

BIOSENSORES APTAMERICOS PARA LA DETECCIÓN DE MOLÉCULAS DE BAJO PESO MOLECULAR

Ana Janeiro¹, Silvana A. Ramírez,¹ Javier M. Montserrat.^{1,2}

¹ Instituto de Ciencias, Universidad Nacional de General Sarmiento, J. M. Gutiérrez 1150, Los Polvorines (B1613GSX), Prov. de Bs. As.; ² INGEBI (CONICET), Vuelta de Obligado 2490 (1428), Buenos Aires, Argentina. E-mail: ajaneiro@ungs.edu.ar

Introducción

El presente trabajo busca mostrar los avances en el desarrollo de un biosensor de base aptamérica¹ capaz de reconocer adenosina.

Los aptámeros son secuencias de ADN o ARN simple cadena, que se obtienen a partir de bibliotecas combinatorias de oligonucleótidos mediante el método SELEX². Son capaces de unirse por interacciones intermoleculares con gran afinidad y selectividad, a un amplio rango de analitos que van desde las moléculas orgánicas pequeñas hasta las proteínas. En forma equivalente a los anticuerpos, los aptámeros pueden utilizarse como elementos de reconocimiento molecular para aplicaciones analíticas. Sin embargo los aptámeros de base ADN ofrecen algunas ventajas frente a los anticuerpos: se pueden desarrollar contra blancos tóxicos, sus secuencias se pueden desnaturalizar y renaturalizar rápidamente, son estables largos tiempos en condiciones normales de almacenamiento, las condiciones físicas y químicas durante el proceso de selección se pueden controlar, se producen por síntesis química lo que resulta en una gran homogeneidad de lotes de producción, y finalmente, es un proceso que no requiere del uso de animales.

Los sensores electroquímicos de base aptamérica han surgido como una alternativa analítica complementaria a los métodos tradicionales como ser HPLC o GC y a los métodos inmunoquímicos antes mencionados para una variedad de blancos en diferentes contextos de aplicación. En estos dispositivos las secuencias aptaméricas funcionan como una capa de biorreconocimiento molecular selectivo de las moléculas blanco. En general, la interacción entre la molécula blanco y el aptámero genera un cambio conformacional desde una forma al azar a una estructura tridimensional definida. Este cambio conformacional ha sido aprovechado para traducir el evento de reconocimiento en una señal electroquímica. Para la obtención de la señal el aptámero es inmovilizado por uno de sus extremos a una superficie de oro a través de interacciones S-Au. Mientras que el otro extremo es modificado con un marcador electroactivo.

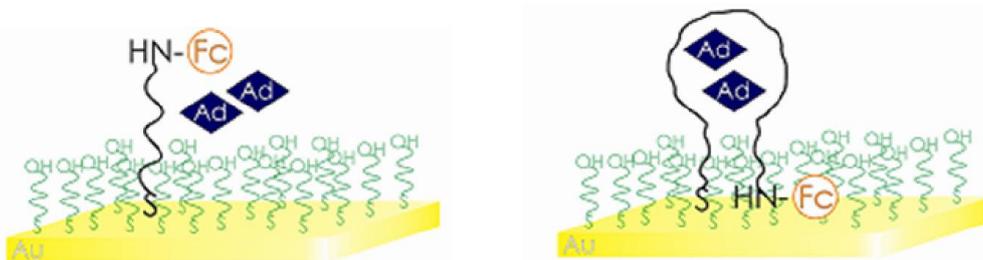


Figura 1- Esquema propuesto del funcionamiento del sensor, en presencia de adenosina, donde el aptámero sufriría un cambio conformacional acercando el marcador electroactivo a la superficie de oro.

Resultados

Se trabaja con el aptámero que reconoce adenosina³ porque su estructura es conocida y se consigue comercialmente con diferentes modificaciones en sus extremos, como por ejemplo fosforotioato o tiol lo que permite inmovilizarlo a la superficie de Au.

Por un lado se analizaron las condiciones óptimas de temperatura, composición del buffer y tiempo de reacción para que el aptámero reconozca a la molécula blanco, adenosina, en solución. Para ello se incubó al aptámero con adenosina en distintas condiciones y los resultados se siguieron por electroforesis en gel de poli(acrilamida). Si bien el comportamiento del aptámero inmovilizado sobre la superficie de Au puede variar respecto a lo que ocurre en solución se busca encontrar condiciones de partida a la hora del armado del sensor.

Otro paso a poner a punto es la conjugación del marcador electroquímico al aptámero. Como marcador se utilizó ferroceno. La conjugación se produce mediante la reacción del aptámero con *N*-hidroxi succinimidil carboxiferroceno (FcNHS). La reacción se siguió mediante HPLC corroborándose la marcación del aptámero. El problema en este punto es la purificación del aptámero marcado, el cuál habría que separar tanto del aptámero como de FcNHS que no hayan reaccionado. Esta etapa se está poniendo a punto: por el momento se logró separar el aptámero sin reaccionar de la mezcla FcNHS - aptámero marcado utilizando un sistema comercial de columnas de separación por afinidad. Luego mediante la precipitación con glicogen se separa el aptámero modificado de FcNHS. El seguimiento de todas las etapas de purificación también es por HPLC con lo cual se puede determinar la concentración de aptámero marcado obtenido.

Una vez que se tiene el aptámero modificado se inmoviliza por inmersión sobre la superficie de oro, se agrega un bloqueante de superficie. Este cumple la función de mantener al aptámero en una conformación que facilite el reconocimiento y además permitir el intercambio electrónico entre el ferroceno y la superficie al producirse el cambio conformacional por agregado de adenosina. El reconocimiento de la adenosina, y por lo tanto su presencia en la muestra se detecta a través de las mediciones de voltametría de onda cuadrada utilizando un potenciostato y una celda de tres electrodos. En este caso el sensor, es decir la construcción sobre láminas de Au policristalino, funciona como electrodo de trabajo. Esta última etapa se pondrá a punto una vez que logre modificarse y purificarse eficientemente el aptámero marcado con el grupo FcNHS. Mientras tanto las modificaciones del electrodo de trabajo se analizan por voltametría cíclica en ferricianuro. La voltametría cíclica evidencia cambios en la superficie al comparar la respuesta de ésta con la correspondiente a la modificación con el aptámero. Estos experimentos se realizan con aptámero sin modificar, ya que la transferencia electrónica estará dada por el ferricianuro el cual se verá más o menos impedido de llegar a la superficie del electrodo en función de la modificación introducida.

Conclusión

Se logró modificar el aptámero con la molécula electroactiva, ferroceno. Para seguir esta reacción se utilizó la técnica de HPLC. Todavía se está poniendo a punto la técnica para purificar el aptámero marcado.

Se pusieron a punto las condiciones de inmovilización del aptámero marcado y de medición electroquímica.

Referencias

- 1-J-G Walter, A. Heilkernbrinker, J. Austerjost, S. Timur, F. Stahl, T. Scheper. Z. Naturforsch. 2012, 67b, 976-986
- 2- D. L. Robertson, G. F. Joyce. Nature (1990), 344, 467-468.
- 3-Huizenga DE, Szostak JW Biochemistry.(1995) 34(2):656-65.