of the antibody onto the ProtA-GEB transducer and the

biotinylated anti-Rabbit IgG was able to compete with anti-Rabbit IgG for the immobilised Rabbit IgG. Enzyme labelling was thus performed in a two-step procedure using HRP–streptavidin conjugate and the electrochemical detection was achieved using H₂O₂ substrate for the HRP enzyme label. Additionally, the enzymatic labelling was performed in a one-step procedure using an antibody directly labelled with the enzyme.

The results obtained with ProtA-GEB transducers were compared to surface-modified devices such as ProtA/GEC and IgG/GEC transducers where both Protein A and the antibody were adsorbed onto the GEC transducer by simple dry adsorption, respectively.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and solutions

Protein A (100 µg of lyophilised powder able to bind 7.3 µg of human IgG) (catalogue number P 9151), Rabbit IgG (RIgG), anti-Rabbit IgG (anti-RIgG), biotinylated anti-Rabbit IgG Fab fragment (biotinylated anti-RIgG) and anti-Rabbit IgG (whole molecule) peroxidase conjugate (anti-RIgG/HRP), were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The streptavidin–horseradish peroxidase conjugate (HRP, 1.11.1.7) came from Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA). Tris, bovine serum albumin (BSA), Tween 20, EDTA, hydroquinone and trisodium citrate were also purchased from Sigma. Hydrogen peroxide came from Merck (Schuchardt, Germany). Streptavidin–rhodamine was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). All other reagents were of the highest grade available.

Aqueous solutions were prepared with doubly distilled water. The compositions of these solutions were: 10 × SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M trisodium citrate, pH 7.0), blocking buffer (Tris–HCl 0.1 M, 1.5 M NaCl, 2% (w/v) BSA, 0.1 (w/v) Tween 20, 5 mM EDTA, pH 7.5), washing solution (Tris–HCl 0.1 M, 1.5 M NaCl, pH 7.5), post enzyme labelling wash solution (10 mM sodium phosphate, pH 6.5, 0.5 M NaCl, 0.05% (w/v) Tween 20, 0.1% w/v BSA, 1 mM EDTA).

The Protein A solution was prepared in 10 × SSC and solutions of HRP–streptavidin, anti-RIgG/HRP

and antibodies were prepared in blocking buffer. The solution of H₂O₂ used as substrate for peroxidase was prepared in 0.1 M phosphate buffer, 0.1 M KCl, pH 7.0.

The graphite-epoxy composite and biocomposites were prepared using graphite powder with a particle size of 50 µm (BDH, Poole, UK) and Epo-Tek H77 (epoxy resin) and hardener (both from Epoxy Technology, Billerica, MA, USA).

2.2. Equipment

Amperometric measurements were performed with an LC-4C amperometric controller (BSA Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, USA). Voltammetric characterisation was carried out using an Autolab PGSTAT (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands). A three-electrode set-up was used comprising a platinum auxiliary electrode (Crison 52-67 1), double junction Ag/AgCl reference electrode (Orion 900200) with 0.1 M KCl as the external reference solution and a working electrode (the immunosensor).

Incubations at a controlled temperature were performed in an Eppendorf thermomixer (model 5436).

Confocal laser scanning microphotographs were taken with a LEICA TCS 4D microscope (Heerbrugg, Switzerland). A scanning electron microscope (Hitachi S-570, Tokyo, Japan) is used to study the optical properties of the electrode surface.

2.3. Construction of the immunosensors

2.3.1. Protein A bulk-modified graphite-epoxy biocomposite (ProtA-GEB)

Graphite powder and epoxy resin were hand mixed in a ratio of 1:4 (w/w). For every gram of graphite/epoxy mixture, an additional 20 mg of Protein A was added, resulting in a 2% (w/w) ProtA-GEB. ProtA-GEB transducers with 1% and 4% (w/w) were also prepared.

The mixture was thoroughly hand mixed to ensure uniform dispersion of Protein A and the graphite throughout the polymer. The resulting paste was placed in a PVC cylindrical sleeve body (6 mm id) having an electrical contact, at a depth of 3 mm. The composite material was cured at 40 °C for 1 week and when not in use the biocomposites were stored at 5 °C.

2.3.2. Graphite-epoxy composite electrodes surface-modified with protein A (ProtA/GEC)

Graphite-epoxy composite electrodes (GEC) without Protein A were constructed. In this case, Protein A was immobilised by simple dry-adsorption on the GEC surface (Pividori et al., 2003, Fig. 2). For this purpose, 20 µl of a solution of Protein A (10 mg/ml) was added to the polished GEC surface of the electrode. The immobilisation of Protein A was allowed to proceed for 1 h at 42 °C. ProtA/GEC electrodes were then briefly washed with 10 × SSC solution, thereby removing the salts adsorbed during the immobilisation. At this point, the electrodes were ready for the first incubation step.

2.3.3. Graphite-epoxy composite electrodes surface-modified with IgG (IgG/GEC)

Graphite-epoxy composite electrodes (GEC) were constructed and RIgG was immobilised by simple dry-adsorption on the GEC surface (Pividori et al., 2003, Fig. 2). For this purpose, 20 µl of a solution of RIgG (1 nmol/ml) was added to the polished GEC surface of the electrode. The immobilisation of the antibody was allowed to proceed for 1 h at 42 °C. IgG/GEC electrodes were then briefly washed with 10 × SSC solution, thereby removing the salts adsorbed during the immobilisation. At this point, the electrodes were ready for the first incubation step.

2.4. Immunosensor renewal

After each use, the ProtA-GEB electrodes were immersed in doubly distilled water and then polished, firstly with abrasive paper and then with alumina paper (polishing strips 301044-001, Orion, Beverly, MA, USA) to give a smooth mirror finish and expose fresh Protein A molecules on the transducer surface.

In the case of ProtA/GEC and IgG/GEC electrodes, the same procedure was performed to give a fresh GEC surface for subsequent adsorption of either Protein A or RIgG.

2.5. Immunoassay procedure

2.5.1. Immunoassay based on two-step enzymatic labelling

The schematic representation of the immunoassay based on a two-step enzymatic labelling procedure is

presented in Fig. 1A–C. Experimental details for each step are given in Table 1. Washing steps with Tris buffer (0.1 M Tris–HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.5) at 37 °C for 5 min were performed after RIgG immobilisation (step A) and the immunological reaction (step B). Following step C, a post enzyme labelling solution was used for washing.

Each step was performed in different Eppendorf tubes containing 150 µl of solution previously equilibrated at the desired temperature with gentle shaking in the thermomixer (Pividori et al., 2003, Fig. 2).

2.5.2. Immunoassay based on one-step enzymatic labelling

Experimental details for the immunoassay for ProtA–GEB and ProtA/GEC electrodes, based on a one-step enzymatic labelling procedure are given in Table 2. Washing steps with Tris buffer (0.1 M Tris–HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.5) at 37 °C for 5 min were performed after RIgG immobilisation (step A). Fol-

lowing step B, a post enzyme labelling solution was used for washing.

Each step was performed in different Eppendorf tubes containing 150 µl of solution previously equilibrated at the desired temperature with gentle shaking in the thermomixer (Pividori et al., 2003, Fig. 2).

In the case of IgG/GEC electrodes, the immunoassay was performed as stated in Table 2, but omitting the immobilisation step. Instead, the antibody RIgG was immobilised by dry adsorption, as described previously.

2.6. Enzyme activity amperometric determination

In all cases, the amount of enzyme-labelled immunological complex on the electrode surface was determined using an amperometric detection procedure. Experiments were performed in 20 ml of 0.1 M phosphate buffer, 0.1 M KCl pH 7.0 with 1.81 mM of hydroquinone. Hydroquinone was used as mediator

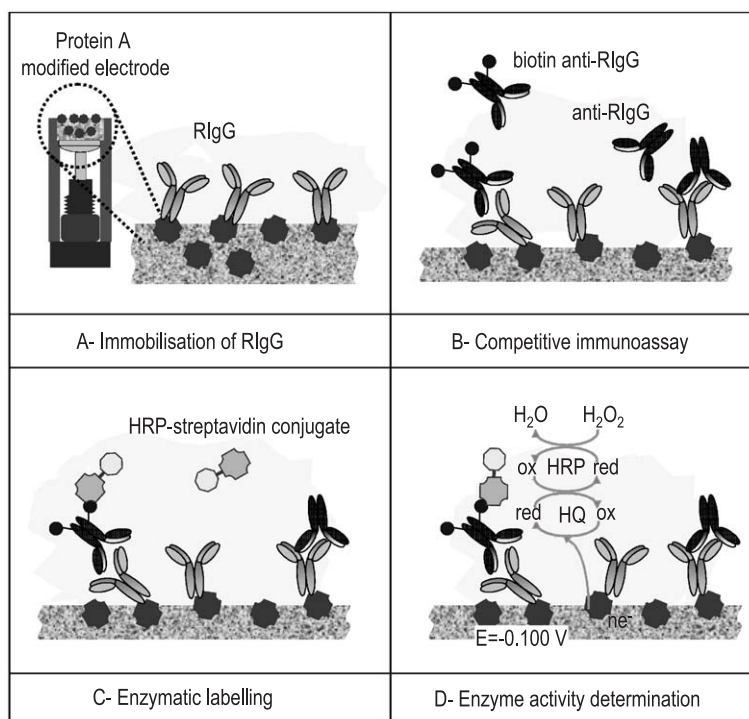


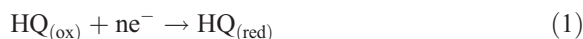
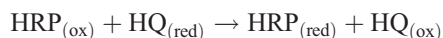
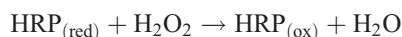
Fig. 1. Schematic representation of the immunoassay based on a two-step labelling procedure using ProtA–GEB biocomposite as a transducer. (A) RIgG immobilisation on the surface of the electrode based on its interaction with Protein A. (B) Competitive immunoassay, using anti-RIgG and biotinylated anti-RIgG. (C) Enzyme labelling using HRP–streptavidin. (D) Electrochemical enzyme activity determination.

Table 1

Experimental details of the immunoassay in a two-step enzyme labelling procedure. The schematic representation of each step is shown in Fig. 1A–C

Step	Reagents	Reagent concentration (specified in figure legends)	Temperature, time, solution
(A) Immobilisation	RIgG	Variable (pmol)	37 °C, 30 min, blocking buffer
(B) Competitive immunoassay	■ anti-RIgG ■ biotinylated anti-RIgG	Variable (pmol)	37 °C, 30 min, blocking buffer
(C) Enzymatic labelling	HRP–streptavidin	Variable (µg)	42 °C, 30 min, blocking buffer

in order to decrease the applied reduction potential. A fresh solution was prepared daily because of its sensitivity to photo-oxidation. Prior to use the electrolyte solution was purged with nitrogen, for at least 1 h (Williams et al., 2003). Hydrogen peroxide was used as the substrate for peroxidase (HRP). Its final concentration was 2.12 mM, corresponding to the H₂O₂ concentration capable of saturating the entire enzyme concentration employed in this labelling procedure. The applied potential was –100 mV (vs. Ag/AgCl). This potential was chosen using cyclic voltammetry experiments (Fig. 4). Fig. 1D and Eq. (1) represent the reactions that occur at the immunosensor surface polarised at –100 mV (vs. Ag/AgCl) upon H₂O₂ addition in the presence of hydroquinone (HQ).



The results of the amperometric measurements are given in vertical bar charts, where each bar shows the mean and the standard deviation of the amperometric signal that corresponds to enzyme saturation for different replicates of the immunosensors.

Table 2

Experimental details of the immunoassay in a one-step enzyme labelling procedure

Step	Reagents	Reagent concentration	Temperature, time, solution
(A) Immobilisation	RIgG	20 pmol	37 °C, 30 min, blocking buffer
(B) Immunoassay/ enzymatic labelling	anti-RIgG/ HRP	1.3 µg	37 °C, 30 min, blocking buffer

2.7. Evaluation of nonspecific adsorption and control assays

As with all kinds of immunoassay, it is important to control and evaluate the background adsorption. To evaluate the nonspecific adsorption onto the ProtA-GEB in the immunoassay based on a two-step enzymatic labelling procedure, sensors identical to the immunosensors were prepared, but omitting the RIgG in the immobilisation step (Fig. 1A and Table 1A). These blank assays evaluate all the adsorption phenomena resulting in an analytical signal, except for the specific binding of Protein A/RIgG/biotinylated anti-RIgG/streptavidin–HRP.

The nonspecific adsorption onto ProtA-GEB and ProtA/GEC in the immunoassay based on a one-step enzymatic labelling procedure was also evaluated omitting the addition of RIgG (Table 2A). In the case of IgG/GEC electrodes, nonspecific adsorption was evaluated omitting the immobilisation by dry-adsorption of the antibody RIgG onto the GEC transducer. Additionally, a control assay at a bare GEC transducer—omitting Protein A—was performed in order to evaluate the effect of having Protein A within or on the ProtA-GEB and ProtA/GEC transducers, respectively. This experiment was performed as shown in Table 2, but using a bare GEC electrode.

3. Results and discussion

3.1. Microscopic characterisation of ProtA-GEB biocomposite

3.1.1. Scanning electron microscopy

SEM images have been used to provide qualitative information about the structure, size and distribution

of graphite microzones as well as the surface properties of the composite and biocomposite.

Fig. 2 shows comparative scanning electron microphotographs of GEC (Fig. 2A) and ProtA-GEB (Fig. 2B). Both surfaces were polished previously and pretreated with ultrasound for 1 min. As can be seen, the surface of the GEC electrodes was heterogeneous. White areas were associated with epoxy resin and dark areas corresponded to islands of conducting material, i.e., graphite. The ProtA-GEB surface differed from that of GEC, which was characterised by a large number of closely spaced graphite microzones. The ProtA-GEB material consisted of larger graphite microzones with a significantly larger inter-zone separation, suggesting a higher bulk resistance. Thus, the inclusion of Protein A in the formulation modified the polymerisation of the graphite-epoxy composite. However, with this technique it was not possible to identify the areas where Protein A was exposed in the ProtA-GEB transducer.

3.1.2. Fluorescence microscopy

The exposure of the Protein A specific binding sites for antibodies on the surface of the ProtA-GEB transducer was studied using confocal laser scanning fluorescence microscopy. The ProtA-GEB surface was treated following a three-step procedure as described in Table 1, but in this case a fluorescent conjugate (rhodamine–streptavidin) was used in the labelling

step (Table 1, step C). The background control was performed omitting the RIgG immobilisation step (Table 1, step A). Fig. 3A shows intense fluorescence areas (in red), corresponding to specific binding to the surface of the ProtA-GEB transducer. This fluorescence could be associated with areas of the biocomposite where Protein A is exposed, confirming the presence of the specific binding sites on the surface of the ProtA-GEB transducer. Fluorescence microscopy confirmed that ProtA-GEB material exposed Protein A binding sites, acting as an affinity matrix. These binding areas were not revealed in the blank assay indicating negligible nonspecific adsorption (Fig. 3B). Both images were taken under identical experimental conditions. The reflection of the material surface (in green) showed the same pattern for both assays.

3.2. Electrochemical characterisation of ProtA-GEB transducers

The electrochemical properties of a given composite depend on the nature of each component. The polymeric matrix provides good adhesion to other components and also possesses excellent insulating characteristics. The amount and distribution of the conducting component as well as the biocomponent in the matrix and on the surface of the polymer will determine the electrochemical characteristics of the resulting biocomposite (Cespedes et al., 1996). Hence,

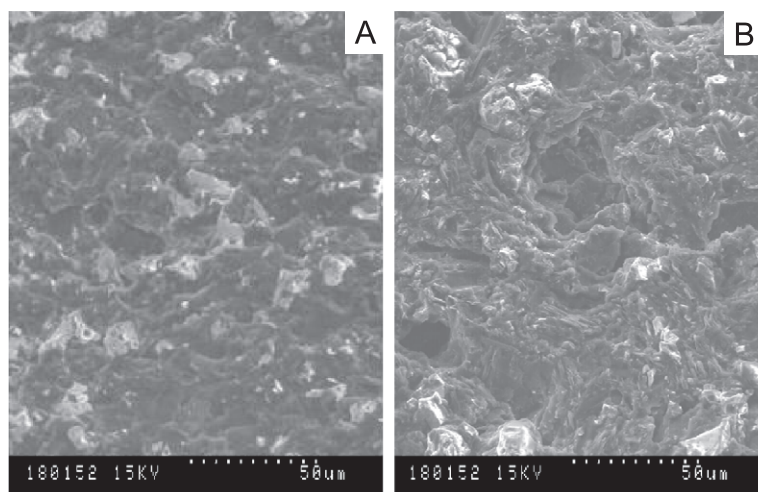


Fig. 2. Scanning electron microphotographs of (A) GEC and (B) ProtA(4%)-GEB. Identical acceleration voltage (10 kV) and resolution (50 μm) were used in both cases.

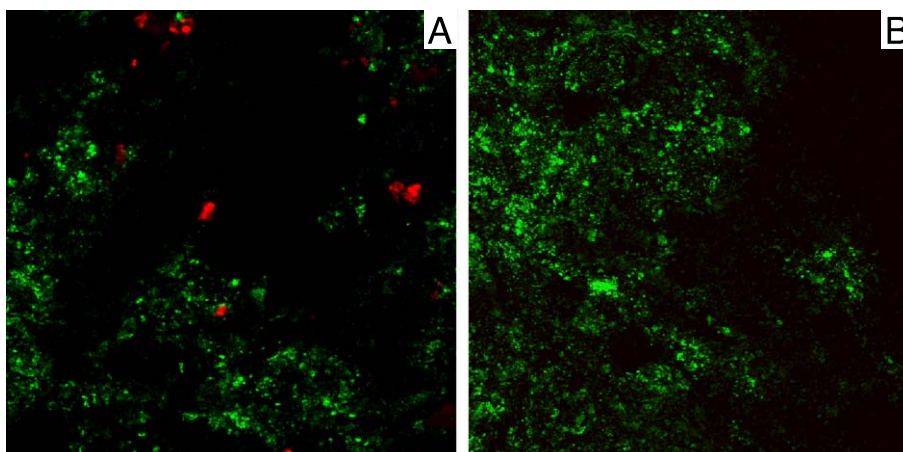


Fig. 3. Confocal laser scanning fluorescence microphotograph for (A) ProtA (4%)-GEB transducers with 2 pmol RIgG, 10 pmol biotinylated anti-RIgG and 50 µg rhodamine–streptavidin, and (B) background adsorption control omitting RIgG. Laser excitation was at 568 nm. Voltage: 352 V.

the purpose of cyclic voltammetry experiments was to characterise, rapidly and simply, the electrochemical behaviour of the ProtA-GEB biocomposite modified with different amounts of the biomaterial. Fig. 4A shows cyclic voltammograms of the ProtA-GEB transducer with different content of Protein A within the biocomposite. The electrochemical properties of 1%, 2% and 4% w/w biocomposites were compared with a GEC transducer without Protein A. As can be observed in Fig. 4A, the amount of Protein A in the formulation affects the rate of electron transfer. The worse electrochemical performance observed with increasing amount of Protein A was attributed to a

decrease in the conducting particles within the biocomposite. Additionally, Fig. 4A shows that the value for the peak-to-peak separation increased with increasing Protein A content, with the oxidation peak moving in a more positive direction and the reduction peak moving in a more negative direction compared with the bare GEC transducer.

The presence of a partially blocked electrode surface could produce a further increase in the value for the peak-to-peak separation. For this reason, cyclic voltammetry experiments with the antibody modified ProtA-GEB transducer were also performed and the results are shown in Fig. 4B. Since in this instance

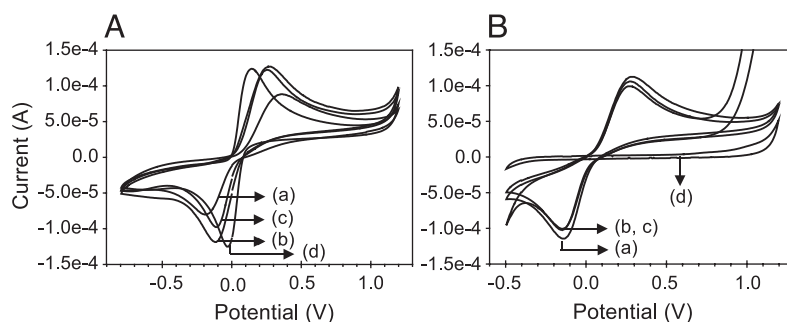


Fig. 4. (A) Cyclic voltammograms of non-modified ProtA-GEB transducers with different content of Protein A: (a) 4%, (b) 2%, (c) 1%, and (d) 0% (GEC transducer, without Protein A). (B) Cyclic voltammograms of (a) non-modified ProtA(2%)-GEB transducer, compared with modified ProtA(2%)-GEB transducers (10 pmol RIgG, 2 pmol anti-RIgG and 50 µg HRP-streptavidin), (b) with and (c) without 2.12 mM H₂O₂ as a substrate. The background signal (d) without hydroquinone for the ProtA(2%)-GEB transducer is also shown. Medium: phosphate buffer 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Hydroquinone, 1.81 mM. Ag/AgCl reference electrode, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

only 2% of the total surface area of the electrode contained Protein A, no shift in the formal peak potential was observed. In Fig. 4A and B, a reduction potential of -0.100 V was chosen for the ProtA(2%)-GEB immunosensor.

3.3. Variation of Protein A content within the carbon-polymer biocomposite

The Protein A content in the carbon-polymer composite could adversely affect the overall electrochemical performance of a given sensor. For this reason, it was decided to optimise the Protein A content in the composition of ProtA-GEB transducers. This was achieved by preparing biocomposites with 1%, 2% and 4% w/w of Protein A. Experiments were carried out as described in Table 1, but omitting the addition of anti-RiGg (non-competitive assay in a two-step enzymatic labelling procedure). In all experiments, three different electrodes were used and polished to a mirror finish prior to their use. The difference in the amperometric signal obtained by the immunosensors and the blank sensors suggested that the immunosensors were working successfully. However, in Fig. 5 it can be seen that there was an optimum current response for electrodes having 2% Protein A. Furthermore, increasing the percentage of

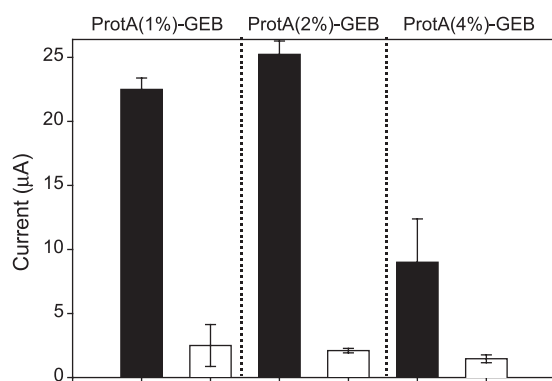


Fig. 5. Non-competitive immunoassay based on a two-step labelling procedure using 1%, 2%, and 4% ProtA-GEB biocomposite electrodes, modified with 10 pmol of RiGg, 2 pmol of biotinylated anti-RiGg and 50 µg of HRP-streptavidin. In all experiments, the nonspecific adsorption value is shown (empty bars). Medium: phosphate buffer 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediator, hydroquinone 1.81 mM. Substrate, H_2O_2 2.12 mM. Ag/AgCl reference electrode. Error bars indicate the standard deviation. $n = 3$.

Protein A from 2% to 4% in the biocomposite adversely affected the electrochemical response due to the decrease in conductivity.

Although the specific amperometric signal was influenced by changing the Protein A content in the biocomposite, nonspecific adsorption was almost constant. The signal-to-nonspecific adsorption ratio was 9, 12 and 6.1 for 1%, 2% and 4% ProtA-GEB, respectively. As a result, ProtA(2%)-GEB electrodes were used for all further experiments.

3.4. Competitive immunoassay based on ProtA(2%)-GEB biocomposite

The performance of the immunosensor based on ProtA(2%)-GEB biocomposite was also evaluated using a competitive immunoassay in a two-step enzymatic labelling procedure, as described in Table 1. Fig. 6 shows that the immunosensor was able to distinguish between 2 and 10 pmol of anti-RiGg and, as such, was able to detect moieties present in the nM range. As can be seen in Fig. 6, for similar amounts of anti-RiGg and the biotinylated anti-RiGg, the immunological reaction with biotin/anti-RiGg predominated. This fact has been previously noted (Killard et al., 1999). The antibody-antigen association rate constants may be the controlling factor for this assay, i.e., they may be significantly slower for the antigen than for the antigen-enzyme conjugate or antigen-biotinylated conjugate.

3.5. Stability of ProtA(2%)-GEB biocomposite

Due to the biological nature of these biocomposite electrodes, another important parameter that needs to be considered is their stability over time. As the Protein A is not chemically attached within the composite electrode, there is a possibility of either loss of stability or leaching during incubation or washing. Such a phenomenon has been observed elsewhere with other carbon-polymer-biocomposite electrodes (Cespedes et al., 1996; Williams et al., 2003).

The stability of these biocomposites was studied using 12 electrodes and experiments were carried on a weekly basis, over a period of 1 month, during which time the electrodes were stored in the upright position at 4 °C or at room temperature. All other experimental

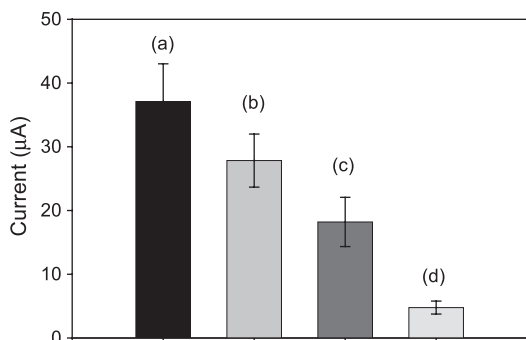


Fig. 6. Competitive immunoassay based on a two-step labelling procedure using ProtA(2%)-GEB biocomposite electrodes, modified with 10 pmol of RiGg, 2 pmol of biotinylated anti-RiGg, and (a) 0 pmol, (b) 2 pmol, and (c) 10 pmol of anti-RiGg. HRP-streptavidin (50 µg) was used for enzyme labelling. Nonspecific adsorption value is also shown (d). All other experimental conditions are identical to Fig. 5. Error bars indicate the standard deviation. $n=3$.

conditions were maintained constant. In all cases, the electrodes were polished prior to use to expose a fresh surface of Protein A available for binding. Fig. 7 shows the results obtained for the ProtA(2%)-GEB transducer, using a non-competitive model immunoassay in a two-step enzymatic labelling procedure, after subtracting the response associated with nonspecific adsorption. This shows comparatively the results with ProtA(2%)-GEB transducers stored at 4 °C with those stored at room temperature (plotted as mean values for a batch of three electrodes, with an RSD of 16.3%). As can be seen, for the ProtA(2%)-GEB transducers stored at 4 °C, a dramatic decrease in the signal occurred for recently prepared devices (1 week) until week 2. After this time, a current plateau was observed, suggesting ageing of the polymeric matrix up until week 2, with stabilisation of the signal and the material after this period of time.

Lower amperometric signals were obtained when the immunosensors were stored at room temperature. Additionally, a general decrease in current with time was observed for the freshly polished biocomposite stored at room temperature surface suggesting a loss in affinity capacity of Protein A within the biocomposite.

Stability studies beyond the fourth week period resulted in a reproducible and high amperometric signal, about 30 µA, at both of the temperatures studied. However, the amperometric signals for transducers stored at 4 °C were higher than for those stored at room temperature.

These results suggest that storage at 4 °C was preferable for ProtA(2%)-GEB transducers.

3.6. Bulk-modified graphite-epoxy composite (ProtA-GEB) versus surface-modified transducers (ProtA/GEC and IgG/GEC)

Fig. 8A shows a comparison of the results for a model non-competitive immunoassay in a one-step enzymatic labelling procedure using ProtA(2%)-GEB transducers and immunosensors based on dry adsorption of Protein A and IgG onto GEC. For the surface-modified Protein A electrodes (ProtA/GEC), 220 µg of Protein A was adsorbed on the GEC transducer while the surface-modified IgG electrodes (IgG/GEC) were prepared by adsorption of 20 pmol of RiGg on the GEC transducer.

The filled bars in Fig. 8A show the specific signal due to the immunological reaction while the empty bars show the nonspecific adsorption, as described in Section 2.7. With all three immunosensors (ProtA-GEB, ProtA/GEC and IgG/GEC), the specific signal was clearly higher than the corresponding nonspecific adsorption.

However, in the case of the ProtA-GEB and ProtA/GEC transducers, the antibody RiGg was immobilised by means of its interaction through Protein A whereas in the case of IgG/GEC, the antibody was directly

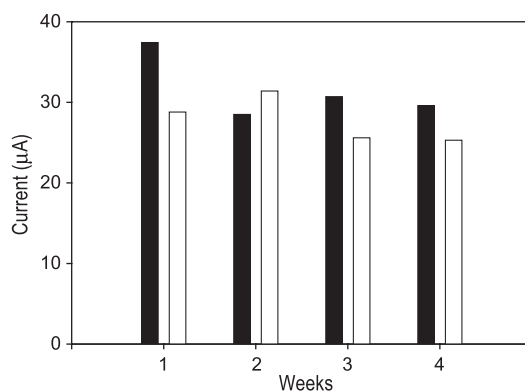


Fig. 7. Stability study over time of ProtA(2%)-GEB biocomposite-based immunosensors stored at 4 °C (filled bars) and at room temperature (empty bars). A non-competitive immunoassay based on a two-step labelling procedure was performed. The ProtA(2%)-GEB biocomposite electrodes were modified with 10 pmol of RiGg, 2 pmol of biotinylated anti-RiGg and 50 µg HRP-streptavidin. All other experimental conditions are identical to Fig. 5.

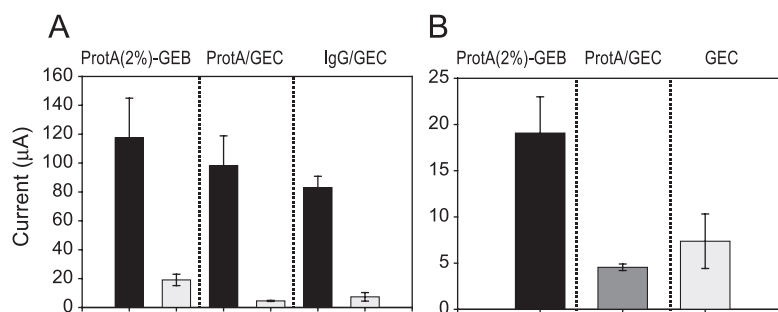


Fig. 8. (A) Comparison between immunosensors based on ProtA(2%)-GEB biocomposite and those based on dry adsorption of 220 µg of Protein A on GEC (ProtA/GEC), and 20 pmol of RIgG on GEC (IgG/GEC) using a model non-competitive immunoassay in a one-step labelling procedure. ProtA(2%)-GEB and ProtA/GEC were modified with 20 pmol of RIgG, as shown in Table 2. Anti-RIgG/HRP (1.3 µg) was used in all experiments. The nonspecific adsorption values are shown by the empty bars. (B) Nonspecific adsorption of anti-RIgG/HRP onto ProtA(2%)-GEB, ProtA/GEC and a bare GEC transducer. All other experimental conditions are identical to Fig. 5. Error bars indicate the standard deviation. $n=3$.

adsorbed to the transducer. The results confirm that when the antibodies are immobilised through Protein A, their Fab binding sites are mostly oriented away from the solid phase. As such, the binding sites are more available for immunological reactions than when the antibodies are randomly adsorbed onto the solid phase, i.e., the transducer. Moreover, the specific signal of the bulk-modified electrodes (ProtA-GEB) was higher than for the Protein A surface-modified devices (ProtA/GEC).

3.7. Nonspecific adsorption study

Fig. 8B shows in details the results for the nonspecific adsorption of the antibody enzyme conjugate onto different modified surfaces.

Nonspecific adsorption of different species onto graphite-epoxy composite (GEC) has been studied previously (Pividori and Alegret, 2003; Pividori et al., 2003). Due to the hydrophobic nature of the bare GEC transducer, the nonspecific adsorption of DNA and enzymes is negligible, even when the surface has not been pretreated with blocking agents (Pividori et al., 2003). These results are confirmed in our study, as shown for the bare GEC transducer (Fig. 8B).

Comparing the results obtained with the biocomposite ProtA(2%)-GEB and the bare electrode GEC, the nonspecific adsorption of the anti-RIgG/HRP onto the biocomposite was clearly higher. This significant difference in nonspecific adsorption values between

ProtA-GEB and the bare GEC is explained by nonspecific interactions between the Protein A (only exposed in a 2% of the total surface of the ProtA/GEB transducer) and the enzyme conjugate antibody. Nevertheless, taking into account the fact that Protein A is bound to the antibody during the immunological assay, this nonspecific interaction between Protein A/anti-RIgG/HRP is expected to occur to a lesser extent in the immunosensor.

However, in the case of Protein A-surface modified GEC (ProtA/GEC), a lower signal for nonspecific adsorption was obtained compared to both the bare GEC and the ProtA-GEB, even though the surface was also modified with Protein A. Unlike the ProtA(2%)-GEB in which Protein A is only exposed on 2% of the total surface of the transducer, ProtA/GEC is modified with a continuous layer of Protein A. In this instance, the lower signal can be explained because electron transfer with the ProtA/GEC transducer occurs to a lesser extent than in both the bare GEC and the ProtA/GEB transducers. This fact was also reported with a DNA-surface modified GEC transducer for electrochemical genosensing (Pividori et al., 2003).

3.8. Protein A-modified electrodes (ProtA-GEB and ProtA/GEC) versus the bare GEC electrode (control assay)

Fig. 9 shows the results of experiments performed as in Table 2 using Protein A-modified electrodes

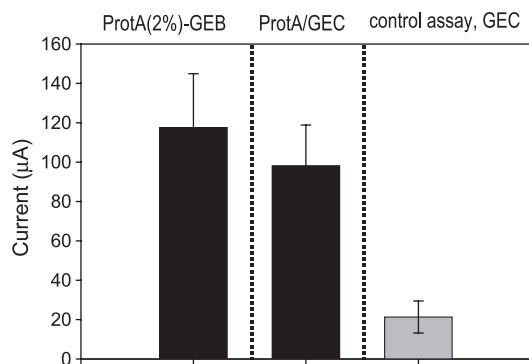


Fig. 9. Comparison between modified (ProtA(2%)-GEB and ProtA/GEC) and non-modified (GEC, control assay) sensors using a model non-competitive immunoassay in a one-step labelling procedure, as stated in Table 2. RIgG 20 pmol and anti-RIgG/HRP 1.3 µg were used in all experiments. All other experimental conditions are identical to Fig. 5. Error bars indicate the standard deviation. $n = 3$.

(ProtA-GEB and ProtA/GEC) compared to the bare GEC Protein A non-modified transducer.

These results confirm the effect of having Protein A within/on the ProtA-GEB and ProtA/GEC transducers, respectively. The immobilisation of the antibody was greatly influenced by the presence of its affinity receptor Protein A, as shown in Fig. 9.

4. Conclusion

The objective of this work was to develop a new transducing material for the production of electrochemical immunosensors that could be easily prepared and using techniques transferable to industrial scale. Within this context, we report the utility and versatility of Protein A-graphite-epoxy biocomposite (ProtA-GEB) for electrochemical immunosensing.

A biocomposite can be considered as an integrated system (Alegret, 2003) that couples the high selectivity provided by the biological molecule with the high sensitivity of electrochemical methods (Ngo, 1987; Skladal, 1997). In the case of an immunocomposite, the biological molecule is an antibody (Santandreu et al., 1997). However, while in an immunocomposite the analytical application of the immunosensor is limited by the specificity of the immobilised antibodies, the ProtA-GEB transducer provides a universal sensing surface whereon a whole range of antibodies with different specificity can be bound.

This fact, combined with high antibody binding efficiency, ensures that the immunosensor is extremely flexible in its analytical application in comparison with the previously reported immunocomposites (Santandreu et al., 1997).

The proposed immunosensor has been prepared successfully in a simple bulk modification procedure based on dry chemistry. This approach overcomes complicated pretreatment steps and avoids the use of wet procedures based on modification of the surface transducer and subsequent immobilisation that are tedious, expensive and time-consuming (Liu et al., 2000). Such an immunosensor design results in a novel approach for antibody immobilisation based on the well-known Protein A–antibody interaction. Attaching an enzyme label marker to the immunological complex formed on the Protein A carbon–polymer biocomposite permits the detection of very small quantities of immunological species (nmol/l). Moreover, the enzymatic labelling can be performed in a two-step procedure, based on the biotin–streptavidin interaction, as well as in a one-step procedure using an antibody labelled with the enzyme.

An additional novel aspect of this work is reproducible surface regeneration of the biocomposite electrodes allowing repeated analyses with the same electrode. Stability studies demonstrate the ability of the same electrode to be used for at least 4-week periods with high amperometric signals.

Although the biocomposite is modified with a protein known to produce higher nonspecific adsorption, the resulting ProtA-GEB material presents a low nonspecific adsorption both for antibodies and for enzyme conjugate. ProtA-GEB does not require blocking steps to minimise the nonspecific adsorption on the free sites of the transducer.

The high sensitivity of this new material, coupled with its compatibility with miniaturisation and mass fabrication technologies (screen-printing techniques), make them very attractive for quick and simple analyses in industrial and environmental applications. Future work will be focused on the possible application of such methods to screen-printed electrodes, permitting the development of disposable electrodes and quantitative immunological detection, in a simple and economic manner.

For all the aforementioned reasons, we suggest that Protein A graphite-epoxy biocomposite based

platforms are very suitable for electrochemical immunoassays.

Acknowledgements

Financial support from EU (“Quality of life and management of living resources”, Rosepromilk, contract # QLK1-CT-2001-01617) is acknowledged.

References

- Alegret, S., 1996. Rigid carbon-polymer biocomposites for electrochemical sensing. A review. *Analyst* 121, 1751–1758.
- Alegret, S., 2003. Integration, a new paradigm in analytical chemistry. In: Alegret, S. (Ed.), *Integrated Analytical Systems*. Elsevier, Amsterdam, pp. 17–18.
- Alegret, S., Alonso, J., Bartroli, J., Cespedes, F., Martinez-Fabregas, E., del Valle, M., 1996. Amperometric biosensors based on bulk-modified epoxy graphite biocomposites. *Sens. Mater.* 8, 147–153.
- Cespedes, F., Martinez-Fabregas, E., Alegret, S., 1996. New materials for electrochemical sensing: I. Rigid conducting composites. *TrAC* 15, 296–304.
- Compton, B.J., Lewis, M., Whigham, F., Gerald, J.S., Countryman, G.E., 1989. Analytical potential of protein A for affinity chromatography of polyclonal and monoclonal antibodies. *Anal. Chem.* 61, 1314–1317.
- De Alwis, U., Wilson, G.S., 1987. Rapid heterogeneous competitive electrochemical immunoassay for IgG in the picomole range. *Anal. Chem.* 59, 2786–2789.
- Killard, A.J., Zhang, S., Zhao, H., John, R., Iwuoha, E.I., Smyth, M.R., 1999. Development of an electrochemical flow injection immunoassay (FIIA) for the real-time monitoring of biospecific interactions. *Anal. Chim. Acta* 400, 109–119.
- Liu, C.-H., Liao, K.-T., Huang, H.-J., 2000. Amperometric immunosensors based on protein A coupled polyaniline-perfluorosulfonated ionomer composite electrodes. *Anal. Chem.* 72, 2925–2929.
- Lu, H.-C., Chen, H.-M., Lin, Y.-S., Lin, J.-W., 2000. A reusable and specific Protein A-coated piezoelectric biosensor for flow injection immunoassay. *Biotechnol. Prog.* 16, 116–124.
- Martorell, D., Cespedes, F., Martinez-Fabregas, E., Alegret, S., 1994. Amperometric determination of pesticides using a biosensor based on a polishable graphite-epoxy biocomposite. *Anal. Chim. Acta* 290, 343–348.
- Ngo, T.T., 1987. *Electrochemical Sensors in Immunological Analysis*. Plenum, New York.
- Palmer, D.A., Edmonds, T.E., Seare, N.J., 1992a. Flow injection electrochemical enzyme immunoassay for theophylline using a protein A immunoreceptor and *p*-aminophenyl phosphate *p*-aminophenol as the detection system. *Analyst* 117, 1679–1682.
- Palmer, D.A., Edmonds, T.E., Seare, N.J., 1992b. Flow injection immunoassay for theophylline using a protein A immunoreactor. *Anal. Proc.* 29, 98–99.
- Pividori, M.I., Alegret, S., 2003. Graphite-epoxy platforms for electrochemical genosensing. *Anal. Lett.* 36, 1669–1695.
- Pividori, M.I., Merkoçi, A., Alegret, S., 2003. Graphite-epoxy composites as a new transducing material for electrochemical genosensing. *Biosens. Bioelectron.* 19, 473–484.
- Santandreu, M., Cespedes, F., Alegret, S., Martinez-Fabregas, E., 1997. Amperometric immunosensors based on rigid conducting immunocomposites. *Anal. Chem.* 69, 2080–2085.
- Sjoquist, J., Meloun, B., Hjelm, H., 1972. Protein A isolated from *Staphylococcus aureus* after digestion with lysostaphin. *Eur. J. Biochem.* 29, 572–578.
- Skladal, P., 1997. Advances in electrochemical immunosensors. *Electroanalysis* 9, 737–745.
- Tijssen, P., 1985. *Practice and Theory of Enzyme Immunoassay*. Elsevier, Oxford.
- Valat, C., Limoges, B., Huet, D., Romette, J.-L., 2000. A disposable Protein A-based immunosensor for flow-injection assay with electrochemical detection. *Anal. Chim. Acta* 404, 187–194.
- Van Emon, J.M., Lopez-Avila, V., 1992. Immunochemical methods for environmental analysis. *Anal. Chem.* 64, 79A–88A.
- Williams, E., Pividori, M.I., Merkoçi, A., Forster, R.J., Alegret, S., 2003. Rapid electrochemical genosensor assay using a streptavidin carbon-polymer biocomposite electrode. *Biosens. Bioelectron.* 19, 165–175.

Electrochemical biosensing based on universal affinity biocomposite platforms

Zacco E., Pividori M.I., Alegret S. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006, 21: 1291–1301

Electrochemical biosensing based on universal affinity biocomposite platforms

E. Zacco^a, M.I. Pividori^{a,b,*}, S. Alegret^a

^a *Grup de Sensors i Biosensors, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain*

^b *Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain*

Received 30 March 2005; received in revised form 25 May 2005; accepted 26 May 2005

Available online 10 August 2005

Abstract

Rigid conducting biocomposites are versatile and effective transducing materials for the construction of a wide range of amperometric biosensors such as immunosensors, genosensors and enzymosensors, particularly if the transducer is bulk-modified with universal affinity biomolecules.

The strept(avidin)–graphite–epoxy biocomposite could be considered as an universal immobilization platform whereon biotinylated DNAs, oligonucleotides, enzymes or antibodies can be captured by means of the highly affinity (strept)avidin–biotin reaction. Universal affinity biocomposite-based biosensors offer many potential advantages compared to more traditional electrochemical biosensors commonly based on a biologically surface-modified transducer. The integration of many materials into one matrix is their main advantage. As biological bulk-modified materials, the conducting biocomposites act not only as transducers, but also as reservoir for the biomaterial. After its use, the electrode surface can be renewed by a simple polishing procedure, establishing a clear advantage of these approaches relative to classical biosensors and other common biological assays. Moreover, the same material is useful for the analysis of many molecules whose determinations are based on genetic, enzymatic or immunological reactions. The different strategies for electrochemical genosensing, immunosensing and enzymosensing, all of them being dependent on the presence of a redox enzyme marker for the generation of the electrochemical signal, based on this universal affinity biocomposite platform are all presented and discussed.

© 2005 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Graphite–epoxy biocomposite; Protein G; (Strept)avidin; Electrochemical biosensing

1. Introduction

Deposition of biological macromolecules with controlled spatial resolution without any loss in their activity is the subject of increasing research efforts owing to the potential application in the field of electrochemical biosensors, biochips and bioreactors (Song and Vo-Dinh, 2004; Oh et al., 2004).

One of the most valuable strategies for the effective immobilization of biomaterial on different substrates is based on the avidin–biotin affinity reaction (Luppa et al., 2001; Song and Vo-Dinh, 2004). Nowadays, the knowledge about this interaction has advanced significantly and offers an extremely versatile tool. The avidin–biotin reaction as an immobilization

strategy for biomolecules presents a variety of specific advantages over other single point immobilization techniques. In particular, the extremely specific and high affinity interaction between biotin and the glycoprotein avidin (association constant, $K_a = 10^{15}$ M) leads to strong associations similar to the formation of a covalent bonding. This interaction is highly resistant to a wide range of chemical (detergents, protein denaturants), pH range variations and high temperatures (Jones and Kurzban, 1995). In addition, the avidin–biotin based-immobilization method maintains the biological activity of the biomolecule being immobilized more successfully than other commonly used methods (Darain et al., 2003; Limoges et al., 2003; Da Silva et al., 2004). Much progress has been done in the modification of biomolecules with biotin. A wide range of macromolecules including proteins – both enzymes and antibodies – (Snejdarkova et al., 1993;

* Corresponding author. Tel.: +34 934034445; fax: +34 934021233.

E-mail address: Isabel.Pividori@ub.edu (M.I. Pividori).

Hoshi et al., 1995; Amounas et al., 2000) polysaccharides and nucleic acids or short oligonucleotides can be readily linked to biotin without serious effects on their biological, chemical or physical properties. As such, avidin should be considered as a universal affinity molecule capable to attach different biotinylated biomolecules.

Numerous coupling strategies have been specially developed for the immobilization of antibodies on different surfaces through the formation of defined linkages. However, by using the common coupling strategies it is not possible to ensure totally free specific binding sites of the immobilized antibody. Some spatial orientations on the surface may prohibit the formation of an antibody–antigen complex. Several approaches have been developed in order to achieve an improved antibody orientation, which leads to a better binding capacity. One of them is based on avidin–biotin interaction. Another one is based on the antibody bonding through Fc fragment to protein A or G (Compton et al., 1989; Lu et al., 1996; Zatta, 1996; Reinecke and Scheper, 1997; Valat et al., 2000; Yakovleva et al., 2003; Oh et al., 2004). These immobilization strategies allow the binding-sites of the antibodies to be oriented away from the solid phase. As a difference with avidin, protein G is able to link the Fc region of many immunoglobulins (Akerstrom et al., 1985; Janis and Regnier, 1989; Larsson, 1990) thus in this case it is not necessary to have the antibody modified with biotin. As an antecedent, we have previously demonstrated the utility of protein A biocomposite (ProtA–GEB) for the universal attachment of antibodies with different specificities (Zacco et al., 2004).

A new universal affinity and renewable transducing material for electrochemical biosensing is reported. This new transducing platform is based on a graphite–epoxy biocomposite prepared by bulk-modification with avidin (Av–GEB).

The utility of Av–GEB as a universal affinity platform for electrochemical enzymosensing and biosensing of DNA was demonstrated by means of the immobilization of enzymes and biotinylated ODNs (oligonucleotides) on the Av–GEB transducer, respectively. The universal attachment of antibodies onto Av–GEB transducer was performed by both (i) the direct immobilization of biotinylated antibodies and (ii) the previous immobilization of biotinylated protein G as a bridge whereon non-biotinylated antibodies can be easily attached.

Av–GEB surface was characterized not only by electrochemical techniques but also by optical techniques such as fluorescence microscopy. Response parameters as well as ease of preparation, robustness, sensitivity, surface regeneration, costs, and transfer to mass production of these different approaches are discussed.

2. Materials and instrumentation

2.1. Chemicals and solutions

The graphite–epoxy composite and biocomposites were prepared using graphite powder with a particle size of 50 μm

(BDH, UK) and Epo-Tek H77 (epoxy resin) and hardener (both from Epoxy Technology, USA). The Av–GEB biocomposite was prepared with Avidin coming from Sigma (product number A9275). The immunological reagents such as protein G (catalogue number P 4589), biotinylated protein G (product number P 8045) rabbit IgG (RIgG), anti-rabbit IgG Fab fragment peroxidase conjugate (anti-RIgG/HRP) (product number A 6667), came from Sigma.

Glucose oxidase–biotin amidocaproyl labeled from *Aspergillus niger* (biotin–Gox) (product number G7779), Peroxidase–biotinamidocaproyl conjugate (product number P9568) and biotin–4–fluorescein (product number B9431) were also purchased from Sigma. Both enzyme (HRP, 1.11.1.7) conjugates used as electrochemical labels – i.e. anti-digoxigenin horseradish peroxidase (anti-Dig–HRP) and the streptavidin–horseradish peroxidase – were purchased from Roche (Germany).

All oligonucleotide stock solutions were prepared with sterilized and deionized water and stored at a temperature of -20°C until required.

The DNA oligomers were obtained from TIB MOLBIOL (Germany). The oligonucleotide sequences specific for the methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (meca gene), used for the electrochemical genosensing were:

- meca capture probe, biotin-3'-GTC GTT TAC CCT TGA GAT TA-5';
- meca target related with methicillin resistance *S. aureus* (MRSA), 5'-CAG CAA ATG GGA ACT CTA ATG GAG ATT TTT CCA AAC AAA ATA TAG ATA TT-3;
- meca digoxigenin labeled probe, 3'-GGT TTG TTT TAT ATC TAT AA-5'-Dig;
- meca digoxigenin labeled (mismatch) probe, 3'-GGT TTG TCT TAT AGC TAT AA-5'-Dig.

Tween 20, hydroquinone, benzoquinone, D-(+)-glucose monohydrate, bovine serum albumin (BSA), sodium dodecyl sulphate (SDS), Tris–HCl, EDTA were purchased from Sigma.

Trisodium citrate, NaCl and hydrogen peroxide were purchased from Merck (Germany). All other reagents were of the highest grade available.

Aqueous solutions were prepared with doubly distilled water. The compositions of these solutions for immuno and enzymosensing were: (i) blocking buffer (0.1 M Tris–HCl, 1.5 M NaCl, 2% (w/v) BSA, 0.1% (w/v) Tween 20, 5 mM EDTA), this solution was prepared at both pH 5 and 7.5; (ii) washing solution (0.1 M Tris–HCl, 1.5 M NaCl, 0.1% (w/v) Tween 20), this solution was prepared at both pH 5 and 7.5. All the immunological reagents were prepared in blocking buffer. The compositions of the solutions for electrochemical genosensing were: (i) hybridization solution (10 \times SSC, 2 \times Denhardt's, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chloroform extracted salmon testes DNA, coming from Sigma); (ii) blocking solution (1 \times PBS, 2% (w/v) BSA, 0.1% Tween 20, 5 mM EDTA, pH 7.5); (iii) post-enzyme labeling wash solution (10 mM sodium

phosphate, 0.5 M NaCl, 0.05% (w/v) Tween 20, 0.1% (w/v) BSA, 1 mM EDTA, pH 6.5).

The solution of H₂O₂ used as substrate for peroxidase was prepared in 0.1 M phosphate buffer, 0.1 M KCl, pH 7.0.

2.2. Equipment

Amperometric measurements were performed with a LC-4C amperometric controller (BAS Bioanalytical Systems Inc., USA). Voltammetric characterization was carried out using an Autolab PGSTAT Eco-chemie (The Netherlands). A three-electrode set-up was used comprising a platinum auxiliary electrode (Crison 52-67 1), double junction Ag/AgCl reference electrode (Orion 900200) with 0.1 M KCl as the external reference solution and a working electrode (the biosensor).

Incubations at a controlled temperature were performed in an Eppendorf thermomixer (model 5436).

Confocal laser scanning microphotographs were taken with a LEICA TCS 4D microscope.

2.3. Construction of the universal affinity biocomposite platform

Graphite powder and epoxy resin were hand mixed in a ratio of 1:4 (w/w). Avidin was added resulting 1–2% (w/w) bulk-modified graphite epoxy biocomposite. As the biomolecule was avidin, an avidin–graphite–epoxy biocomposite (Av–GEB) was obtained. The mixture is thoroughly hand mixed to ensure the uniform dispersion of the affinity modifier and the graphite powder throughout the polymer. The resulting paste was placed in a PVC cylindrical sleeve body (6 mm i.d.), which has an electrical contact at a depth of 3 mm. Graphite–epoxy composite (GEC) electrodes without avidin were also constructed.

The composite material was cured at 40 °C for 1 week and when not in use the biocomposite electrodes were stored at 4 °C.

Before each use, the surface of the electrode was wetted with double distilled water and then thoroughly smoothed with abrasive paper and then with alumina paper (polishing strips 301044-001, Orion).

The reproducibility of the construction of the sensors based on GEC and the polishing procedure have been previously reported (Pividori et al., 2001).

3. Procedures

3.1. Modification and electrochemical determination of the Av–GEB electrodes

Unless otherwise specified, the modification of the Av–GEB platform during the different incubation steps – such as immobilization, hybridization, affinity reactions and enzymatic labeling steps, and during the washing steps – were performed with the electrode dipped in 150 µl of a

solution previously equilibrated at the desired temperature in Eppendorf tubes. This volume was chosen purely because it corresponds to quantity required to ensure that the Av–GEB electrode is fully immersed in the solution. All the modifications were performed under controlled temperature and gently shaking using an Eppendorf thermomixer.

The different strategies for electrochemical genosensing, immunosensing and enzymosensing are dependent on the presence of a redox enzyme marker for the generation of the electrochemical signal.

In the case of electrochemical DNA biosensing and immunosensing, the amount of HRP-labeled complex on the electrode surface is related with the extent of biological reaction occurring on the surface of the biosensor. The amount of HRP enzyme was thus determined by using an amperometric detection procedure. Experiments were performed in a 20 ml 0.1 M phosphate buffer, 0.1 M KCl pH 7.0 with 1.81 mM of hydroquinone, 1.1 mM of hydrogen peroxide as previously reported (Pividori et al., 2003; Zacco et al., 2004).

As in the case of electrochemical biosensing using HRP as an enzymatic marker, the same mediator (hydroquinone) was used for the determination of hydrogen peroxide by means of the enzymatic biosensing based on HRP.

In the case of enzymosensing for the determination of the glucose, 100 µl of a saturated solution of benzoquinone prepared in double distilled water was used as the mediator for the enzyme glucose oxidase. The electrochemical determination was performed in 20 ml of 0.1 M phosphate buffer, 0.1 M KCl pH 7.0.

The applied potential was –0.250 V (versus Ag/AgCl) for electrochemical genosensing (Williams et al., 2003), –0.200 V for immunosensing and enzymosensing of H₂O₂, and +0.300 V for enzymosensing of glucose. These potentials were chosen using cyclic voltammetry experiments (results not shown).

3.2. Microscopic characterization of the Av–GEB platform

The exposure of the avidin specific binding sites of the Av–GEB (1%) platform was studied using confocal laser scanning fluorescence microscopy.

The Av–GEB surface was modified as described in Table 1. In this instance a small fluorescent conjugate (Biotin–fluorescein) was used for the modification of the Av–GEB electrode surface. The background control was performed using non-biotinylated fluorescein but the same Av–GEB platform.

3.3. Electrochemical characterization of the Av–GEB platform

The electrochemical characterization of the Av–GEB platforms modified with both 1 and 2% of avidin was first performed using biotin–HRP. The experimental conditions for the modification of the Av–GEB (1 and 2%) with the biotin–HRP are shown in detail in Table 1. The non-specific

Table 1
Experimental conditions for microscopic and electrochemical characterization of Av–GEB

Step	Reagent concentration	Experimental conditions ^a
Microscopic characterization of Av–GEB (1%) platform		
1. Incubation step	Biotin-4-fluorescein (80 pmol)	1. 37 °C, 30 min, blocking buffer pH 7.5
2. Washing step		2. 37 °C, 5 min (three times), washing buffer pH 7.5
Electrochemical characterization of Av–GEB (1–2%) platform		
1. Incubation step	Biotin–HRP (variable 1–75 pmol)	1. 37 °C, 30 min, blocking buffer pH 7.5
2. Washing step		2. 37 °C, 5 min, washing buffer pH 7.5
Electrochemical enzymosensing based on Av–GEB (1%)		
1. Incubation step	Biotin–HRP (25 pmol); biotin–glucose oxidase (variable 25–100 pmol)	1. 37 °C, 30 min, blocking buffer pH 7.5
2. Washing step		2. 37 °C, 5 min, washing buffer pH 7.5

^a For the composition of the solution being used, see Section 2.1.

adsorption controls were performed in identical conditions but in this case GEC electrodes (without avidin) were used. In each experiment, three replicates were performed. The transducers were stored at 4 °C over the time.

The electrochemical characterization was based on the activity of the enzyme HRP immobilized on the biosensor through the biotin–avidin reaction. The experimental conditions for the electrochemical determination based on the enzyme HRP was previously explained in Section 3.1.

3.4. Electrochemical biosensing: the different strategies

3.4.1. Electrochemical DNA biosensing based on Av–GEB

The first assay was performed in order to demonstrate the capability of Av–GEB for the specific detection of a DNA

sequence related with the gene *mecA*, specific to methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) (Katayama et al., 2000). A schematic representation of the assay is shown in Fig. 1A. The concentration of DNA target corresponded to a typical yield of amplified DNA from a short PCR amplification procedure. The experimental procedure consists of four individual steps. All the steps were performed in Eppendorf tubes under controlled temperature and agitation using the Eppendorf thermomixer and at a final volume of 150 μ l.

The experimental conditions for electrochemical genosensing are shown in detail in Table 2. Non-specific adsorption controls were performed in identical conditions but omitting the addition of *mecA* target related with methicillin resistance *S. aureus* (MRSA). The electrochemical characterization was based on the activity of the enzyme HRP immobilized on the Av–GEB platform as a label for the

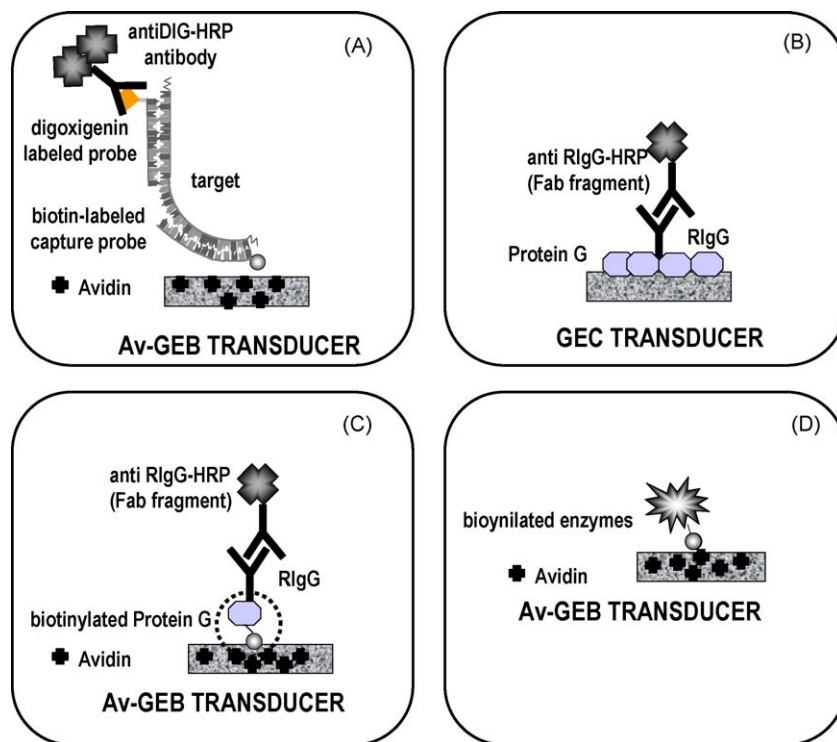


Fig. 1. Schematic representation for the electrochemical DNA biosensing (A), immunosensing (B and C) and enzymosensing (D) procedures based on Av–GEB.

Table 2
Experimental conditions for electrochemical DNA biosensing based on Av–GEB

Step	Reagent concentration	Experimental conditions ^a
1. One step immobilization and hybridization in capture format	(a) <i>mecA</i> biotin labeled capture probe, 150 nmol; (b) <i>mecA</i> target related with methicillin resistance <i>S. aureus</i> (MRSA), 150 nmol; (c) <i>mecA</i> digoxigenin labeled probe, 150 nmol; (d) <i>mecA</i> digoxigenin labeled (mismatch) probe (only in the interference assay), 150 nmol	1. 42 °C, 60 min, hybridization solution
2. Post-immobilization/ hybridization washing step		2. 42 °C, 5 min, 0.01 M Tris, pH 7.4
3. Enzymatic labeling	AntiDig–HRP, 12.45 µg/µl	3. 37 °C, 40 min, blocking solution (for electrochemical genosensing)
4. Post-enzyme labeling washing step		4. 37 °C, 5 min, post-enzyme labeling wash solution ^a

^a For the composition of the solution being used, see Section 2.1.

hybridization reaction. The experimental conditions for the electrochemical determination based on the enzyme HRP was previously explained in section 3.1.

3.4.2. Electrochemical immunosensing based on Av–GEB

The second approach is based on the immunological interactions of a previously immobilized antibody. To achieve this purpose, two different immobilization strategies for the antibody were used. The first one is based on the immobilization of biotinylated antibodies directly on the surface of Av–GEB (results not shown). However, a more versatile approach was achieved if the Av–GEB platform is previously modified with biotinylated protein G. As protein G is able to link the Fc region of many kind of antibodies (Akerstrom et al., 1985; Larsson, 1990; Lu et al., 1996), in this approach it is not necessary to dispose of the antibody modified with biotin. Protein G can be considered as a universal affinity molecule for the attachment of antibodies with different specificities.

In order to show the capability of biotin–protein G for immobilizing antibodies on the Av–GEB surface, two approaches based on model immunological assay were designed, as it is shown in Fig. 1.

The first one was performed by the direct adsorption of protein G on the GEC surface (Fig. 1B). In this case, 20 µl of a solution of protein G (0.075 µM) was added onto the polished surface of a GEC electrode, as shown in Table 3. The dry-adsorption of protein G was allowed to proceed at 42 °C until dryness (approximately 30 min), obtaining a thick protein G layer on GEC.

In the second case the single point attachment of protein G on the transducer surface was achieved by the interaction between the biotinylated protein G with the avidin confined within the Av–GEB biocomposite, as shown in Fig. 1C. This approach was performed in a one-step as well as in a two-step assay. In the two-step assay, the Av–GEB platform was firstly modified in a separated step with biotin–protein G, following by the immunological reaction in a subsequent step. On the contrary, the one-step assay was performed by the incubation of all the reagents during a sole step, with the immobilization of the biotin–protein G and the immunological reaction occurring at the same time. Experimental details of the two different assays are shown in Table 3.

In all cases, the non-specific adsorption on the Av–GEB platform was evaluated. For this purpose, sensors identical

Table 3
Experimental conditions for electrochemical immunosensing based on Protein G

	Step	Reagent concentration	Experimental conditions ^a
Dry adsorption of protein G on GEC	1. Modification of GEC surface with protein G by dry-adsorption	Protein G (1.5 pmol, 20 µl)	1. 42 °C, PBS buffer pH 7.5 until dryness
	2. Incubation step	RIgG (3 pmol) anti-RIgG–HRP (5 pmol)	2. 37 °C, 30 min, blocking buffer pH 5
	3. Washing step		3. 37 °C, 5 min, washing buffer pH 5
Single-point attachment of biotinylated protein G through biotin–streptavidin reaction			
One step assay	1. Incubation step	Biotin–protein G (1.5 pmol) RIgG (3 pmol) anti-RIgG–HRP (5 pmol)	1. 37 °C, 30 min, blocking buffer pH 5
	2. Washing step		2. 37 °C, 5 min, washing buffer pH 5
Two step assay	1. Modification of Av–GEB surface with biotin–protein G	Biotin–protein G (1.5 pmol)	1. 37 °C, 30 min, blocking buffer pH 5
	2. Washing step		2. 37 °C, 5 min, washing buffer pH 5
	3. Incubation step	RIgG (3 pmol) anti-RIgG–HRP (5 pmol)	3. 37 °C, 30 min, blocking buffer pH 5
	4. Washing step		4. 37 °C, 5 min, washing buffer pH 5

^a For the composition of the solution being used, see Section 2.1.

to the biosensors but omitting the RIgG addition during the incubation step were prepared.

The electrochemical characterization was based on the activity of the enzyme HRP immobilized on the Av–GEB platform as a label for the immunological reaction. The experimental conditions for the electrochemical determination based on the enzyme HRP was previously explained in Section 3.1.

3.4.3. Electrochemical enzymosensing based on Av–GEB

The electrochemical enzymosensing approach based on Av–GEB platform relies on the immobilization of the biotinylated enzymes by means of the avidin molecules confined within the biocomposite, as shown in Fig. 1D. In order to demonstrate the capability of Av–GEB for electrochemical enzymosensing, biotinylated horseradish peroxidase (biotin–HRP) and biotinylated glucose oxidase (biotin–GOx) were used for the enzymatic detection of their substrates, H_2O_2 and glucose, respectively. Experimental details of the two different assays are shown in Table 1. The experimental conditions for the electrochemical determination based on both the enzyme HRP and glucose oxidase was previously explained in Section 3.1.

3.5. Stability of the Av–GEB platform

Due to the biological nature of the Av–GEB universal affinity platform, another important parameter that needs to be considered is their stability over time.

To study the stability of Av–GEB biocomposite, a batch of six electrodes were prepared using the same basic graphite–epoxy composite paste. The resulting paste was equally divided: Avidin was added to one half for the construction of three Av–GEB (1%) electrodes while the remaining paste was used to construct three GEC electrodes. Those GEC electrodes were used in order to control the non-specific adsorption coming from the non-specific interac-

tion between the biotinylated enzyme (Biotin–HRP) and the graphite–epoxy composite base material. The experiments using Av–GEB as well as GEC were carried on a weekly basis during the first month. After that, the experiments were carried on a monthly basis, over a 7-month period, during which time the electrodes were stored in an upright position at 4 °C. In all cases the electrodes were polished prior to each stability evaluation to expose a fresh surface with avidin-binding sites. All other experimental conditions were maintained constant. The experimental conditions for the electrochemical determination based on the enzyme HRP was previously explained in Section 3.1.

4. Results and discussion

4.1. Microscopic characterization of the Av–GEB platform

Confocal laser scanning fluorescence microscopy was used to study the exposure of the avidin specific binding sites of the Av–GEB platform. This study was performed with a small and flexible biotinylated fluorescein molecule as a fluorescence marker. Fig. 2B shows intense fluorescence areas corresponding to specific binding between the avidin molecules confined within the Av–GEB platform and the biotinylated fluorescein molecules. These binding areas are less revealed in the blank assay (Fig. 2A) indicating negligible non-specific adsorption. Both images were taken under identical experimental conditions. As the graphite–epoxy is a porous material (Pividori et al., 2003) the image showed in this paper was taken by summing the fluorescence of different planes that constitute the transducer.

Fluorescence microscopy thus confirms that Av–GEB platform exposes active binding sites for biotin, acting as affinity matrix.

This fluorescence can be associated to the Av–GEB areas where not only avidin is exposed but also reached by the

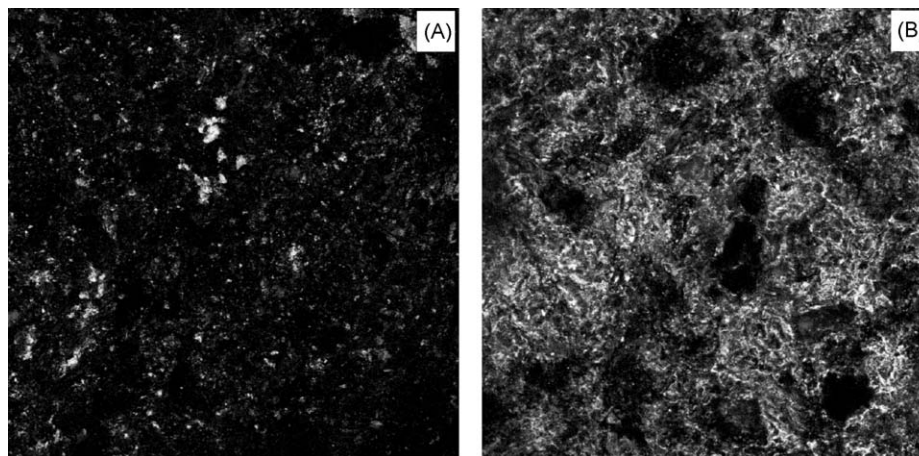


Fig. 2. Confocal laser scanning fluorescence microphotograph for Av–GEB transducers submitted to (A) non-biotinylated fluorescein (background adsorption) and (B) 80 pmol of biotinylated fluorescein. Laser excitation was at 568 nm; voltage: 352 V.

small fluorescence molecule, confirming the presence of the specific binding sites within the Av–GEB transducer. As the graphite–epoxy composite is a porous material it is expected that small biotinylated molecules can easily diffuse in/out the pores and reach the exposed avidin molecules. Similar interactions to those found for the small fluorescein–biotin molecule could be expected for the small and flexible ODN molecules, i.e. for the electrochemical DNA biosensor based on Av–GEB. However, for molecules with higher MW and lower flexibility, such as antibodies, immunocomplexes and enzymes, the interaction with the Av–GEB surface could be complicated by diffusion processes.

Although the biotin affinity centers of the Av–GEB showed to be active, they could be more easily reached by small biotinylated molecules. The interaction with more rigid and larger biomolecules was expected to be lower.

4.2. Electrochemical characterization of the Av–GEB platform

As demonstrated for other biocomposite materials previously developed in our research group (Williams et al., 2003; Zacco et al., 2004) the amount of biomolecules in the formulation of biocomposite normally affects the rate of electron transfer. The decreased electrochemical signal with the increase of avidin is attributed to the decrease in the electric contact between the conducting particles within the biocomposite. As such, it was expected that the amount of the avidin molecule within the Av–GEB platform could affect not only the affinity recognition performance of the affinity biosensor but also its electrochemical behavior.

The purpose of the electrochemical characterization was hence to evaluate the electrochemical behavior of the Av–GEB biocomposite modified with different amounts of affinity molecule. Fig. 3 shows the response pattern of Av–GEB modified with 1% (triangle) and 2% (circle) after its reaction with different quantities of biotinylated–HRP. The

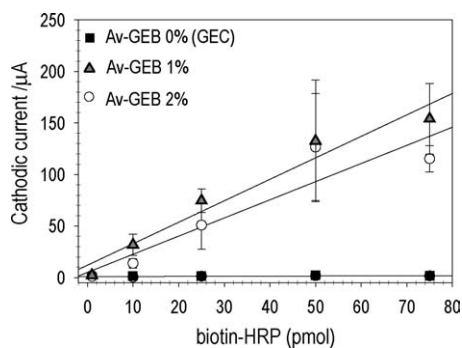


Fig. 3. Electrochemical characterization of Av–GEB 0% (GEC), Av–GEB (1%) and (2%) platforms by using biotinylated–HRP. All experiments were carried out in an aqueous 1.81 mM hydroquinone and 2.12 mM H_2O_2 in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 and 0.1 M KCl. Applied potential: -200 mV (vs. Ag/AgCl). The standard deviation of the signal values was obtained with different replicates. In all studies, $n = 3$.

response associated with the non-specific adsorption is also shown (square).

Due to the high electrochemical signal obtained from the biotinylated–HRP it was not possible to observe saturation of the avidin-binding sites as such a signal was beyond the range of the amperometric unit. In this study, the enzyme HRP is closer, almost in intimate contact, with the electrochemical transducer if compared to those genosensors and immunosensors in which the HRP was used as a marker. In those cases, the HRP is separated from the transducer by the dsDNA or the immunocomplex lengths. As such, the electron transfer rate in those cases was found to be lower.

In all the cases, it is possible to observe the excellent electrochemical features of the Av–GEB transducer and the lineal response under the addition of biotinylated molecules. Additionally, this study also demonstrates the high affinity biorecognition capacity of this affinity platform.

As it was not possible in this study to observe the saturation of the avidin-binding site by the biotin–HRP, both 1% (triangles up) and 2% (circles) Av–GEB showed similar electrochemical performance. On the contrary, others experiments (Williams et al., 2003; Zacco et al., 2004) with other biocomposite previously designed in our laboratories showed the dependence of the electrochemical performance of the biocomposite with the quantity of biomolecules within the biocomposite.

The non-specific adsorption using GEC as transducer under the same experimental conditions was also studied. Comparing the results obtained between the biocomposite (Av–GEB) and the composite (GEC), the non-specific adsorption of the biotinylated enzyme was found to be negligible (Fig. 3). In this study is again demonstrated the low non-specific adsorption showed by the graphite–epoxy composite, a fact previously remarked (Pividori et al., 2003). This is an important feature of this material to be highlighted for its use as a universal affinity platform. The non-specific adsorption was found to be approximately $2 \mu A$, all over the studied concentration range at these experimental conditions.

4.3. Electrochemical biosensing: the different strategies

The Av–GEB could be considered as an universal immobilization platform whereon biotinylated DNAs, ODNs, enzymes or antibodies can be captured by means of the highly affinity (strept)avidin–biotin reaction. The different strategies for electrochemical genosensing, immunosensing and enzymosensing based on this universal affinity biocomposite platform are schematically presented in Fig. 1.

4.3.1. Electrochemical DNA biosensing based on Av–GEB

The main objective of these experiments is to demonstrate that Av–GEB platform is useful for determining the *mecA* DNA sequence related with methicillin resistance *S*.

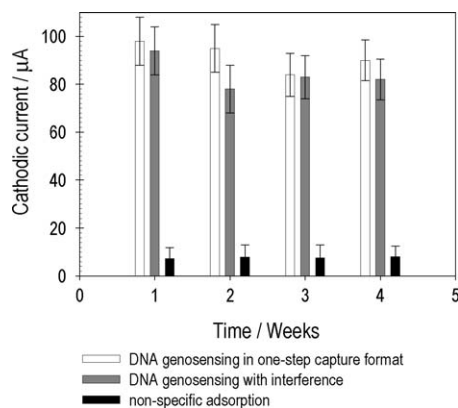


Fig. 4. Genosensor for detecting *mecA* gene in *S. aureus* in one-step capture format. *MecA* target, biotinylated capture probe and digoxigenin signaling probe: 150 nmol; immobilization and hybridization in one-step: 60 min, 42 °C. AntiDIG–HRP: 124.5 µg; enzymatic labeling: 60 min, 37 °C. For interference study, 150 nmol of two-mismatch digoxigenin signaling probe was also added. Other experimental conditions were as in Fig. 3 except for the applied potential: –250 mV (vs. Ag/AgCl). In all studies, $n = 4$.

aureus (MRSA) in a simpler and specific manner respect to previous DNA biosensing devices. For this reason, we designed an approach that requires only a one step hybridisation/immobilisation procedure (Williams et al., 2003). Fig. 4 shows that this genosensor design based on Av–GEB is able to successfully immobilize onto the electrode surface through a biotin–avidin interaction the *mecA* biotin labeled capture probe, while the hybridization with the *mecA* target and the *mecA* digoxigenin labeled probe is occurring at the same time.

Traditionally, products recovered from a PCR amplification procedure require a purification step (Jurinke et al., 1997) to remove any interference including the enzymes used throughout the reaction. Additionally, there is a problem associated with inaccurate amplification or amplification of additional DNA sequence in addition to the core gene. For these reasons a mismatch assay was carried out by including a DNA sequence which differed by two mismatch base-pairs. The intention of this assay was to establish the selectivity of the genosensor based on Av–GEB to a specific DNA sequence in the presence of a mismatch DNA sequence. Fig. 4 also shows that the DNA biosensor based on Av–GEB is capable to distinguishing between two DNA sequences which differ very marginally in the base-pairs. As can be seen the current response is similar to what was obtained for the non-mismatch assay.

4.3.2. Electrochemical immunosensing based on Av–GEB

One of the most important features in the immunosensor design is the proper choice of the immobilization method for keeping the affinity of the antibodies. Although it was possible to immobilized biotinylated antibodies directly on the surface of Av–GEB (results not shown) a more versatile

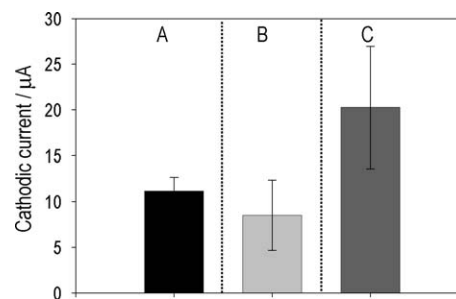


Fig. 5. Comparison between the different strategies for immunological biosensing based on protein G as universal affinity molecule. Dry adsorption of protein G on GEC (A). Single-point attachment of biotinylated protein G on Av–GEB (2%) electrodes in one incubation step (B) and in two incubation steps (C). Detailed experimental protocols are shown in Table 3. In all cases, the non-specific adsorption was evaluated omitting the incubation step with RIG. Other experimental details were as described in Fig. 3 ($n = 3$).

approach was achieved by immobilizing firstly biotinylated protein G. As protein G is able to link the Fc region of different antibodies, there is no need to modify the antibody with biotin. As an antecedent, we have previously demonstrated the utility of protein A biocomposite (ProtA–GEB) for the universal attachment of antibodies with different specificities (Zacco et al., 2004). As it was previously demonstrated for protein A, when the antibodies are immobilized through their Fc fragment to protein A (or G), their Fab binding sites are mostly oriented away from the solid phase.

In this case, the modification of the transducer with protein G was performed by two strategies, as shown in Fig. 1: (i) the direct adsorption of protein G onto GEC (Fig. 1B), and (ii) the immobilization of biotinylated protein G on Av–GEB (Fig. 1C). Detailed experimental protocols followed for the different assays are shown in Table 3. The bars shown in Fig. 5 represent the net signal coming from the difference between the biosensing signal and the non-specific adsorption signal.

Fig. 5A shows the results when a thick protein G layer was obtained by dry-adsorption in the surface of the GEC electrode, while Fig. 5C shows the results when biotin–protein G was immobilized through avidin/biotin reaction on Av–GEB surface. In both cases, the same immunological procedure was performed after the modification of the transducer with the protein G, as shown in Table 3. Taking into account that lower quantities of protein G are expected to be immobilized in the case of the assay performed with the Av–GEB biocomposite compared to the thick protein G layer adsorbed in the surface, higher response was obtained in the case of the Av–GEB biocomposite when comparing the results shown in Fig. 5A and C. These results confirm the better exposure of protein G when it was single-point attached through avidin/biotin reaction. As such, the binding sites are more available for the immunological reaction than when the protein G is randomly adsorbed onto the solid phase, i.e. the transducer.

Although in Fig. 5B and C, the modification of the Av–GEB transducer with protein G was achieved via the

biotin–avidin reaction, in Fig. 5B the immunological reaction was performed together with the immobilization of the protein G in one-step, while in Fig. 5C, the immobilization/immunological reactions were performed in a two successive step assay. The results demonstrate that a better coverage of the Av–GEB with protein G is achieved when a two-step assay was used. It could be related to the fact that bigger and more rigid immunological complex are more hindered to reach the avidin binding sites within the porous surface of the Av–GEB respect to the smaller immunocomplex not bound to protein G.

4.3.3. Electrochemical enzymosensing based on Av–GEB

Fig. 6 show results corresponding to the enzymosensing strategy based on renewable Av–GEB (1%) biocomposite modified with biotinylated enzymes.

Glucose biosensors are one of the most extensively studied biosensing devices because of the relatively high durability of the enzyme, typically glucose oxidase.

Moreover, the ever increasing demand for glucose determination creates an incentive to develop new strategies for its determination (Bakker, 2004). Fig. 6A shows the determination of glucose in different concentration range using the Av–GEB platform modified with different amount of biotin–glucose oxidase. A linear range of 0–3.5 mM was achieved. A resulting experimental detection limits as low as 0.05 mM was observed. These results confirm the high sensitivity of this device as far as its performance for the immobilization of the biotinylated enzyme. As the blood concentration of glucose is ranged between 300 and 700 mM, the developed glucose biosensor would be able to evaluate glucose in real samples in proper diluted samples. Moreover, as it can be seen in Fig. 6A, by controlling the amount of the immobilized biotin–glucose oxidase it is possible to achieved variable sensitivities in the biosensing devices. The utility of the Av–GEB platform for electrochemical enzymosensing was also demonstrated for the determination of hydrogen peroxide with biotin–HRP, as shown in Fig. 6B.

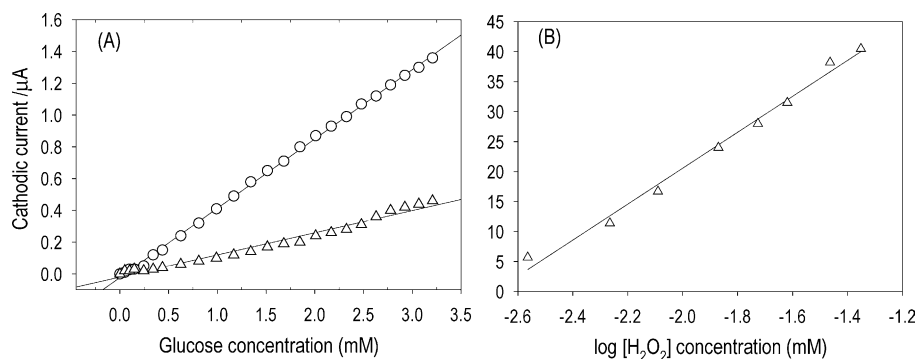


Fig. 6. (A) Enzymatic biosensing for the detection of glucose based on a renewable Av–GEB (1%) biocomposite; 100 pmol (circles) and 25 pmol (triangles up) of biotin–GOx were used. The electrochemical detection in this case was carried out in an aqueous saturated benzoquinone solution and with an applied potential of +300 mV. (B) Enzymatic biosensing for the detection of H₂O₂ based on a renewable Av–GEB (1%) biocomposite; 25 pmol of biotin–HRP was used. Other experimental details were as described in Fig. 3.

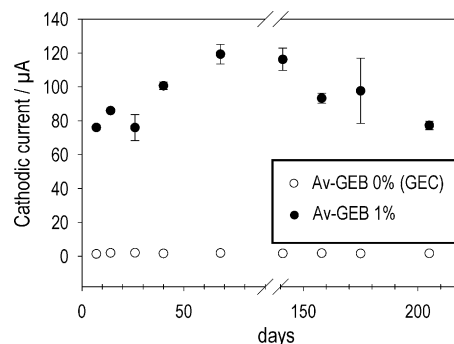


Fig. 7. Stability study of the Av–GEB (1%) over the time; 25 pmol of biotinylated HRP was used. Enzyme incubation 30 min, 37 °C. Other experimental details were as described in Fig. 3.

4.4. Stability of the Av–GEB platform

Due to the biological nature of these biocomposite electrodes, another important parameter that needs to be considered is their stability over time. As avidin is not chemically attached within the composite electrode, there is a possibility of either loss of stability or leaching during incubation or by washing solutions. Such phenomenon has been observed elsewhere for other carbon–polymer–biocomposite electrodes (Céspedes et al., 1996). The stability of these biocomposites was studied using replicates during almost seven months. All other experimental conditions were maintained constant. In all cases, the electrodes were polished prior to use exposing a fresh surface of avidin available for binding.

Fig. 7 shows comparatively the results using biotin–HRP in a one-step enzymatic labeling procedure for Av–GEB (1%) transducer and the evaluation of the non-specific adsorption with GEC transducers. As can be seen, for the Av–GEB (1%) transducers stored at 4 °C, a dramatic increase in the signal occurs for recently prepared devices (1 week) until week 4. After this time, ageing of the polymeric matrix up until week 4 that stabilize the signal and the material after this period of time could be occurred.

5. Conclusion

Graphite–epoxy composites (GEC) and biocomposites (GEB), widely studied by our research group, show excellent transducing features.

However, the practical features related with the use of a universal affinity molecule such as avidin as a bioaffinity agent embedded into bulk modified electrodes has never been previously demonstrated. The same Av–GEB was found to be a universal immobilization platform whereon different biotinylated molecules can be captured by means of avidin–biotin molecular recognition process. The versatility of Av–GEB as a universal immobilization platform by the attachment of ODNs, DNA, enzymes or antibodies was demonstrated. Moreover, the biological activity of the immobilized biomolecules was shown to be increased by this single point immobilization procedure.

The fact that the same biocomposite material could be used for the immobilization of many biomolecules is an important practical feature to be considered for the massive fabrications of electrochemical biosensing devices. Moreover, this material can be easily prepared through dry chemistry using procedures that can be transferred to mass fabrication establishing a clear advantage for the development of *biokits*. Additionally, the biosensor design based on Av–GEB fulfils the requirements desired for these devices: ease of preparation, robustness, sensitivity, low cost of production, ease of miniaturization and simple use and fast response.

As it was previously demonstrated, GEC materials have shown unique and selective adsorption behavior (Pividori and Alegret, 2005). While DNA, proteins, enzymes or other biomolecules are shown to be firmly and irreversible adsorbed on GEC under dry conditions, the wet adsorption of non-specific biomolecules was shown to be negligible under stirring or convection conditions in solution. Similarly, Av–GEB showed a negligible non-specific wet adsorption under stirring conditions, which can be attributed to the polymeric nature of the composite as well as the possibility to perform a gentle washing during the washing steps. Although dry-adsorption showed to be a good immobilization technique onto GEC (Pividori et al., 2003), avidin–biotin interactions are one of the strongest known protein–ligand interactions and should therefore withstand a stronger washing step.

The possibility of controlling the spatial resolution for the exposure of the affinity biomolecule by merely controlling its percentage in the composition of the biocomposite will be further study. Future research will be also focused on controlled spatial deposition of biomolecules (such as DNA and proteins) over the Av–GEB surface for the construction of multiplexed devices.

Acknowledgements

We thank the Ministerio de Educación y Ciencia de Madrid (Project BIO 2004-02776) for financial assistance.

María Isabel Pividori acknowledges the financial support from “Juan de la Cierva” Program from MEC, Madrid. Emanuela Zacco acknowledges the financial support from the Comissionat per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya.

References

- Akerstrom, B., Brodin, T., Reis, K., Bjorck, L., 1985. Protein-G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Immunol.* 135, 2589–2592.
- Amounas, M., Innocent, C., Cosnier, S., Seta, P., 2000. A membrane based reactor with an enzyme immobilized by an avidin-biotin molecular recognition in a polymer matrix. *J. Membr. Sci.* 176, 169–176.
- Bakker, E., 2004. Electrochemical sensors. *Anal. Chem.* 76, 3285–3298.
- Céspedes, F., Martínez-Fàbregas, E., Alegret, S., 1996. New materials for electrochemical sensing. I. Rigid conducting composites. *Trends Anal. Chem.* 15, 296–304.
- Compton, B.J., Lewis, M., Whigham, F., Gerald, J.S., Countryman, G.E., 1989. Analytical potential of protein-A for affinity-chromatography of polyclonal and monoclonal-antibodies. *Anal. Chem.* 61, 1314–1317.
- Darain, F., Park, S.-U., Shim, Y.-B., 2003. Disposable amperometric immunosensor system for rabbit IgG using a conducting polymer modified screen-printed electrode. *Biosens. Bioelectron.* 18, 773–780.
- Da Silva, S., Grosjean, L., Ternan, N., Mailley, P., Livache, T., Cosnier, S., 2004. Biotinylated polypyrrole films: an easy electrochemical approach for the reagentless immobilization of bacteria on electrode surfaces. *Bioelectrochemistry* 63, 297–301.
- Hoshi, T., Anzai, J.-I., Osa, T., 1995. Controlled deposition of glucose-oxidase on platinum-electrode based on an avidin–biotin system for the regulation of output current of glucose sensors. *Anal. Chem.* 67, 770–774.
- Janis, L.J., Regnier, F.E., 1989. Dual-column immunoassays using protein G affinity chromatography. *Anal. Chem.* 61, 1901–1906.
- Jones, M.L., Kurzban, G.P., 1995. Noncooperativity of biotin binding to tetrameric streptavidin. *Biochemistry* 34, 11750–11756.
- Jurinke, C., Van den Boom, D., Collazo, V., Lüchow, A., Jacob, A., Köster, H., 1997. Recovery of nucleic acids from immobilized biotin–streptavidin complexes using ammonium hydroxide and applications in MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* 69, 904–910.
- Katayama, Y., Ito, T., Hiramatsu, K., 2000. A new class of genetic element, *staphylococcus* cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1549–1555.
- Larsson, A., 1990. An ELISA procedure for the determination of protein G-binding antibodies. *J. Immunol. Meth.* 135, 273–275.
- Limoges, B., Savéant, J.-M., Yazidi, D., 2003. Quantitative analysis of catalysis and inhibition at horseradish peroxidase monolayers immobilized on an electrode surface. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 9192–9203.
- Lu, B., Smyth, M.R., O’Kennedy, R., 1996. Immunological activities of IgG antibody on pre-coated Fc receptor surfaces. *Anal. Chim. Acta* 331, 97–102.
- Luppa, P.B., Sokoll, L.J., Chan, D.W., 2001. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta* 314, 1–26.
- Oh, B.K., Chun, B.S., Park, K.W., Lee, W., Lee, W.H., Choi, J.W., 2004. Fabrication of protein G LB film for immunoglobulin G immobilization. *Mater. Sci. Eng. C: Biomimet. Supramol. Syst.* 24, 65–69.
- Pividori, M.I., Alegret, S., 2005. DNA adsorption on carbonaceous materials. In: Wittman (Ed.), *Immobilization of DNA on Chips*. Springer Verlag.

- Pividori, M.I., Merkoci, A., Alegret, S., 2001. Classical dot–blot format implemented as an amperometric hybridisation genosensor. *Biosens. Bioelectron.* 16, 1133–1142.
- Pividori, M.I., Merkoci, A., Alegret, S., 2003. Graphite–epoxy composites as a new transducing material for electrochemical genosensing. *Biosens. Bioelectron.* 19, 473–484.
- Reinecke, M., Scheper, T., 1997. Fast online flow injection analysis system for IgG monitoring in bioprocesses. *J. Biotechnol.* 59, 145–153.
- Snejdarkova, M., Rehak, M., Otto, M., 1993. Design of a glucose minisensor based on streptavidin glucose-oxidase complex coupling with self-assembled biotinylated phospholipid membrane on solid support. *Anal. Chem.* 65, 665–668.
- Song, J.M., Vo-Dinh, T., 2004. Miniature biochip system for detection of *Escherichia coli* O157:H7 based on antibody-immobilized capillary reactors and enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal. Chim. Acta* 507, 115–121.
- Valat, C., Limoges, B., Huet, D., Romette, J.-L., 2000. A disposable protein A-based immunosensor for flow-injection assay with electrochemical detection. *Anal. Chim. Acta* 404, 187–194.
- Williams, E., Pividori, M.I., Merkoçi, A., Forster, R.J., Alegret, S., 2003. Rapid electrochemical genosensor assay using a streptavidin carbon polymer biocomposite electrode. *Biosens. Bioelectron.* 19, 165–175.
- Yakovleva, J., Davidsson, R., Bengtsson, M., Laurell, T., Emneus, J., 2003. Microfluidic enzyme immunosensors with immobilised protein A and G using chemiluminescence detection. *Biosens. Bioelectron.* 19, 21–34.
- Zacco, E., Pividori, M.I., Llopis, X., del Valle, M., Alegret, S., 2004. Renewable protein A modified graphite–epoxy composite for electrochemical immunosensing. *J. Immunol. Meth.* 286, 35–46.
- Zatta, P.F., 1996. A new bioluminescent assay for studies of protein G and protein A binding to IgG and IgM. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 32, 7–13.



Electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of pesticides residues

Zacco E., Pividori M.I., Alegret S., Galve R., M.-P. Marco. *Analytical Chemistry*. 2006, 78: 1780-1788

Electrochemical Magnetoimmunosensing Strategy for the Detection of Pesticides Residues

E. Zacco,[†] M. I. Pividori,^{*,‡} and S. Alegret[†]

Sensors & Biosensors Group, Analytical Chemistry Division, Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain, and Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

R. Galve and M.-P. Marco

Applied Molecular Receptors Group (AMRg), IIQAB–CSIC, 08034 Barcelona, Catalonia, Spain

A novel electrochemical immunosensing strategy for the detection of atrazine based on magnetic beads is presented. Different coupling strategies for the modification of the magnetic beads with the specific anti-atrazine antibody have been developed. The immunological reaction for the detection of atrazine performed on the magnetic bead is based on a direct competitive assay using a peroxidase (HRP) tracer as the enzymatic label. After the immunochemical reactions, the modified magnetic beads can be easily captured by a magnetosensor made of graphite–epoxy composite, which is also used as the transducer for the electrochemical immunosensing. The electrochemical detection is thus achieved through a suitable substrate and mediator for the enzyme HRP. The electrochemical approach is also compared with a novel magneto-ELISA based on optical detection. The performance of the electrochemical immunosensing strategy based on magnetic beads was successfully evaluated using spiked real orange juice samples. The detection limit for atrazine using the competitive electrochemical magnetoimmunosensing strategy with anti-atrazine-specific antibody covalent coupled with tosyl-activated magnetic beads was found to be $6 \times 10^{-3} \mu\text{g L}^{-1}$ ($0.027 \text{ nmol L}^{-1}$). This strategy offers great promise for rapid, simple, cost-effective, and *on-site* analysis of biological, food, and environmental samples.

Pesticides represent a major hazard to public health throughout the world, due to the sheer volume of pesticide usage, coupled to their universal distribution, persistence in the environment, and toxicological properties. Atrazine has been one of the most widely used herbicides for the selective control of annual grasses and broad-leaved weeds. It was found to be a persistent environmental contaminant.¹ Because of their polarity, triazine herbicides are usually not absorbed to the soil but percolate through it causing

contamination of groundwater and surface waters. The methods generally used to measure pesticides and industrial pollutant residues are based on chromatographic techniques involving extraction and extensive purification procedures.^{2,3} Large sample volumes are often necessary to reach the required detection limits. Moreover, expensive and sophisticated equipment is needed, which must be run by experienced personnel.⁴ As a result, routine and efficient residue control by the official laboratories becomes problematic.

Food and environmental regulatory agencies have established control programs due to the increasing concern about the possibility that residues of those pesticides arrive to the consumer through food or through the contaminated environment. The European Community (EC), according to the Council Directives—86/362/EEC3 and 90/642/EEC4—has thus established the maximum levels (MRL, maximum residue limits) for pesticide residues. Member States are requested to regularly check the levels of pesticides in foodstuffs. Inspections and monitoring procedures should be carried out in accordance with the provisions giving by the Council Directives 89/397/EEC5 and 93/99/EC6. Moreover, and besides the national monitoring programs, the Commission Recommendation 2002/1/EC9 requests the participation of each Member State in a specific EU coordinated monitoring program. According to these requirements, and in order to protect the public health, official laboratories should be able to efficiently process a high number of samples. As a consequence, the development of rapid, inexpensive, sensitive, and high sample throughput and *on-site* analytical strategies, which can be used as an “alarm” to rapidly detect the risk of contamination by pesticides of water resources and a wide variety of food matrixes, such as fruit and fruit juices, vegetables, and other foodstuffs, are required.

Immunoassays (IAs) are analytical tests that use antibodies as specific recognition elements. The IA has proven to be one of the most productive technology contributions to medicine and fundamental life science research in the twentieth century for both

* To whom correspondence should be addressed. Permanent address: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. E-mail address: Isabel.Pividori@uab.es.

[†] Autonomous University of Barcelona.

[‡] University of Barcelona.

(1) Papiernik, S. K.; Spalding, R. F. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 749–754.

(2) Steinheimer, T. R. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 588–595.

(3) Kaune, A.; Brüggemann, R.; Sharma, M.; Ketttrup A. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 335–343.

(4) Cai, Z.; Wang D.; Ma W. T. *Anal. Chim. Acta.* **2004**, *503*, 263–270.

qualitative and quantitative analysis. A great number of research papers have appeared over the last years describing the development of novel IA strategies for detecting trace amounts of chemicals in environmental and food samples. An important number of IAs are commercially available now for pesticide detection.^{5,6} The U.S. Environmental Protection Agency (EPA) has validated some of these assays, which are included in the SW-846 method list.⁷

Magnetic beads are known to be a powerful and versatile tool in a variety of analytical and biotechnology applications.^{8–11} The use of magnetic beads greatly improves the performance of the immunological reaction, due to (i) an increase in the surface area, as well as (ii) the faster assay kinetics achieved because the beads are in suspension and the analytical target does not have to migrate very far. Moreover, the matrix effect is minimized due to the improved washing and separation steps despite this increased surface area. Additionally, the magnetic beads can be easily magnetically manipulated by using permanent magnets or electromagnets. Therefore, the analysis of samples performed on magnetic beads can be easily achieved without any pre-enrichment, purification, or pretreatment steps, which are normally necessary for standard methods.

Many immunological-based assays have been developed for the sensitive detection of atrazine in real samples,^{12–14} some of them commercially available magnetic particle-based assays.¹⁵

On the other hand, electrochemical sensors have revolutionized modern analysis because of their technical simplicity and speed in response by the direct transduction to an electronic equipment.^{16,17} Mass fabrication, low cost, and decentralized in-field analysis are other important features of electrochemical sensors. An electrochemical immunosensing strategy based on magnetic sensors is presented, as a rapid, sensitive, simple, inexpensive, and user-friendly analytical method against the classical assays for the detection of pesticides in food samples. This novel strategy combines the advantages taken from immunochemical assays, magnetic beads separation, and electrochemical transduction. The assay relies on the immunochemical reaction of the pesticide with its specific antibody immobilized on magnetic beads and the competition with the enzyme tracer. The modified magnetic beads are then captured by the magnetic field on the magneto-electrochemical sensor. Electrochemical detection is then

performed, and it is based on the activity of the enzyme tracer. As will be demonstrated, this novel electrochemical immunosensing strategy offers many potential advantages compared to the traditional methods for detection of pollutants as well as the classical immunological strategies or those immunosensors based on a surface-modified conducting phase.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals and Immunochemicals. Atrazine (2-chloro-4-(ethylamino)-6-isopropylamino-s-triazine), 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl), carbodiimide (EDCI), and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) were purchased from Sigma. All other reagents were of the highest available grade. Bradford solution (Bio-Rad protein assay Catalog No. 500-0006) was purchased from Bio-Rad laboratories GMGH (Munich, Germany). Preparation of the anti-atrazine antibody (Ab10) and of the enzyme tracer (*N*-(4-chloro-6-isopropylamin[1,3,5]triazin-2-yl)-4-butanoic acid coupled to horseradish peroxidase) has been described previously.¹² The preimmune antibodies (Abpre) were obtained from the antisera of nonimmunized white New Zealand rabbits. Antibodies were used after purification by ammonium sulfate precipitation¹⁸ as described in Supporting Information.

Materials. The graphite–epoxy composite was prepared using graphite powder with a particle size of 50 μm (BDH) and Epo-Tek H77 (epoxy resin) and hardener (both from Epoxy Technology). Magnetic particles modified with carboxyl groups (MP-COOH) were purchased from Estapor (Product No. 00-39, Merck). Tosylactivated magnetic beads (MB-Tosyl) (Dynabeads M-280 Product No. 142.03) were purchased from Dynal Biotech ASA (Oslo, Norway) as well as protein A modified magnetic beads (MB-ProtA) (Dynabeads Protein A Product No. 100.01). The filters were Millex-GV 0.22- μm filters (Millipore Corp., Bedford, MA).

Buffer Solutions. All buffer solutions were prepared with MilliQ water. Unless otherwise indicated, all the incubation steps were performed in PBST. The composition of the PBS solution was phosphate buffer 10 mmol L⁻¹, pH 7.5, with 0.8% (w/v) NaCl, while in PBST, 0.05% v/v Tween was also added.

Equipment. Amperometric measurements were performed with a LC-4C amperometric controller (BSA Bioanalytical Systems Inc.). A three-electrode setup was used comprising a platinum auxiliary electrode (Crison 52-67 1), double junction Ag/AgCl reference electrode (Orion 900200) with 0.1 M KCl as the external reference solution, and a working electrode (the magnetosensor). Voltammetric characterization was carried out using an Autolab PGSTAT Eco-chemie. Optical measurements were performed on a SpectramaxPlus microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The competitive curves were analyzed with a four-parameter logistic equation using the proper software (Genesys, LabSystems). The magnetic separation during the washing steps was performed using a magnetic separator Dynal MPC-S (Product No. 120.20, Dynal Biotech ASA) or 96-well plate separation rack (Product No. CD1001, Cortex Biochem). A scanning electron microscope (Hitachi S-570, Tokyo, Japan) is used to study the distribution of the magnetic beads on the electrode surface.

Construction of Magneto Graphite–Epoxy Composite (m-GEC) Electrodes. Graphite powder and epoxy resin were

- (5) Oubiña, A.; Ballesteros, B.; Carrasco, P. B.; Galve, R.; Gascón, J.; Iglesias, F.; Sanvicens, N.; Marco M. P. In *Simple Handling and Trace Analysis of Pollutants*; Barceló, D., Ed.; Elsevier B.V.: Amsterdam, 2000; Chapter 7.
- (6) Ballesteros, B.; Barceló, D.; Dankwardt A.; Schneider P.; Marco M. P. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *475*, 105–115.
- (7) U.S. Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/>.
- (8) Richardson, J.; Hawkins, P.; Luxton, R. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 989–993.
- (9) Seydack, M. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2454–2469.
- (10) Matsunaga, T.; Okamura, Y. *Int. J. Nanosci.* **2002**, *1*, 383–389.
- (11) Lawruk, T. S.; Gucco, A. M.; Mihaliak, C. A.; Dolder, S. C.; Dial, G. E.; Herzog, D. P.; Rubio, F. M. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2913–2918.
- (12) Gascón, J.; Oubiña, A.; Ballesteros, B.; Barceló, D.; Camps, F.; Marco, M. P.; González-Martínez, M. A.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, A. *Anal. Chim. Acta* **1997**, *347*, 149–162.
- (13) Schneider, P.; Hammock, B. D. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 525–530.
- (14) Bushway, R. J.; Perkins, B.; Savage, S. A.; Lekousi, S. L.; Ferguson, B. S. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1989**, *42*, 899–904.
- (15) www.abraxiskits.com.
- (16) Alegret, S. In *Integrated Analytical Systems*; Alegret, S., Ed.; Comprehensive Analytical Chemistry Vol. XXXIX; Elsevier B.V.: Amsterdam, 2003; Chapter 1.
- (17) Keay, R. W.; McNeil, C. J. *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 963–970.

- (18) Manson, M. M., Ed. *Immunochemical Protocols*; Methods in Molecular Biology 10; Humana Press: Totowa, NJ, 1992.

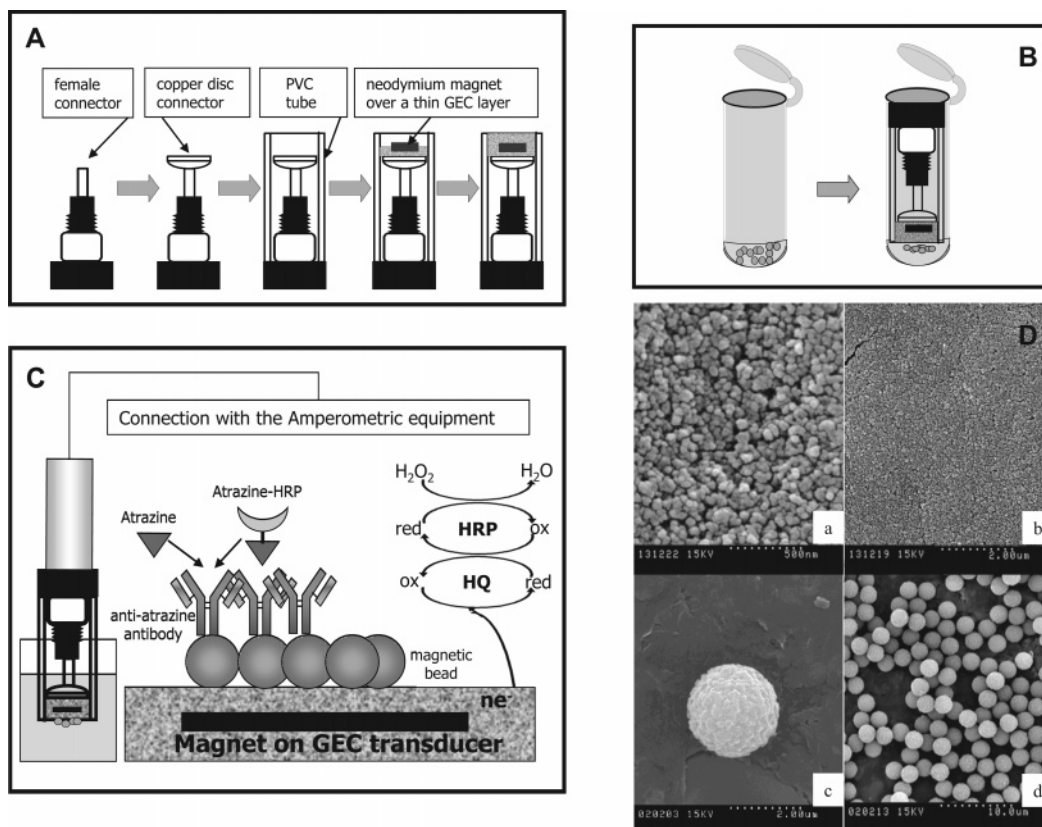


Figure 1. Schematic representation of the electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of atrazine. (A) Preparation of the m-GEC electrode. (B) After the immunoreaction, the antibody-modified magnetic beads were captured for the m-GEC electrode. (C) Chemical reactions occurring at the m-GEC surface polarized at -0.150 V (vs Ag/AgCl) upon the addition of H_2O_2 in the presence of mediator (HQ). (D) Scanning electron microphotographs of carboxylated magnetic particles (MP-COOH) (a, b) on the surface of sensors taken at 0.5 and 2 μm of resolution, respectively; and tosylated magnetic beads (MB-tosyl) (c, d) taken at 2 and 10 μm of resolution, respectively. Identical acceleration voltage (15 kV) was used in all cases.

hand-mixed in a 1:4 (w/w) ratio. This mixture was thoroughly hand-mixed to ensure the uniform dispersion of the graphite powder throughout the polymer. The schematic representation of the construction of the m-GEC electrode is shown in Figure 1A. The resulting paste was placed to a depth of 3 mm in a cylindrical PVC sleeve body (6-mm i.d.) with a copper plate as electrical contact. For preparation of the m-GEC electrode, a small neodymium magnet (3-mm i.d.) was placed into the center of this electrode after the addition of a thin layer of composite paste in order to avoid direct contact between the magnet and the electrical connector (Figure 1A). After filling the electrode body gap completely with the soft paste, the electrode was tightly packed. The m-GEC electrodes were cured at 90 $^\circ\text{C}$ for 3 days in order to obtain a rigid composite (Figure 1A). Before each use, the electrode surface of the m-GEC electrodes were renewed by a simple polishing procedure, wetted with double-distilled water, and then thoroughly smoothed with abrasive paper and then with alumina paper (polishing strips 301044-001, Orion).

Antibody Binding to the Magnetic Beads. Antibodies were covalently coupled to MP-COOH and MB-Tosyl magnetic beads while MB-ProtA magnetic beads were modified by affinity interactions through the Fc part of the antibodies. The covalently modified magnetic beads were stable for at least three months if stored at 4 $^\circ\text{C}$, while MB-ProtAs were immediately used after the attachment of the antibody. Information of how the covalent or affinity

modification of the antibodies was performed can be found in Supporting Information.

In all cases, three different pools of modified magnetic beads (MP-COOH, MB-Tosyl, MB-ProtA) were prepared: (i) with the specific Ab10 antibody; (ii) with the nonspecific antibody (Abpre); and (iii) without any antibody, only treated with the corresponding coupling buffer. The efficiency of the coupling strategies was evaluated by the Bradford test¹⁹ analyzing the protein concentration in the supernatant before and after the conjugation. The assay was performed by comparing the samples with a standard curve achieved with a reference IgG reagent.

Competitive Assay Using a Magneto-ELISA Procedure. Optimal concentrations of the enzymatic tracer and the antibody-modified magnetic beads were chosen to produce a signal ranging from 0.7 and 1 absorbance units in 30 min by performing a two-dimensional assay. Further experimental information is provided in Supporting Information.

The competitive assay was performed in microtiter plates, and all the referred quantities are "the amounts added per well". After each incubation or washing step, the magnetic beads were separated from the supernatant on the side wall by using a magnet—positioned under the microtiter plate. Atrazine standard solutions (50 $\mu\text{L}/\text{well}$) in PBST (from 0.0032 to 1000 nmol L^{-1})

(19) Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.

were mixed with 50 μL of the Ab10 modified magnetic bead suspensions (10 μg of MP-COOH, 2.5 μg of MB-Tosyl, and the modified MB-ProtA prepared as described in Supporting Information) followed by the addition of the enzyme tracer. In the case of MP-COOH and MB-Tosyl, 50 μL of 0.075 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enzyme tracer was added, while for MB-ProtA, 50 μL of 0.15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enzyme tracer was used. The competitive immunological reaction was allowed to proceed with gentle shaking for 30 min at room temperature. The magnetic beads were then washed with 150 μL of PBST three times. After that, 100 μL of substrate solution (0.004% v/v hydrogen peroxide and 0.01% w/v 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine in 0.04 mol L^{-1} citrate buffer) were added and the plates incubated again for 30 min at room temperature. The enzymatic reaction was stopped by adding 50 μL of 4 mol L^{-1} H_2SO_4 . The final solutions were separated from the magnetic beads and added to a different plate for the absorbance measurements at 450 nm. The nonspecific signal was also measured using the magnetic particles modified with the preimmune antibodies Abpre. The standard curve was fitted to a four-parameter logistic equation according to the formula $y = (A - B/[1 - (X/C)D]) + B$, where A is the maximal absorbance, B is the minimum absorbance, C is the concentration producing 50% of the maximal absorbance, and D is the slope at the inflection point of the sigmoid curve.

Competitive Assay Using the Electrochemical Magneto-immunosensing Strategy. Optimal concentrations of the enzyme tracer and the antibody-modified magnetic beads were chosen to produce an amperometric signal ranging from 4 to 8 μA in 30 min by performing a two-dimensional assay in 2-mL Eppendorf tubes. Further experimental information is provided in Supporting Information. The competitive assay was performed in 2-mL Eppendorf tubes, and all the referred quantities are the amounts added per tube. After each incubation or washing step, the magnetic beads were separated from the supernatant on the side wall by placing the Eppendorf tubes in a magnet separator until the beads migrated to the tube sides and the liquid was clear.

The competitive assay was performed by mixing 50 μL of atrazine standard solutions (from 0.0032 to 1000 nmol L^{-1}) with 50 μL of the Ab10 modified magnetic bead suspensions (25 μg of MP-COOH, 10 μg of MB-Tosyl, and the modified MB-ProtA prepared as described in Supporting Information) followed by the addition of the enzyme tracer. In the case of MP-COOH, 50 μL of 0.075 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enzyme tracer was added, while for MB-Tosyl and MB-ProtA, 50 μL of 0.15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enzyme tracer was used. The competitive immunological reaction was allowed to proceed with gentle shaking for 30 min at room temperature. The magnetic beads were then washed with 150 μL of PBST three times. Finally, the beads were resuspended in 160 μL of PBST and captured by dipping the m-GEC into the tubes, as shown in Figure 1B. The amperometric signal was determined by using the m-GEC as a working electrode and by dipping the three-electrode setup in 20 mL of 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer/0.1 mol L^{-1} KCl, pH 7. The electrochemical signal was recorded after the addition of the mediator (hydroquinone, 1.81×10^{-3} mol L^{-1}) and the enzyme substrate (hydrogen peroxide, 2.12×10^{-3} mol L^{-1}). The response was determined by polarizing the working electrode surface (m-GEC) at -0.150 V (Figure 1C). This working potential was previously optimized (as further explained in the Electrochemical Magneto Immunosensing Strategy section). Hydroquinone was

used as mediator in order to decrease the working potential.²⁰ Hydrogen peroxide was used as the substrate for peroxidase at a concentration to ensure that all of the enzyme molecules have substrate bound. At this concentration of substrate, V_{max} —the enzymatic maximum rate regarding the Michaelis–Menten model—and thus a greater electrochemical signal, was achieved.

Figure 1C also shows the reactions that occur at the m-GEC surface polarized at -0.150 V (vs Ag/AgCl) upon H_2O_2 addition in the presence of hydroquinone (HQ). The standard curve was fitted to a four-parameter logistic equation according to the formula described for the magneto-ELISA procedure.

SEM Characterization of m-GEC Modified with the Magnetic Beads. The scanning electron microscopy (SEM) technique was used to evaluate the distribution of the magnetic beads on the surface of the m-GEC. For this purpose, after the capture of the magnetic beads by the m-GEC electrode, SEM was performed. The same acceleration voltage (15 kV) but different resolutions (10, 2, and 0.5 μm) were used.

Electrochemical Magnetoimmunosensing Strategy. Electrochemical Characterization and Optimization. Reproducibility Study. The electrochemical characterization was first performed by cyclic voltammetry of the m-GEC and using HQ as electroactive indicator in order to obtain an estimation of the optimum applied potential. The m-GEC surface modified or not with a layer of magnetic beads was compared with a GEC transducer. The applied potential window scanned by cyclic voltammetry was from -0.75 to 1.25 V (vs Ag/AgCl). After that, the optimum applied potential for the electrochemical magnetoimmunosensing strategy was determined. To achieve this purpose, the assay was performed with 50 μL of MP-COOH/Ab10 modified magnetic particles (25 μg) in 2-mL Eppendorf tubes. The controls were performed using MP-COOH/Abpre. The magnetic particles were incubated with 50 μL of the enzyme tracer solution (0.05 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in PBST.


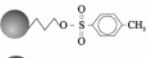

The immunological reaction was allowed to proceed with gentle shaking for 30 min at room temperature. The magnetic beads were then washed and captured with the m-GEC electrode, as previously explained. The amperometric response was determined at the following working potentials: -0.200 , -0.150 , -0.100 , and -0.050 V (vs Ag/AgCl). Finally, the reproducibility of the competitive electrochemical magnetoimmunosensing strategy was performed by using a batch of three different m-GEC polarized at -0.150 V (vs Ag/AgCl).

Electrochemical Magnetoimmunosensing Measurements. Samples. Bottled samples such as drinking water and orange juice were obtained from a local retail store and characterized regarding pH and conductivity. Water samples were directly measured. The orange juice samples were first adjusted to pH 7.5, diluted five times with PBST, and filtered through 0.22- μm filter before measurement.

Matrix Effect Studies. Standard curves were prepared with each sample—diluted and undiluted with PBST—and measured with the magneto-ELISA and the electrochemical magnetoimmunosensor. Both strategies were performed with MB-Tosyl modified with the Ab10-specific antibodies. The standard curves were compared with the same curves prepared in PBST.

(20) Williams, E.; Pividori, M. I.; Merkoci, A.; Forster, R. J.; Alegret, S. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *19*, 165–175.

Table 1. Comparison of the Technical Properties and the Main Features of the Magnetic Beads

Magnetic Particles	Size (μm)	Polymer nature/Composition	Ferrite (%)	Surface activation	Surface Active Group	Antibody Coupling Strategy	Active chemical functionality	Ab Coupling Efficiency (%)
MP-COOH [®]	0.196	Polystyrene	50	EDCI/NHS		Covalent Binding	0,155 mmol/g	39
MB-Tosyl [®]	2.8	Polystyrene	15	No required		Covalent Binding	0.1-0.2 mmol/g	92
MB-ProteinA [®]	2.8	Polystyrene	15	No required		Affinity Binding	Variable	N.D. ^a

^a Not determined.

Accuracy Studies. On the other hand, four different PBST and orange juice solutions spiked with atrazine (0.5, 1, 2, and 4 nmol L⁻¹ for PBST and 0, 10, 20, and 50 nmol L⁻¹ for orange juice) were prepared and measured using the electrochemical magnetoimmunosensing strategy.

RESULT AND DISCUSSION

Efficiency of the Antibody Coupling to the Magnetic Beads. Two different magnetic beads (MP-COOH, MB-Tosyl) were used for covalent coupling of the specific anti-atrazine purified antibody Ab10. The primary amino function of the antibodies reacted directly through a SN2 reaction with the MB-Tosyl beads, while covalent bonding to the carboxylic groups of the MP-COOH particles was achieved through the formation of an amide bond by using carbodiimide as activator. Finally, the attachment of the specific Ab10 antibody to the MB-ProtA particles was achieved through the specific affinity to the protein A for the Fc part of the rabbit antibody molecules.^{21–24} The advantages of this last strategy are the proper orientation of the antibody binding sites and the potential wide applicability of this immunosensing approach to other antibody molecules.²⁵ Table 1 shows comparatively the characteristics of three different magnetic beads (MP-COOH, MB-Tosyl, MB-ProtA) and the antibody bonding yield estimated by the analysis of the protein content in the supernatant before and after the immobilization procedure. As can be observed, bonding to the MB-Tosyl (92%) was higher than to the MP-COOH beads (39%). These yields could not be taken as an indication of their further performance in the magnetoimmunosensing due to the different features (as the size and composition) of the magnetic beads. The differences in sizes (2.8 μm vs 200 nm) or in the chemical activation could explain the differences in the coupling efficiency. However, the three types of beads were then evaluated by the magnetoimmunosensing strategy.

SEM Characterization of m-GEC Modified with the Magnetic Beads. The SEM technique was used to provide qualitative information about structure, size, and distribution of magnetic beads MP-COOH and MB-Tosyl on the surface of the m-GEC. Figure 1D(c, d) shows the uniform size, the shape, and the smooth surface of the magnetic beads (MB-Tosyl) taken with two

resolutions, while Figure 1D(a, b) shows the smaller nanometer-sized of the magnetic particles (MP-COOH). Moreover, the magnetic particles were heterogeneous in size (ranging from 100 to 200 nm) and shape.

Magneto-ELISA and Electrochemical Magnetoimmunosensing Strategy. In the competitive assay, the enzyme tracer competes with the atrazine for the antigen binding sites of the antibody. The sensitivity in a competitive immunoassay is determined by the affinity of the antibody for the specific antigen. Low detection limits can be obtained when appropriate assay conditions are chosen.¹² Optical and electrochemical two-dimensional experiments were performed in order to select optimum concentrations for both the antibody-modified magnetic beads and the enzyme tracer for the immunochemical competitive assays (magneto-ELISA and magnetoimmunosensor). From the two-dimensional experiments performed as shown in Supporting Information, the following parameters have been chosen to be tested in further competitive assays for both optical and electrochemical detection: (i) MP-COOH ranging from 10 to 25 μg ; (ii) MB-Tosyl from 2.5 to 10 μg ; and (iii) MB-ProtA from 4 to 12 μg , incubated with 50 μL of Ab10 antibodies ranging from 0.16 to 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Two enzyme tracer concentrations were chosen: 0.075 and 0.15 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

First, MP-COOH magnetic particles modified with the specific antibody were evaluated. An increasing amperometric response from 3.8 to 8 μA was recorded when the amount of MP-COOH/Ab10 particles increased from 10 to 25 μg . On the contrary, no increment was observed with the MP-COOH/Abpre while the nonspecific signal remained at $\sim 2 \mu\text{A}$. Under the same conditions (25 μg of MP-COOH and 50 μL of 0.075 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enzyme tracer), a specific signal of $\sim 5.5 \mu\text{A}$ was achieved although a decrease over the time was observed. A stabilization of the electrochemical signal in 3 μA was reached after two weeks. A release of the antibodies from magnetic particles over time due to noncovalent binding of the antibodies to the bead surfaces, a reorganization of the antibodies in the solution, or the nonspecific interaction of the antibodies with the BSA present in the storage buffer could be potential reasons for this decrease in the signal. In contrast, the electrochemical signal of the Ab10 modified MB-Tosyl magnetic beads remained constant at $\sim 8 \mu\text{A}$ over the time with an excellent signal-to-noise ratio (10 μg of MB-Tosyl/Ab10 particles and 50 μL of 0.15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enzyme tracer). Finally, the MB-ProtA magnetic beads were also evaluated. A maximum signal of 6 μA was achieved with a good electrochemical signal-to-noise ratio when the electrochemical magnetoimmunosensing strategy

(21) Hjelm, H.; Hjelm, K.; Sjöquist, J. *FEBS Lett.* **1972**, *28*, 73–76.

(22) Palmer, S. *Am. Biotechnol. Lab.* **2002**, *20*, 58–60.

(23) Heelan, B. *Methods Mol. Med.* **2000**, *40*, 281–288.

(24) Zatta, P. J. *Biochem. Biophys. Methods* **1996**, *32*, 7–13.

(25) Zacco, E.; Pividori, M. I.; Llopis, X.; Del Valle, M.; Alegret, S. *J. Immunol. Methods* **2004**, *286*, 35–46.

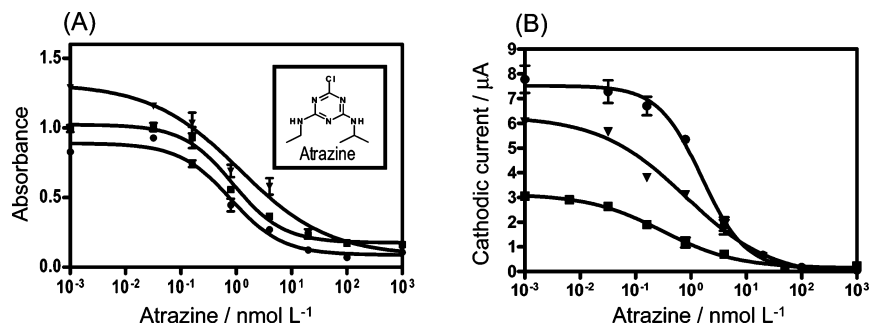


Figure 2. Competitive immunoassays for the determination of atrazine, performed with the magneto-ELISA procedure (A) and with the electrochemical magnetoimmunosensing strategy (B). Each graph shows the response obtained using the three different types of magnetic beads evaluated in this work. (■) MP-COOH, (●) MB-Tosyl, and (▼) MB-ProtA. In all cases, $n = 3$. Further experimental details are explained in the text and in Table 2.

Table 2.

(A) Magneto-ELISA Immunoassay Features Using the Different Types of Magnetic Beads ^a						
	MB (μg)	A_{max}	A_{min}	IC_{50} (nmol L^{-1}) ^b	linear range (nmol L^{-1})	LOD (nmol L^{-1}) ^c
MP-COOH	10	1.025	0.175	0.74 ± 0.39	0.23–4.08	0.11 ± 0.01
MB-ProtA	4	1.319	0.081	1.16 ± 0.38	0.11–1.59	0.04 ± 0.02
MB-Tosyl	2.5	0.890	0.087	0.80 ± 0.44	0.14–3.74	0.03 ± 0.02
(B) Electrochemical Magnetoimmunosensing Strategy Features Using the Different Types of Magnetic Beads ^a						
	MB (μg)	I_{max}^d	I_{min}^d	IC_{50} (nmol L^{-1}) ^e	linear range (nmol L^{-1})	LOD (nmol L^{-1}) ^f
MP-COOH	25	3.004	0.177	0.30 ± 0.01	0.04–2.87	0.02 ± 0.01
MB-ProtA	12	6.174	0.206	0.80 ± 0.40	0.38–5.43	0.03 ± 0.03
MB-Tosyl	10	7.152	0.110	1.34 ± 0.24	0.08–7.7	0.03 ± 0.07

^a The values have been extracted from the four-parameter equation used to fit the standard curves shown in Figure 2A and B, respectively. In all cases, $n = 3$. ^b IC_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$): MP-COOH = 0.16; MB-ProtA = 0.25; MB-Tosyl = 0.17. ^c LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$): MP-COOH = 20×10^{-3} ; MB-ProtA = 9×10^{-3} ; MB-Tosyl = 6×10^{-3} . ^d I is the cathodic current. ^e IC_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$): MP-COOH = 0.06; MB-ProtA = 0.17; MB-tosyl = 0.29. ^f LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$): MP-COOH = 4×10^{-3} ; MB-ProtA = 6×10^{-3} ; MB-Tosyl = 6×10^{-3} .

performed with 12 μg of MB-ProtA, 50 μL of 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ab10 antibody, and 50 μL of 0.15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enzyme tracer.

After the optimization of the reagent quantities for both the magneto-ELISA and the electrochemical magnetoimmunosensing strategies, the competitive assays were performed by varying the amount of atrazine pesticide. Figure 2A shows the competitive curves obtained with the magneto-ELISA using the different specific antibody Ab10-modified magnetic beads when plotting absorbance versus atrazine concentrations. Excellent results were accomplished with IC_{50} values ranging from 0.16 to 0.25 $\mu\text{g L}^{-1}$ and LODs between 6×10^{-3} and 20×10^{-3} $\mu\text{g L}^{-1}$ depending on the type of magnetic beads used. Table 2A shows other immunoassay parameters extracted from the four-parameter equation used to fit the standard curves. Similarly, Figure 2B shows the corresponding standard curves obtained with the electrochemical magnetoimmunosensing strategy when plotting the electrochemical signal values obtained versus the atrazine concentrations. As shown in Table 2B, results obtained by both methods are very similar, with IC_{50} values ranging from 0.06 to 0.29 $\mu\text{g L}^{-1}$ and LODs between 4×10^{-3} and 6×10^{-3} $\mu\text{g L}^{-1}$ depending on the type of magnetic beads used. Although the detection limits were good in all cases, the assays using the MB-Tosyl/Ab10 magnetic beads showed the best features regarding stability over time and the signal-to-nonspecific adsorption ratio. For this reason, MB-Tosyl/

Ab10 beads were chosen for further evaluation of the electrochemical magnetoimmunosensing strategy with real samples.

Electrochemical Magnetoimmunosensing Strategy. Electrochemical Characterization and Optimization. Reproducibility Study. Cyclic voltammograms of m-GEC with and without magnetic beads over the surface in 1.81×10^{-3} mol L^{-1} hydroquinone phosphate buffer solution are shown in Figure 3A. The purpose of cyclic voltammetry experiments was to characterize, rapidly and simply, the electrochemical behavior of the new m-GEC sensor comparatively with a GEC electrode commonly used in our laboratories.^{26,27} Moreover, the approximate location of the reduction potential of benzoquinone (HQox) can be rapidly established. It is known that in the presence of a partially blocked electrode the value for the peak-to-peak separation will increase, with the oxidation peak moving in a more positive direction and the reduction peak moving in a more negative direction.²⁸ As shown in Figure 1D, the surface of the m-GEC electrode is completely covered with a monolayer of magnetic beads. However, no shift in potential is observed with compared m-GEC with and

(26) Ramirez-García, S.; Alegret, S.; Céspedes, F.; Forster, R. J. *Analyst* **2002**, *127*, 1512–1519.

(27) Céspedes, F.; Martínez-Fàbregas, E.; Alegret, S. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **1996**, *15*, 296–304.

(28) Herne, T. M.; Tarlov, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8916–8920.

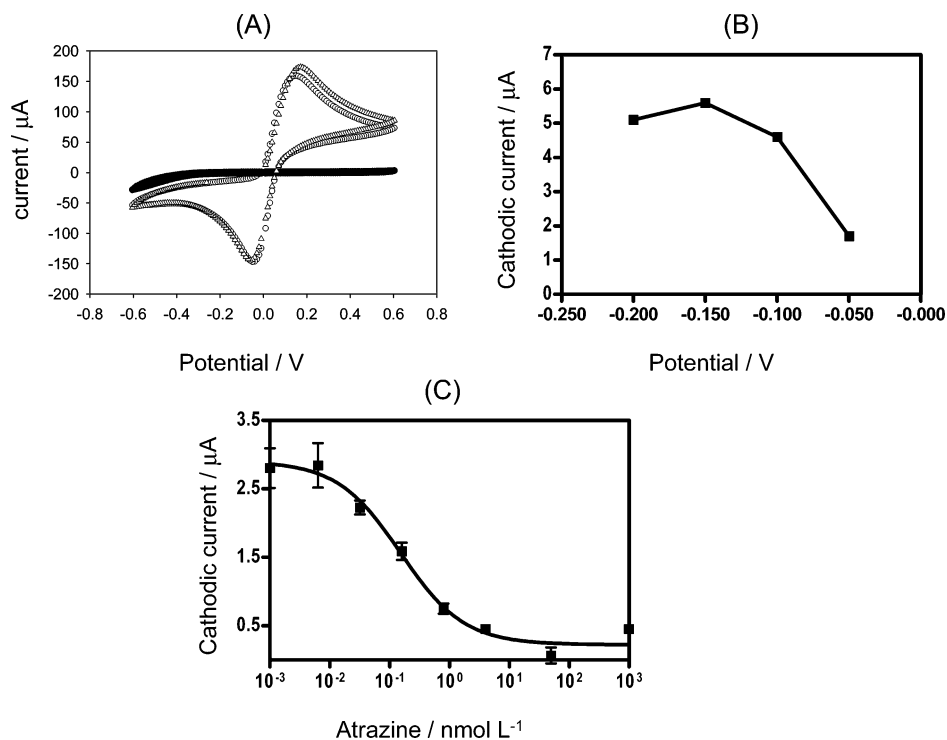


Figure 3. (A) Cyclic voltammograms of (Δ) m-GEC and (O) m-GEC submitted to the electrochemical magnetoimmunosensing strategy and modified with a monolayer of magnetic beads. The background signal without hydroquinone for m-GEC transducer is also shown (●). Medium: phosphate buffer 0.1 mol L^{-1} , KCl 0.1 mol L^{-1} , pH 7.0. Hydroquinone, $1.81 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ vs Ag/AgCl reference electrode, $v = 0.050 \text{ V s}^{-1}$ (B) Optimization of the working potential applied in the modified m-GEC when the electrochemical magnetoimmunosensing strategy is performed. The signal-to-noise ratio is shown, obtained with the MP-COOH beads modified with the Ab10-specific antibody as well as with the Abpre. Further experimental details are explained in the text. (C) Competitive curve obtained with a batch of three different m-GEC electrodes and MP-COOH/Ab10 modified magnetic beads.

without magnetic beads. Moreover, the magnet did not affect the electrochemical behavior of the electrodes if the cyclic voltammograms obtained with GEC and m-GEC are compared.^{20,25}

The applied potential serves as the driving force for the electron-transfer reaction of the electroactive species. The resulting current is a direct measure of the rate of the electron-transfer reaction. It is thus reflecting the rate of the recognition event and is proportional to the concentration of the analyte. Hydroquinone was extensively used in our laboratories as an electrochemical marker for different biosensing strategies.^{20,25,29} Optimization of the applied potential was performed by varying the potential around the potential for the HQ obtained by cyclic voltammetry. The electrochemical magnetoimmunosensing strategy was performed and the electrochemical detection was recorded at -0.050 , -0.100 , -0.150 , and -0.200 V (vs Ag/AgCl). Figure 3B shows the signal-to-nonspecific adsorption ratio obtained by comparing the signals with the MP-COOH modified with the Ab10-specific antibody in respect to the same beads treated with Abpre antibodies. The maximum ratio was achieved at -0.150 V (vs Ag/AgCl). This value was chosen as the optimal reduction potential for the competitive electrochemical magnetoimmunosensing strategy. Finally, a batch of three m-GEC electrodes were modified and used to make electrochemical magnetoimmunosensing measurements at -0.150 V (vs Ag/AgCl). The standard curve shown in Figure 3C is the average of three experiments

performed with three different electrodes. As shown in Figure 3C, good reproducibility was observed. The coefficient of variation value for the electrochemical response at different concentrations in the linear range is 17%. Fitting the results of the three experiments to a four-parameter equation provides an IC_{50} of $3.2 \times 10^{-3} \mu\text{g L}^{-1}$ and a LOD value of $0.32 \times 10^{-3} \mu\text{g L}^{-1}$. The excellent detection limit allows direct measurement of real samples such as water, juices, and other foodstuff in compliance with the actual European legislation. Moreover, the assay is very simple and uses very small sample volumes. Individual samples can be measured in just in $\sim 40 \text{ min}$.

Electrochemical Magnetoimmunosensing Strategy for Atrazine Determination in Real Samples. As a preliminary study, the electrochemical immunosensing strategy was used to measure bottled water and food samples. For this purpose, drinking water and orange juice bottled samples were obtained from a local retail store and used, on a first instance, to evaluate the extension of the potential nonspecific interferences. Figure 4 shows the standard curves obtained when measuring the real matrixes using the electrochemical magnetoimmunosensor compared to the curves obtained when measuring PBST buffer. For the case of bottled drinking water (Figure 4A), samples could be directly measured without any pretreatment. The low conductivity of these samples did not affect the electrochemical response of the sensor. As it can be observed, almost a perfect superposition with the reference curve prepared in buffer was achieved without any sample pretreatment. Similar results were obtained with the magneto-ELISA (data not shown). As the European legislation

(29) Santandreu, M.; Céspedes, F.; Alegret, S.; Martínez-Fàbregas, E. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2080–2085.

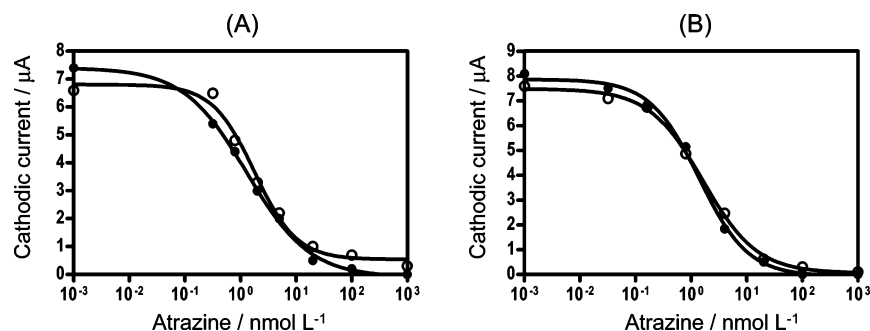


Figure 4. Results from the electrochemical magnetoimmunosensing strategy of real samples such as (A) bottled water and (B) commercial orange juice. In both cases, the comparison between the inhibition curves obtained with PBST buffer (●) and real spiked samples (○) are shown. Experiments were performed using MB-Tosyl/Ab10 modified particles. Further experimental details are explained in the text.

Table 3. Recovery Percentage in PBST and Orange Juice with MB-Tosyl/Ab10 Modified Particles

PBST buffer			orange juice		
real concn (nmol L ⁻¹)	found concn (nmol L ⁻¹)	recovery (%)	real concn (nmol L ⁻¹)	found concn (nmol L ⁻¹)	recovery (%)
0.5	0.79	159.2	0	1.48	
1	1.59	159.4	10	16.12	161
2	2.36	118.3	20	27.98	139.9
4	4.25	106.45	50	58.66	117.32

fixes the maximum level of atrazine at a value of $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$, the detection limit of the novel electrochemical magnetoimmunosensing strategy allows us to measure potable water samples according to the legislation.

In the case of orange juice, preliminary experiments performed with the magneto-ELISA demonstrated that nonspecific interferences can be easily eliminated by a very simple pretreatment of the sample, consisting of just adjusting the pH to 7.5 (the original pH of the sample was ~ 3.5), filtering the sample through a $0.2\text{-}\mu\text{m}$ filter, and diluting the filtrate 5 times with PBST.

As shown in Figure 4B, the curves obtained with pretreated orange juice samples are almost identical to those with PBST. Under these conditions, the limit of detection obtained with this sample is $25 \times 10^{-3} \mu\text{g L}^{-1}$, which is also below the MRL ($0.1 \mu\text{g L}^{-1}$) established by the actual European legislation.

Finally, and as a preliminary study of the immunosensor accuracy, spiked samples were prepared with the orange juice and measured with the electrochemical magnetosensing strategy. The recovery values are shown in Table 3. Although an overestimation of the spiked value is observed, results obtained are very close to the spiked values.

CONCLUSION

A novel electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of atrazine residues in real samples such as orange juice has been developed. The performance of the novel electrochemical magnetoimmunosensing strategy has been compared with a magneto-ELISA method using the same immunoreagents but with an optical measurement instead of the electrochemical signal. Similar detection limits were obtained in both cases. Anti-atrazine-specific antibodies have been successfully coupled to three different types of magnetic beads but differing in size, composition, and chemical functionality. With all types of beads,

excellent detection limits were achieved. However, the electrochemical signal was greater using the MB-Tosyl and the MB-ProtA beads, probably due to the higher antibody coupling efficiency. Covalent coupling of the antibodies provides a fair stable pool of Ab derivatized magnetic beads, allowing proceeding directly with the electrochemical measurements. As an alternative, MB-ProtA particles provide a flexible immunological platform whereon different antibodies with different specificities can be attached with a short incubation step (ranging from 10 to 30 min) immediately before using them.

The novel competitive electrochemical magnetoimmunosensing strategy can easily reach the required LOD for potable water ($0.1 \mu\text{g L}^{-1}$) and food samples (i.e., orange juice, MRL $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$) established by the European Community directives without any or with very simple sample pretreatments. Because of the simplicity of the immunochemical procedure presented here, this strategy can be suitable for fast semiquantitative and quantitative on-site analysis for the presence of atrazine (or atrazine immunoreactive herbicides) in the real samples. The fabrication of the m-GEC electrodes used in the design of this novel competitive electrochemical magnetoimmunosensing strategy can be easily transferred to industrial scale. The high sensitivity of this new material coupled with its compatibility with miniaturization and mass fabrication technologies (screen-printing techniques), makes them very attractive as user-friendly devices for quick and point-of-care analyses in industrial and environmental applications.

Future work will be focused on the possible application of such a method to screen-printed electrodes, allowing the development of disposable electrodes capable of a quantitative immunological detection, in a simple, low cost, and easy to manipulate manner.

ACKNOWLEDGMENT

Financial support from Ministry of Education and Science (MEC), Madrid (Project BIO2004-02776) and from the EC (IST-2003-508774) is acknowledged. E.Z. acknowledges the support received from the Comissionat per a Universitats i Recerca of the Generalitat of Catalonia (FI/2003-00455). M.I.P. acknowledges the financial support from Universidad Nacional del Litoral (Argentina). We thank Estapor for kindly providing magnetic bead samples to perform this study.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Received for review July 15, 2005. Accepted January 6, 2006.

AC0512610

SUPPORTING INFORMATION

Purification of the antibodies. The purification of the specific anti-atrazine serum and the preimmune serum were performed by the following method. A saturated solution of ammonium sulfate was added dropwise at 4 °C to 3 mL of serum to obtain a 45 % saturated solution. After 4 hours, the antibodies were precipitated and the supernatant was separated from the solid by centrifugation (4000 g, 10 min.). The solid was dissolved with 1.5 mL of PBS and dialyzed against PBS 0.5 mM (4 x 5 L) and milli Q water (1 x 5 L) at 6 °C, and subsequently the samples were lyophilized. A solution of the antibodies in PBS 20 mM were filtrated by passing them through a 0.45 µm filter and purified with a HiTrap Protein A HP column. Finally, the antibodies were dialyzed and lyophilized following the protocol above described obtaining around 10 mg of pure antibodies from the anti-atrazine serum (Ab10) and the preimmune serum (Abpre).

Covalent attachment of the antibodies to MP-COOH. 250 µl (50 mg mL⁻¹) of the magnetic particles were washed twice with phosphate buffer pH 6. A solution containing 45 mg of 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDCI, 50 mol) and 27 mg of N-hydroxysuccinimide (NHS, 50 mol) in 3 mL of phosphate buffer pH 6 was prepared and 2.5 mL of this solution was added to the magnetic particles. The mixture with the activating agent was shook for 15 min at room temperature. The magnetic particles were washed with in 1 mL of HCl 2 mM and resuspended in 1.48 mL of phosphate buffer 20 mM pH 7.5. For the antibody coupling to the magnetic beads step, 71 µl (5 mg mL⁻¹) of the antibody solution previously purified were added to the activated magnetic beads. The reaction was allowed to proceed for two hours at room temperature with gentle mechanical shaking to minimize the sedimentation of the particles. The beads were washed again three times with phosphate buffer 20 mM pH 7.5, and finally resuspended in phosphate buffer 20 mM pH 7.5 with 100 mM Glycine, 0.05 % (w/v) BSA, 0.02 % NaN₃ to reach a 50 mg mL⁻¹ stock solution. The coupling efficiency was evaluated by the Bradford test, analyzing the protein concentration in the supernatant after the covalent attachment. Before each assay, a volume of MP-COOH corresponding to the desired amount was washed with PBST and resuspended in a volume in order to obtain the correct amount of magnetic particle in 50 µL.

Covalent attachment of the antibodies to MB-Tosyl. 200 µl (30 mg mL⁻¹, approximately 2 x 10⁹ magnetic beads) were washed twice with 1 mL of borate buffer 0.1 M pH 8.5, avoiding foaming. The magnetic beads were resuspended in 380 µl of borate buffer 0.1 M pH 8.5. 120 µl (1 mg mL⁻¹) of the purified antibody was added. The beads were incubated 48 hours at room temperature with slow tilt rotation. The modified beads were then washed twice in PBS, 0.1 % (w/v) BSA for 5

minutes at 4 °C, and with Tris 0.2 M, pH 8.5, 0.1 % (w/v) BSA solution, for 24 hours at room temperature and finally, for 5 minutes at 4 °C in PBS, 0.1 % (w/v) BSA. Finally, the magnetic beads were resuspended in PBS, 0.1 % (w/v) BSA to reach a 12 mg mL⁻¹ stock dilution. The coupling efficiency was evaluated by the Bradford test, analyzing the protein concentration in the supernatant after the covalent attachment. Before each assay, a volume of MP-Tosyl corresponding to the desired amount was washed with PBST and resuspended in a volume in order to obtain the correct amount of magnetic beads in 50 µL.

Protein A mediated attachment of the antibodies to MB-ProtA. For the Magneto ELISA strategy, 50 µl per well of Protein A-modified magnetic beads (MB-ProtA, 40 mg mL⁻¹) (12 and 4 µg per well) in PBST 100 mmol L⁻¹ pH 8.1 is incubated in a microtiter plate with 50 µl of antibody ranging from 0.0625 to 2 µg mL⁻¹ in the same buffer. In the case of the electrochemical magneto immunosensing strategy, the modification was performed directly in 2 mL Eppendorf tubes but 50 µl per tube of MB-ProtA (4, 8, 12 and 24 µg) and 50 µl of antibody solution (0.5 to 2 µg mL⁻¹) PBST 100 mmol L⁻¹ pH 8.1 was used. In both strategies, the incubation was performed for 30 min at room temperature with gentle shaking. Immediately after the immobilization of the antibodies, the magnetic beads were employed for the immunological assay.

Optimization of the Magneto-ELISA procedure. The optimization of the Magneto-ELISA procedure was performed by a two-dimensional assay. The optimal concentrations of the enzyme tracer and the antibody-modified magnetic beads MPCOOH and MB-Tosyl were chosen to produce between 0.7 and 1 absorbance units in 30 min. For this purpose 50 µl of increasing amount of modified magnetic beads MPCOOH y MB-Tosyl (ranging from 0.3 to 50 µg) in PBST and 50 µl of enzyme tracer solution (ranging from 0.0125 to 0.8 µg mL⁻¹) were evaluated. The final volume of the reaction was 100 µl per well. Similarly, the optimal concentrations for the MB-ProtA with the antibody and tracer were chosen as it was described above. In that case, two step assays were performed. After a washing step, 50 µl per well of PBST buffer and 50 µl of enzyme tracer solution (ranging from 0.0125 to 0.8 µg mL⁻¹) were added and incubated for 30 min. After the washing steps, 100 µl of the substrate solution 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (0.01% w/v) and hydrogen peroxide (0.004% v/v) in citrate buffer 0.04 mol L⁻¹ was added and the plates were incubated again for 30 min at room temperature. The enzymatic reaction was stopped by 50 µl adding of 4 M H₂SO₄. The final solutions were separated from the magnetic beads and added to a different plate for the optical measurements.

Optimization of the electrochemical magneto immunosensing strategy. The optimal concentration of the enzyme tracer and the modified antibody magnetic beads MP-COOH and MB-Tosyl were chosen to produce between 4 to 8 µA of amperometric response in 30 min. For this purpose 50 µl of increasing amount of modified magnetic beads (ranging from 10 to 25 for MP-COOH, and from 2.5 to 10 µg for MB-Tosyl) and 50 µl of enzyme tracer solution ranging from 0.1 to 0.025 µg mL⁻¹, were evaluated. The final volume of the reaction was 100 µl. Similarly, the

optimal concentrations for the MB-ProtA, the enzyme label and the antibody were chosen as it was described above.

In that case, two-step assays were performed. Different amounts of ProtA-MB were evaluated (4, 8, 12 and 24 μg) in 50 μl of PBST 100 mmol L^{-1} pH 8.1 with increasing concentration of antibody (from 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in the same buffer. The reaction was performed for 30 min at room temperature. After a washing step in the same buffer, 50 μl of PBST and 50 μl of enzyme tracer (ranging from 0.05 to 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in PBST were also added and incubated for 30 min. After the washing and separation steps, the amperometric experiment were performed by dipping the three-electrode set up in 20 mL phosphate buffer 0.1 mol L^{-1} , KCl 0.1 mol L^{-1} pH 7 with hidroquinone $1.81 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ and hydrogen peroxide $2.12 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. The electrochemical signal was recorded immediately after addition of substrate (hydrogen peroxide) and mediator (hidroquinone). The electrochemical response was determined by polarizing the working electrode surface (m-GEC) at -0.150 V.

Electrochemical biosensing of pesticides residues based on biocomposite and immunocomposite platforms

Zacco E., Marco M.-P., Galve R., Alegret S., Pividori M.I. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006. En prensa. Disponible *on-line* desde el 7 de noviembre de 2006.



Electrochemical biosensing of pesticide residues based on affinity biocomposite platforms

E. Zacco^a, R. Galve^a, M.P. Marco^b, S. Alegret^{a,*}, M.I. Pividori^a

^a Grup de Sensors i Biosensors, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

^b Applied Molecular Receptors Group (AMRg), IIQAB-CSIC, 08034 Barcelona, Catalonia, Spain

Received 5 April 2006; received in revised form 17 July 2006; accepted 28 July 2006

Abstract

A novel and very sensitive electrochemical immunosensing strategy for the detection of atrazine based on affinity biocomposite transducers is presented. Firstly, the graphite–epoxy composite transducer was bulk-modified with different universal affinity biomolecules, such as avidin and Protein A. Two strategies for the immobilization of the anti-atrazine antibodies on both biocomposite transducers were evaluated: ‘wet-affinity’ and ‘dry-assisted affinity’ immobilization. Finally, the performance of a novel anti-atrazine immunocomposite bulk-modified with anti-atrazine antibodies was also evaluated. The better immobilization performance of the anti-atrazine antibodies was achieved by ‘dry-assisted affinity’ immobilization on Protein A (2%) graphite–epoxy biocomposite (ProtA(2%)-GEB) as a transducer. The immunological reaction for the detection of atrazine performed on the ProtA(2%)-GEB biosensors is based on a direct competitive assay using atrazine-HRP tracer as the enzymatic label. The electrochemical detection is thus achieved through a suitable substrate and a mediator for the enzyme HRP. This novel strategy was successfully evaluated using spiked orange juice samples. The detection limit for atrazine in orange juices using the competitive electrochemical immunosensing assay was found to be $6 \times 10^{-3} \mu\text{g L}^{-1}$ (0.03 nmol L^{-1}) thus this biosensing method accomplishes by far the LODs required for the European Community directives for potable water and food samples ($0.1 \mu\text{g L}^{-1}$). This strategy offers great promise for rapid, simple, cost effective, and on-site biosensing of biological, food, and environmental samples.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Graphite–epoxy biocomposite; Protein A; Avidin; Atrazine; Electrochemical biosensing; Immunoassay

1. Introduction

Atrazine has been one of the most widely used herbicides and a persistent environmental contaminant (Papiernik and Spalding, 1998). Because of their polarity, triazine herbicides usually cause contamination of groundwaters and surface waters. Food and environmental regulatory agencies have established control programs in order to avoid those pesticides to enter the food supply. The European Community (EC) has thus established the maximum residue limits (MRL) for pesticide residues. Mass fabrication, low cost, and decentralized in-field analysis are important features of electrochemical sensors to be considered as analytical methodology for the rapid detection of pesticides residues in environmental or food samples (Alegret, 2003). Besides electrochemical biosensing of pesticides, many

immunological-based assays have been developed for the sensitive detection of pollutants, including atrazine, in real samples (Schneider and Hammock, 1992). Numerous coupling strategies have been specially developed for the immobilization of antibodies on different surfaces – such as polystyrene microtiter plates for ELISAs or carbon transducer for electrochemical biosensing – through the formation of defined linkages with improved antibody orientation and binding capacity. One of them is based on avidin–biotin interaction (Wilchek and Bayer, 1988, 1990; Wilchek et al., 2006). ‘Chicken egg white’ avidin – a glycosylated and positively charged ($pI \sim 10.5$) protein – and its bacterial analogue streptavidin, share a similarly high affinity ($K_a \sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$) for the vitamin biotin (Green, 1990).

Another immobilization strategy is based on the antibody bonding through Fc fragment to Protein A or G. The bond strength – from strong to weak – between Protein A (or G) and an antibody is greatly affected by the antibody classes and subclasses (Sjoquist et al., 1972a,b; Akerstrom et al., 1985; Compton et al., 1989; Janis and Regnier, 1989; Larsson, 1990).

* Corresponding author. Tel.: +34 581 1976; fax: +34 581 2379.
E-mail address: salvador.alegret@uab.es (S. Alegret).

The interaction between Protein A of *Staphylococcus aureus* and the Fc region of IgG was mapped in some detail. The data suggested a binding site spanning the C γ 2–C γ 3 junction in the Fc region. The binding involves the formation of multiple non-covalent bonds between the Protein A and amino acids of the binding Fc site. Considered individually, the attractive forces (hydrogen and electrostatic bonds, van der Waals and hydrophobic forces) are weak by comparison with covalent bonds. However, the large number of interactions results in a large total binding energy in the case of IgG. Regarding other immobilization strategies for antibodies on solid supports such as adsorption or covalent cross-linking, both avidin–biotin and Protein A-based linkages promote the binding sites of the antibodies to be oriented away from the solid phase. However, as a difference with avidin, Protein A is able to link the Fc region of many immunoglobulins, thus it is not necessary to have the antibody modified with biotin. As an antecedent, we have previously demonstrated the utility of avidin (Av-GEB) (Zacco et al., 2006a) and Protein A biocomposite (ProtA-GEB) (Zacco et al., 2004) for the universal attachment of biotinylated biomolecules and antibodies with different specificities, respectively.

In this paper, novel electrochemical immunosensing platforms for the detection of atrazine based on affinity biocomposite are presented. A graphite–epoxy composite transducer was bulk-modified with universal affinity biomolecules, such as avidin (Av-GEB) and Protein A (ProtA-GEB), and the performance for the immobilization of the antibodies was evaluated with two strategies: (i) ‘wet’ and (ii) ‘dry-assisted’ affinity immobilization, i.e., affinity reaction in the presence or absence of water. Furthermore, a novel and specific immunocomposite directly bulk-modified with anti-atrazine antibodies (Ab_(anti-atrazine)-GEB) was also evaluated. Among all these novel transducers materials, the better immobilization performance of the anti-atrazine antibodies was achieved by ‘dry-assisted affinity’ immobilization on Protein A (2%) graphite–epoxy biocomposite. The sensitive detection of atrazine relies on the immunochemical reaction of the pesticide with its specific antibody immobilized on the transducer, and the competition with the enzyme tracer.

This novel electrochemical immunosensing strategy is a rapid, sensitive, simple, inexpensive, and user-friendly analytical method for the detection of pesticides in food samples.

2. Materials and instrumentation

Atrazine, Avidin (product number A9275), Protein A (Catalog No. P9151), BiotinTagTM (Catalog No. B-TAG) was purchased from Sigma. Bradford solution (Bio-Rad protein assay Catalog No. 500-0006) was purchased from Bio-Rad laboratories GMGH (Munich, Germany).

The graphite–epoxy composite and biocomposites were prepared using graphite powder with a particle size of 50 μ m (BDH, UK) and Epo-Tek H77 (epoxy resin) and hardener (both from Epoxy Technology, USA). Tween 20, hydroquinone, bovine serum albumin (BSA), were also purchased from Sigma. NaCl and hydrogen peroxide were purchased from Merck (Germany). All other reagents were of the highest grade available.

All buffer solutions were prepared with MilliQ water. When otherwise indicated the compositions of buffer were: (i) blocking buffer was phosphate buffer saline (PBS) 10 mmol L⁻¹, pH 7.5 with 0.8% (w/v) NaCl, 0.05% (v/v) Tween (PBST) and 0.5% BSA, (ii) washing buffer (PBST). All the incubation steps were performed in blocking buffer and the immunological reagents were prepared in the same buffer. The equipment for amperometric measurements was previously described (Zacco et al., 2006a).

3. Procedures

3.1. Preparation and Purification of the anti-atrazine antibodies and enzyme tracer

The Preparation of the anti-atrazine antibody and the enzyme tracer (*N*-(4-chloro-6-isopropylamin-[1,3,5]triazin-2-yl)-4-butanolic acid coupled to horseradish peroxidase) has been previously described (Gascón et al., 1997; Zacco et al., 2006b). The biotinylation of the specific anti-atrazine antibodies was performed as recommended by the commercial kit manufacturer and using biotinamido hexanoic acid 3-sulfo-*N*-hydroxysuccinide ester (Biotin-AC-SulfoNHS, BACSulfoNHS) (Wilchek and Bayer, 1990) as the labeling reagent. The protein content of the biotinylated fraction was evaluated by Bradford test (Bradford, 1976) giving a value of 5.7 mg mL⁻¹.

3.2. Construction of the biosensor based on the affinity biocomposite platform

The construction of ProtA-GEB (Fig. 1A_i) and Av-GEB (Fig. 1B_i) was previously described in detail (Zacco et al., 2004, 2006a). The Ab_(anti-atrazine)-GEB biosensor (Fig. 1E_i), was identically prepared, but in this case, the purified and lyophilized antibodies specific for atrazine were added to obtain a 1% (w/w) bulk-modified graphite–epoxy biocomposite (Ab_(anti-atrazine)-GEB).

Graphite–epoxy composite (GEC) electrodes without the biological modifier were also constructed for control assays. In all cases, the biocomposite material was cured at 40 °C for 1 week and when not in use the electrodes were stored at 5 °C. The reproducibility of the construction of the sensors based on GEC and the polishing procedure have been previously reported (Pividori et al., 2003).

3.3. Modification of the biosensors

Unless otherwise specified, the modification of the Av-GEB, ProtA-GEB, and Ab_(anti-atrazine)-GEB platform during immobilization, affinity reactions, enzymatic labelling, and washing steps were performed with the sensor dipped in 150 μ L of a solution previously equilibrated at room temperature in Eppendorf tubes (Fig. 1C). This volume was chosen purely because it corresponds to quantity required to ensure that the biosensor is fully immersed in the solution. All the modifications were performed under controlled temperature and gently shaking using an Eppendorf Thermomixer.

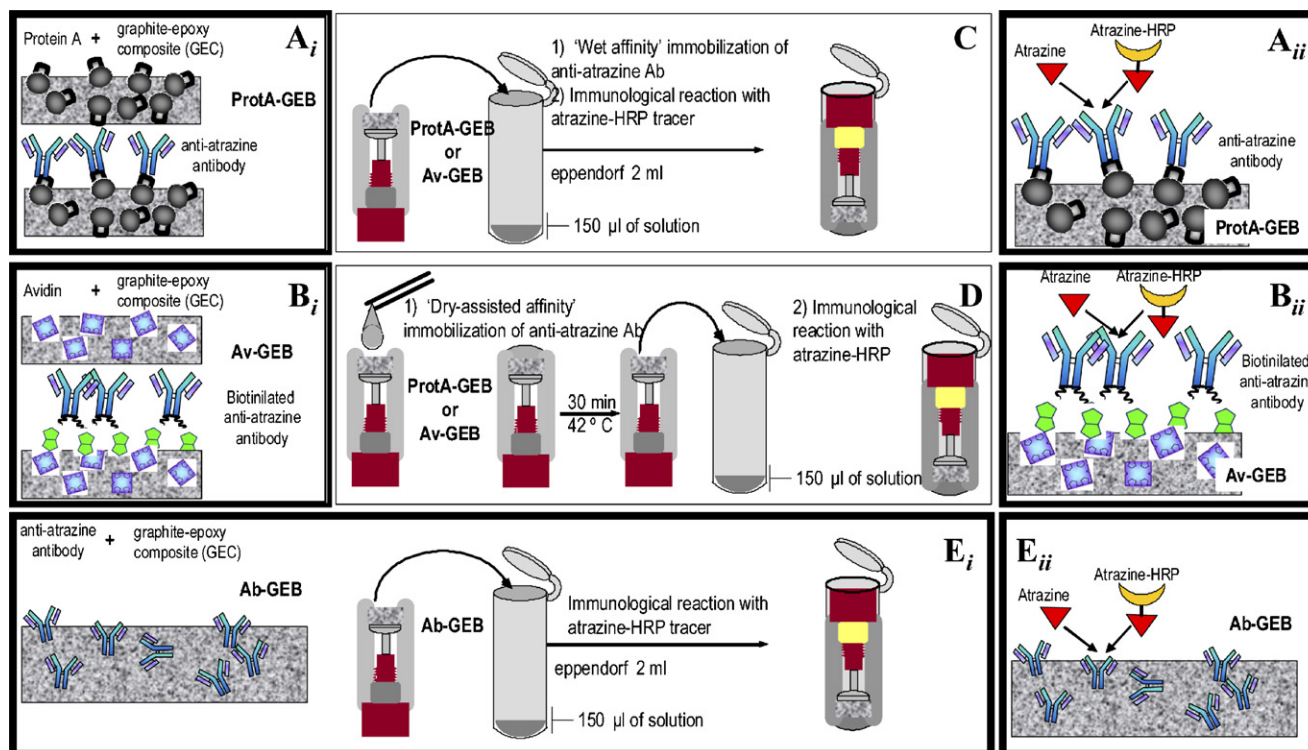


Fig. 1. The different biocomposite materials (protA-GEB, Av-GEB, Ab-GEB) and the different strategies for the immobilization of anti-atrazine antibodies on the surface of the electrochemical transducer for the electrochemical biosensing of atrazine.

3.4. Biosensor renewal

After each use, the ProtA-GEB, Av-GEB, and Ab_(anti-atrazine)-GEB electrodes were immersed in doubly distilled water and then polished, firstly with abrasive paper and then with alumina paper (polishing strips 301044-001, Orion, Beverly, MA, USA) giving a smooth mirror finish and exposing fresh Protein A, Avidin or anti-atrazine specific antibody, respectively, on the transducer surface.

3.5. Electrochemical immunosensing of atrazine: the different strategies

3.5.1. Immobilization of the anti-atrazine antibodies

Three different strategies for the immobilization of the antibodies on the biosensor were used, as shown in Fig. 1. The first one relies on ‘wet-affinity’ immobilization (Fig. 1C), and it was performed by dipping the electrodes (ProtA-GEB or Av-GEB) for 30 min at room temperature and with slight agitation in eppendorf tubes containing 150 µL of the non-modified or the biotinylated antibodies, respectively, in order to achieve the immobilization based on the affinity reaction on the surface of ProtA-GEB (Fig. 1A_{ii}) or Av-GEB (Fig. 1B_{ii}) electrodes, respectively. The second strategy relies on ‘dry-assisted affinity’ immobilization (Fig. 1D), and it was performed by adding 20 µL of the non-modified or the biotinylated antibodies to the surface of ProtA-GEB (Fig. 1A_{ii}) or Av-GEB (Fig. 1B_{ii}) electrodes, at 40 °C, until dryness (approximately for 30 min) under static conditions. The third strategy is based on the used of Ab_(anti-atrazine)-GEB (Fig. 1E_i) as immunosensing transducer. In

this case it is not necessary to proceed to the surface immobilization of the antibodies since they were retained on the bulk of the immunocomposite (Fig. 1E_{ii}). For the evaluation of the different immobilization strategies two kinds of controls were evaluated: (i) with the biocomposite (GEB) but treated with preimmune serum, in order to control and evaluated the non-specific adsorption and (ii) with GEC instead of the respective biocomposite, in order to evaluate the effectiveness of the immobilization strategy due to the affinity biomolecule.

3.5.2. Electrochemical determination

The amount of HRP-labeled immunocomplex on the electrode surface is related with the extent of immunological reaction occurring on the surface of the biosensor. The amount of HRP enzyme was thus determined by using an amperometric detection procedure. Experiments were performed in a 20 mL 0.1 M phosphate buffer, 0.1 M KCl, pH 7.0 with 1.81 mM of hydroquinone, 1.1 mM of hydrogen peroxide as previously reported (Pividori et al., 2001). The applied potential was -0.200 V (versus Ag/AgCl). These potentials were chosen using cyclic voltammetry experiments (results not shown).

3.5.3. Evaluation of the immobilization efficiency of anti-atrazine antibodies on ProtA-GEB

Protein A can be considered as a universal affinity molecule for the attachment of antibodies with different specificities, since Protein A is able to link the Fc region of many kind of antibodies (Sjoquist et al., 1972a,b). The first strategy for the immobilization of the anti-atrazine antibodies was thus based on the binding of the non-modified specific antibodies directly

Table 1
 Experimental details for the different biosensing strategies

Biocomposites	Antibodies immobilization	Steps	Reagents concentration	Experimental conditions
Av-GEB (1%) (Fig. 1B _i)	• Wet-affinity immobilization (Fig. 1C)	1. Antibodies incubation - Washing step - Fig. 1C 2. Tracer incubation - Washing step - Fig. 1C 3. Amperometric detection	• Antibodies: variable (~0.14 μg) • Tracer: variable (~0.01 μg)	- Blocking buffer*, 30 min, pH 7.5 - Washing buffer*, 5 min - Blocking buffer, 30 min, pH 7.5 - Washing buffer, 5 min
	• Dry-assisted affinity immobilization (Fig. 1D)	1. Dry absorption - Washing step - Fig. 1D 2. Tracer incubation - Washing step - Fig. 1D 3. Amperometric detection	• Antibodies: variable (~0.14 μg) • Tracer: variable (~0.01 μg)	- Blocking buffer*, 30 min, pH 7.5, 40 °C - Washing buffer*, 5 min - Blocking buffer, 30 min, pH 7.5 - Washing buffer, 5 min
ProtA-GEB (2–4%) (Fig. 1A _i)	• Wet-affinity immobilization (Fig. 1C)	1. Antibodies incubation - Washing step - Fig. 1C 2. Tracer incubation - Washing step - Fig. 1C 3. Amperometric detection	• Antibodies: variable (~0.5 μg) • Tracer: variable (~0.02 μg)	- Blocking buffer*, 30 min, pH 7.5 - Washing buffer*, 5 min - Blocking buffer, 30 min, pH 7.5 - Washing buffer, 5 min
	• Dry-assisted affinity immobilization (Fig. 1D)	1. Dry absorption - Washing step - Fig. 1D 2. Tracer incubation - Washing step - Fig. 1D 3. Amperometric detection	• Antibodies: variable (~0.5 μg) • Tracer: variable (~0.02 μg)	- Blocking buffer*, 30 min, pH 7.5, 40 °C - Washing buffer*, 5 min - Blocking buffer*, 30 min, pH 7.5 - Washing buffer*, 5 min
Ab10-GEB (1%) (Fig. 1E _i)	Bulk immobilization	2. Tracer incubation - Washing step - Fig. 1E _i 3. Amperometric detection	• Tracer: variable (~0.02 μg)	- Blocking buffer*, 30 min, pH 7.5 - Washing buffer*, 5 min

* The composition of the solution being used, is shown in ‘Materials and instrumentation’ section in the text.

on ProtA-GEB. The main advantage of this approach is that non-modified antibody can be directly immobilized on the transducer. Two strategies for the immobilization of non-modified anti-atrazine antibodies on ProtA-GEB were performed, as previously explained and detailed shown in Fig. 1A_i and Table 1: (i) ‘wet-affinity’ immobilization (Fig. 1C), and (ii) ‘dry-assisted affinity’ immobilization (Fig. 1D).

After the surface modification with the antibody, the biosensors were incubated with the enzyme tracer (Fig. 1A_{ii}), and finally, measured.

In both cases, a batch of six electrodes was studied: three of them modified with the specific anti-atrazine antibody, while the other three were treated with the preimmune serum, as a negative control.

Moreover the same assay was performed with GEC electrodes (the epoxy composite without Protein A) instead of

ProtA-GEB. In the case of the strategy based on ‘wet-affinity’ immobilization, two controls were performed, one of them without any pretreatment while the second one treated with the specific anti-atrazine antibody. In the case of the strategy based on ‘dry-assisted affinity’ immobilization, the controls with GEC were performed by dry adsorption on GEC of the specific anti-atrazine antibody, as well as the preimmune serum.

3.5.4. Evaluation of the immobilization efficiency of anti-atrazine antibodies on Av-GEB

The strong avidin–biotin affinity reaction is an efficient way to attach antibodies to an electrode surface. The second immobilization strategy of the anti-atrazine antibodies was thus based on the immobilization of the biotinylated specific antibodies directly on the surface of Av-GEB (Fig. 1B_i). Two strategies for the immobilization of biotinylated anti-atrazin antibodies on

Av-GEB were performed, as previously explained and detailed shown in Fig. 1 and Table 1: (i) ‘wet-affinity’ immobilization (Fig. 1C) and (ii) ‘dry-assisted affinity’ immobilization (Fig. 1D).

In both cases, after the surface modification with the antibody, the biosensors were incubated with the enzyme tracer (Fig. 1B_{ii}), and finally, measured, as explained in Table 1. In both cases, a batch of six electrodes was studied: three of them modified with the specific biotinylated anti-atrazine antibody, while the other three were treated with the preimmune serum previously submitted to the biotinylation treatment, as a negative control. Moreover, the same assay was performed with GEC electrodes as control (the epoxy composite without avidin) instead of Av-GEB.

3.5.5. Evaluation of the immobilization efficiency of anti-atrazine antibodies on Ab_(anti-atrazine)-GEB

Finally, the last strategy for immobilizing the specific anti-atrazine antibodies was based directly on the bulk modification of the composite in order to obtain an immunocomposite (Fig. 1E_i) (Santandreu et al., 1997). In this case, it is not necessary to proceed with the immobilization of the antibody as it was directly contained in the bulk of the electrochemical transducer. The enzymatic labeling step was thus directly carried out: the biosensors were incubated with the enzyme tracer (Fig. 1E_{ii}), and finally, measured, as explained in Table 1.

In this case, for the evaluation of the non-specific adsorption, GEC electrodes were treated as the Ab_(anti-atrazine)-GEB. Those electrodes were used to evaluate the non-specific adsorption coming from the non-specific interaction between the tracer enzyme (atrazine-HRP) and the graphite–epoxy composite material. The experimental conditions for the electrochemical determination based on the enzyme HRP were previously explained.

3.5.6. Electrochemical competitive immunosensing of atrazine based on ‘dry-assisted affinity’ immobilization of the anti-atrazine antibodies on ProtA-GEB

As ‘dry-assisted affinity’ (Fig. 1D) immobilization on ProtA-GEB was found to be the better strategy for attaching anti-atrazine antibodies, this strategy was used for further studies. A competitive immunoassay was used for the determination of atrazine, following the sequence shown in Fig. 1A_i, D, and A_{ii}.

Optimal concentrations of the enzyme tracer was chosen to produce an amperometric signal ranging from 4 to 8 μ A in 30 min by performing a two-dimensional assay in 2-mL Eppendorf tubes (results not shown) (Zacco et al., 2006b).

Firstly, the anti-atrazine specific antibody was immobilized on ProtA-GEB as previously explained in “Immobilization of the anti-atrazine antibodies” and in Fig. 1D.

After a washing step, the competitive assay was performed placing the modified ProtA-GEB biosensors with anti-atrazine antibodies in 2-mL Eppendorf tubes. The competitive assay was performed by mixing 50 μ L of atrazine standard solutions (from 0.0032 to 1000 nmol L⁻¹), 50 μ L of enzyme tracer (0.4 μ g mL⁻¹), and 50 μ L of blocking buffer in order to reach 150 μ L of solution for keeping the biosensors immersed in solu-

tion. The competitive immunological reaction was allowed to proceed with gentle shaking for 30 min at room temperature. The amperometric signal was determined as previously explained in “electrochemical determination”. The standard curve was fitted to a four-parameter logistic equation according to the formula $y = (A - B/[1 - (X/C)^D]) + B$, where A is the maximal amperometric signal, B the minimum amperometric signal, C the concentration producing 50% of the maximal amperometric signal, and D is the slope at the inflection point of the sigmoid curve.

3.5.7. Electrochemical competitive immunosensing of atrazine in real samples

Bottled orange juice were obtained from a local retail store and characterized regarding pH and conductivity. After spiked with the atrazine, the orange juice samples were adjusted to pH 7.5, diluted five times with PBST, and filtered through 0.22- μ m filter before measurement.

The matrix effect was evaluated by comparing the standard curves of the samples with the same curves prepared in PBST.

4. Results and discussion

4.1. Evaluation of the immobilization efficiency of anti-atrazine antibodies on ProtA-GEB

One of the most important features in the immunosensor design is the proper choice of the immobilization method for keeping the affinity of the antibodies. When the antibodies are immobilized through their Fc fragment to Protein A, their Fab binding sites are mostly oriented away from the solid phase (Zacco et al., 2004). As Protein A is able to link the Fc region of different antibodies, there is no need to modify the antibody with biotin.

Fig. 2A shows that ‘wet-affinity’ immobilization can be used for the corrected immobilization of anti-atrazine antibodies on ProtA-GEB. By comparing Fig. 2A[(a) with (b) and (c)] it is clearly reflected that the immobilization of the anti-atrazine antibody is due to the interaction with the Protein A and not due to the non-specific interaction of the antibody with the polymeric matrix (GEC). Moreover, Fig. 2A(d) demonstrated that the value of the non-specific adsorption is mostly due to the interaction of the enzyme tracer with the graphite–epoxy polymeric matrix (GEC).

Fig. 2B shows the performance of ‘dry-assisted’ affinity immobilization of anti-atrazine antibodies on ProtA(2%)-GEB. By comparing Fig. 2B[(a) and (b)] the anti-atrazine antibody is clearly immobilized and well-oriented on the ProtA-GEB transducer. In the case of ProtA(2%)-GEB modified with a preimmune serum, a thick antibody layer is expected to be formed on the transducer as the Protein A within the biocomposite is able to attach the Fc part of both specific or non-specific antibodies. This thick and compact layer of ‘non-specific antibody’ acts as a diffusion barrier; as such, the diffusion of the electroactive species from the solution to the electrochemical transducer is greatly prevented, and the electrochemical signal was lower (Pividori and Alegret, 2005). Moreover, the specific

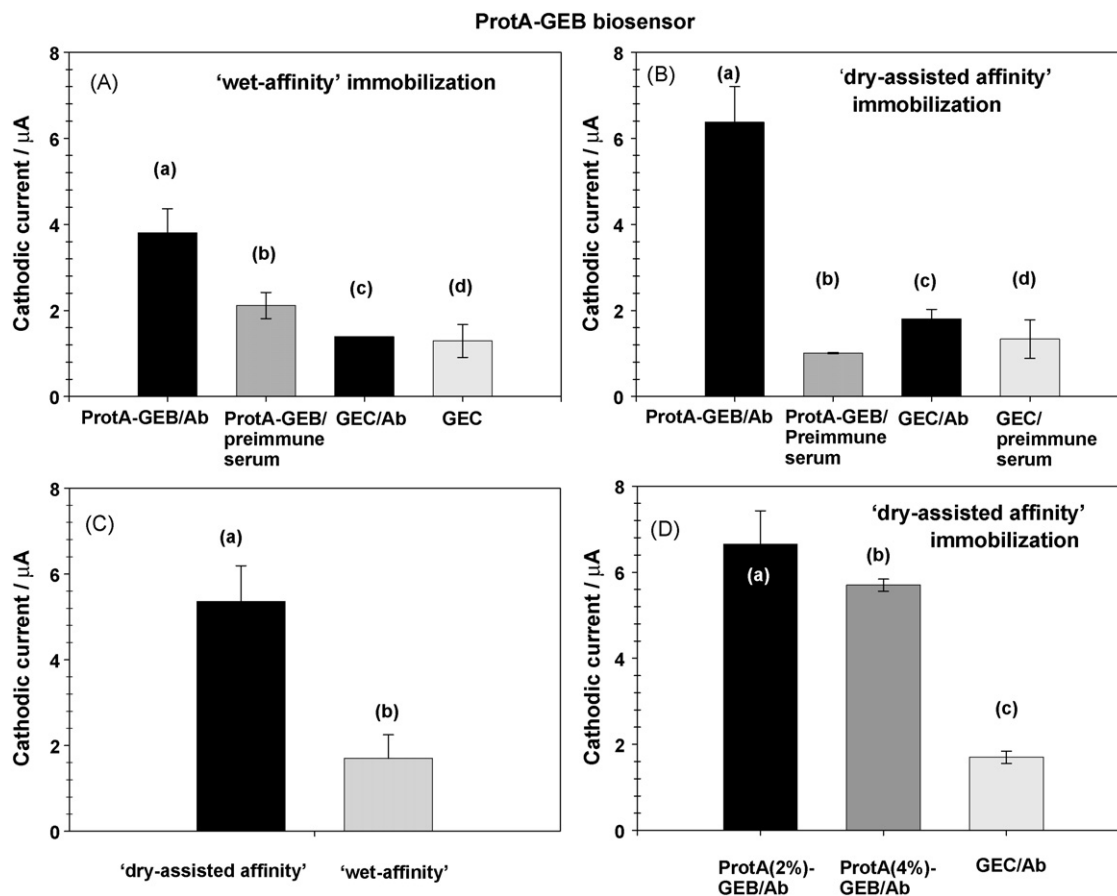


Fig. 2. Different strategies for the immobilization of anti-atrazine specific antibodies on ProtA(2%)-GEB. (A) ‘wet-affinity’ immobilization, on ProtA-GEB modified with 0.5 µg anti-atrazine antibodies (a) and preimmune serum (b); and GEC treated with 0.5 µg anti-atrazine antibodies (c) and without any treatment (only GEC with enzyme tracer) (d). (B) ‘dry-assisted affinity’ immobilization on ProtA-GEB modified with 0.5 µg anti-atrazine antibodies (a) and preimmune serum (b); and GEC treated with 0.5 µg anti-atrazine antibodies (c) and with preimmune serum (d). (C) ‘dry-assisted affinity’ immobilization (a) vs. ‘wet-affinity’ immobilization (b) net signals. (D) dry-assisted affinity strategy of 0.5 µg anti-atrazine specific antibodies on ProtA(2%)-GEB (a) and ProtA(4%)-GEB (b) and by dry adsorption on GEC (c). In all cases, the biosensors were further incubated with atrazine-HRP tracer (0.02 µg). All experiments were carried out in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 with 0.1 M KCl, 1.81 mM hydroquinone and 1.11 mM H₂O₂. Applied potential: –0.200 V (vs. Ag/AgCl). In all cases, n = 3.

antibody is clearly dry-adsorbed on GEC [Fig. 2B(c) versus (d)], as many other biomolecules that were previously dry-adsorbed on GEC (Protein G, Protein A, IgG, DNA, Avidin) (Zacco et al., 2003, 2006a). However, dry adsorption on GEC does not provide a well-oriented layer of specific antibodies [Fig. 2B(c)], while ‘dry-assisted’ affinity immobilization on ProtA-GEB provides a compact and well-oriented layer of specific antibodies [Fig. 2B(a)]. Fig. 2C compares the net signal (signal to non-specific adsorption) obtained with ‘wet’ and ‘dry-assisted’ affinity immobilization strategies, i.e., in the presence and absence of water, respectively. As Fig. 2C shows, a better specific antibody layer was obtained with dry-assisted affinity immobilization. It can be explained because of the nature of the bond between Protein A and the Fc part of the antibody (Sjoquist et al., 1972a,b; Akerstrom et al., 1985; Compton et al., 1989; Janis and Regnier, 1989; Larsson, 1990). Among the different kind of binding forces (hydrogen bonding, electrostatic forces, van der Waals, and hydrophobic bonds), the later may contribute up to half the total strength of the bond. Hydrophobic bonds rely on the association of non-polar, hydrophobic groups so that contact with water molecules is minimized. The results confirm that

the absence of water (i.e., ‘dry-assisted’ affinity immobilization) favor the hydrophobic bonds, and renders the binding capacity of the biocomposite higher than in the case of ‘wet-affinity’ immobilization.

The Protein A content could adversely affect the overall electrochemical performance of a given biocomposite. This parameter was previously optimized (Zacco et al., 2004). Fig. 2D shows that increasing the percentage of Protein A from 2 to 4% in the biocomposite adversely affected the electrochemical response due to the decrease in conductivity. As a result, ProtA(2%)-GEB electrodes were used for all further experiments. Fig. 2D(c) shows the control when the anti-atrazine antibodies were dry-adsorbed on GEC. By comparing the signal it is clearly demonstrated that the presence of Protein A greatly improved the orientation of the antibodies. These results confirm again the better exposure of specific anti-atrazine antibody when it was single-point attached through Protein A interaction. As such, the binding sites are more available for the immunological reaction than when the specific antibody is randomly adsorbed onto the solid phase, i.e., the transducer.

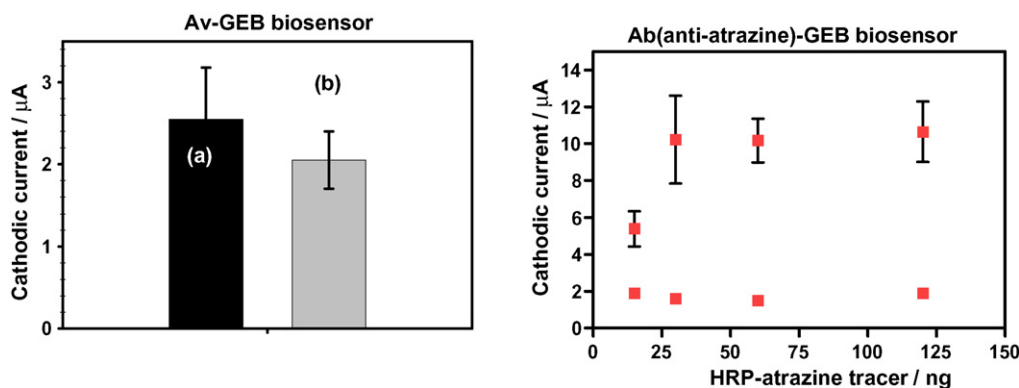


Fig. 3. (left) Different strategies for the immobilization of 0.14 μg biotinylated anti-atrazine specific antibodies on Av(1%)-GEB. by 'dry-assisted affinity' immobilization (a) vs. 'wet-affinity' immobilization (b). The net signals are shown, and taken from the non-specific adsorption control made with the same sensors modified with preimmune serum. All biosensors were then incubated with atrazine-HRP tracer (0.01 μg). (right) Immobilization of anti-atrazine specific antibodies within the bulk of the biocomposite Ab(anti-atrazine 1%)-GEB. The biosensors were then incubated with atrazine-HRP tracer ranging from 0 to 0.125 μg . All other conditions were the same as for Fig. 2. In all cases, $n = 3$.

4.2. Evaluation of the immobilization efficiency of anti-atrazine antibodies on Av-GEB

The Av-GEB could be considered as an universal immobilization platform whereon biotinylated antibodies can be captured by means of the highly affinity (strept)avidin-biotin reaction ($K_a \sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$). Fig. 3 (left) shows that, although a higher signal was obtained with dry-assisted affinity immobilization, the performance of wet and dry-assisted strategies for immobilizing biotinylated antibodies on Av-GEB are almost the same. This could be explained because of the high K_a between avidin-biotin. Although a great influence of water in the immobilization efficiency of antibodies through the Protein A was found, such effect was not observed for the avidin-biotin interaction. The nature of the bonding depending on avidin showed to be not as dependent on hydrophobic bonds as in the case of Protein A.

4.3. Evaluation of the immobilization efficiency of anti-atrazine antibodies on Ab(anti-atrazine)-GEB

The anti-atrazine antibodies can be directly included in the formulation of the biocomposite. In this approach, the proper

orientation of the antibody can be an issue. Fig. 3 (right) shows that the anti-atrazine antibody is available for the immunological reaction. A 'plateau' in the amperometric signal was observed with 0.025 μg of enzyme tracer, while the non-specific signal showed to be low (almost negligible) and constant for all the concentration range of enzyme tracer. However, the biocomposite surface showed to be different after each surface renewal step, according to the reproducibility of the assay showed in Fig. 3 (right) (RSD higher than 15% for Ab-GEB versus less than 8% for ProtA-GEB). As a result, the availability of the antibodies binding site on the surface is not always reproducible in the immunocomposite, suggesting that the antibodies are randomly oriented, and not always available in the same rate for the immunological reaction.

4.4. Electrochemical competitive immunosensing of atrazine based on 'dry-assisted affinity' immobilization of the anti-atrazine antibodies on ProtA-GEB

Since 'dry-assisted affinity' immobilization on ProtA-GEB was found to be the better strategy for attaching anti-atrazine antibodies, it was used for further studies. A competitive

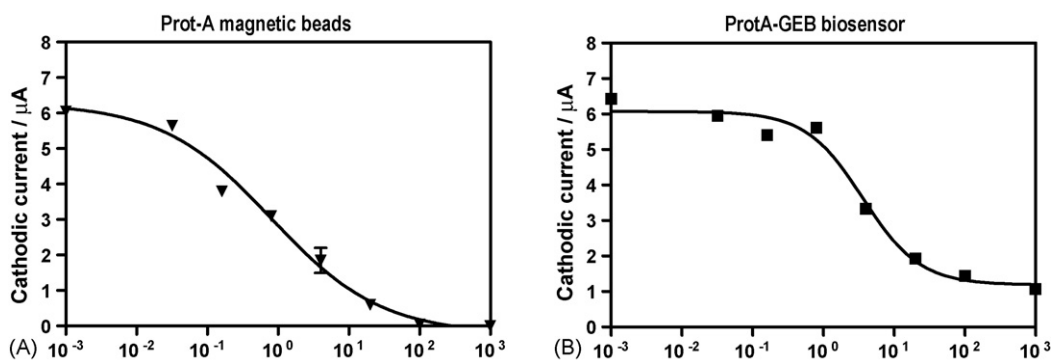


Fig. 4. Competitive immunoassays for the determination of atrazine, performed with the electrochemical magnetoimmunosensing strategy with 12 μg of Protein A magnetic beads (A) and with an electrochemical biosensing strategy based on ProtA-GEB platforms with 'dry-assisted affinity' immobilization of the anti-atrazine antibodies (0.5 μg) on ProtA(2%)-GEB (B). Further experimental data for (A) is explained in Zacco et al. (2006b). (B) The biosensors were incubated with 0.02 μg of atrazine-HRP tracer. In all cases, $n = 3$.

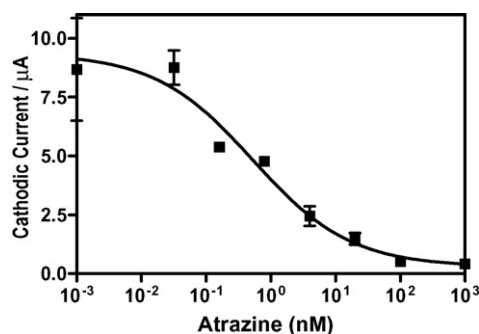


Fig. 5. Competitive immunoassays for the determination of atrazine in spiked orange juice samples, based on ‘dry-assisted affinity’ immobilization of the anti-atrazine antibodies (0.5 µg) on ProtA(2%)-GEB. The biosensors were then incubated with 0.02 µg of atrazine-HRP tracer. In all cases, $n = 3$. Further experimental details are explained in the text and in Table 1.

immunoassay was used for the determination of atrazine in PBST buffer. Fig. 4 shows the corresponding standard curve for the detection of atrazine on ProtA(2%)-GEB and also shows the main features for this strategy. As can be seen, the atrazine can be easily detected in PBST buffer, showing IC_{50} values of 3.6 nmol L^{-1} and the linear range between 0.7 and 13.5 nmol L^{-1} while the LOD was found to be 0.17 nmol L^{-1} (0.037 µg L^{-1}). Similar results were found with the electrochemical magneto immunosensing strategy with Protein A modified magnetic beads (Zacco et al., 2006b and Fig. 4), showing that the immunological reaction is achieved in similar rate over the ProtA-GEB biocomposite as well as in the surface of Protein A magnetic beads which are known to minimize the matrix effect.

4.5. Electrochemical competitive immunosensing of atrazine in real samples

Fig. 5 shows the standard curve obtained when measuring the spiked orange juice with the ‘dry-assisted affinity’ immobilization of the anti-atrazine antibodies on ProtA(2%)-GEB. This preliminary experiments demonstrated that non-specific interferences can be eliminated in part by a very simple pretreatment of the sample, consisting of just adjusting the pH to 7.5 (the original pH of the sample was ~ 3.5), filtering the sample through a 0.2-µm filter, and diluting the filtrate five times with PBST.

As shown in Fig. 5, the atrazine can be easily detected in orange juice since the curves obtained with pretreated orange juice samples are similar to those with PBST, showing IC_{50} values of 0.5 nmol L^{-1} and the linear range between 0.08 and 6.07 nmol L^{-1} while the LOD was found to be 0.03 nmol L^{-1} ($6 \times 10^{-3} \text{ µg L}^{-1}$). As the European legislation fixes the maximum level of atrazine at a value of 0.1 µg L^{-1} , the detection limit of the novel electrochemical immunosensing strategy based on ‘dry-assisted affinity’ immobilization of the anti-atrazine antibodies on ProtA(2%)-GEB allows us to measure real samples according to the legislation.

5. Conclusion

A novel electrochemical immunosensing strategy for the detection of atrazine residues in real samples such as orange

juice has been developed. Anti-atrazine specific antibodies have been successfully surface-immobilized on both avidin and Protein A modified graphite–epoxy biocomposite (Av-GEB and protA-GEB, respectively). Moreover, the anti-atrazine specific antibodies have been bulk-immobilized on an immunocomposite specific for the detection of atrazine. However, ProtA-GEB has been used in further analysis since better reproducibilities were achieved and it is not necessary to perform the previous biotinylation of the anti-atrazine antibodies for immobilized them. It was found that the binding capacity of the biocomposite showed to be higher when a ‘dry-assisted’ affinity strategy was performed. In this case the hydrophobic bonds – between Protein A and the Fc of the anti-atrazine antibodies – seemed to be favored. Using ProtA-GEB in a competitive immunological assay for the detection of atrazine, excellent detection limits were achieved. The novel competitive electrochemical immunosensing strategy can easily reach the required LOD for potable water and orange juice (MRL 0.1 µg L^{-1}) established by the European Community directives with very simple sample pretreatments. Because of the simplicity of the immunochemical procedure presented here, this strategy can be suitable for fast semiquantitative and quantitative on-site analysis for the presence of atrazine (or atrazine immunoreactive herbicides) in real samples. The fabrication of the biocomposite based biosensor can be easily transferred to industrial scale. The fact that the same biocomposite material could be used for the immobilization of many antibodies is an important practical feature to be considered for the massive fabrications of electrochemical biosensing devices. Moreover, this material can be easily prepared through dry chemistry using procedures that can be transferred to mass fabrication establishing a clear advantage for the development of *biokits*. Additionally, the biosensor design fulfils the requirements desired for these devices: ease of preparation, robustness, sensitivity, low cost of production, ease of miniaturization and simple use and fast response for industrial and environmental applications.

References

- Akerstrom, B., Brodin, T., Reis, K., Bjorck, L., 1985. *J. Immunol.* 135, 2589–2592.
- Alegret, S., 2003. In: Alegret, S. (Ed.), *Integrated Analytical Systems. Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. XXXIX. Elsevier B.V., Amsterdam (Chapter 1).
- Bradford, M.M., 1976. *Anal. Biochem.* 72 (1–2), 248–254.
- Compton, B.J., Lewis, M., Whigham, F., Gerald, J.S., Countryman, G.E., 1989. *Anal. Chem.* 61, 1314–1317.
- Gascón, J., Oubiña, A., Ballesteros, B., Barceló, D., Camps, F., Marco, M.-P., González-Martínez, M.A., Morais, S., Puchades, R., Maquieira, A., 1997. *Anal. Chim. Acta* 347, 149–162.
- Green, N.M., 1990. *Methods Enzymol.* 184, 51–67.
- Janis, L.J., Regnier, F.E., 1989. *Anal. Chem.* 61, 1901–1906.
- Larsson, A., 1990. *J. Immunol. Methods* 135, 273–275.
- Papiernik, S.K., Spalding, R.F., 1998. *J. Agric. Food Chem.* 46, 749–754.
- Pividori, M.I., Merkoci, A., Alegret, S., 2001. *Biosens. Bioelectron.* 16, 1133–1142.
- Pividori, M.I., Merkoci, A., Alegret, S., 2003. *Biosens. Bioelectron.* 19, 473–484.
- Pividori, M.I., Alegret, S., 2005. *Anal. Lett.* 38, 2541–2565.

- Santandreu, M., Cespedes, F., Alegret, S., Martinez-Fabregas, E., 1997. *Anal. Chem.* 69, 2080–2085.
- Schneider, P., Hammock, B.D., 1992. *J. Agric. Food Chem.* 40, 525–530.
- Sjoquist, J., Hjelm, H., Johansson, I.B., Movitz, J., 1972a. *Eur. J. Biochem.* 30, 190.
- Sjoquist, J., Meloun, B., Hjelm, H., 1972b. *Eur. J. Biochem.* 29, 572–578.
- Wilchek, M., Bayer, E.A., 1988. *Anal. Biochem.* 171, 1–32.
- Wilchek, M., Bayer, E.A., 1990. *Methods Enzymol.* 184, 14–45.
- Wilchek, M., Bayer, E.A., Livnah, O., 2006. *Immunol. Lett.* 103, 27–32.
- Zacco, E., Pividori, M.I., Llopis, X., del Valle, M., Alegret, S., 2004. *J. Immunol. Methods* 286, 35–46.
- Zacco, E., Pividori, M.I., Alegret, S., 2006a. *Biosens. Bioelectron.* 21, 1291–1301.
- Zacco, E., Pividori, M.I., Alegret, S., Galve, R., Marco, M.-P., 2006b. *Anal. Chem.* 78, 1780–1788.

Electrochemical determination of atrazine in orange juice and bottled water samples based on Protein A biocomposite electrodes

Zacco E., Galve R., Sánchez Baeza F., Marco M.-P. Alegret S., M.I. Pividori, in *Electrochemical Sensor Analysis*. Elsevier. Amsterdam (2007). En prensa.

Electrochemical determination of atrazine in orange juice and bottled water samples based on Protein A biocomposite electrodes

E. Zacco[‡], Roger Galve[§], Francisco Sánchez Baeza[§], M.-P Marco[§], S. Alegret[‡], M. I. Pividori^{*‡}

[‡] Grup de Sensors i Biosensors, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain.

[§] Applied Molecular Receptors Group (AMRg), IIQAB-CSIC, 08034, Barcelona, Catalonia, Spain.

* Corresponding author: e-mail: Isabel.Pividori@uab.es; Fax: +34 93 581 2379; Tel: +34 935812118

1. Objectives

- (a) To purify the specific anti-atrazine antibody
- (b) To construct a Protein A graphite-epoxy composite (ProtA-GEB) electrode
- (c) To quantify atrazine residues in orange juice and bottled water based on its immunological reaction with the specific antibody by using an electrochemical strategy based on ProtA-GEB electrode

2. Materials and Instruments

50 μm particle size graphite powder (BDH, UK), Epotek H77 resin and hardener (Epoxy Technology, USA).

PVC tube (6 mm i.d.), 18 mm long; Copper disk (6 mm od and 0.5 mm thickness).

Platinum auxiliary electrode (Crison 52-67 1, Spain), double junction Ag/AgCl reference electrode (Orion 900200) with 0.1M KCl as external reference solution; m-GEC as working electrode.

Eppendorf Thermomixer 5436 for temperature-controlled incubations.

LC-4C Amperometric Controller (BAS Bioanalytical System, USA) for chronoamperometric measurements.

3. Chemicals and Biochemicals

Protein A (100 μg of lyophilised powder able to bind 7.3 μg of human IgG, catalogue number P9151). Hydroquinone (Sigma), hydrogen peroxide (Merck, Germany).

Millex®-GV 0.22 μm filters, Millipore Corporation, Bedford, MA USA.

Standard PBS buffer (phosphate buffer 10 mmol L⁻¹ pH 7.5 with 0.8 % (w/v) NaCl, prepared with milliQ water), PBST buffer PBS with 0.05 % v/v Tween. Supporting electrolyte (0.1 M Phosphate buffer, 0.1 M KCl, pH 7.0).

The preparation and characterization of the anti-triazine antibody and the enzyme tracer coupled to horseradish peroxidase was previously described in detail (Gascón et al., 1997).

4. Construction of the ProtA-GEB electrode

- 1- Follow the steps 1, 2 and 3 described in the protocol 'Electrochemical determination of *Salmonella spp* based on GEC electrodes'.
- 2- Meanwhile, prepare the Protein A graphite-epoxy biocomposite (ProtA-GEB) paste by hand-mixing Epo-Tek H77 (epoxy resin) and its hardener (both from Epoxy Technology, USA) at a 20:3 (w/w) ratio, according to the manufacturer. When the resin and hardener are well-mixed, add the graphite powder (particle size 50 μm , BDH, UK) in a 1:4 (w/w) ratio. Add a further amount of Protein A to obtain a 2 % w/w. Mix the soft resulting paste thoroughly again until it becomes homogenous (approximately for 30 min).
- 3- Fill the PVC cylindrical sleeve body the electrode body gap completely with the soft ProtA-GEB paste and pack the electrode tightly.
- 4- Cure the electrode at 40 °C for 7 days until the paste become completely rigid.
- 5- Polish the surface of the ProtA-GEB electrode prior to each use firstly with abrasive paper, and then with alumina paper (polishing strips 301044-001, Orion) to give a smooth mirror finish with a fresh renewable surface. When not in use the electrodes were stored at 4 ° C.

5. Purification of the anti-triazine antibodies

To 3 mL of immune and preimmune antisera of immunized and non-immunized New Zealand white rabbits, respectively, add a saturated solution of ammonium sulfate dropwise at 4°C to obtain a 45 % saturated solution. Separate the supernatant after 4 hours from the solid by centrifugation (4000 g, 10 min). Dissolve the solid in 1.5 mL of PBS and dialyze against PBS 0.5 mM (4 x 5 L) and milli Q water (1 x 5 L) at 6 °C. Filtrate a solution of the antibodies in PBS 20 mM by passing them through a 0.45 μm filter and purify with a HiTrap Protein A HP column. Finally, dialyze and lyophilize the antibodies as above described. 10 mg of pure antibody is obtained.

6. Electrochemical determination of *atrazine* in orange juice

- *Immobilization of anti-atrazine antibody on ProA-GEB.* Add 20 μL of a solution (0.5 μg) of anti-atrazine antibodies onto the polished surface of a ProtA-GEB electrode. Allow to proceed the adsorption at 42 °C until dryness (approximately 30 min) under static conditions.

- *Construction of the standard atrazine curve (in orange juice).*
- Adjust the pH of the orange juice to 7.5 (the original pH of the sample was ~3.5), filter the sample through a 0.2 μm filter, and dilute the filtrate 5 times with PBST.
- Spike the orange juice with atrazine in order to obtain from 0.0032 to 1000 nmol L^{-1} solutions.
- Mix 50 μL of atrazine standard solutions in orange juice with 50 μL of 0.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of the enzyme tracer (atrazine-HRP) and 50 μL of PBST buffer in order to keep the biosensors immersing in solution, in 2-mL Eppendorf tubes.
- Place the modified ProtA-GEB electrodes and perform the competitive reaction with gentle shaking for 30 min at room temperature. Wash the electrodes with 150 μL of PBST buffer.
- In the meantime, set the chronoamperometric unit with the Ag/AgCl as reference electrode, the platinum as auxiliary electrode and the modified GEC electrode as working electrode. Set the potential fixed at -0.150 V. Immerse them in an electrochemical cell containing 20 ml supporting buffer with 1.81 mmol L^{-1} hydroquinone. Finally, add H_2O_2 at a final concentration of 1.11 mmol L^{-1} with gentle shaking. Register the current when the steady state is reached.
- Fit the standard curve to a four-parameter logistic equation according to the formula $y = (A-B / [1-(X/C)^D]) + B$, where A is the maximal amperometric current, B is the minimum amperometric current, C is the concentration producing 50 % of the maximal amperometric current, and D is the slope at the inflection point of the sigmoid curve.

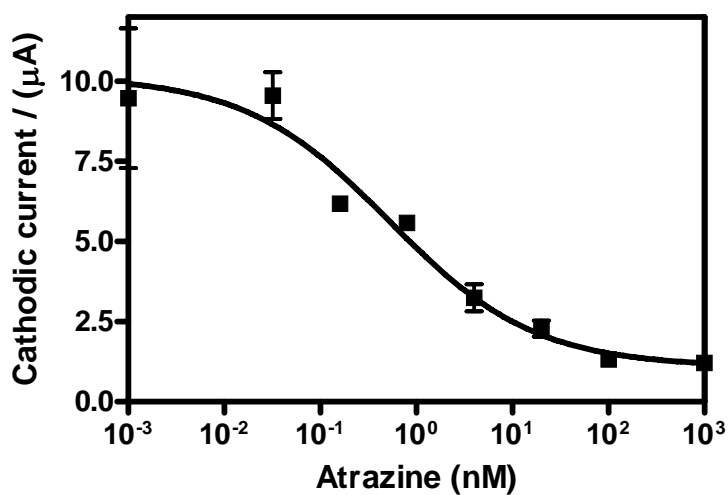
7. Selected literature

Bradford, M. M, 1976. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Gascón, J., Oubiña, A., Ballesteros, B., Barceló, D., Camps, F., Marco, M.-P, González-Martínez, M. A., Morais, S., Puchades, R., Maquieira, A., 1997. *Anal. Chim. Acta* 347, 149-162.

Zacco, E., Pividori, M.I., Alegret, S., Galve, R., and Marco, M.-P., 2006b. *Anal. Chem.* 78, 1780-1788.

FIGURE CAPTIONS



Competitive immunoassays for the determination of atrazine in spiked orange juice samples, based on 'dry-assisted affinity' immobilization of the anti-atrazine antibodies (0.5 µg) on ProtA(2%)-GEB. The biosensors were then incubated with 0.02 µg of atrazine-HRP tracer. In all cases, n = 3.

Electrochemical determination of atrazine in orange juice and bottled water samples based on Protein A biocomposite electrodes

Zacco E., Galve R., Sánchez Baeza F., Marco M.-P. Alegret S., M.I. Pividori, in *Electrochemical Sensor Analysis*. Elsevier. Amsterdam (2007). En prensa.

Electrochemical determination of sulfonamide antibiotics in milk samples using a class-selective antibody

E. Zacco[†], Roger Galve[§], Javier Adrian[§], Francisco Sánchez Baeza[§], M.-P Marco[§], S. Alegret[†], M. I. Pividori^{*†}

[†] Grup de Sensors i Biosensors, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain.

[§] Applied Molecular Receptors Group (AMRg), IIQAB-CSIC, 08034, Barcelona, Catalonia, Spain.

* Corresponding author: e-mail: Isabel.Pividori@uab.es; Fax: +34 93 581 2379; Tel: +34 935812118

1. Objectives

- (a) To purified the specific anti-sulfonamide antibody
- (b) To construct a magneto graphite-epoxy composite (m-GEC) electrode
- (c) To immobilized the specific anti-sulfonamide antibody on Tosyl-modified magnetic beads
- (d) To quantify sulfonamide antibiotics in milk based on its immunological reaction with the class-selective specific antibody by using an electrochemical strategy based on magnetic beads and m-GEC electrode

2. Materials and Instruments

50 μm particle size graphite powder (BDH, **UK**), Epotek H77 resin and hardener (Epoxy Technology, USA).

PVC tube (6 mm i.d.), 18 mm long; Copper disk (5.9 mm o.d. and 0.5 mm thickness), neodymium magnet (3 mm i.d.). Magnetic separator Dynal MPC-S (product no.120.20, Dynal Biotech ASA, Norway).

Platinum auxiliary electrode (Crison 52-67 1, Spain), double junction Ag/AgCl reference electrode (Orion 900200) with 0.1M KCl as external reference solution; m-GEC as working electrode.

Eppendorf Thermomixer 5436 for temperature-controlled incubations.

LC-4C Amperometric Controller (BAS Bioanalytical System, USA) for chronoamperometric measurements.

Scanning electron microscope (Hitachi S-570, Tokyo, Japan) for study the distribution of the magnetic beads on the m-GEC electrode surface.

3. Chemicals and Biochemicals

Tosylactivated magnetic beads (MB-Tosyl) (Dynabeads[®] M-280 Prod.N^o 142.03, Dynal[®] Biotech ASA, Oslo, Norway). Hydroquinone (Sigma), hydrogen peroxide (Merck, Germany).

Standard PBS buffer (phosphate buffer 10 mmol L⁻¹ pH 7.5 with 0.8 % (w/v) NaCl, prepared with milliQ water), PBST buffer PBS with 0.05 % v/v Tween. Supporting electrolyte (0.1 M Phosphate buffer, 0.1 M KCl, pH 7.0).

The preparation and characterization of the anti-sulfonamide antibody and the enzyme tracer coupled to horseradish peroxidase will be forthcoming described.

4. Construction of the m-GEC electrode

The construction of the m-GEC electrode is detailed explain in "Rapid electrochemical verification of PCR amplification of *Salmonella* spp based on m-GEC electrodes" The steps are schematically explained in Figure 1 therein.

5. Purification of the Anti-sulfonamide antibodies

To 3 mL of immune and preimmune antisera of immunized and non-immunized New Zealand white rabbits, respectively, add a saturated solution of ammonium sulfate dropwise at 4°C to obtain a 45 % saturated solution. Separate the supernatant after 4 hours from the solid by centrifugation (4000 g, 10 min). Dissolve the solid in 1.5 mL of PBS and dialyze against PBS 0.5 mM (4 x 5 L) and milli Q water (1 x 5 L) at 6 °C. Filtrate a solution of the antibodies in PBS 20 mM by passing them through a 0.45 µm filter and purify with a HiTrap Protein A HP column. Finally, dialyze and lyophilize the antibodies as above described. 10 mg of pure antibody is obtained.

6. Antibody binding to the magnetic beads

Wash 350 µl (30 mg mL⁻¹) of tosyl-modified magnetic beads (10.5 mg) with 1 mL of borate buffer 0.1 mol L⁻¹ pH 8.5, avoiding foaming. Resuspend the magnetic beads in 875 µl of the same buffer. Add 210 µl (1 mg mL⁻¹) of the purified antibody. Incubate the beads for 48 hours at room temperature with slow tilt rotation. Wash the modified beads in PBS, 0.1 % (w/v) BSA for 5 minutes at 4°C, and then with Tris 0.2 mol L⁻¹, pH 8.5, 0.1 % (w/v) BSA solution, for 24 hours at room temperature. Finally, wash again for 5 minutes at 4°C in PBS, 0.1 % (w/v) BSA. Resuspend the modified magnetic beads in PBS, 0.1 % (w/v) BSA to reach a 12 mg mL⁻¹ stock solution.

Evaluate the coupling efficiency by the Bradford test, analyzing the protein concentration in the supernatant after the covalent attachment.

Prepare three different pools of modified MB-Tosyl magnetic beads: i) with the specific anti- sulfonamide antibody; ii) with the non-specific antibody (with the non-immunized serum) and, iii) without any antibody, only treated with the corresponding coupling buffer.

7. Electrochemical determination of *sulfonamide* in milk

Construction of the standard sulfomethazine curve (in PBST).

- Mix 50 μL of sulfamethazine standard solutions (from 1.92 to 30000 nmol L^{-1}) with 50 μL of the anti-sulfamethazine modified magnetic bead suspensions (15 μg of MB-Tosyl) followed by the addition of 50 μL of enzyme tracer 0.075 $\mu\text{g mL}^{-1}$.
- Perform the competitive immunological reaction with vigorous shaking for 30 min at room temperature.
- Put the tubes on the magnetic separator until the solution becomes clear, and eliminate the supernatant. Perform a washing step of the magnetic beads with 150 μL of PBST. Repeat the washing step three times.
- Resuspend the beads in 160 μL of PBST.
- Capture the magnetic beads by dipping the m-GEC electrode inside the eppendorf tube, until the solution becomes clear.
- In the meantime, set the chronoamperometric unit with the Ag/AgCl as reference electrode, the platinum as auxiliary electrode and the modified GEC electrode as working electrode. Set the potential fixed at -0.150 V. Immerse them in an electrochemical cell containing 20 ml supporting buffer with 1.81 mmol L^{-1} hydroquinone. Finally, add H_2O_2 at a final concentration of 1.11 mmol L^{-1} with gentle shaking. Register the current when the steady state is reached.
- Fit the standard curve to a four-parameter logistic equation according to the formula $y = (A-B / [1-(X/C)^D]) + B$, where A is the maximal absorbance, B is the minimum absorbance, C is the concentration producing 50 % of the maximal absorbance, and D is the slope at the inflection point of the sigmoid curve.

Construction of the standard sulfomethazine curve (in milk).

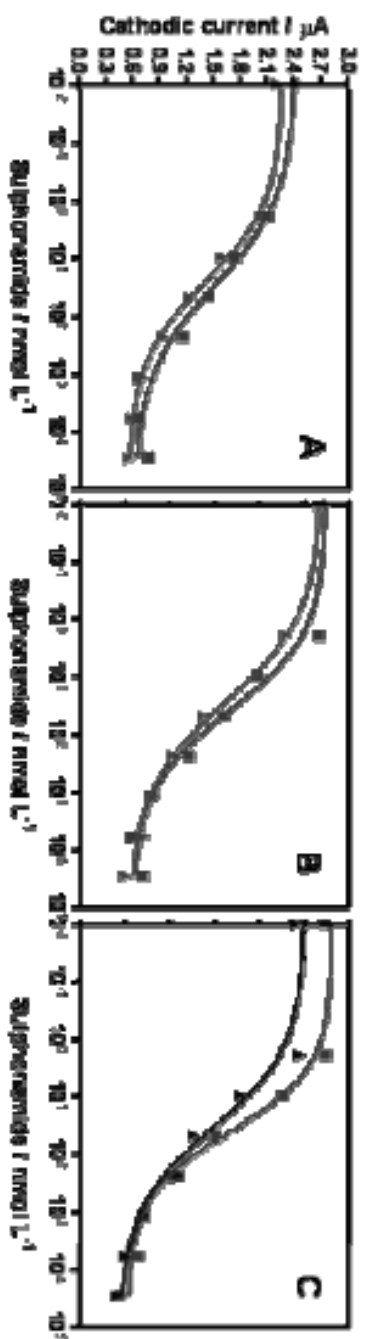
This protocol can be performed in UHT Pasteurized milk (skimmed, semi-skimmed, and full cream) without any pretreatment. In the case of raw full cream milk, dilute the milk 1/4 with PBST.

- Spike the milk with sulfomethazine in order to obtain from 1.92 to 30000 nmol L⁻¹ solutions.
- Mix 50 μL of sulfamethazine standard solutions (from 1.92 to 30000 nmol L⁻¹) with 50 μL of the anti-sulfamethazine modified magnetic bead suspensions (15 μg of MB-Tosyl) followed by the addition of 50 μL of enzyme tracer 0.075 μg mL⁻¹.
- Follow the protocol described above for PBST sulfomethazine standard solutions.

8. Selected literature

Bradford, M. M, 1976. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

E. Zacco, M. I. Pividori, S. Alegret, R. Galve, and M.-P. Marco. Electrochemical Magnetoimmunosensing Strategy for the Detection of Pesticides Residues. *Anal. Chem.* 2006, 78, 1780-1788



	IC ₅₀ (nmol L ⁻¹) [†]	E _{50%} *	E _{10%} *	Linear Range (nmol L ⁻¹)	Slope	LOD (nmol L ⁻¹) [†]
Pasteurized Skimmed milk†	23.24	2.23	0.54	3.22-240.75	0.62	1.03
PBST standard curve†	28.65	2.41	0.61	2.36-304	0.55	0.57
Pasteurized Semi-Skimmed milk†	27.54	2.70	0.55	6.10-410.14	0.56	0.74
PBST standard curve†	39.73	2.75	0.58	2.79-418.70	0.64	2.14
Pasteurized Full Cream milk†	36.53	2.80	0.54	8.93-449.60	-0.78	3.67
PBST standard curve†	41.03	2.51	0.45	5.18-414.23	0.62	1.73

[†] The values have been extracted from the four-parameter equation used to fit the standard curves shown in Figure 4. A, B, and C, respectively.

In all cases, $n = 3$. [†]IC₅₀ (ng L⁻¹): 6.28 skimmed, 6.96 semi-skimmed, 9.69 full cream; [†]LOD (ng L⁻¹): 0.26 skimmed, 0.18 semi-skimmed, 0.91

full cream without dilution; * I is the cathodic current (in μA).

Competitive immunoassays for the determination of sulfonamide, performed with the electrochemical magneto immunosensing strategy in skimmed (A), semi-skimmed (B) and full cream (C) UHT milk. Each graph shows the response obtained using (▲) milk samples without any pretreatment and (■) PBST solutions, performed with tosyl magnetic beads modified with anti-sulfonamide antibodies. In all cases, n=3. The table shows comparatively other features of the electrochemical Magneto Immunosensing strategy for the detection of UHT milk.

Anexo

Electrochemical magneto immunosensing of antibiotic residues in milk

Zacco E., Galve R., Adrian J., Marco M.-P., Alegret S., Pividori M.I. *Biosensors and Bioelectronics*. En prensa.



Electrochemical magneto immunosensing of antibiotic residues in milk

E. Zacco^a, Javier Adrian^b, Roger Galve^b, M.-P. Marco^b, S. Alegret^a, M.I. Pividori^{a,*}

^a *Sensors & Biosensors Group, Analytical Chemistry Division, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain*

^b *Applied Molecular Receptors Group (AMRg), IIQAB-CSIC, 08034 Barcelona, Catalonia, Spain*

Received 23 April 2006; received in revised form 6 October 2006; accepted 10 October 2006

Abstract

A novel electrochemical immunosensing strategy for the detection of sulfonamide antibiotics in milk based on magnetic beads is presented. Among the different strategies for immobilizing the class-specific anti-sulfonamide antibody to the magnetic beads – such as those based on the use of Protein A or COOH-modified magnetic beads, – the best strategy was found to be the covalent bonding on tosyl-activated magnetic beads. The immunological reaction for the detection of sulfonamide antibiotics performed on the magnetic bead is based on a direct competitive assay using a tracer with HRP peroxidase as the enzyme label. After the immunochemical reactions, the modified magnetic beads can be easily captured by a magneto sensor made of graphite–epoxy composite (m-GEC), which is also used as the transducer for the electrochemical immunosensing. The electrochemical detection is thus achieved through a suitable substrate for the enzyme HRP and an electrochemical mediator. The electrochemical approach is also compared with a novel magneto-ELISA based on optical detection. The performance of the electrochemical immunosensing strategy based on magnetic beads was successfully evaluated using spiked milk samples, and the detection limit was found to be $1.44 \mu\text{g L}^{-1}$ (5.92 nmol L^{-1}) for raw full cream milk. This strategy offers great promise for rapid, simple, cost-effective and on-site analysis of biological, food and environmental samples.

© 2006 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Sulfonamide; Electrochemical immunosensor; Competitive immunoassay; Magnetic beads; Milk samples

1. Introduction

During recent decades the use of antibiotics and chemotherapeutics in animal husbandry has increased considerably (Woodward, 2003). Among the different kind of antibiotics, sulfonamides are widely used because of their broad spectrum of antibacterial activity to treat infections and to preventively control the outbreak of diseases, to improve feed efficiency and to promote growth. Mastitis is the most prevalent disease, which requires antimicrobial treatment, affecting milk (Honkanen-Buzalski and Reybroeck, 1995). The presence of certain antimicrobial agent residuals in milk constitutes a potential hazard for the consumer and may cause allergic reactions, interference in the intestinal flora and resistant populations of bacteria in the general population, thereby rendering antibiotic treatment ineffective (Dewdney et al., 1991; Currie et al., 1998). Furthermore, important economic losses are related with the inhibition of the bacterial processes involved in the elaboration

of cheese and cultured milk products (Mourot and Loussourorn, 1981; Brady and Katz, 1988). As a consequence, food and environmental regulatory agencies have established control programs due to the increasing concern about the possibility that residues of antibiotic arrive to the consumer through food of animal origin (Bergwerff and Schloesser, 2003). Due to their toxicity, the EC has specified a maximum residue limits (MRL) for the sum of sulfonamides in milk at 100 ppb (Commission Regulation no. 675/92, 1992). Member States are thus requested to regularly check the levels of sulfa drugs residues in food-stuffs. Routine methods used for determination of antimicrobials in milk are usually based on growth inhibition of a sensitive test organism (Marshall, 2003). Microbial assays detect a broad spectrum of antibiotics and chemotherapeutics but their sensitivity to sulfonamides are usually non-satisfactory. The chromatographic techniques, involving extraction and extensive purification procedures, are also used to confirm in positive findings. Large sample volumes are often necessary to reach the required detection limits. Moreover, expensive and sophisticated equipment is needed which must be run by experienced personnel. As a result, routine and efficient residue control by the

* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 2118; fax: +34 93 581 2379.
E-mail address: isabel.pividori@uab.es (M.I. Pividori).

official laboratories becomes problematic. According to these requirements, and in order to protect the public health, official laboratories should be able to efficiently process a high number of samples. As a consequence, the development of rapid, inexpensive, sensitive and high sample throughput and on-site analytical strategies which can be used in a wide variety of food matrices are required, since the standard chromatographic techniques does not meet these requirements. Electrochemical sensors have revolutionized modern analysis because of their technical simplicity and speed in response by the direct transduction to electronic equipments (Alegret, 2003). Mass fabrication, low cost and decentralized in-field analysis are other important features of electrochemical sensors to be considered as analytical tool for the rapid detection of antibiotic residues in environmental or food samples. Besides electrochemical biosensing of antibiotic residues (Agüí et al., 2002; Pellegrini et al., 2004), many immunological-based assays have been developed for the sensitive detection of antibiotic residues detection in food samples (Strasser et al., 2003; Pastor-Navarro et al., 2004). Immunoassays (IAs) are analytical tests, which use antibodies as specific recognitions elements. Moreover, recent advances allow the IAs to be performed on magnetic beads as a support. The magnetic beads are known to be a powerful and versatile tool in a variety of analytical and biotechnology applications (Richardson et al., 2001). The use of non-porous magnetic beads greatly improves the performance of the immunological reaction, due to: (i) an increase in the surface area, as well as (ii) the faster assay kinetics achieved because the beads are in suspension and the analytical target does not have to migrate very far. According to their properties as well as the improved washing and separation steps, the matrix effect is minimized despite this increased surface area. Additionally, the magnetic beads can be easy magnetically manipulated by using permanent magnets or electromagnets. Therefore, the analysis of samples performed on magnetic beads can be easily achieved without any pre-enrichment, purification or pre-treatment steps, which are normally necessary for standard methods.

An electrochemical immunosensing strategy based on magnetic sensors is presented in this paper, as a rapid, sensitive, simple, inexpensive and user-friendly analytical method against to classical assays for the detection of sulfonamide antibiotics in milk samples. This strategy combines the advantages taken from immunochemical assays, magnetic beads separation and electrochemical transduction. The assay relies on the immunochemical reaction of the antibiotic with a class-specific antibody immobilized on magnetic beads, and the competition with the enzyme tracer. Since sulfonamide antibiotics – such as other food residues – are low-molecular weight molecules, which contain only one antigenic determinant, a competitive assay was performed (Chu, 2003). Among the different strategies for immobilizing the class-specific anti-sulfonamide antibody to the magnetic beads (Danczyk et al., 2003; Fuentes et al., 2005), the best strategy regarding the antibody coupling efficiency was found to be the covalent bonding on tosyl-activated magnetic beads (Zacco et al., 2006).

The modified magnetic beads are then captured by the magnetic field on the magneto sensor. The electrochemical detection

is then performed and it is based on the activity of the enzyme tracer. As it will be demonstrated, this novel electrochemical immunosensing strategy offers many potential advantages compared to the traditional methods for detection of pollutants as well as the classical immunological strategies or those immunosensors based on a surface-modified conducting phase.

2. Materials and methods

2.1. Instrumentation

Amperometric measurements were performed with a LC-4C amperometric controller (BSA Bioanalytical Systems Inc., USA). A three-electrode setup was used comprising a platinum auxiliary electrode (Crison 52-67 1), double junction Ag/AgCl reference electrode (Orion 900200) with 0.1 M KCl as the external reference solution and a working electrode (the magneto sensor). Voltammetric characterization was carried out using an Autolab PGSTAT Eco-chemie (The Netherlands). Optical measurements were performed on a SpectramaxPlus microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The competitive curves were analyzed with a four-parameter logistic equation using the proper software (Genesys, Labsystems). The magnetic separation during the washing steps was performed using a magnetic separator Dynal MPC-S (product No. 120.20, Dynal Biotech ASA, Norway) or 96-Well Plate Separation Rack (product No. CD1001, Cortex Biochem, CA, USA). A scanning electron microscope (SEM) (Hitachi S-570, Tokyo, Japan) is used to study the distribution of the magnetic beads on the electrode surface.

2.2. Chemicals and immunochemicals

1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide (EDCI) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) were purchased from Sigma. All the reagents were of the highest available grade. The Bradford solution (BIO-RAD protein assay cat no. 500-0006) was purchased from BIO-RAD laboratories GMGH (Munich, Germany). The graphite–epoxy composite was prepared using graphite powder with a particle size of 50 μm (BDH, UK) and Epo-Tek H77 (epoxy resin) and hardener (both from Epoxy Technology, USA). Tosyl-activated magnetic beads (MB-Tosyl) (Dynabeads[®] M-280 Prod. No. 142.03) were purchased from Dynal[®] Biotech ASA (Oslo, Norway). The filters were Millex[®]-GV 0.22 μm filters (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). All buffer solutions were prepared with milliQ water. Unless otherwise indicated all the incubation steps were performed in PBST. The composition of the PBS solution was phosphate buffer 10 mmol L⁻¹ pH 7.5 with 0.8% (w/v) NaCl, while in PBST, 0.05% (v/v) Tween was also added.

2.3. Preparation and purification of the anti-sulfonamide class-specific antibodies and enzyme tracer

Class-selective antibodies against sulfonamide antibiotics have been produced after careful design and chemical synthesis of an immunizing hapten preserving as much as possible the properties of the target substance (geometry, conformation

and electronic distribution). Specificity studies have shown that at least 11 sulfonamide antibiotics can be sensitively detected by the antibodies. The preparation and characterization of the antibodies as well as the enzyme tracer coupled to horseradish peroxidase (SA1-HRP) will be forthcoming described. The preimmune antibodies (Abpre) were obtained from the antisera of non-immunized New Zealand white rabbits.

The antisera and Aspre were purified following two different methods. A saturated solution of ammonium sulfate was added dropwise at 4 °C to 3 mL of serum to obtain a 45% saturated solution. After 4 h, the antibodies were precipitated and the supernatant was separated from the solid by centrifugation (4000 × g, 10 min). The solid was dissolved with 1.5 mL of PBS and dialyzed against PBS 0.5 mM (4 × 5 L) and milli Q water (1 × 5 L) at 6 °C, and subsequently the samples were lyophilized. A solution of the antibodies in PBS 20 mM were filtrated by passing them through a 0.45 μm filter and purified with a HiTrap Protein A HP column. Finally, the antibodies were dialyzed and lyophilized following the protocol above described obtaining around 10 mg of pure Ab and Abpre antibodies.

2.4. Construction of magneto graphite–epoxy composite (m-GEC) electrodes

The construction of the magneto graphite–epoxy composite (m-GEC) electrodes was previously reported in detail (Zacco et al., 2006), and it is detailed explain in Fig. 1A. Briefly graphite

powder and epoxy resin were hand-mixed in a 1:4 (w/w) ratio. The resulting paste was placed to a depth of 3 mm in a cylindrical PVC sleeve body (6 mm i.d.) with a copper plate as electrical contact. For preparation of m-GEC electrode, a small neodymium magnet (3 mm i.d.) was placed into the centre of this electrode. After filling, tightly packed the GEC paste in the electrode body gap, the m-GEC electrodes were cured at 90 °C for 3 days to obtain a rigid composite. Before each use, the electrode surface of m-GEC electrodes were renewed by a simple polishing procedure, wetted with double distilled water and then thoroughly smoothed with abrasive paper and then with alumina paper (polishing strips 301044-001, Orion).

2.5. SEM characterization of m-GEC modified with the magnetic beads

The scanning electron microscopy technique was used to evaluate the distribution of the tosyl-modified magnetic beads on the surface of the m-GEC. For this purpose, after the capture of the magnetic beads by the m-GEC electrode (Fig. 1B), SEM was performed. The same acceleration voltage (15 kV) but different resolutions 2, 10, 50, 100 and 500 μm were used.

2.6. Antibody binding to the magnetic beads

Antibodies were covalently coupled to MB-Tosyl magnetic beads. Accordingly to the manufacturer, covalently modified

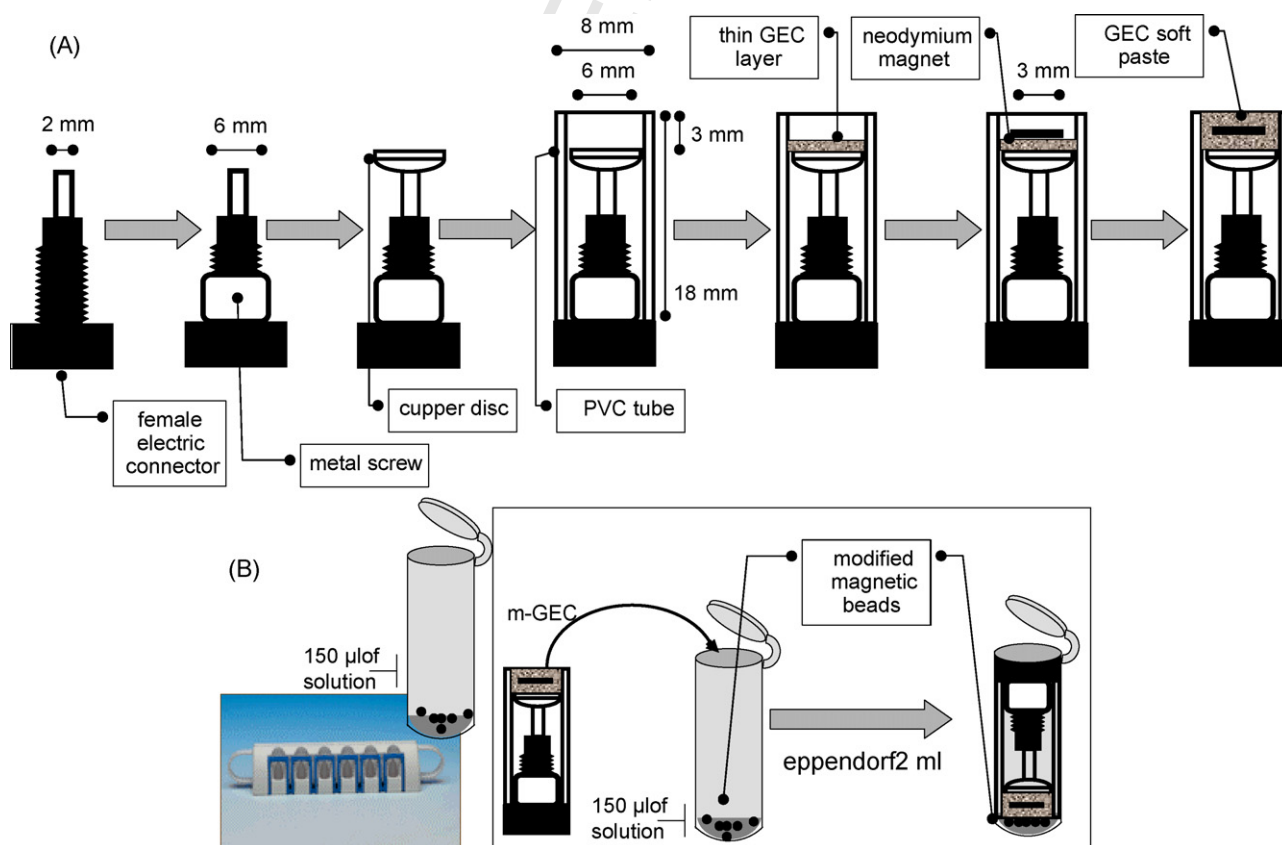


Fig. 1. (A) Detailed schematic representation of the magnetic sensor (m-GEC) construction. (B) Schematic representation of how the magnetic sensor (m-GEC) attracts the previously modified magnetic beads.

magnetic beads were stable for at least three months if stored at 4 °C. A 350 μL (30 mg mL^{-1}) of tosyl-modified magnetic beads (10.5 mg), were washed twice with 1 mL of borate buffer 0.1 mol L^{-1} pH 8.5, avoiding foaming. The magnetic beads were resuspended in 875 μL of borate buffer 0.1 mol L^{-1} pH 8.5. A 210 μL (1 mg mL^{-1}) of the purified antibody was added. The beads were incubated 48 h at room temperature with slow tilt rotation. The modified beads were then washed twice in PBS, 0.1% (w/v) BSA for 5 min at 4 °C and with Tris 0.2 mol L^{-1} , pH 8.5, 0.1% (w/v) BSA solution, for 24 h at room temperature and finally, for 5 min at 4 °C in PBS, 0.1% (w/v) BSA. Finally, the magnetic beads were resuspended in PBS, 0.1% (w/v) BSA to reach a 12 mg mL^{-1} stock solution.

Before each assay, a volume of tosyl-modified magnetic beads corresponding to the desired amount was washed with PBST and resuspended in a volume in order to obtain the correct amount of magnetic beads in 50 μL . In all cases, three different pools of modified MB-Tosyl magnetic beads were prepared: (i) with the class-selective antibodies against sulfonamide antibiotics; (ii) with the non-specific antibody (Abpre) and (iii) without any antibody, only treated with the corresponding coupling buffer. The efficiency of the coupling strategies was evaluated by the Bradford test (Bradford, 1976) analyzing the protein concentration in the supernatant before and after the conjugation. The assay was performed by comparing the samples with a standard curve achieved with a reference IgG reagent.

2.7. Competitive assay using the electrochemical magneto immunosensing strategy

The competitive assay was performed in 2 mL Eppendorf tubes, and all the referred quantities are ‘the amounts added per tube’. After each incubation or washing step, the magnetic beads were separated from the supernatant on the side wall by placing the Eppendorf tubes in a magnet separator until the beads were migrated to the tube sides and the liquid was clear (Fig. 1B).

The optimal concentration of the enzyme tracer and the modified antibody MB-Tosyl magnetic beads were chosen to produce between 0.5 and 3 μA of amperometric response in 30 min in 2 mL Eppendorf tubes. For this purpose, a two-dimensional assay was performed, by adding 50 μL of increasing amount of modified magnetic beads (ranging from 5 to 15 μg for MB-Tosyl) and 50 μL of enzyme tracer solution ranging from 0.025 to 0.10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

The competitive assay was performed by mixing 50 μL of sulfapyridine standard solutions (from 1.92 to 30,000 nmol L^{-1}) with 50 μL of the class-selective anti-sulfonamide modified magnetic bead suspensions (15 μg of MB-Tosyl) followed by the addition of 50 μL of enzyme tracer 0.075 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The competitive immunological reaction was allowed to proceed with vigorous shaking for 30 min at room temperature. The magnetic beads were then washed with 150 μL of PBST three times. Finally, the beads were resuspended in 160 μL of PBST and captured by dipping the magneto-sensor (m-GEC) into the tubes (Fig. 2A, i). The amperometric signal was determined by using the magnetic beads-modified m-GEC as a working electrode and

by dipping the three-electrode setup in 20 mL phosphate buffer 0.1 mol L^{-1} , 0.1 mol L^{-1} KCl, pH 7 (Fig. 2A, ii). The electrochemical signal was recorded after the addition of the mediator (hydroquinone, HQ; 1.81×10^{-3} mol L^{-1}) and the enzyme substrate (hydrogen peroxide, 1.11×10^{-3} mol L^{-1}). The response was determined by polarizing the working electrode surface (m-GEC) at -0.150 V (Fig. 1A, iii). Hydroquinone was used as mediator in order to decrease the working potential. Hydrogen peroxide was used as the substrate for peroxidase at a concentration to ensure that all of the enzyme molecules have substrate bound. At this concentration of substrate, V_{max} – the enzymatic maximum rate regarding the Michaelis–Menten model – and thus a greater electrochemical signal, was achieved.

Fig. 2A, iii also shown the reactions that occur at the m-GEC surface polarized at -0.150 V (versus Ag/AgCl) upon H_2O_2 addition in the presence of hydroquinone. The standard curve was fitted to a four-parameter logistic equation according to the formula $y = (A - B/[1 - (X/C)^D]) + B$, where A is the maximal amperometric signal, B the minimum amperometric signal, C the concentration producing 50% of the maximal amperometric signal (IC50 value), while D is the slope at the inflection point of the sigmoid curve. LOD values were obtained as 90% of A value, the maximal amperometric signal.

2.8. Competitive assay using magneto-ELISA procedure

In order to compare the signals and the sensitivity, the competitive assay was performed using a magneto-ELISA procedure with optical detection (Fig. 2B). The competitive assay was performed in microtiter plates, and all the referred quantities are ‘the amounts added per well’. After each incubation or washing step, the magnetic beads were separated from the supernatant on the side wall by using a magnet – positioned under the microtiter plate – (Fig. 2B). A 50 μL (per well) of sulfapyridine standard solutions in PBST (from 1.92 to 30,000 nmol L^{-1}) were mixed with 50 μL of the class-selective anti-sulfonamide modified magnetic bead suspensions (15 μg of MB-Tosyl) followed by the addition of 50 μL of enzyme tracer 0.075 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The competitive immunological reaction was allowed to proceed with vigorous shaking for 30 min at room temperature. The magnetic beads were then washed with 150 μL of PBST three times. After that, 100 μL of substrate solution 0.004% (v/v) hydrogen peroxide and 0.01% (w/v) TMB – 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine – in citrate buffer 0.04 mol L^{-1}) were added and the plates incubated again for 30 min at room temperature. The enzymatic reaction was stopped by adding 50 μL of H_2SO_4 4 mol L^{-1} . The final solutions were separated from the magnetic beads and added to a different plate for the absorbance measurements at 450 nm. The non-specific signal was also measured using the magnetic particles modified with the preimmune antibodies Abpre. The standard curve was fitted to a four-parameter logistic equation according to the formula $y = (A - B/[1 - (X/C)^D]) + B$, where A is the maximal absorbance, B the minimum absorbance, C the concentration producing 50% of the maximal absorbance and D is the slope at the inflection point of the sigmoid curve. LOD values were obtained as 90% of A value, the maximal absorbance.

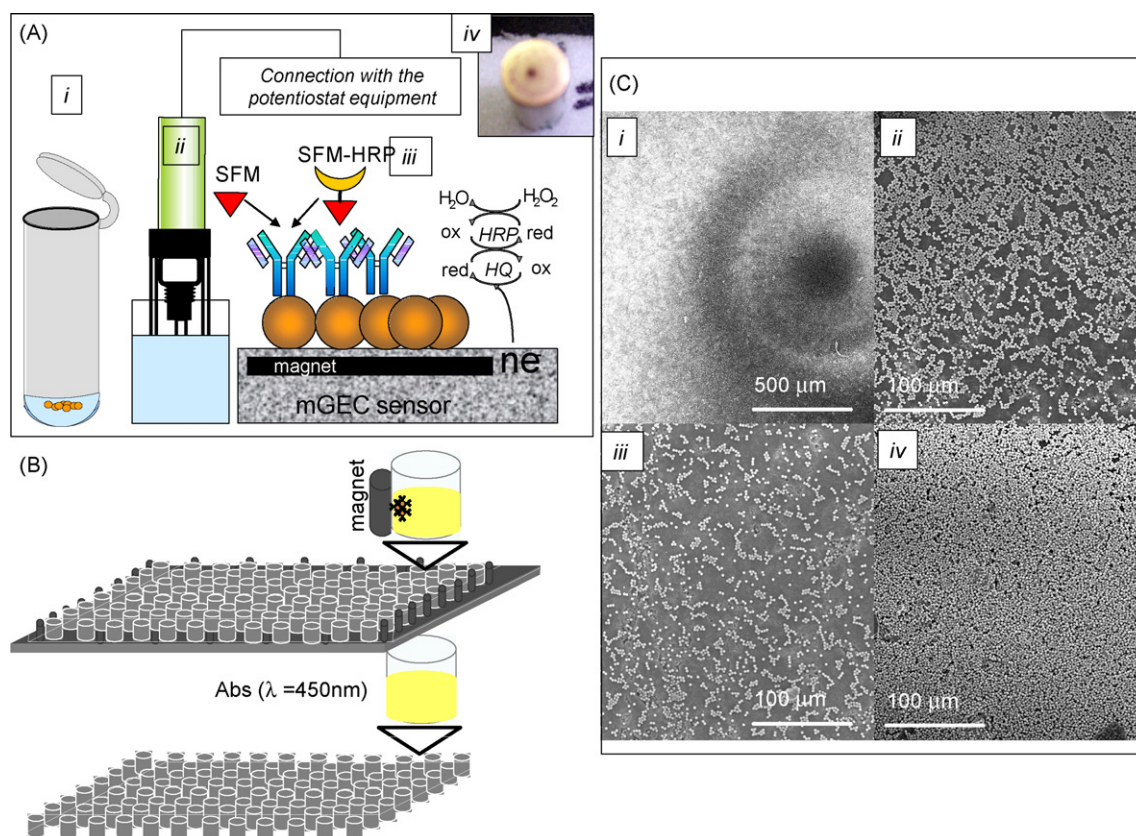


Fig. 2. (A) Schematic representation of the electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of sulfonamides. After the immunoreaction, the antibody-modified magnetic beads were captured for the m-GEC electrode (i). Chemical reactions occurring at the m-GEC surface polarized at -0.150 V (vs. Ag/AgCl) upon the addition of H_2O_2 in the presence of mediator (HQ) (ii and iii). Appearance of the m-GEC electrode covered with the magnetic beads (iv). (B) Schematic representation of the magneto-ELISA strategy for the detection of sulfonamides performed on magnetic microtiter plates. (C) Scanning electron microphotographs of tosylated magnetic beads on the surface of m-GEC sensors taken at 0.5 mm (i) and $100\ \mu\text{m}$ (ii–iv) of resolution. Identical acceleration voltage (15 kV) was used in all cases.

2.9. Electrochemical magneto immunosensing measurements in milk samples: matrix effect and accuracy studies

One of the major concerns regarding immunoassay in real samples relies on the interference by sample matrix. This problem is generally overcome by dilution of the sample to a range, which does not affect the assay or by using sample extract in the preparation of the standard curve. Sample clean-up may sometimes be necessary (Chu, 2003). The matrix effect was evaluated in pasteurized skimmed, semi-skimmed and full cream milk as well raw full cream milk, which were obtained from a local retail store. The pasteurized milks were lyophilized and stocked at -20°C whereas the raw milk was stored for few days at 4°C . All the samples were characterized regarding pH and conductivity.

Standard curves were prepared with undiluted and 1/2 and 1/4 PBST diluted milk samples spiked with increasing concentration of standard sulfapyridine (from 1.92 to $30,000\text{ nmol L}^{-1}$), and measured with the magneto-ELISA and the electrochemical magneto immunosensing strategy. Both strategies were performed with MB-Tosyl modified with the class-selective anti-sulfonamide antibodies.

In order to evaluate the matrix effect, the standard curves performed in milk were compared with the same curves prepared in PBST.

On the other hand, five different raw full cream milk samples were spiked with sulfapyridine in order to obtain 0 , 200 , 400 , 800 and 2000 nmol L^{-1} solutions and then diluted 1/4 in PBST. Additionally, a standard curves for diluted raw fresh full cream milk as well PBST buffer were prepared. The samples were analyzed by the electrochemical magneto immunosensing strategy.

3. Result and discussion

The scanning electron microscopy technique was used to provide qualitative information about structure, size and distribution of tosyl-modified magnetic beads on the surface of the m-GEC. As can be seen in the picture taken with the lower resolution (0.5 mm) (Fig. 2C, i) the magnetic beads are irregularly distributed on the surface of the m-GEC electrode, following the magnetic fields determined by the magnet inside the electrode. Thick areas showing a higher concentration of magnetic beads (Fig. 2C, iv) are followed by almost bare areas where the transducer can be clearly seen (Fig. 2C, iii). This distribution of the

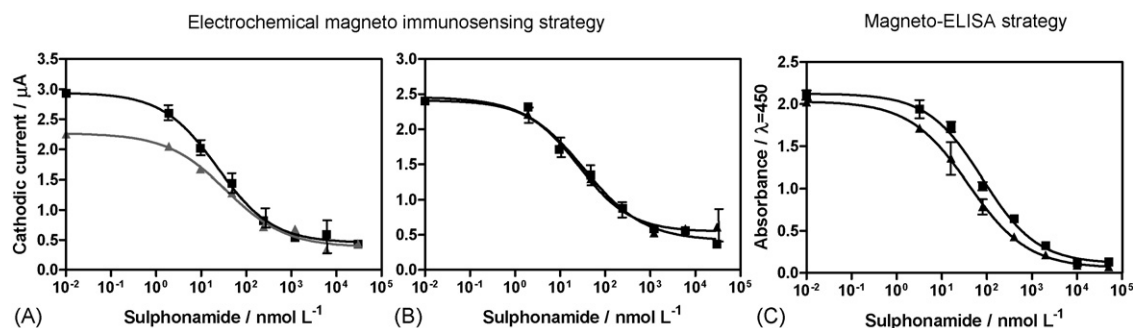


Fig. 3. Competitive immunoassays for the determination of sulfonamide antibiotics, performed with the electrochemical magneto immunosensing strategy and with the magneto-ELISA procedure. Each graph shows the response obtained using (▲) raw full cream milk samples diluted 1/2 with PBST buffer (A); (▲) raw full cream milk samples diluted 1/4 with PBST buffer (B) and (■) PBST solutions, performed with tosyl magnetic beads modified with anti-sulfonamide antibodies. Medium: phosphate buffer 0.1 mol L⁻¹, KCl 0.1 mol L⁻¹, pH 7.0. H₂O₂, 2.12 × 10⁻³ mol L⁻¹. Hydroquinone, 1.81 × 10⁻³ mol L⁻¹. Applied potential: -0.150 V vs. Ag/AgCl reference electrode, $\nu=0.050$ V s⁻¹. In all cases, $n=3$. Further experimental details are explained in the text and in Table 1.

magnetic beads is beneficial since the bare areas of GEC transducer are easily reached by the soluble mediator in order to obtain the electrochemical signal (Fig. 2C, ii).

In the competitive assay the enzyme tracer competes with the sulfonamide for the antigen binding sites of the antibody (Fig. 2A, iii). The sensitivity in a competitive immunoassay is determined by the affinity of the antibody for the specific antigen. Low detection limits can be obtained when appropriate assay conditions are chosen. Electrochemical two-dimensional experiments were performed in order to select optimum concentrations for both the antibody-modified magnetic beads and the enzyme tracer for the competitive assays. From the two-dimensional experiments the following parameters have been chosen to be assayed in further competitive assays for both optical and electrochemical detection: (i) tosyl-modified magnetic beads from 15 μg ; incubated with 50 μL , 50 μL of spiked buffer and 50 μL of enzyme tracer 0.075 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

The electrochemical signal of the class-selective anti-sulfonamide modified MB-Tosyl magnetic beads remained constant around 3 μA over the time with an excellent signal-to-non-specific adsorption ratio.

After the optimization of the reagent quantities in the electrochemical magneto immunosensing strategies, the competitive assays were performed by varying the amount of sulfapyridine.

Fig. 3 shows comparative the competitive curves obtained with the electrochemical magneto immunosensing strategy (Fig. 2A) versus the magneto-ELISA strategy (Fig. 2B) performed in raw full cream milk and PBST buffer under the same experimental conditions. Fig. 3C shows the competitive curves obtained with the magneto-ELISA strategy when plotting absorbance versus antibiotic concentrations, while Fig. 3A and B shows the standard curves obtained with the electrochemical magneto immunosensing strategy, processing raw full cream milk diluted 1/2 and 1/4 PBST buffer, respectively.

Excellent results, as detailed shown in Table 1, were accomplished for the detection of sulfonamide antibiotics in diluted raw full cream sample with electrochemical (IC₅₀ of 6.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ and LOD of 0.36 $\mu\text{g L}^{-1}$) as well optical (IC₅₀ of 9.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ and LOD of 0.23 $\mu\text{g L}^{-1}$) detection, and for the 1/4 diluted samples. Regarding the original sample, the values for the electrochemical detection were, in this case, IC₅₀ of 25.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ and LOD of 1.44 $\mu\text{g L}^{-1}$, while for the optical detection, IC₅₀ of 39.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ and LOD of 0.92 $\mu\text{g L}^{-1}$. R.S.D. values for the electrochemical magneto immunosensing strategy were 8.8% at a concentration of 80 nmol L⁻¹ (20 $\mu\text{g L}^{-1}$) for the 1/4 diluted raw full cream milk (80 $\mu\text{g L}^{-1}$ in the original sample). Same R.S.D. values were observed in all the concentration range and they were quite similar to those obtained in PBST buffer.

Table 1
Electrochemical magneto immunosensing strategy vs. magneto-ELISA Immunosensing strategy using whole diluted (1/4) raw milk

	IC ₅₀ (nmol L ⁻¹)	Max signal ^a	Min signal ^d	Linear range (nmol L ⁻¹)	Slope	LOD (nmol L ⁻¹)
Raw full cream milk sample						
Electrochemical strategy ^b	25.6 ^c	2.41 μA	0.55 μA	4.22–175.53	-0.75	1.48 ^d
Optical strategy ^b	39.42 ^c	2.04 a.u.	0.06 a.u.	2.97–185.41	-0.66	0.91 ^d
PBST buffer						
Electrochemical strategy ^b	33.68 ^c	2.46 μA	0.42 μA	5.12–367.05	-0.65	1.76 ^f
Optical strategy ^b	79.45 ^c	2.13 a.u.	0.11 a.u.	5.27–308.18	-0.71	1.70 ^f

^a The maximal and the minimal signals are the cathodic current (in μA) for the electrochemical strategy and the absorbance units for the optical strategy.

^b The values have been extracted from the four-parameter equation used to fit the standard curves shown in Fig. 2A and B, respectively. In all cases, $n=3$.

^c IC₅₀ ($\mu\text{g L}^{-1}$): 9.8 for the optical strategy and 6.37 for the electrochemical strategy.

^d LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$): 0.23 for the optical strategy and 0.36 for the electrochemical strategy.

^e IC₅₀ ($\mu\text{g L}^{-1}$): 20 for the optical strategy and 8.38 for the electrochemical strategy.

^f LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$): 0.42 for the optical strategy and 0.44 for the electrochemical strategy.

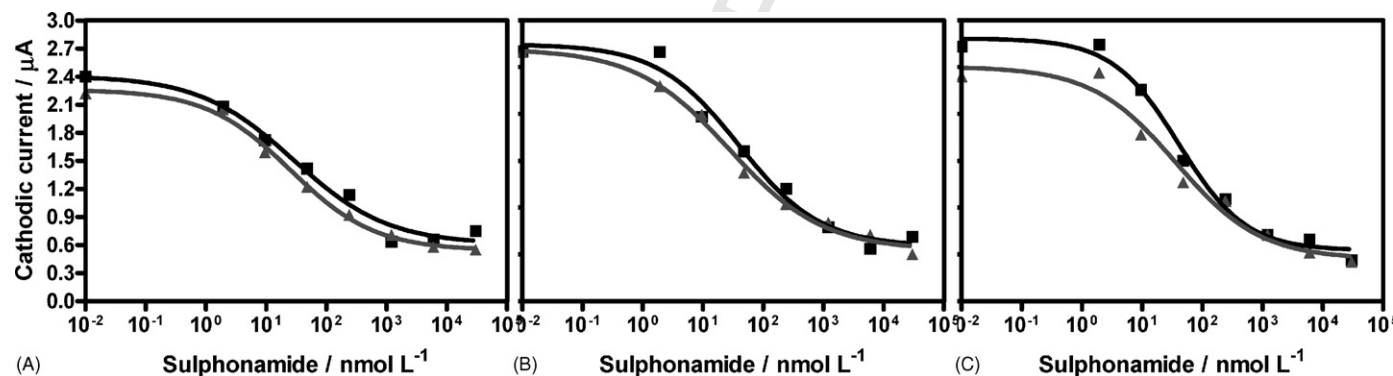
417 **Table 1** shows other immunoassay parameters extracted from the
 418 four-parameter equation used to fit the standard curves.
 419 Although the results obtained with both methods are quite similar,
 420 better efficiency was obtained using the electrochemical
 421 strategy: a lower matrix effect was observed for the electro-
 422 chemical detection of raw full cream milk when compared with
 423 the optical detection.

424 **Fig. 3A** and **B**, shows comparatively the amperometric signal
 425 obtained with different sample dilutions. With a 1/2 dilution
 426 of the raw full cream milk in PBST buffer, matrix effect is still
 427 observed as shown in the **Fig. 3A**, when compared the competi-
 428 tive curve of the sample respect to the PBST buffer curve.
 429 However, with a 1/4 dilution of the milk, the matrix effect is
 430 fully avoided as shown in the **Fig. 3B** and an almost complete
 431 match is observed when compared with the PBST buffer
 432 curve.

433 The same sample treatment was found to be useful not only
 434 for the determination of raw milk by the electrochemical mag-
 435 neto biosensing strategy, but also for all varieties of ultra high

436 temperature (UHT) milk, such as full cream (about 3.25% fat),
 437 semi-skimmed (about 1.5–1.8% fat) and skimmed (0.1% fat).
 438 For this purpose, the samples were obtained from a local retail
 439 store and used, on a first instance, to evaluate the extension
 440 of the potential non-specific interferences. **Fig. 4** shows the
 441 standard curves obtained with all varieties of UHT milk using
 442 the electrochemical magneto immunosensor compared to the
 443 curves obtained when measuring PBST buffer. As it can be
 444 observed almost a perfect match with the reference curve pre-
 445 pared in PBST buffer was achieved without any sample dilution
 446 and/or pre-treatment. However, and as expected, as increasing
 447 the matrix complexity from skimmed (A), semi-skimmed (B)
 448 and full cream (C) UHT milk, the matching with the reference
 449 curve prepared in PBST buffer was getting worse.

450 As the European legislation fix the maximum residue limits of
 451 sulfonamide in a value of 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ppb) the detection limit
 452 of the novel electrochemical magneto immunosensing strategy
 453 allow to measure any kind of milk according to the EC legisla-
 454 tion.



	IC ₅₀ (nmol L ⁻¹) [§]	I _{max} *	I _{min} *	Linear Range (nmol L ⁻¹)	Slope	LOD (nmol L ⁻¹) [†]
Pasteurized Skimmed milk [‡]	25.24	2.23	0.54	3.22–240.75	0.62	1.03
PBST standard curve [‡]	28.65	2.41	0.61	2.36–304	0.55	0.57
Pasteurized Semi-Skimmed milk [‡]	27.54	2.70	0.55	6.10–410.14	0.56	0.74
PBST standard curve [‡]	39.73	2.75	0.58	2.79–418.70	0.64	2.14
Pasteurized Full Cream milk [‡]	36.53	2.80	0.54	8.93–349.60	-0.78	3.67
PBST standard curve [‡]	41.03	2.51	0.45	5.18–414.23	0.62	1.73

[‡] The values have been extracted from the four-parameter equation used to fit the standard curves shown in Figure 4, A, B, and C, respectively.

In all cases, n = 3. [§] IC₅₀ ($\mu\text{g L}^{-1}$): 6.28 skimmed, 6.86 semi-skimmed, 9.09 full cream; [†] LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$): 0.26 skimmed, 0.18 semi-skimmed, 0.91

full cream without dilution* I is the cathodic current (in μA).

Fig. 4. Competitive immunoassays for the determination of sulfonamide, performed with the electrochemical magneto immunosensing strategy in skimmed (A), semi-skimmed (B) and full cream (C) UHT milk without any pre-treatment, i.e. without dilution in PBST buffer. Each graph shows the response obtained using (\blacktriangle) milk samples, and (\blacksquare) PBST solutions, performed with tosyl magnetic beads modified with anti-sulfonamide antibodies. In all cases, n = 3. Further experimental details are explained in the text. The table shows comparatively other features of the electrochemical magneto immunosensing strategy vs. optical magneto immunosensing strategy for the detection of UHT milk.

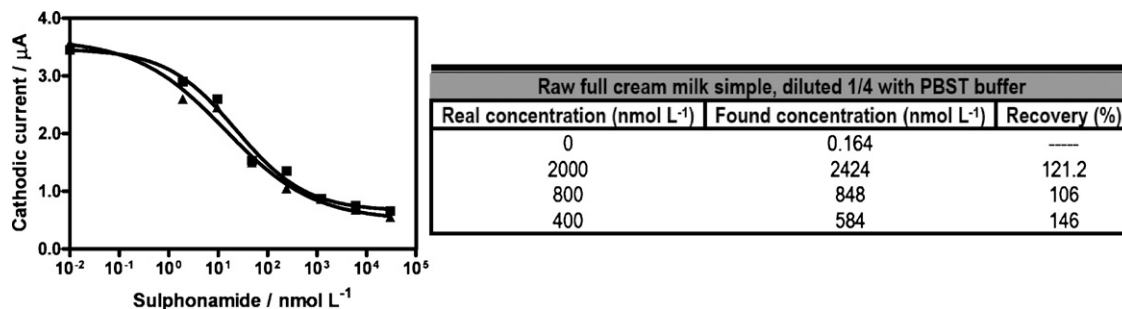


Fig. 5. Standard curve for the competitive immunoassays determination of sulfonamide in raw full cream milk samples. The graph shows the response obtained using (▲) raw full cream milk samples diluted 1/4 with PBST buffer and (■) PBST solutions. The later was taken as a standard curve for the recovery calculation showed in Table (right). In all cases, $n = 3$.

Finally and as a preliminary study of the immunosensor accuracy, five spiked samples were prepared with the raw full cream milk diluted 1/4 and tested with electrochemical magneto immunosensing strategy, using as a standard curve PBST solutions.

Fig. 5 also shows the recovery values. Although an overestimation of the spiked value is observed because the competitive curve in PBST is taken as a standard curve, results obtained are very close to the spiked values.

4. Conclusion

A novel electrochemical magneto immunosensing strategy for the detection of antibiotic residues in milk has been developed. Covalent coupling of anti-sulfonamide class-specific antibodies have been successfully performed on tosyl-modified magnetic beads, achieving an excellent antibody coupling efficiency. The performance of the novel electrochemical magneto immunosensing strategy has been compared with a magneto-ELISA method using the same immunoreagents but with an optical measurement instead of the electrochemical signal. Similar detection limits were obtained with both strategies.

The novel competitive electrochemical magneto immunosensing strategy can easily reach the required LOD for food samples ($0.1 \mu\text{g L}^{-1}$) established by the European Community directives without any or very simple sample pre-treatments, such as just a dilution in PBST buffer. Both raw and UHT full cream, semi-skimmed and skimmed milk can be easily determined by the electrochemical magneto immunosensing strategy.

The magnetic beads provide an easy way for completely removing the matrix effect and to improve the non-specific adsorption. Moreover, the use of magnetic beads provides improved features regarding sensitivity and selectivity of the assay.

Because of the simplicity of the immunochemical procedure presented here this strategy can be suitable for fast semiquantitative and quantitative on-site analysis of the presence of sulfa drugs residues in all kind of milk.

Future work will be focused on the possible application of such method to screen printed electrodes, allowing the development of disposable electrodes capable of a quantitative immuno-

logical detection, in a simple, low cost and easy to manipulate manner.

The sensibility conferred by the m-GEC electrode in connection with the use of magnetic beads and enzymatic labeling result in a rapid, cheap, robust and environment-friendly device which allows the detection of antibiotic residues on food and environmental samples.

References

- Agüí, L., Guzmán, A., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M., 2002. *Anal. Chim. Acta* 461, 65–73.
- Alegret, S., 2003. *Integrated Analytical Systems*. In: Alegret, S. (Ed.), *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. XXXIX. Elsevier B.V., Amsterdam, Chapter 1.
- Bergwerff, A.A., Schloesser, J., 2003. *Antibiotics and Drugs, Residue Determination, Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, pp 254–261.
- Bradford, M.M., 1976. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brady, M.S., Katz, S.E., 1988. *J. Food Prot.* 51, 8–11.
- Chu, F.S., 2003. *Immunoassays, Radioimmunoassay and Enzyme Immunoassay, Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, pp. 3248–3255.
- Commission Regulation (EEC) N°. 675/92, 1992, *Official Journal of the European Community L73/8 of 19 march 1992*.
- Currie, D., Lynas, L., Kennedy, G., McCaughey, J., 1998. *Food Addit. Contam.* 15, 651–660.
- Danczyk, R., Krieder, B., North, A., Webster, T., HogenEsch, H., Rundell, A., 2003. *Biotech. Bioeng.* 84, 215–223.
- Dewdney, J.M., Maes, L., Raynaud, J.P., Blanc, F., Scheid, J.P., Jackson, T., Lens, S., Verschuere, C., 1991. *Food Chem. Toxicol.* 29, 477–483.
- Fuentes, M., Mateo, C., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R., 2005. *Biosens. Bioelectron.* 20, 1380–1387.
- Honkanen-Buzalski, T., Reybroeck, W., 1995. *Antimicrobials. In: Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. IDF Special Issue No. 9505. International Dairy Federation, Brussels, Belgium*, pp. 26–35.
- Marshall, R.J., 2003. *Milk, Analysis, in Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, pp. 3963–3968.
- Mourot, D., Loussourorn, S., 1981. *Rec. Med. Vét.* 157, 175–177.
- Pastor-Navarro, N., García-Bover, C., Maquieira, A., Puchades, R., 2004. *Anal. Bioanal. Chem.* 379, 1088–1099.
- Pellegrini, G.E., Carpico, G., Coni, E., 2004. *Anal. Chim. Acta* 520, 13–18.
- Richardson, J., Hawkins, P., Luxton, R., 2001. *Biosens. Bioelectron.* 16, 989–993.
- Strasser, A., Dietrich, R., Usleber, E., Märklbauer, E., 2003. *Anal. Chim. Acta* 495, 11–19.
- Woodward, K.N., 2003. *Antibiotics and drugs, Uses in Food Production, Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, pp. 249–254.
- Zacco, E., Pividori, M.I., Alegret, S., Galve, R., Marco, M.-P., 2006. *Anal. Chem.* 78, 1780–1788.